



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTOR EN BIOQUÍMICA

Título: “El Receptor de Acetilcolina Nicotínico y su Entorno
Lipídico: Estudios Celulares y Biofísicos”

Baier Carlos Javier

Bahía Blanca

Argentina

2008

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur (UNS), y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título ni en esta ni en otra Universidad. La misma contiene los resultados originales obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 12 de Noviembre de 2002 y el 30 de Junio de 2008, bajo la dirección del Dr. Francisco José Barrantes, Investigador Superior de CONICET, y Profesor titular de la Cátedra de Química Biológica I de la Universidad Nacional del Sur.

30 de Junio de 2008

Carlos Javier Baier

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

AGRADECIMIENTOS

- A mi director de Tesis, el Dr. Francisco J. Barrantes, por haberme permitido desarrollar las tareas de investigación presentadas en esta Tesis Doctoral, por su apoyo y dirección.
- Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB).
- A la Universidad Nacional del Sur (UNS).
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- A la gente del INIBIBB (muchacha) que participó de una u otra manera en el desarrollo de esta tesis.
- A Cristina, mi compañera de ruta.
- A las charlas, mates, almuerzos y delirios de la oficina del fondo.
- A mi familia.

RESUMEN

En la presente Tesis estudiamos diferentes aspectos de la interacción entre el receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) y lípidos de la membrana, especialmente los esfingolípidos (SL) y el colesterol. En la primera sección estudiamos la participación de los SL sobre el tráfico hacia la membrana plasmática del AChR en un sistema de células no polarizadas de mamífero (células CHO-K1/A5). Demostramos que la inhibición de la biosíntesis de SL altera el transporte normal del AChR hacia la membrana plasmática y promueve su acumulación en el interior celular. Además, demostramos que los SL intervienen en estadios tempranos de la vía exocítica de esta proteína y que su déficit causa la retención y acumulación de receptores desensamblados en el retículo endoplasmático. Postulamos que los SLs tendrían una actividad similar a chaperonas proteicas, en calidad de “chaperonas lipídicas”, en el ensamblaje y tráfico del AChR. En el segundo capítulo estudiamos la distribución y movilidad del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 y su relación con el colesterol. Determinamos que el AChR se encuentra distribuido en forma de pequeñas agrupaciones, en el orden de los 50 nm de diámetro, por lo cual denominamos a estas agrupaciones nano-agregados de AChR. La difusión del AChR en el plano de la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5, comparable a la fracción móvil de AChRs de microtubos de rata, es dependiente del contenido de colesterol en la misma. La fracción de AChR móviles se reduce a la mitad cuando se elimina el colesterol de la membrana. Tanto interacciones directas del AChR con el colesterol, así como interacciones con el esqueleto cortical de actina, participan en estos fenómenos. Los hallazgos presentados en esta Tesis contribuyen al conocimiento general de la modulación que ejercen los lípidos de las membranas biológicas sobre la biología celular del AChR.

ABSTRACT

In the present Thesis different aspects of the nicotinic acetylcholine receptor (AChR) and membrane lipids interactions were studied, especially sphingolipids (SL) and cholesterol. In the first section, the participation of SL on AChR trafficking to plasma membrane in a non-polarized mammalian cell system (CHO-K1/A5 cells) was analyzed. We demonstrate that the inhibition of SL biosynthesis impairs the normal transport of AChR to the plasma membrane and promotes its accumulation inside the cell. We further show that SLs intervene at an early stage of the exocytic pathway and that their depletion provokes the retention and accumulation of unassembled receptor in the endoplasmic reticulum. On the basis of these results we hypothesize that SLs display a chaperone-like activity, as “lipid chaperones”, in the assembly and trafficking of AChRs. In the second chapter, we studied the distribution and mobility of plasma membrane AChR in CHO-K1/A5 cells, and its relationship with cholesterol. We observed that the AChR is distributed in the form of small aggregates, having a diameter of 50 nm, whereby these clusters were called nano-aggregates of AChR. The diffusion of AChR in the plasma membrane plane of CHO-K1/A5 cells, comparable to AChR mobile fraction from rat myotubes, is dependent on cholesterol levels. The AChR mobile fraction was reduced to 50% when cholesterol was depleted from the plasma membrane. Direct interactions between AChR and cholesterol, as well interactions with the cortical actin skeleton, are involved in these phenomena. The results presented in this work contribute to general knowledge of lipid modulation on AChR cellular biology.

ÍNDICE

Introducción	1
Generalidades	2
El receptor de acetilcolina (AChR)	5
- Generalidades y clasificación	5
- Estructura del AChR	7
Desarrollo de la unión neuromuscular	12
Enfermedades asociadas al AChR muscular	17
Microambiente lipídico del AChR e interacciones AChR – lípido	20

Capítulo I

Influencia de los esfingolípidos sobre la biogénesis, tráfico intracelular y

expresión en membrana plasmática del AChR en células CHO-K1/A5	27
<i>Introducción</i>	28
<i>Materiales y Métodos</i>	43
- Materiales	43
- Células sensibles a la temperatura en el metabolismo de SL (SPB-1/SPH-) e inhibición de la biosíntesis de SL en células CHO-K1/A5 mediante el empleo de ISP-1, FB-1 y PDMP	44
- Transfecciones	44
- Tratamiento con SM exógena	45
- Microscopía de Fluorescencia	45
- Determinación de la cantidad de AChR desensamblado mediante microscopía de fluorescencia	47
- Microscopía de fluorescencia cuantitativa	47
- Análisis de intermediarios del AChR mediante gradientes de densidad de sacarosa	48

- Experimentos de ligazón de superficie con α BTX-[I ¹²⁵]	48
- Análisis lipídico	49
- Estudio de las características biofísicas de la membrana del RE	
Espectroscopia de fluorescencia	49
Anisotropía de fluorescencia	50
- Fraccionamiento subcelular para obtención de fracciones enriquecidas en membranas de RE	51
- Ensayos de solubilidad en detergente	53
- Western Blot	53
- Análisis de la solubilidad en Tritón X-100 de la proteína VSVG- GFP transfectada en células CHO-K1/A5	54
<i>Resultados</i>	55
- La expresión del AChR en membrana plasmática disminuye en células CHO-K1 SPB1/SPH ⁻ , deficientes en SL	55
- Evaluación del AChR en la superficie celular de células CHO- K1/A5 bajo la inhibición farmacológica de la SPT	58
- Inhibición en estadios tardíos de la biosíntesis de SL	60
- El bloqueo de la biosíntesis de SL conduce a una acumulación intracelular del AChR	60
- El AChR intracelular está predominantemente localizado en el RE en células que poseen la biosíntesis de SL inhibida	61
- Reversión de los efectos de la inhibición de la biosíntesis de SL por la adición de SM exógena	63
- La acumulación intracelular del AChR esta asociada con un ensamblaje deficiente del AChR	64
- Efecto de las altas concentraciones de PDMP en el tráfico del AChR a la membrana plasmática	67

- La depleción de SL afecta la salida del AChR en estadios tempranos de la vía secretoria	74
- El ensamblaje ineficiente del AChR no es una consecuencia de una disponibilidad disminuida de la proteína chaperona calnexina	77
- Análisis de las características biofísicas de las membranas del RE tras la depleción de SL	78
- Estudio de la asociación del AChR con membranas resistentes a la extracción con detergente (DRMs, detergent-resistant membranes) en los compartimentos iniciales de la vía secretoria	82
- Los niveles celulares y la expresión en membrana plasmática de la proteína VSVG-GFP no son afectados por la inhibición de la biosíntesis de SL	87
<i>Discusión</i>	90

Capítulo II

<i>Influencia del colesterol en la distribución y movilidad lateral del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5</i>	103
<i>Introducción</i>	104
<i>Materiales y Métodos</i>	110
- Materiales	110
- Cultivo celular	111
- Transfecciones	111
- Preparación de “láminas” de membranas plasmática	111
- Remoción del colesterol y marcaje con sondas fluorescentes de membranas plasmáticas aisladas y células enteras	
Microscopía de epifluorescencia (campo ancho)	111
Microscopía STED	112
Experimentos de FRAP	113

- Microscopía de epifluorescencia (campo ancho)	113
Análisis de datos	114
- Microscopía STED	115
Análisis de datos	115
- Mediciones de recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueado (FRAP)	115
- Preparación de vesículas unilaminares gigantes (GUVs, por giant unilamellar vesicles)	117
<i>Parte I</i>	
<i>Análisis de la distribución del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 basado en microscopía de epifluorescencia (campo ancho, wide-field microscopy)</i>	
<i>Resultados</i>	119
- La disminución del AChR de la superficie celular dependiente de colesterol requiere integridad celular	119
- Estructura de los dominios de AChR en membrana plasmática analizados por microscopía de epifluorescencia	123
- Los acúmulos del AChR inducidos por anticuerpos son facilitados por la remoción de colesterol	125
- Distribución del receptor de transferrina en membranas aisladas de células CHO-K1/A5	126
<i>Parte II</i>	
<i>Análisis de la distribución del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 mediante depleción estimulada de la emisión, microscopía STED (stimulated emission depletion)</i>	
<i>Resultados</i>	130
- El AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 se encuentra en forma de “nano – agregados”, según lo evidencia la microscopía STED	130

- La depleción de colesterol en la membrana plasmática favorece la formación de acúmulos del AChR inducido por anticuerpos	135
<i>Parte III</i>	
<i>Estudio de la movilidad del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 mediante la técnica de recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueado (FRAP, fluorescence recovery after photobleaching)</i>	
	138
<i>Resultados</i>	141
- Dinámica de sondas lipídicas fluorescentes en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5	141
- La movilidad lateral del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 es afectada por el contenido de colesterol	148
- La alteración observada en la movilidad en la membrana plasmática del AChR tras la depleción de colesterol se relaciona con la integridad del citoesqueleto de actina	152
- La incubación con complejos CDx-colesterol no afecta negativamente la movilidad del AChR en la membrana plasmática	155
- El coeficiente de difusión del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 es sensible al contenido de colesterol de la misma	157
- Análisis de la naturaleza de la fracción de AChR móviles en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5	159
- Rapsina-GFP se asocia con el AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 y reduce la movilidad del receptor en la misma	163
<i>Discusión</i>	165
Conclusiones	177
Referencias	182

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso regula todos los aspectos de las funciones corporales y posee una extraordinaria complejidad. El cerebro humano, centro de control que almacena, computa, integra y transmite información, contiene aproximadamente 10^{12} neuronas (células nerviosas), cada una formando miles de conexiones con otras neuronas. Millones de neuronas especializadas sensan diferentes características del ambiente externo e interno y transmiten la información recogida al cerebro para su procesamiento y almacenaje. Al mismo tiempo, millones de otras neuronas especializadas regulan la contracción de los músculos y la secreción de hormonas. El sistema nervioso contiene también células gliales, las cuales ocupan los espacios entre las neuronas y modulan sus funciones.

La función de las neuronas es comunicar información, misión que cumple mediante señales eléctricas y químicas. Las neuronas sensoriales poseen receptores especializados que convierten a diferentes clases de estímulos ambientales (por ejemplo, luz, tacto, sonidos, olores) en señales eléctricas. Estas señales eléctricas son entonces convertidas en señales químicas que, a su vez, son enviadas a otras neuronas, denominadas interneuronas, las cuales convierten nuevamente a la información a señales eléctricas. Por último, la información es transmitida a neuronas motoras que estimulan el músculo u otras neuronas que estimulan otros tipos celulares como los presentes en las glándulas.

Determinados aspectos complejos del sistema nervioso, como por ejemplo la visión y la conciencia, no pueden ser comprendidos a nivel de una única célula sino a nivel de redes nerviosas que deben ser analizadas mediante técnicas de análisis de sistemas. El sistema nervioso se encuentra en constante cambio. Por ejemplo, en el desarrollo de la memoria se producen alteraciones en la naturaleza y en el número de interconexiones entre neuronas individuales.

Las sinapsis son los sitios especializados donde las neuronas reciben y envían información proveniente de otras células. Estos sitios cumplen un rol sumamente importante en la formación de los circuitos neuronales que permiten la coordinación de procesos complejos (Fig. 1). Las sinapsis generalmente transmiten la señal eléctrica en una sola dirección, es decir, un axón terminal de la célula presináptica envía señales que son

captadas por la célula postsináptica. También es importante señalar que existen dos tipos de sinapsis, una relativamente rara, la sinapsis eléctrica; y la más abundante, la sinapsis química.

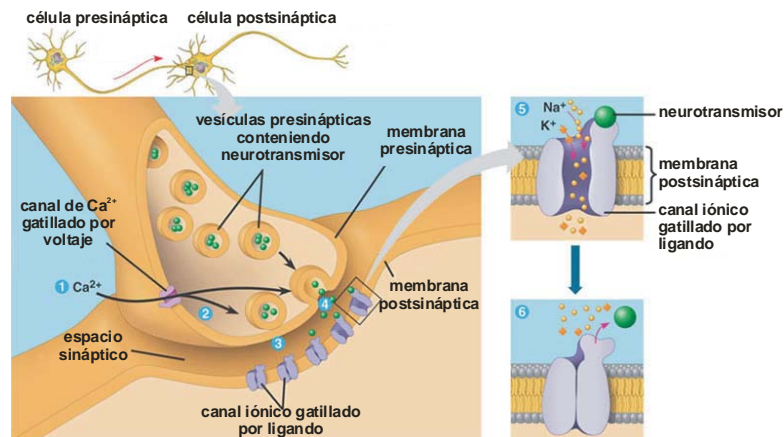


Fig. 1. Sinapsis nerviosa. Ver texto para detalles.

En la sinapsis química, el axón terminal de la neurona presináptica contiene vesículas que poseen un neurotransmisor particular (Fig. 1). La célula postsináptica puede ser una dendrita o el cuerpo celular de otra neurona, una célula muscular o de una glándula, o raramente, otro axón. Así, cuando el potencial de acción en la célula presináptica alcanza el axón terminal (Fig. 1(1)), provoca un aumento localizado en el nivel de Ca^{2+} citosólico (Fig. 1(2)) a través de canales de Ca^{2+} gatillados por voltaje. Este aumento de Ca^{2+} provoca la fusión de las vesículas que contienen el neurotransmisor con la membrana plasmática (Fig. 1(3)), liberando su contenido dentro de la hendidura (o espacio) sináptica (el espacio entre las dos células) (Fig. 1(4)). El neurotransmisor difunde a través de la hendidura sináptica, insumiéndole aproximadamente 0,5 milisegundos (ms) unírsele a su receptor correspondiente en la membrana de la célula postsináptica (Fig. 1(5-6)). La unión del neurotransmisor a su receptor provoca cambios en la permeabilidad iónica en la membrana postsináptica, cambiando así el potencial eléctrico de la misma. Si la célula postsináptica es una neurona, este disturbio eléctrico puede ser suficiente para disparar un potencial de

acción. Por otro lado, si la célula postsináptica es una célula muscular, la alteración en el potencial de membrana seguido a la unión del neurotransmisor puede inducir la contracción muscular. En cambio, si es una célula glandular, el neurotransmisor puede inducir la secreción de una hormona. En algunos casos, las enzimas presentes en la sinapsis se encargan de destruir al neurotransmisor una vez que éste ha realizado su función (Fig. 1(6)). Otras veces la señal termina cuando el neurotransmisor difunde o es transportado nuevamente hacia la célula presináptica (Lodish et al., 1999).

Los canales iónicos forman poros hidrofílicos que atraviesan la membrana y permiten el flujo pasivo de iones a favor de su gradiente electroquímico (Fig. 1(5-6)). Poseen una muy alta eficiencia de transporte, es decir, a través de un canal en estado abierto pueden pasar hasta 100 millones de iones por segundo, velocidad de transporte 10^5 veces mayor a la de cualquier proteína de transporte conocida. Estas proteínas son sofisticadas máquinas celulares que responden a cambios físicos y químicos en su ambiente, experimentan cambios conformacionales precisamente controlados y cronometrados que le permiten cumplir su rol de componentes esenciales en varios sistemas. Los canales iónicos poseen las siguientes similitudes estructurales entre sí: presencia de un poro central que atraviesa la membrana lipídica y contiene agua en su interior, a través del cual se movilizan los iones, y están conformados usualmente por 4-5 α hélices transmembrana (Fig. 2-3). Estas diferentes hélices que constituyen el poro del canal pueden ser parte de diferentes subunidades. Los canales iónicos no están continuamente “abiertos”. Estos son “gatillados”, lo que provoca la apertura del canal, breve, seguido de su cierre (Fig. 1(5-6)). Existen cientos de canales iónicos diferentes, los cuales se distinguen entre sí en base a su selectividad de iones, mecanismo de “gatillado” y similitud de secuencia. El acceso al poro es gobernado por una “puerta”, cuya apertura o cierre es gatillado por señales eléctricas, químicas o mecánicas, dependiendo del canal. Además, la actividad de muchos canales iónicos es regulada por fosforilación y defosforilación de la proteína. La continua estimulación (química o eléctrica) de la mayoría de los canales conduce a un estado cerrado desensibilizado, o inactivado, el cual es

refractario a su posterior apertura, hasta que el estímulo inicial es removido. Los canales iónicos operados por ligando (LGICs, por "*Ligand-Gated Ion Channels*") forman un grupo de canales iónicos en el cual la apertura de canal es controlada por la unión de un mensajero químico. Estas proteínas tienen varias características en común, fisiológicas y estructurales, y, como consecuencia de su estructura oligomérica, tienen un cierto número de sitios de unión del ligando. Los sitios de unión del ligando y la "puerta" están situados a una distancia considerable uno respecto del otro. Los sitios de unión del ligando están generalmente localizados en la interfase entre dos subunidades adyacentes (Fig. 2B). Los canales iónicos son los responsables de la excitabilidad eléctrica de las células musculares así como de la mayoría de la señalización eléctrica del sistema nervioso. Una neurona contiene, en general, 10 o más clases diferentes de canales iónicos, los cuales se localizan en diferentes dominios de su membrana plasmática (Alberts et al., 2002; Berg et al., 2002; Kalamida et al., 2007).

El receptor de acetilcolina (AChR)

El AChR pertenece a una superfamilia de canales iónicos gatillados por ligandos, conocida como receptores de lazo de cistina ("*cys-loop receptors*") porque todas las subunidades de la superfamilia contienen, en su porción aminoterminal extracelular, un par de cisteínas unidas covalentemente, las cuales están separadas por 13 aminoácidos (Kao y Karlin, 1986; Karlin, 2002). Dicho par de cisteínas se encuentra entre el sitio de unión del ligando y el dominio del canal iónico (Fig. 3). Esta superfamilia de receptores incluye a los AChRs de tipo muscular y neuronal, los receptores de 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃), los receptores de ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_A) y GABA_C, los receptores de glicina y los receptores de invertebrados de glutamato e histidina (Karlin, 2002).

El AChR es una proteína integral de membrana (Fig. 2) que responde a la unión de acetilcolina (ACh), la cual es sintetizada, almacenada y finalmente liberada por las neuronas colinérgicas. Al igual que otros receptores de membrana, el AChR ha sido clasificado de

acuerdo con sus propiedades farmacológicas o su afinidad relativa por varias moléculas, por lo cual pueden ser divididos en:

a) *AChR nicotínicos* (AChRn, el AChR ionotrópico), los cuales responden a nicotina. Estos receptores son los prototipos de los LGICs (Lindstrom, 1997, 2003).

b) *AChR muscarínicos* (AChRm, el AChR metabotrópico), los cuales responden a muscarina. Estos receptores son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Wess, 1996).

Los AChR nicotínicos están compuestos por 5 subunidades homólogas, organizadas alrededor de un poro central (Fig. 2) y divididos en dos grupos:

a) *AChR tipo muscular*: se encuentra presente en el músculo de vertebrados, y es el que media la transmisión neuromuscular en la unión neuromuscular (UNM), así como en órgano eléctrico de peces (Lindstrom, 2003).

b) *AChR tipo neuronal*: se encuentra distribuido a través del sistema nervioso. También se lo ha encontrado en células “no excitables” como linfocitos, monolitos, macrófagos, células dendríticas, adipocitos, queratinocitos, células endoteliales y células epiteliales de intestino y pulmón (Sharma y Vijayaraghavan, 2002).

En total, hasta ahora se logrado clonar 17 tipos de subunidades del AChR nicotínico consistentes en las siguientes subunidades: α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), a la cual corresponde la mayor parte del sitio de unión del ligando, β ($\beta 1$ - $\beta 4$), γ , δ y ϵ . En base a sus diferentes propiedades de unión a ligandos, y teniendo en cuenta los diferentes tipos de AChR nicotínicos se los clasificó en dos clases principales:

- a) *AChRs que unen α -Bungarotoxina (α BTX)*, los cuales pueden ser homopentámeros de subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$, o heteropentámeros, como $\alpha_2\beta\varepsilon(\gamma)\delta$.
- b) *AChRs que no unen α BTX*, los cuales contienen las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$. Estos existen sólo como heteropentámeros y unen agonistas con alta afinidad.

El AChR nicotínico de tipo muscular está constituido por cinco clases de subunidades, a saber, $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , ε y δ . En electrocitos y músculo fetal, la composición del receptor es $\alpha_2\beta\gamma\delta$, mientras que en el músculo adulto es $\alpha_2\beta\varepsilon\delta$ (Fig. 2). Con respecto a los AChR nicotínicos de tipo neuronal, éstos están compuestos por dos clases ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$). Cuando se expresan heterológamente, las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y 9 forman heteropentámeros funcionales. Las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\alpha 10$ forman complejos funcionales sólo cuando se co-expresan con subunidades β o con tras subunidades α (Karlin, 2002; Kalamida et al., 2007).

En el presente capítulo, y en el desarrollo de la presente tesis, abarcaremos diferentes aspectos de la biología y biofísica del AChR de tipo muscular, y en adelante, con AChR nos referiremos al AChR nicotínico muscular.

Estructura del AChR

El AChR es una proteína integral de membrana compuesta por 4 subunidades diferentes, homólogas ($\alpha 1$, $\beta 1$, γ , ε y δ), que forman un pentámero con estequiometría $\alpha_2\beta\varepsilon(\gamma)\delta$ y una masa molecular de aproximadamente 270 kDa (Fig. 2). Estudios bioquímicos realizados conjuntamente con estudios electrofisiológicos, inmunoquímicos y de análisis de secuencia han conducido a la estructura consenso para todas sus subunidades (Fig. 2):

- a) Cada subunidad contiene un dominio amino terminal de ~210-220 aminoácidos de longitud y que contiene el sitio de unión de agonistas y antagonistas competitivos (Dennis et al., 1988).
- b) Cuatro segmentos transmembrana hidrofóbicos, denominados M1-M4, de 15-20 aminoácidos de longitud; y dos pequeños segmentos hidrofóbicos que unen a los segmentos transmembrana M1-M2 y M2-M3 (Noda et al., 1983; Barrantes, 1983-2004).
- c) Un gran segmento intracelular que varía en tamaño (100-150 aminoácidos de longitud) y secuencia entre subunidades, el cual une a los segmentos transmembrana M3-M4, y el cual contiene los sitios de fosforilación (Huganir y Greengard, 1990; Swope et al., 1999).
- d) Un segmento carboxilo terminal hidrofílico y extracelular corto, de ~4-18 aminoácidos de longitud.

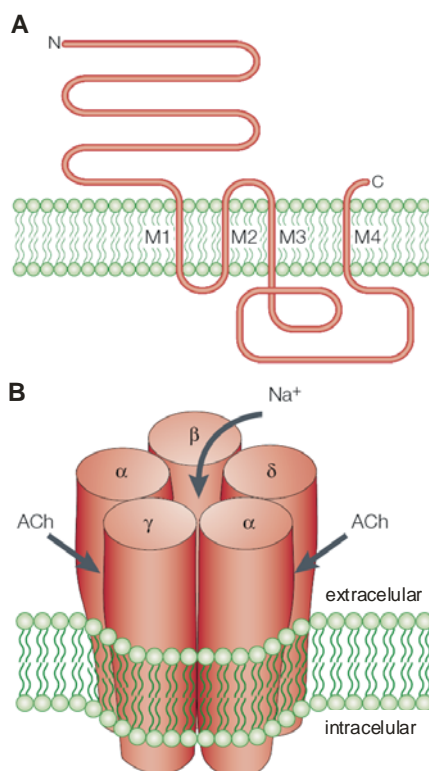


Fig. 2. Estructura del AChR. A) Representación esquemática de la estructura de las subunidades del AChR. B) Representación de la estructura cuaternaria del AChR, en la cual se observa el arreglo de las 5 subunidades, los sitios de unión de ACh y la porción axial del canal por el cual se transportan los cationes. Adaptado de Karlin (2002) *Nat Rev Neurosci.* **3**, 102-114.

La información estructural del AChR proviene de estudios de microscopía electrónica de AChR de *Torpedo* (Toyoshima y Unwin, 1990; Unwin, 1993, 1995; Beroukhim y Unwin, 1995). Estos estudios pioneros revelaron las dimensiones y la forma de la molécula, definieron el arreglo y los límites de las subunidades del AChR con una resolución de 9-17 Å. Posteriormente, estudios con una resolución de 4-4.6 Å arrojaron datos acerca de los dominios extracelular y transmembrana (Miyazawa et al., 1999, 2003, Unwin, 2005) (Fig. 3). La estructura atómica del dominio de unión de ACh proviene de la dilucidación de la estructura cristalina de la proteína AChBP (de sus siglas en inglés, *acetylcholine-binding protein*), la cual es un derivado soluble de células de la glia del molusco *Lymnaea stagnalis* y análogo natural al sitio de unión del ligando del AChR (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001). Esta proteína es un homopentámero soluble con subunidades de 210 aminoácidos y es el homólogo funcional y estructural al segmento extracelular de las subunidades de los receptores que pertenecen a la familia “cys-loop”. Los datos obtenidos de esta proteína, a saber: un cilindro de 62 Å de altura, un diámetro de 80 Å y un poro de 18 Å de diámetro, se correlacionan con la información de AChR de *Torpedo* propuesta por Miyazawa et al. (1999).

En el modelo de 4 Å (Unwin, 2005, ver revisión Kalamida et al., 2007), el AChR de *Torpedo* posee una longitud de ~ 160 Å (normal al plano de la membrana), el cual está dividido en tres dominios (Fig. 3). *El dominio de unión del ligando*, en la porción amino terminal extracelular está formado principalmente por estructuras β , unidas al “cys-loop”. Contiene una α hélice terminal y varios lazos que poseen importancia funcional (A, B, C, lazo cis, lazo β - β , Fig. 3). Dos porciones separadas de este dominio participan en la formación del sitio de unión de agonistas y antagonistas. El “componente principal” del sitio de unión reside en la subunidad α , mientras que el “componente complementario” reside en las subunidades adyacentes no α . El dominio de unión a ACh está formado por los lazos A, B y C en la subunidad α y por las hebras β 5 y β 6 de las subunidades adyacentes, γ o δ (Fig. 3). Esos sitios se encuentran 40 Å aproximadamente por encima de la membrana y en lados

opuestos al poro del canal. La unión de ACh en estos sitios produce rotaciones en los segmentos de la molécula, que se transmiten a los segmentos transmembrana. El dominio extracelular de la subunidad $\alpha 1$ contiene la región inmunogénica principal (“*main immunogenic region*” - MIR), la cual abarca los aminoácidos 67-76 de la subunidad $\alpha 1$ (Fig. 3), contra la cual reaccionan varios autoanticuerpos generados en la enfermedad autoinmune Miastenia Gravis (Tzartos et al., 1988, 1998). *El dominio transmembrana* forma el poro del canal y es la porción que se encuentra en contacto con los lípidos de la membrana (Barrantes, 1992, 1993, 2002, 2003, 2004). Este dominio, conformado por los segmentos M1-M4 constituidos por α hélices (Figs. 2, 3, 6), están dispuestos simétricamente formando el poro del canal (Miyazawa et al., 1999, 2003, Unwin, 2005). Barrantes (2003) propuso la distinción de tres anillos concéntricos en esta región (Fig. 6): a) un anillo interno formado por los 5 segmentos M2 provenientes de las cinco subunidades que forman el AChR. Estos segmentos forman la pared del canal y no se encuentran en contacto con los lípidos de la membrana. b) Un anillo medio, formado por los 10 segmentos M1 y M3, limitan internamente con el anillo de segmentos M2, y externamente con los lípidos de la membrana y c) el anillo externo, formado precisamente por los 5 segmentos más externos, M4, también en contacto con los lípidos de la bicapa. En el estado cerrado del canal, los 5 segmentos M2 se reúnen entre sí, a la altura media de la membrana, generando una zona hidrofóbica, la cual es considerada la “puerta” del canal y que funcionaría como barrera energética a la permeación de iones (Unwin, 2005). Además de los segmentos M1-M4, los pequeños segmentos que conectan M1-M2 (intracelular) y M2-M3 (extracelular) son considerados parte de la porción que atraviesa la membrana plasmática (Fig. 3). *El dominio intracelular* es el gran segmento que conecta los segmentos transmembrana M3-M4, el cual contiene un α hélice curvada inmediatamente antes de la porción transmembrana M4 (Fig. 3). Cada subunidad contribuye con una α hélice para formar la pared del vestíbulo (Fig. 3). Estas cinco α hélices forman un cono pentagonal invertido con espacios entre ellas de un ancho $< 8 \text{ \AA}$, el que es comparable al diámetro de

iones sodio y potasio hidratados, rodeadas por cadenas cargadas negativamente. Estos espacios representarían las vías para el transporte de cationes, constituyendo además un filtro de carga y tamaño, impidiendo que aniones o cationes de mayor tamaño pasen a través del canal (Unwin, 2005).

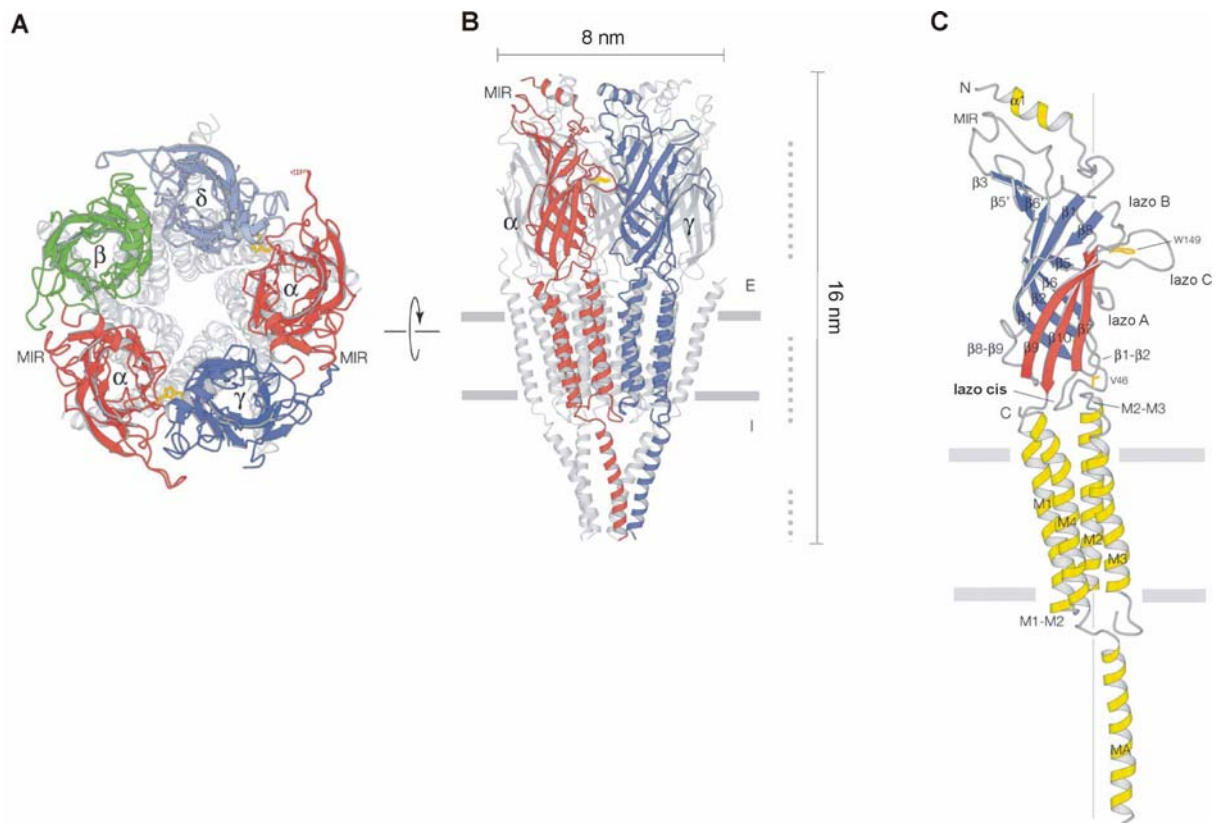


Fig. 3. Diagrama de cintas del AChR. A) Vista desde la hendidura sináptica. B) Paralelo al plano de la membrana. Para mayor claridad de las figuras, sólo los sitios de unión al ligando están remarcados en A) y sólo las dos subunidades que están al frente están remarcadas en B). Las distintos colores representan distintas subunidades: α , roja; β , verde; γ , azul; δ , celeste. Las líneas punteadas a la derecha de B) señalan las tres zonas principales de contacto entre las subunidades. C) Vista ampliada de la subunidad α . Las hélices α están en amarillo, las estructuras β están en azul (internas) y rojo (externas). Se observa también la localización de los distintos "loops" (ver texto), así como la localización N y C terminal. También se señala el MIR y la zona correspondiente a la membrana (líneas grises horizontales, E, extracelular; I, intracelular). Adaptado de Unwin (2005) *J Mol Biol.* **346**, 967-989.

Los principales sitios de contacto entre las distintas subunidades se producen a tres niveles distintos (Fig. 3 B). A nivel del dominio extracelular, las distintas subunidades interactúan a través de cadenas polares situadas en las interfaces de cada subunidad. En el dominio transmembrana, cadenas hidrofóbicas que se proyectan desde los segmentos M1, M2 y M3 son los mayores responsables de los contactos intersubunidades. Intracelularmente, las interacciones intersubunidades implican contactos entre los segmentos que unen M1-M2, así como el que une M3-M4 (Unwin, 2005).

Desarrollo de la unión neuromuscular

Durante el desarrollo embrionario, cuando los mioblastos se fusionan para formar los miotubos, se activan una serie de genes postsinápticos, entre ellos, los que codifican para las distintas subunidades del AChR. Las distintas subunidades del AChR son sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE), donde ellas son ensambladas para generar el receptor maduro y posteriormente son transportadas a la membrana plasmática (estos aspectos de la biología del AChR son discutidos en mayor detalle en el Capítulo I de la presente tesis). En este estadio, los AChRs de la membrana plasmática alcanzan una densidad de $\sim 1000/\mu\text{m}^2$. En la UNM adulta, en cambio, la concentración de AChRs en la membrana postsináptica alcanza a 10000-20000 AChRs/ μm^2 , mientras que en el resto de la membrana plasmática de las células musculares, la concentración de AChRs es <10 AChRs/ μm^2 (Matthews-Bellinger y Salpeter, 1983; Merlie y Sanes, 1985; Sanes y Lichtman, 2001; Kummer et al., 2006). La generación de la UNM implica la generación de especializaciones pre- y postsinápticas, las cuales requieren la interacción coordinada y secuencial entre las terminales nerviosas de la neurona motora y el músculo (Sanes y Lichtman, 2001; Witzemann, 2006). Con la formación de las fibras musculares (días embrionarios (E) 12-14 en ratón), se produce un fenómeno conocido como “*prepatterning*”, es decir, agrupaciones de AChR se concentran en las regiones centrales de las fibras (Fig. 4). Estos sitios son posteriormente utilizados por la terminal nerviosa que llega para formar los

contactos sinápticos, quedando dispersos los agregados (“clusters”) de AChRs no innervados. En el estadio E17 un sitio sináptico se estabiliza y el patrón postsináptico maduro queda establecido. Durante el desarrollo postnatal, innervaciones múltiples de las fibras musculares quedan reducidas a contactos sinápticos simples y el AChR embrionario ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) es reemplazado por el AChR adulto ($\alpha_2\beta\epsilon\delta$) (Fig. 4) (Gu y Hall, 1988; Yumoto et al., 2005; Witzemann, 2006), el cual adquiere la forma característica de “pretzel” (Sanes y Lichtman, 2001).

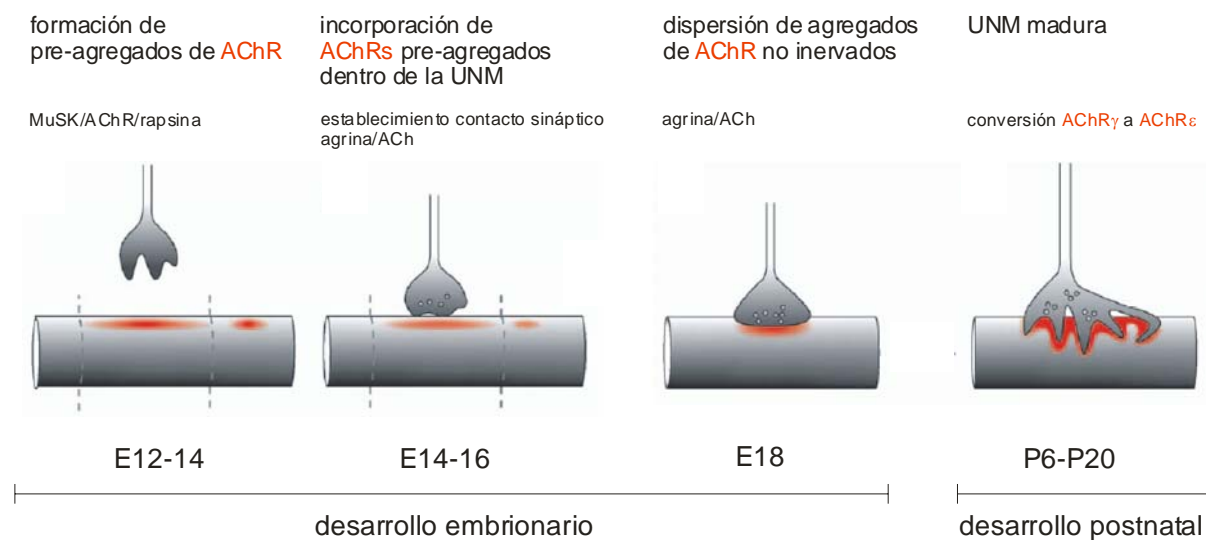


Fig. 4. Sinaptogénesis neuromuscular. Adaptado de Kummer et al. (2006) *Current Opinion in Neurobiology* **16**, 74-82 y Witzemann (2006) *Cell Tissue Res.* **326**, 263-271.

Hasta la década de 1990, en base a numerosos experimentos bioquímicos y genéticos, se postulaba que en la sinaptogénesis muscular los axones liberan dos señales localizadas que dirigen la diferenciación postsináptica debajo de sus terminales (Fig. 5A). Una de ellas era agrina, la cual reorganizaba las proteínas sinápticas en el plano de la membrana y la neuregulina, la cual estimulaba la transcripción en los núcleos subsinápticos. La agrina, mediante su unión a una proteína quinasa específica muscular (MuSK, por

muscle-specific kinase), estimulaba el agrupamiento de AChRs y rapsina en la membrana plasmática postsináptica. La neurergulina, por su parte, vía los receptores Erb, inducía la transcripción de AChR y otros ARNs específicos de sinapsis en los núcleos subsinápticos. Estas etapas iniciales ensamblaban un aparato postsináptico rudimentario, el cual posteriormente era remodelado por potenciales de acción inducidos por ACh liberada desde la terminal nerviosa (Fig.5A) (Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006).

Sin embargo, estudios posteriores condujeron a una revisión del modelo anterior (Fig. 5B). Se observó en células musculares que permanecieron aneurales durante su desarrollo (alrededor de los estadios E14/15) la formación de agregados de AChR en la zona central de las mismas ("prepatternning") (Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). Estudios posteriores demostraron que estos agregados de AChR se forman previamente a la llegada del axón y que algunos de estos se incorporaron dentro de la sinapsis (Flanagan-Steet et al., 2005). Estas observaciones sugieren que *los axones motores son dispensables en los estadios iniciales de la diferenciación postsináptica y que estos AChRs pre-agregados participan en la sinaptogénesis de la unión neuromuscular* (Flanagan-Steet et al., 2005; Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006). Ahora bien, ¿cómo se forman estos pre-agregados del AChR? Witzemann (2006) propone que las concentraciones de MuSK alrededor de núcleos localizados centralmente en miofibras en desarrollo podrían alcanzar niveles críticos para su actividad quinasa intrínseca más tempranamente que los núcleos localizados más distalmente. Un proceso de retroalimentación ("feedback") positivo activaría no sólo la expresión de MUSK, sino también de AChR. Los nuevos AChRs se agregarían y estabilizarían debido a la rapsina, formándose así preagregados de AChR independientemente de señales nerviosas.

También se observó la presencia de agregados de AChR en embriones que no expresan agrina (Lin et al., 2001), indicando de este modo que la agrina no es imprescindible en la formación de pre-agregados del AChR. En estos embriones, el axón es incapaz de interactuar con los agregados de AChR y de establecer contactos sinápticos estables, lo que conduce a la dispersión de los agrupamientos de AChR (Lin et al., 2001;

Yang et al., 2001). Así, *el rol fisiológico de la agrina podría interpretarse al de estabilizar los contactos sinápticos, impedir la dispersión de agregados de AChR y controlar el crecimiento axonal, en vez de inducir especializaciones postsinápticas en miofibras en desarrollo* (Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006). Llamativamente, en músculo que no expresa agrina, los agregados de AChR persisten por más tiempo en los músculos aneurales que en los inervados, con lo cual la agrina contrarrestaría los efectos de un derivado neural que dispersa los agregados de AChR. Este derivado neural pareciera ser la ACh. Esta hipótesis fue confirmada en animales doble mutantes para la agrina y ACh (Misgeld et al., 2005). La ACh desestabilizaría los sitios postsinápticos nacientes, con lo cual, el rol fisiológico de la agrina sería contrarrestar este efecto “antisinaptogénico” de la ACh. La dispersión de los agregados de AChR inducida por la ACh estaría mediada por la ciclina Cdk5 (Lin et al., 2005). Estos resultados sugieren que *la agrina actúa en la sinaptogénesis neuromuscular como un agente “anti-declustering” de tal modo que la neurotransmisión (ACh) dispersa agrupaciones de AChRs que no se encuentren estabilizadas por agrina* (Bloch, 1986; Misgeld et al., 2005; Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006).

Utilizando células musculares insensibles a la *neuregulina*, Escher et al. (2005) recientemente demostraron que ésta es dispensable en la formación de la UNM, y que *sus efectos de señalización al músculo serían mediados indirectamente a través de las células de Schwann*. La especialización transcripcional de los núcleos sinápticos requiere agrina y MuSK (Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006). La presencia de núcleos postsinápticos por debajo de la membrana postsináptica, anclados por la proteína syne-1, sintetizan a los AChRs y demás proteínas postsinápticas, contribuyendo de este modo al ensamblaje del aparato postsináptico. Sin embargo, la presencia de estos núcleos es dispensable en el desarrollo de la UNM (Apel et al., 2000; Grady et al., 2005; Kummer et al., 2006).

Se desconoce a la fecha cómo se produce la transformación de la UNM de neonatos, ovoides, en UNM adultas, con su característica morfología ramificada. Se pensaba que esta transformación era un proceso dependiente del nervio, pero el hallazgo según el cual los miotubos cultivados aneuralmente desarrollan agregados de AChR

semejantes a la UNM adulta cambiaron este punto de vista (Kummer et al., 2004, 2006). Así, la *maquinaria intrínseca muscular posee la capacidad de formar agregados de AChR con el patrón de la UNM adulta* (Kummer et al., 2006).

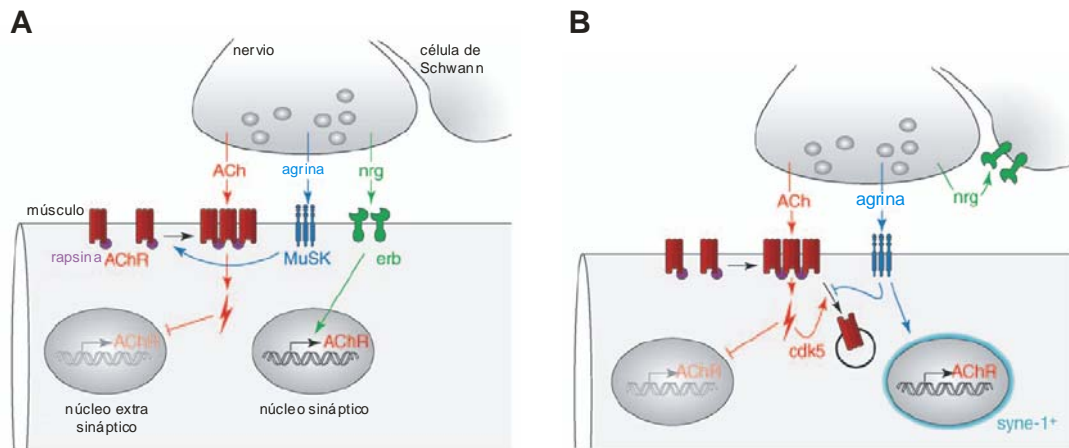


Fig. 5. Modelo molecular de los procesos involucrados en el desarrollo de la UNM. Adaptado de Kummer et al. (2006) *Current Opinion in Neurobiology* **16**, 74-82.

En base a lo comentado previamente, el nuevo modelo de formación de la UNM se resume en las Figs. 4 y 5B (Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006) (compararlo con la Fig. 5A):

- a) el músculo tiene la capacidad de formar pre-agregados de AChR, independientemente del axón de la neurona motora, que se posicionan en el centro de los sitios postsinápticos. Aquí MuSK activaría la expresión de AChR y MuSK, y los agregados de AChR estabilizados por rapsina formarían agrupaciones de AChR en la membrana plasmática;
- b) los axones de las neuronas motoras reconocen estos pre-agregados de AChR y algunos de estos son incorporados a la sinapsis.
- c) la liberación de ACh por las terminales nerviosas inducen potenciales postsinápticos que determinan la localización del aparato postsináptico e impide

el agrupamiento del AChR en sitios donde no existe contacto entre la terminal nerviosa y el músculo;

d) la liberación de agrina neural contrarrestaría la acción de la ACh, estabilizando los agregados de AChR contactados por el nervio y estimularía la actividad quinasa de MuSK y la acumulación de AChR impidiendo la dispersión de especializaciones postsinápticas;

e) la neuregulina es un factor crucial en la formación de la UNM, actuando como un factor trófico para las células de Schwann.

Recientemente se ha observado que los lípidos, especialmente el colesterol y los esfingolípidos (SL), también participan en el proceso de biogénesis y mantenimiento de la UNM (Bezakova y Ruegg, 2003; Campagna y Fallon, 2006; Zhu et al., 2006; Stetzkowski-Marden et al., 2006; Willmann et al., 2006). Estos estudios determinaron que la partición del AChR y varias proteínas del aparato postsináptico en dominios lipídicos, ricos en colesterol y SL, es necesaria para el agrupamiento inicial del AChR así como para la posterior estabilidad de estas agrupaciones. Este tema es discutido más detalladamente en el Capítulo II de la presente tesis.

Enfermedades asociadas al AChR muscular.

El AChR nicotínico muscular está involucrado en una serie de enfermedades adquiridas y hereditarias, las cuales conducen a una transmisión neuromuscular deteriorada y a debilidad muscular. La enfermedad autoinmune adquirida Miastenia Gravis (MG) es la más común y la mejor estudiada de este grupo hasta ahora. Es causada, en general, por autoanticuerpos contra el AChR. Los Síndromes Miasténicos Congénitos (SMC) son condiciones hereditarias raras, las cuales poseen varias anomalías que afectan la liberación de ACh, la actividad acetilcolinesterasa y la función y/o niveles de expresión del AChR (ver revisiones Lindstrom, 2003; Conti-Fine et al., 2006; Kalamida et al., 2007).

La *Miastenia Gravis* es una enfermedad autoinmune no hereditaria. Se caracteriza por presentar, generalmente, autoanticuerpos circulantes que se unen y destruyen el AChR muscular. Esto se refleja en debilidad muscular y fatigabilidad. Esta enfermedad puede ser localizada en un único grupo muscular, por ejemplo MG ocular, o puede abarcar a varios grupos musculares, MG generalizada. Los autoanticuerpos reducen el número de AChRs disponibles, causando un defecto en la transmisión neuromuscular y provocando debilidad muscular. Aunque el 85% de los pacientes presentan autoanticuerpos contra el AChR, el restante 15% son seronegativos. De éstos, un 20-40% poseen anticuerpos contra la proteína postsináptica MuSK. También existen pacientes con anticuerpos contra proteínas del tejido muscular estriado.

Los autoanticuerpos pueden reducir el número de AChRs en la membrana postsináptica a través de tres mecanismos:

- a) la unión de autoanticuerpos al AChR activa la cascada del sistema de complemento, resultando en la formación del complejo de ataque a la membrana, con la resultante destrucción de la membrana postsináptica. Esto conduce a la morfología característica de la UNM en pacientes con MG, la cual pierde los pliegues característicos y adquiere una superficie relativamente plana.
- b) Los autoanticuerpos producen el entrecruzamiento de AChRs presentes en la membrana postsináptica de la UNM, causando la endocitosis de estos complejos y su posterior degradación. Este proceso reduce el número de AChRs presentes en la UNM.
- c) La unión de autoanticuerpos a los sitios de unión del ligando del AChR provoca el bloqueo funcional del AChR por interferir en la unión de la ACh liberada en la membrana presináptica al AChR. Esto resulta en falla de la transmisión neuromuscular.

Más de la mitad de los pacientes de MG poseen autoanticuerpos contra el AChR dirigidos contra el epítipo denominado MIR. El MIR no es un único epítipo, sino una región en la cual se superponen epítipos dependientes de la conformación del AChR (ver Fig. 3),

siendo los residuos 67-76 de la subunidad $\alpha 1$ el centro de la región. Este segmento se encuentra en la parte más accesible del AChR, en el extremo sináptico de ambas subunidades $\alpha 1$ (Tzartos et al., 1988, 1998; Kalamida et al., 2007).

Con el objeto de controlar la MG, actualmente se utilizan medicamentos que mejoran la transmisión neuromuscular o que deprimen el sistema inmune. Estos medicamentos incluyen inhibidores de la acetilcolinesterasa e inmunosupresores esteroidales y no esteroidales. Un tratamiento quirúrgico consiste en la timectomía (Conti-Fine et al., 2006; Kalamida et al., 2007).

Los *Síndromes Miasténicos Congénitos (SMC)* son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias caracterizados por una transmisión neuromuscular defectuosa y consecuente fatiga muscular. La mayoría de los síntomas de los SMC se produce en los dos primeros años de vida. Básicamente el diagnóstico se realiza por la presencia de síntomas miasténicos en ausencia de anticuerpos contra el AChR, MuSK o canales de Calcio. Hasta ahora se han reportado ~60 mutaciones en diferentes subunidades del AChR ($\alpha 1$, $\beta 1$, ϵ y δ), afectando tanto los dominios extracelulares, los segmentos transmembrana M1-M3 y el gran dominio citoplasmático entre los segmentos M3-M4, así como mutaciones en otras proteínas postsinápticas. Los SMC se pueden agrupar en dos categorías: *mutaciones cinéticas*, las cuales pueden incrementar la respuesta a la ACh (como en los síndromes de canal lento, *slow-channel syndromes*) o disminuir la respuesta a la ACh (como en los síndromes de canal rápido, *fast-channel syndromes*); o mutaciones que afectan negativamente la expresión del AChR (ver revisiones Lindstrom, 2003; Kalamida et al., 2007).

Los *síndromes de canal lento o rápido* son anomalías cinéticas en la función del AChR. En los *síndromes de canal lento* el AChR posee un tiempo de estado abierto anormalmente prolongado, lo que ocasiona que la corriente sináptica decaiga muy lentamente. En consecuencia, la región postsináptica es sobrecargada de cationes, lo que

ocasiona miopatía de la UNM, pérdida de AChRs, ensanchamiento del espacio sináptico y apoptosis. Los síndromes de canal lento son causados por mutaciones dominantes que provocan ganancia de función del AChR. La mayoría de las mutaciones (~ 18) se localizan en el segmento M2 de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ , y también en sitios cercanos al sitio de unión de ACh, aumentando la afinidad por la ACh (ver revisión Kalamida et al., 2007).

Los *síndromes de canal rápido* se caracterizan porque el AChR posee un tiempo de estado abierto anormalmente corto, con lo cual la respuesta sináptica decae rápidamente. Ésto puede deberse a una menor afinidad por la ACh, menor eficiencia de gatillado o un número bajo de aperturas del AChR tras la unión de la ACh. La mayoría de estos síndromes son causados por mutaciones recesivas (~13) que provocan una disminución de la funcionalidad del AChR. Las mutaciones en el dominio extracelular disminuyen la afinidad por la ACh, las presentes en los segmentos transmembrana afectan la eficiencia de gatillado y las presentes en el lazo intracelular M3-M4 de la subunidad ϵ desestabilizan la cinética del canal (Kalamida et al., 2007).

Otros SMC poseen *deficiencia en el AChR con o sin anomalías en la cinética del AChR*. Éstos se producen por mutaciones recesivas que conducen a un número reducido de AChR funcionales en la membrana postsináptica. Frecuentemente se localizan en el lazo intracelular M3-M4 de la subunidad ϵ (~ 50) y afectan los niveles de expresión, la traslación o residuos críticos para el proceso de ensamblaje. Otras deficiencias de AChR son ocasionadas por mutaciones en la proteína rapsina (~ 21), o en el gen de la proteína MuSK (~ 2) (ver revisión Kalamida et al., 2007).

Microambiente lipídico del AChR e interacciones AChR – lípido.

Para comprender el rol que cumplen las proteínas de membrana en estados de salud y enfermedad es necesario conocer los mecanismos moleculares que están involucrados en sus funciones. Esto requiere conocer no sólo la información estructural de la proteína, sino también comprender cómo el ambiente lipídico en que se encuentra

inmersa afecta su estructura, su organización y su función. Todas las proteínas de membrana poseen una propiedad en común: contienen una o más regiones hidrofóbicas, generalmente estructuras α hélice, con la cual atraviesan la bicapa lipídica. Varias propiedades de las proteínas de membrana están determinadas por interacciones entre sus segmentos transmembrana y los lípidos que los rodean, por lo cual estos segmentos actuarían como sensores del ambiente lipídico circundante. Las alteraciones en el ambiente lipídico de una proteína pueden provocar modificaciones estructurales en los segmentos transmembrana así como cambios en la orientación y ángulo de las α hélices, conformación o alteraciones en la interacción entre las α hélices de una misma proteína, o entre proteínas vecinas. Estas alteraciones, a nivel de los segmentos transmembrana, pueden producir cambios estructurales a nivel de las porciones extramembrana de la proteína, lo que se podría traducir en cambios funcionales, en formación o disociación de estructuras oligoméricas (ver revisión Nyholm et al., 2007).

Con respecto al AChR, la porción del mismo que atraviesa la membrana plasmática, 20 segmentos transmembrana constituidos por α hélices, representa el 25% del total de la proteína, del cual, un 30% se encuentra en íntimo contacto con los lípidos que la rodean (Toyoshima y Unwin, 1990). El estudio de las interacciones lípido-proteína entre el AChR y los lípidos de la membrana en los cuales se encuentra inserto ha sido motivo de estudio desde hace muchos años. En un trabajo pionero, Marsh y Barrantes (1978), empleando membranas de *Torpedo* ricas en AChR, determinaron la presencia de una porción de lípidos inmovilizados respecto del resto de la membrana. Esta fracción de lípidos corresponde a la porción de lípidos que rodean íntimamente al AChR. Posteriormente se procedió a la caracterización de esta interacción en términos de su estequiometría, selectividad lipídica y su relación con la funcionalidad del canal (ver revisiones Barrantes, 1989, 1992, 1993, 2002, 2003, 2004).

La importancia del estudio de las interacciones lípido-proteína del AChR radica en que desde la síntesis y ensamblado de sus subunidades en el RE, hasta su llegada a la

membrana plasmática, y su función como canal iónico en la membrana postsináptica, todo, ocurre en su medio natural, la membrana en la cual está inserto (Barrantes, 2004).

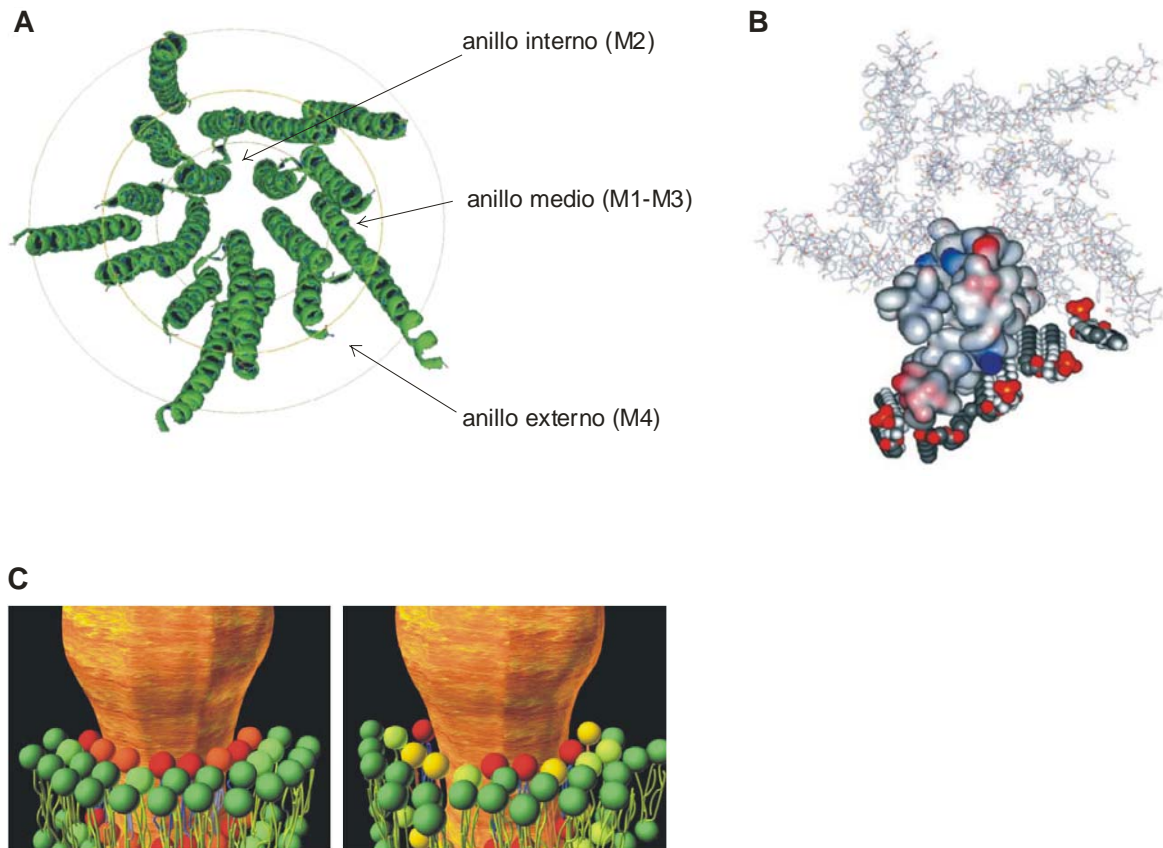


Fig. 6. El AChR y su entorno lipídico. A) Vista superior de los segmentos transmembrana del AChR, en donde se señalan los tres anillos concéntricos, formados por los diferentes segmentos transmembrana del AChR (interno, M2; medio, M1 y M3; y externo, M4) alrededor del poro central del canal (ver texto para más detalles). B) Los lípidos de la membrana interactúan con los segmentos transmembrana más externos del AChR. En la figura se muestran la interacción de una subunidad del AChR con cuatro moléculas de ácido fosfatídico y una molécula de diacilglicerol, los cuales poseen selectividad por el AChR. Aproximadamente 20 moléculas de lípidos por hemicapa pueden “acomodarse” en el perímetro del AChR. C) Los lípidos que rodean el AChR se encuentran en continuo intercambio con el del resto de los lípidos de la membrana. Los lípidos que poseen mayor selectividad por el AChR pasan un tiempo mayor en su entorno inmediato, concentrándose relativamente con respecto a aquellos lípidos que no poseen selectividad por el mismo. Adaptado de Barrantes (2003) *Curr Opin Drug Discov Devel.* **6**, 620-632 (A y B); y Barrantes (2004) *Brain Res Brain Res Rev.* **47**, 71-95 (C).

Desde su biogénesis hasta su llegada a la membrana plasmática, el AChR interactúa con distintos ambientes lipídicos de membrana, y estos distintos ambientes participan y modulan diferentes aspectos de su biología y funcionalidad (Brusés et al., 2001; Marchand et al., 2002; Pediconi et al., 2004; Campagna y Fallon, 2006; Zhu et al., 2006; Stetzkowski-Marden et al., 2006; Willmann et al., 2006; Kellner et al., 2007; Baier y Barrantes, 2007; Borroni et al., 2007; Gallegos et al., 2008), los cuales serán discutidos en mayor detalle en los Capítulos I y II de la presente tesis. La influencia del ambiente lipídico de la membrana sobre la funcionalidad del AChR es seguramente el aspecto más importante de la interacción AChR-lípidos (Barrantes, 2004, 2007). Estudios sobre el estado biofísico de membranas ricas en AChR de *Torpedo*, utilizando la sonda Laurdan, indicaron una menor polaridad del ambiente (una menor fluidez de la membrana) en el microambiente del AChR, demostrando que la zona de los lípidos que se encuentran más cercanos al AChR está más inmovilizada con respecto al resto de la membrana (Antollini et al., 1996; Antollini y Barrantes, 1998; Barrantes, 2004), tal como fue demostrado previamente por Marsh y Barrantes (1978) (ver Fig. 6C).

Se ha demostrado que el AChR posee cierta selectividad lipídica en cuanto a los lípidos que lo rodean, y que parte de esta selectividad está determinada, o es necesaria, para mantener la funcionalidad de esta proteína en la membrana en la que se encuentra inserta. Los primeros intentos para tratar de analizar la influencia de los lípidos del microentorno del AChR sobre la funcionalidad del receptor se realizaron empleando sistemas de AChR reconstituido, los cuales poseen la ventaja de disecar las contribuciones individuales de cada especie lipídica sobre distintas propiedades del canal, como unión y transiciones inducidas por ligando así como la capacidad del AChR para transportar iones a través de la membrana (Barrantes, 2004). Primeramente se encontró que la movilidad de ciertas sondas lipídicas (sondas de androstanol y fosfolípidos, como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) era restringida como consecuencia de su interacción con el AChR (Marsh y Barrantes, 1978; Marsh et al., 1981). En estudios posteriores se determinó la asociación preferencial del AChR con esteroides, ácido fosfatídico y ácidos grasos, más que

con otras especies lipídicas (Ellena et al., 1983; Barrantes, 2004). Se observó que, cuando se reconstituía el AChR en vesículas conteniendo sólo fosfatidilcolina, los receptores no eran funcionales, y que la presencia de colesterol y fosfolípidos cargados negativamente, como el ácido fosfátidico o fosfatidilserina, restauraban la capacidad al AChR de experimentar transiciones de estado inducidas por agonista así como para estabilizar su estructura secundaria (Criado et al., 1982a. Ochoa et al., 1983; Criado et al., 1984; Fong y McNamee, 1986, 1987; Bhushan y McNamee, 1993; ver revisión Barrantes, 2004). La presencia de ácidos grasos en vesículas conteniendo el AChR bloquean el flujo de iones sodio inducido por agonistas (Andreasen y McNamee, 1980). En base a estudios realizados por Ellena et al. (1983) y Mantipragada et al. (2003) se pudo establecer una clasificación de lípidos de acuerdo con su selectividad por el AChR, los cuales pertenecen a tres categorías diferentes (Barrantes, 2004): a) *un grupo de alta selectividad*, constituido por ácidos grasos, androstanol y ácido fosfátidico; b) *un grupo con afinidad intermedia*, constituido por esfingomiélin (SM) y fosfatidilserina; c) y *un grupo de afinidad moderada a baja*, conformado por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y gangliósidos.

Se han postulado varias hipótesis para tratar de explicar cómo los esteroides y demás lípidos afectan la funcionalidad del AChR. Estas teorías incluyen a) efectos indirectos sobre el AChR ejercidos sobre las propiedades biofísicas de la membrana (tales como fluidez, formación de dominios lipídicos, etc), y b) efectos directos mediados por la interacción de los lípidos directamente en los segmentos transmembrana del AChR (Barrantes, 2003, 2004).

De acuerdo con lo señalado por Barrantes (2003, 2004), como consecuencia de la alta densidad de empaquetamiento del AChR en las membranas postsinápticas, sólo tres a cuatro capas de fosfolípidos de la membrana separan la primer capa de lípidos que rodean el AChR de la siguiente “primer anillo o cinturón” de lípidos, y la rigidez de dichos lípidos aumenta a medida que nos acercamos al AChR (ver Fig. 6C). Como mencionamos anteriormente, los lípidos inmediatos al AChR están relativamente inmobilizados, y aunque se espera que estos lípidos tengan una velocidad de difusión 50-100 veces menor a la de

los lípidos de la membrana ($1-5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), el grado de intercambio de éstos con los del resto de la membrana se encuentra en el orden de $1-5 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ (Barrantes, 1989; 2004). Así, las especies lipídicas que poseen selectividad por el AChR pasan, en promedio, un tiempo mayor en el entorno inmediato del AChR, y así son concentrados de manera relativa, al resto de los lípidos de la membrana, los cuales no poseen selectividad por la proteína (ver Fig. 6C).

La cara del AChR expuesta a los lípidos de la membrana contiene hendiduras y protusiones en los cuales los lípidos que rodean al AChR pueden acomodarse (Barrantes, 2003) (ver Fig. 6B). Aminoácidos cargados rodean la porción transmembrana de la proteína situada en la interfase membrana-agua, mientras que la porción embebida en la membrana no posee aminoácidos cargados. Aproximadamente 20 moléculas lipídicas pueden colocarse en el perímetro del AChR en una hemicapa de la membrana, por lo tanto el número mínimo de lípidos necesarios para rodear al AChR es de ~ 40 (Ellena et al., 1983; Mantipragada et al., 2003; Barrantes, 2003) (ver Fig. 6B).

Uno de los mayores desafíos para la comprensión de la relación lípidos-función del AChR es dilucidar los mecanismos de propagación de la información desde los sitios expuestos a los lípidos, mencionados anteriormente, al resto de la molécula del receptor (Barrantes, 2003).

En la presente Tesis Doctoral se estudiaron diferentes aspectos de la biología celular del AChR y su relación con dos clases lipídicas principales, los SL (desarrollado en el Capítulo I) y el colesterol (desarrollado en el Capítulo II). Más específicamente, en base a la relación previamente documentada entre los SL y el AChR (Roccamo et al., 1999), nos propusimos diseccionar en qué estadio/s de la vida intracelular del AChR, así como de su destino final en la membrana plasmática, los SL son necesarios para la correcta expresión del AChR en la superficie celular. Respecto del AChR y el colesterol, nos abocamos a estudiar los efectos de este lípido sobre la expresión, distribución y propiedades dinámicas (movilidad lateral) del AChR en la membrana plasmática. Para llevar a cabo estos estudios

empleamos las células CHO-K1/A5, las cuales expresan en forma estable y heteróloga el AChR de tipo muscular adulto ($\alpha_2\beta\epsilon\delta$) y diversas técnicas de biología celular y molecular, bioquímicas, y especialmente, diferentes técnicas de microscopía de fluorescencia.

CAPÍTULO I

INFLUENCIA DE LOS ESFINGOLÍPIDOS SOBRE LA BIOGÉNESIS, TRÁFICO INTRACELULAR Y EXPRESIÓN EN MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ACHR EN CÉLULAS CHO-K1/A5

INTRODUCCIÓN

Las membranas celulares contienen muchos más lípidos que los necesarios para formar una bicapa lipídica (Fig. 1.1). Además, estos diferentes lípidos no están distribuidos al azar entre las organelas subcelulares, así como también, entre los distintos lados de estas organelas (Fig. 1.3). La evidencia actual indica que los lípidos poseen funciones mucho más allá que la de sólo proveer el esqueleto de las membranas celulares. Actualmente se reconoce a los lípidos como reguladores versátiles y sumamente dinámicos de numerosos procesos celulares, los cuales abarcan desde el crecimiento, desarrollo y supervivencia celular hasta la señalización y el tráfico intracelular (van Meer y Holthuis, 2000; Futerman y Hannum, 2004; Holthuis y Levine, 2005). Varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, están relacionadas con la biosíntesis (o degradación) de esfingolípidos (SL) (Hartmann et al., 2007). Por todo esto, la dinámica de la organización de la membrana lipídica y sus implicaciones fisiológicas es actualmente un tema de gran interés, y se lo está abordando a través de enfoques multidisciplinarlos.

Los **lípidos mayoritarios** presentes en las membranas celulares son los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides (Fig. 1.1). Los **glicerolípidos** están basados en el glicerol (Fig. 1.1 A, sombreado color azul), al cual están unidas dos cadenas de ácidos grasos de 16-18 átomos de carbono de longitud (Fig. 1.1 A, sombreado color rosa). Estos ácidos grasos están unidos en la posición 1 y 2 del glicerol, formando así el diacilglicerol (DAG). Generalmente el ácido graso de la posición 2 posee una doble ligadura *cis*, produciendo una curvatura en la cadena hidrocarbonada, la cual disminuye el grado de empaquetamiento de la membrana. Un fosfato (P) puede unirse a la posición 3 del glicerol, formando ácido fosfatídico (PA), y este grupo fosfato puede estar unido a otro grupo (R) el

cual puede ser neutro, produciendo fosfatidil serina (PS) o fosfatidilinositol (PI), o a un grupo con carga acídica, o básica, formando fosfatidiletanolamina (PE) o fosfatidilcolina (PC).

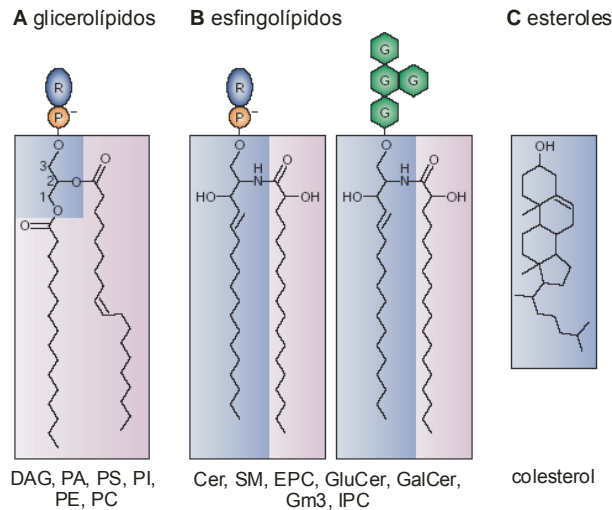


Fig. 1.1. Lípidos celulares mayoritarios. Adaptado de Holthuis y Levine (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 209-220.

Los **esfingolípidos** (SL) están basados en una base esfingosa de 18 átomos de carbono, la cual usualmente es esfingosina en animales (Fig. 1.1 B, sombreado color azul), con una cadena de ácido graso saturado de 16-26 átomos de carbono (Fig. 1.1 B, sombreado color rosa), el cual es unido por un enlace amida al nitrógeno, formando así ceramida (Cer). En la dihidroceramida, esfinganina reemplaza a la esfingosina (la esfinganina carece de la doble ligadura *trans* entre los carbonos C4 y C5). En plantas y hongos la fitoceramida contiene fitoesfingosina (C4-OH esfinganina) y ácidos grasos que generalmente están hidroxilados en el C2. En células animales, la cabeza grupal esfingosa (R) puede ser fosfatidilcolina, generando así esfingomielina (SM) o fosfoetanolamina, formando así etanolaminafosforil ceramida (EPC). Alternativamente, en el caso de los glicosfingolípidos (GSL), el grupo R puede ser glucosa, formando glucosilceramida (GluCer) o galactosa, formando galactosilceramida (GalCer), los cuales pueden ser posteriormente decorados con monosacáridos extras (G) generando un amplio rango de

GSL (como por ejemplo GM3). Los SL en plantas y hongos típicamente contienen en la cabeza grupal fosfoinositol, formando inositolfosforil ceramida (IPC) (van Meer y Holthuis, 2000, Holthuis y Levine, 2005). Los **esteroles** están basados en una estructura planar de cuatro anillos (Fig. 1.1 C), estando presente colesterol en mamíferos, ergosterol en hongos, stigmasterol y sitosterol en plantas.

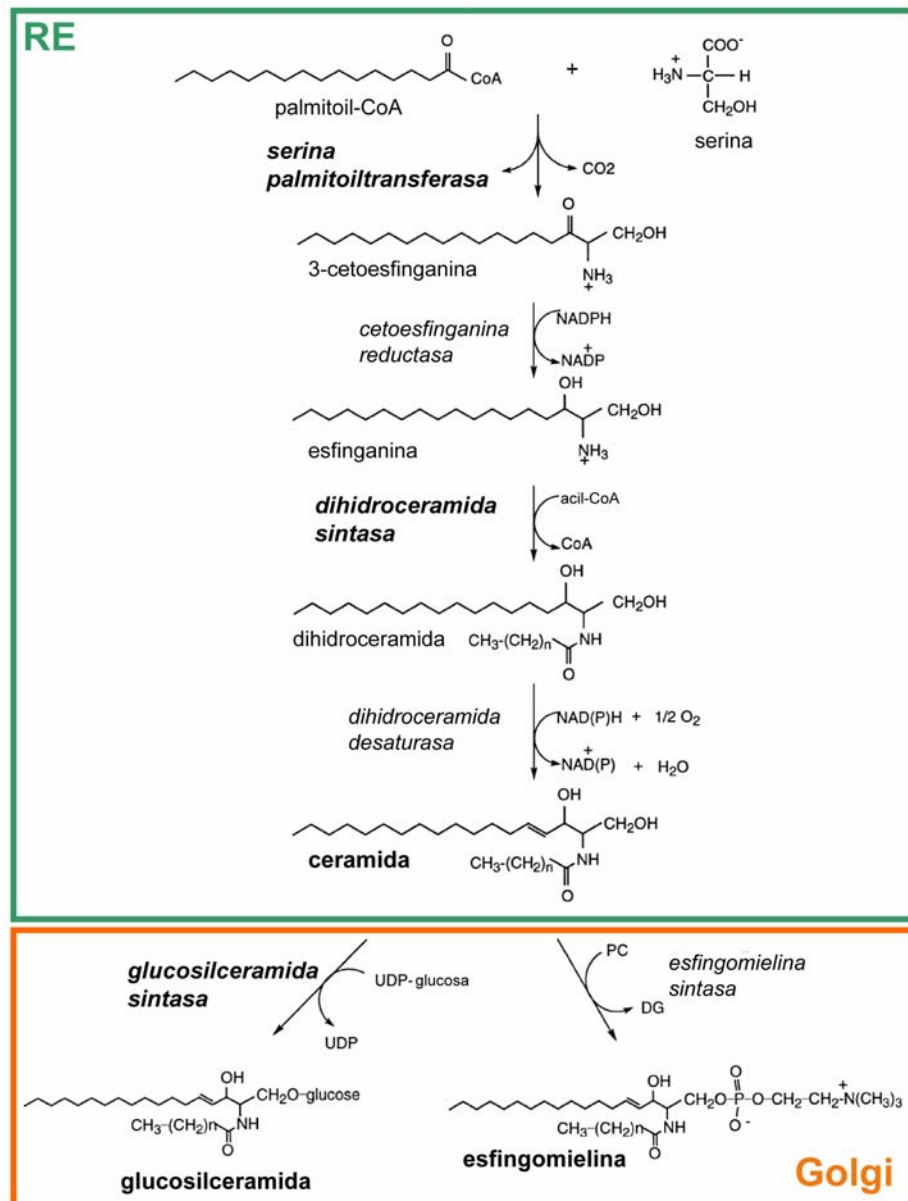


Fig. 1.2. Biosíntesis de SL. Adaptado de Perry (2002) *Biochim Biophys Acta* **1585**, 146-152.

La **biosíntesis de SL** en células eucariotas esta espacialmente separada de la biosíntesis de glicerolípidos y esteroides (Holthuis et al., 2001). Mientras que la de estos últimos es producida en el retículo endoplasmático (RE), la biosíntesis de SL se inicia en el RE y continúa en el complejo de Golgi (Fig. 1.2). El primer paso en la biosíntesis de SL es catalizado por la enzima serina palmitoil transferasa (SPT) (Merrill, 1983) y continúa en el lado citoplasmático del RE hasta la síntesis de ceramida (Mandon et al., 1992). La ceramida luego es translocada, por medio de fenómenos de transporte vesicular y no vesicular, al aparato de Golgi (Fukasawa et al., 1999; Hanada et al., 2003, Kudo et al., 2008, ver revisión en Hanada et al., 2007), y posteriormente convertida a SM en el lumen del complejo de Golgi por la enzima SM sintetasa o a GluCer por la enzima GluCer sintetasa en la cara citosólica del aparato de Golgi (Jeckel et al., 1992). Luego de la translocación al lado luminal del aparato de Golgi, GluCer es convertida a lactosilceramida y GSL complejos (por revisiones ver Holthuis et al., 2001; Merrill, 2002; Perry, 2002; Hanada, 2003).

Los SL son lípidos enriquecidos en la membrana plasmática, Fig. 1.3, en comparación a otras membranas intracelulares (Schwarzmann y Sandhoff, 1990). Más aún, la distribución de estos lípidos parece ser no homogénea en el plano de las membranas celulares. **Los lípidos de membrana muestran una distribución no aleatoria dentro y entre organelas que están conectadas mediante tráfico vesicular.** La membrana plasmática es rica en esteroides, SL y glicerolípidos saturados, los cuales, debido a su alta densidad de empaquetamiento, favorecen la rigidez e impermeabilidad de la membrana. Por ejemplo, la composición lipídica de la membrana plasmática de hígado de rata es 30-40 mol% colesterol, 10-15 mol% SM y GSL, 25 mol% PC, 15 mol% PE, 5 mol% PE y 5 mol% PI. También, la membrana plasmática posee una composición lipídica asimétrica entre cada lado de la misma (Devaux y Morris, 2004), los aminofosfolípidos son concentrados en la cara citosólica, y los SL en la cara extracelular de la misma. La topología del colesterol no está totalmente esclarecida, pero probablemente está determinada por su alta afinidad con los SL y los glicerolípidos saturados. La membrana del RE, por otro lado, posee una composición lipídica simétrica y primariamente contiene glicerolípidos no saturados que

hacen flexible a esta membrana, y por lo tanto, facilitan la incorporación de proteínas recientemente sintetizadas. Por ejemplo, la composición de la membrana del RE en hígado de rata es 5 mol% colesterol, 50-60 mol% PC, 25 mol% PE y 10 mol % PI (Holthuis y Levine, 2005).

La teoría de la balsas lipídicas, propuesta por Simons e Ikonen (1997), postula que los SL existen en microdominios segregados lateralmente formando “balsas” (rafts), un fenómeno que involucra una asociación preferencial con colesterol (ver revisiones de Simons y Toomre, 2000; Brown y London, 2000; Edidin, 2003a,b). Ha sido postulado que el alto grado de empaquetamiento entre SL y colesterol es el responsable de su resistencia a extracción con detergentes (Ahmed et al., 1997; Brown y London, 2000; London y Brown 2000), dando así la definición operacional de las llamadas membranas resistentes a la extracción con detergentes (DRMs, *detergent-resistant membranes*), y su propiedad de flotación en fracciones “livianas” en gradientes de sacarosa sometidos a centrifugación. Estos microdominios de membrana han sido postulados a concentrar moléculas de señalización y receptores en regiones particulares de la superficie celular (Brown y London, 2000). Marchand et al. (2002) ha recientemente demostrado que el AChR y la proteína rapsina son recuperados en DRMs en células COS sometidas a extracción con Tritón X-100 en frío.

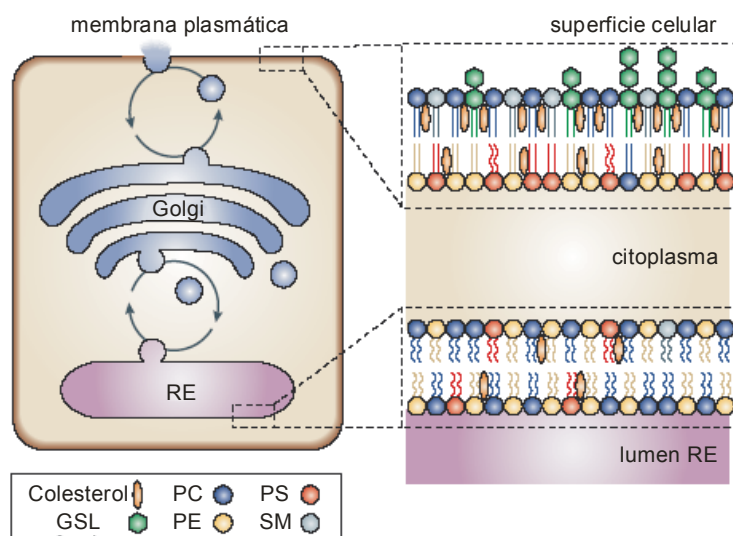


Fig. 1.3. Distribución subcelular de lípidos de membrana. Adaptado de Holthuis y Levine (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 209-220.

De lo expuesto se deduce que existe un **gradiente de SL a través de la vía secretoria**. Aunque primariamente los SL son ensamblados en el Golgi, los SL son enriquecidos en la membrana plasmática y membranas endocíticas celulares, mientras solo bajas cantidades de SL son encontrados en el RE (Fig. 1.3) (Holthuis et al., 2001). Comprender como los lípidos de la membrana plasmática logran esa distribución no aleatoria en las membranas celulares es actualmente un gran desafío de la biología celular.

Una de las principales dificultades para comprender **cómo los lípidos son transportados y vehiculizados** dentro de la célula es que carecen de las señales de direccionamiento que poseen las proteínas para dirigir su destino intracelular. Los lípidos de membrana están sujetos a tres clases de movimiento: a) difusión lateral en el plano de la membrana, b) flip-flop a través de la membrana, c) difusión fuera de la membrana a la fase acuosa, seguida de inserción dentro de otra membrana (ver revisiones van Meer y Holthuis, 2000; van Meer y Sprong 2004; Riezman y van Meer, 2004; Holthuis y Levine, 2005)

a) Difusión o movimiento lateral. Los lípidos se mueven en el plano lateral de la membrana con coeficientes de difusión que son 10-100 veces mayores que los hallados para la mayoría de las proteínas de membrana. Los lípidos pueden difundir cubriendo un área de $0.1-1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ en una célula con típicamente $10-20 \mu\text{m}$ en cada dimensión. Como consecuencia de este alto grado de difusión, los lípidos se podrían equilibrar entre distintas organelas conectadas por tráfico vesicular. Sin embargo, esta mezcla no se observa, y las células son capaces de mantener una única composición lipídica y proteica en cada una de sus organelas. De esta manera, el enriquecimiento de SL y colesterol en la membrana plasmática respecto al RE no se debe a su síntesis en la membrana plasmática o su hidrólisis en el RE. Estos lípidos, por lo contrario, están sujetos a un exhaustivo proceso de direccionamiento intracelular.

b) Movimiento trans-membrana. El movimiento de los lípidos entre las dos caras de la membrana se lo conoce como flip-flop. Este movimiento, en sistemas modelo, es lento para lípidos que poseen una cabeza o grupo polar, y mucho más rápido para lípidos neutros. Este transporte toma segundos a minutos para colesterol o ceramida, y horas para

PC, SM y GSL. Sin embargo en el RE existen flipasas que permiten el movimiento de los lípidos recién sintetizados en la cara citosólica hacia la cara luminal a una velocidad similar a la de su producción, permitiendo así una composición simétrica de esta membrana. Este tipo de flipasas funcionan independientemente de la energía metabólica. En cambio, en la membrana plasmática, donde la PS y PE están distribuidas casi exclusivamente del lado citoplasmático, esta distribución es mantenida por flipasas dependientes de ATP, denominadas translocasas (ver revisión Raggars et al., 2000).

c) Intercambio monomérico. Los lípidos pueden intercambiarse entre membranas como simples monómeros. Este proceso es relativamente rápido para lípidos de simple cadena o cadena corta, pero prácticamente nulo para lípidos con dos cadenas hidrocarbonadas, como PC y GSLs. Sin embargo, este proceso de transporte es sumamente importante para organelas que no están conectadas a través de tráfico vesicular, como es el caso de las mitocondrias. Actualmente se está reconsiderando al transporte monomérico ya que se ha documentado que el transporte de fosfolípidos desde el RE hasta la membrana plasmática prosigue a pesar de haberse inhibido las vías de transporte vesicular. Un caso particular de este transporte es el de ceramida desde el RE hasta el *trans* Golgi (Funato y Riezman, 2001; Hanada et al., 2003) y más recientemente el hallazgo de una proteína que transporta GluCer hacia el RE, FAPP2 (Halter et al., 2007; D'Angelo et al., 2007 y ver comentarios de Levine, 2007).

Dada la bidireccionalidad del tráfico vesicular que existe entre el RE y la membrana plasmática, es de suma importancia comprender como es mantenido, o qué es lo que determina, el **gradiente lipídico**, principalmente de colesterol y SL (Fig. 1.3), entre la membrana plasmática y el RE (ver revisión Nickel et al., 1998). El colesterol, sintetizado en el RE, puede moverse a través de la membrana y entre membranas adyacentes como monómero. Su localización probablemente se deba a su afinidad por los SL y glicerolípidos saturados. Los SL, por su parte, empiezan su síntesis en el RE, culminando la misma en el Golgi. Para mantener el gradiente de SL hacia la membrana plasmática, éstos deberían incluirse en transportadores anterógrados y ser excluidos de los retrógrados. De acuerdo al

modelo de maduración de las cisternas (Glick et al., 1997), un gradiente positivo de SL hacia la membrana plasmática podría lograrse si estos lípidos son obligados a permanecer en las cisternas donde fueron sintetizados incluyéndose principalmente en el transporte anterógrado (ver revisión Nickel et al., 1998). En apoyo a esta hipótesis, las vesículas COPI contienen reducidas cantidades de SL y colesterol en comparación a las membranas de Golgi que les dieron origen (Brügger et al., 2000). Se han propuesto modelos para explicar como se produciría el **direccionamiento/partición diferencial de lípidos** (Holthuis y Levine, 2005). Se ha postulado que la maquinaria generadora de vesículas es reclutada a microdominios lipídicos separados, o que la generación de curvatura (producto de cubiertas o proteínas motoras) induce una partición diferencial de lípidos que naturalmente tienden a formar membranas rígidas y planas. Estudios de microscopía óptica de alta resolución han demostrado que la formación de microdominios lipídicos pueden disparar eventos de fusión y fisión de membranas, con lo cual existiría la posibilidad de que la célula pueda explotar estas características de inmiscibilidad lipídica para dirigir la formación de vesículas en membranas biológicas (Baumgart et al., 2003; 2007).

La exclusión de SL y colesterol de las vesículas COPI (Brügger et al., 2000) sería la responsable de su progresiva acumulación en las cisternas en maduración, y este proceso probablemente estaría asociado a la depleción de las mismas en glicerolípidos no saturados (Schneiter et al., 1999). Este proceso influiría notablemente en las propiedades biofísicas de estas membranas impartiendoles características únicas. El enriquecimiento en colesterol y SL a lo largo de la vía secretoria tendría alguna relación con el aumento del espesor de las membranas desde el RE hasta la membrana plasmática (Mitra et al., 2004). Existen teorías que explican el direccionamiento de proteínas estableciendo una relación entre el espesor de la membranas de la vía exocítica, reguladas por el colesterol, y la longitud de los segmentos transmembrana (Bretscher y Munro 1993), pero las propiedades intrínsecas de la membrana, más que su espesor, estarían involucradas en este proceso (Lundbaek et al., 2003; Mitra et al., 2004). El direccionamiento de proteínas es determinado principalmente por señales o motivos de tráfico en la secuencia proteica, principalmente en las proteínas

basolaterales. Para las proteínas apicales, en cambio, se cree que interacciones débiles entre SL y glicoproteínas juegan un rol importante en el destino de las mismas (Ikonen y Simons, 1998; Aït Slimane y Hoekstra, 2002; Schuck y Simons, 2004; Rodriguez-Boulan et al., 2005)

Se han reportado **enfermedades neurodegenerativas** asociadas a alteraciones en la biosíntesis de SL. La *enfermedad de Alzheimer* es el desorden neurodegenerativo más común. Los cambios histopatológicos característicos en pacientes con Alzheimer son la presencia de placas neuríticas extracelulares compuestas de péptido β -amiloide ($A\beta$) y ovillos intracelulares neurofibrilares formados por la proteína tau, anormalmente fosforilada. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son demencia progresiva e irreversible, deterioro cognitivo y pérdida de la memoria (Selkoe, 2001; Sisodia y St George-Hyslop, 2002; Masters et al., 2006; Hartmann et al., 2007). El principal componente de los depósitos amiloides extracelulares, $A\beta$, es generado por un corte proteolítico secuencial de la proteína precursora del amiloide (APP, por *amyloid precursor protein*). Existen dos vías de procesamiento de la APP, una no patológica (en la cual el APP es cortado por la α -secretasa) y otra patológica. En esta última, el fragmento generado por el procesamiento inicial del APP por la β -secretasa es clivado por la γ -secretasa generando el $A\beta$. Se observó que los SL disminuyen la producción de $A\beta$ mediante inhibición de la γ -secretasa (Sawamura et al., 2004; Grimm et al., 2005). Inhibición de SMasas, enzimas que degradan SM, conducen a un aumento de SM y a una disminución de $A\beta$ (Grimm et al., 2005). El patrón de GSL en cerebros de pacientes de Alzheimer está alterado (Kracun et al., 1990). El gangliosido GM1, al igual que el colesterol, se une al $A\beta$, y se postula que complejos GM1/ $A\beta$ pueden actuar como “semillas” para formación y depósito de $A\beta$. En presencia de GM1 se observó un aumento de la actividad de la γ -secretasa y una disminución de la actividad de la α -secretasa, lo cual resultó en un aumento en la producción de $A\beta$ de 10 veces (Zha et al., 2004). Inhibición de la enzima GluCer sintasa disminuyó la producción de $A\beta$ (Tamboli et al., 2005). El colesterol juega también un rol importante en la patogénesis de

la enfermedad de Alzheimer (ver revisión Hartmann et al., 2007), ya que se observó que este lípido estimula la producción de A β mediado por la γ secretasa. Inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, HMGR, enzima limitante en la biosíntesis de colesterol, reduce los niveles de A β 40 y A β 42 (este posee mayor hidrofobicidad y es la especie predominante en placas seniles). En base a estas relaciones, Hartmann et al. (2007) postulan un ciclo de regulación entre SL, colesterol y el procesamiento de APP (Fig. 1.4).

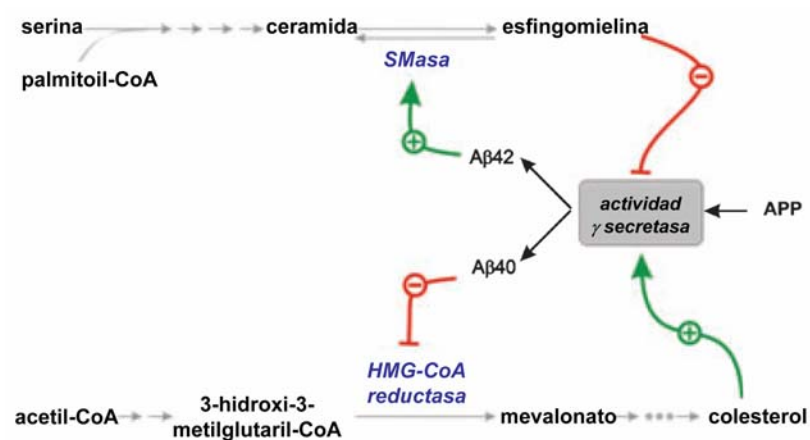


Fig. 1.4. Interrelación entre SL, colesterol y el procesamiento de APP. Hartmann et al. (2007) *J. Neurochem.* **103**, Suppl. 1, 159–170.

La neuropatía sensorial hereditaria tipo 1 (HSN1, por *hereditary sensory neuropathy type 1*) es una neuropatía periférica debilitante que predominantemente afecta la parte distal de las extremidades. A medida que la enfermedad progresa, se produce degeneración de las neuronas motoras con una denervación secundaria, atrofia y debilidad de los músculos de las extremidades. La forma de herencia de esta enfermedad es autosómica dominante (Whitaker et al., 1974; Dyck, 1993). Al menos tres variantes génicas están involucradas en ésta enfermedad. Uno de ellos, el defecto genético en el locus 9q22 de familias con HSN1, esta asociado con una mutación sin sentido en el gen SPTLC1 (Bejaoui et al., 2001;

Dawkins et al., 2001). SPTLC1 codifica la subunidad LCB1 de la SPT. Esta enzima se expresa en prácticamente todos los tejidos y su actividad se localiza en el RE (ver revisión de Hanada, 2003). La SPT eucariota se cree que es un heterodímero, formada por las subunidades LCB1 y LCB2, los cuales son expresadas por los genes SPTLC1 y SPTLC2, respectivamente (Hanada et al., 2000a). Bejaoui et al. (2002) examinaron las mutaciones C133Y y C133W, identificadas en familias con HSN1 (Bejaoui et al., 2001; Dawkins et al., 2001) y encontraron que en linfoblastos de pacientes con HSN1, las mutaciones no afectaron los niveles basales de las subunidades LCB1 y LCB2, pero si provocaron una disminución en la actividad de la enzima SPT (SM, ceramida y GSL disminuyeron un 43% en linfoblastos de pacientes afectados, cuando se los comparó con controles sanos). Transfección de células CHOK1 que carecen de la subunidad LCB1 (Hanada et al., 1998) con las subunidades mutadas no pudieron rescatar el fenotipo de estas células. Sobre-expresión de las subunidades mutadas (LCB1C133Y y LCB1C133W) en células CHOK1 tipo salvaje reprimió la actividad de la SPT, a pesar de tener LCB1 endógena normal. Mediante ensayos de inmunoprecipitación, estos autores hallaron que las subunidades mutadas, al igual que la subunidad normal, interactúan con la subunidad LCB2. Con estos resultados los autores concluyen que las mutaciones presentes en la subunidad LCB1, identificadas en pacientes con HSN1, confieren efectos dominantes negativos sobre la actividad de la SPT. Recientemente McCampbell et al. (2005) desarrollaron ratones transgénicos que sobre-expresan SPTLC1 (tipo salvaje) o la mutación SPTLC1(C133W). Los ratones que sobre-expresan la subunidad mutada desarrollan gran parte de la sintomatología presente en pacientes con HSN1. Hallaron que en estos ratones la mutación SPTLC1(C133W) posee un efecto dominante negativo sobre la actividad de la SPT (al igual que lo demostró *in vitro* Bejaoui et al., 2002). McCampbell et al. (2005) observaron que estos animales desarrollan un progresivo daño neuronal, con disminución en la expresión de receptores de sodio sensibles al voltaje tipo 1.8 (Nav1.8) y de receptores termosensitivos (TRP).

La *epilepsia progresiva con retardo mental* (EPMR, por *progressive epilepsy with mental retardation*) corresponde a un grupo de enfermedades neurodegenerativas hereditarias en la cual el desarrollo temprano del individuo es normal y a los 5-10 años de vida comienza un deterioro mental progresivo. Se detectó una mutación en el gen CLN8 en pacientes con EPMR (Ranta et al., 1999), el cual codifica para una proteína transmembrana que se localiza en el RE y el compartimiento intermedio ER-Golgi, y que posee una señal de retención para el RE (Lonka et al., 2000, 2004). Este gen fue asociado recientemente a una familia de proteínas con dominio homólogo al TLC, las cuales poseen funciones en síntesis de lípidos y transporte (Winter y Ponting, 2002). Miembros de esta familia están involucrados en translocación de proteínas recientemente sintetizadas a través del RE, exportación de proteínas ancladas a GPI desde RE y síntesis de ceramida en levaduras así como en células de mamífero (Hegde et al., 1998; Barz y Walter 1999; Heinrich et al., 2000; Guillas et al., 2001; Schorling et al., 2001; Venkataraman et al., 2002; Riebeling et al., 2003). En cerebros de pacientes con estados avanzados de EPMR se encontró niveles reducidos de ceramida y GSL (galactosilceramida y lactosilceramida), así como un aumento en glicerolípidos con cadenas hidrocarbonadas poli-insaturadas (Hermansson et al., 2005). Los autores proponen que estos cambios en niveles de lípidos pueden provocar alteraciones en la estabilidad de las membranas, tráfico vesicular, neurotransmisión, y estos factores en conjunto contribuirían a la progresión de la patogénesis de la EPMR.

Existe evidencia de que **el metabolismo de los SL esta relacionado con el tráfico y destino de varias proteínas**. Rosenwald et al. (1992) han sugerido que el transporte de proteínas a través de la vía secretoria puede estar acoplado a la biosíntesis de SL. En forma similar, Ledesma et al. (1998), mostraron que en neuronas totalmente polarizadas HA y Thy-1 interactúan con balsas de colesterol y SL y que el destino incorrecto de la proteína axonal Thy-1, pero no de una proteína dendrítica, se produce en células deprivadas de SL. Sprong et al. (2001) mostraron que el direccionamiento de la enzima tirosinasa a los melanosomas es dependiente de GSL. Wang y Chang (2002) y Lee et al. (2002) demostraron que el tráfico y oligomerización de Pma1 a la membrana plasmática en

levaduras es dependiente del metabolismo de SL. En cultivos de neuronas de hipocampo, la depleción de colesterol y SL conduce a una inestabilidad en los receptores AMPA de la superficie celular, con lo cual se pierden sinapsis (inhibitorias y excitatorias) así como espinas dendríticas (Hering et al., 2003). En la conversión de la proteína prionica celular (PrP(C)) a la forma patológica “scrapie” (PrP(Sc)), lo cual es el paso central de la *encefalopatía espongiiforme transmisible*, es importante su distribución en dominios de membrana resistentes a la extracción con detergentes (DRMs) o rafts de membrana (Mattei et al., 2002; Brügger et al., 2004; Botto et al., 2004). La forma inmadura de PrP(C), ya se asocia con rafts en el RE. Interesantemente, a diferencia de la proteína madura, la forma inmadura diglicosilada posee diferente susceptibilidad a la depleción de colesterol y SL. El colesterol es importante para la cinética de maduración y la conformación de la proteína, a diferencia de lo que ocurre con los SL (Sarnataro et al., 2004). Harikumar et al. (2005) demostraron que el receptor de colecistoquinina (CCK) también posee un comportamiento diferencial ante la depleción de SL o colesterol. Los SL participan principalmente en el tráfico de la proteína, mientras que el colesterol es importante para la función de la misma.

Recientemente se sugirió que **la formación de rafts puede asistir, o aún preceder, el agrupamiento (*clustering*) del AChR vía rapsina** en la membrana postsináptica (Bruses et al., 2001; Marchand et al., 2002). En la membrana postsináptica de *Torpedo* no hay un enriquecimiento específico en gangliosidos en la interfase lípido-proteína del AChR (Mantipragada et al., 2003). De esta manera, una interacción selectiva que podría dirigir la proteína a rafts vía estos GSL, o servir como un sitio de nucleación para la formación de rafts, parece estar ausente en el AChR. La pérdida de asociación con gangliosidos no necesariamente excluye que otros SL pueden participar en la formación de estos dominios. En efecto, estudios recientes indican que existe una afinidad moderada de una SM fluorescente por la membrana que rodea el AChR (Bonini et al., 2002).

En función de analizar si los SL están asociados o interactúan con el AChR, en el laboratorio se desarrolló un sistema no polarizado de células deficientes en la biosíntesis de

SL y que expresan en forma heteróloga el AChR. Así, la línea celular SPB-1/SPH⁻, es una línea celular derivada de las células parentales CHO-K1, desarrollada por Hanada et al. (1990) que posee una mutación termosensible en la primer enzima de la vía biosintética de SL, la SPT. Con este sistema, se demostró en nuestro laboratorio que estas células expresan una menor cantidad de AChR en membrana plasmática cuando son crecidas a temperaturas no permisivas (Roccamo et al., 1999).

Así nosotros primero investigamos los efectos de la depleción de SL en la línea celular SPB-1/SPH⁻, inducido por la temperatura de crecimiento y por las condiciones del medio de cultivo, en la distribución del AChR en la superficie celular por medio de microscopía de fluorescencia. Posteriormente, y con la finalidad de determinar el papel preciso que tienen los SL en el tráfico y expresión en membrana plasmática del AChR, nosotros usamos la línea parental, CHO-K1/A5, en la cual provocamos la inhibición de la biosíntesis de SL por diferentes agentes farmacológicos (ISP-1, FB-1 o PDMP), ver Fig. 1.5. En este sistema obtuvimos resultados que reprodujeron los observados en las células SPB-1/SPH⁻, sugiriendo que la llegada del AChR a membrana plasmática esta alterada cuando se produce un bloqueo en la biosíntesis de SL y la resultante alteración en la relación AChR en membrana plasmática/AChR intracelular es revertida a los niveles normales cuando se agrega SM exógena al medio de cultivo. Además, nosotros pudimos demostrar que la proporción de AChR no ensamblado aumenta en las células que poseen alterada la biosíntesis de SL. También observamos que parte del AChR se encuentra en DRMs en membranas del RE y que esta asociación se ve alterada en células que fueron tratadas con las drogas inhibitorias. Conjuntamente, **los resultados obtenidos indican que existe una estrecha relación entre el AChR y los SL ya a nivel de la vía secretoria temprana, en el RE, y que estos lípidos son cruciales para la correcta biogénesis del AChR.**

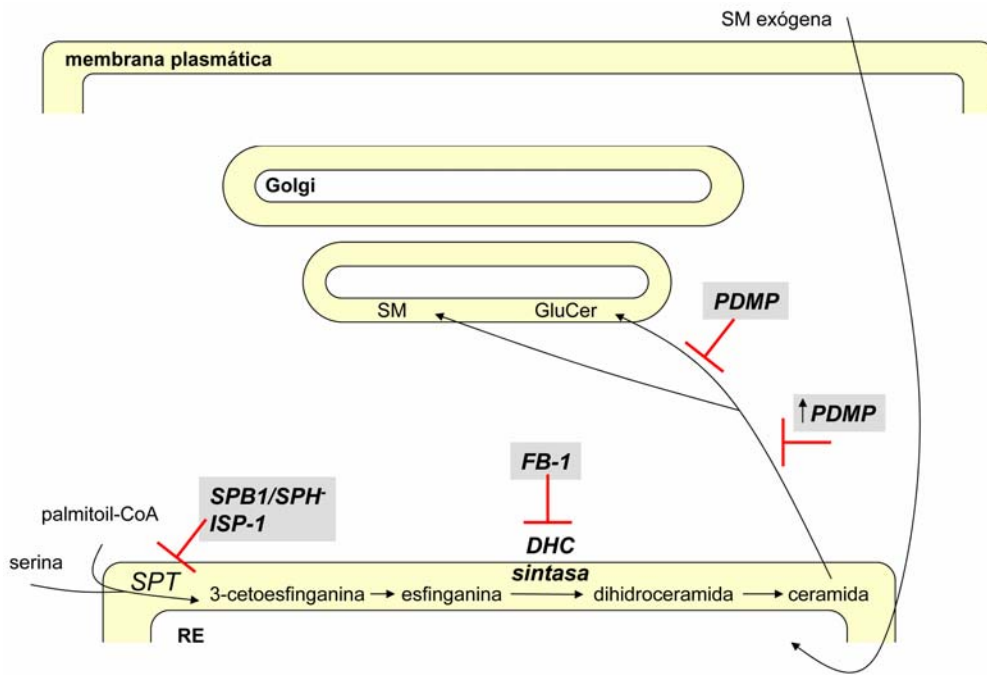


Fig. 1.5. Manipulación del metabolismo de SL en células CHO-K1/A5 para el estudio de la relación entre estos lípidos y el AChR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Medio Nutridoma-SP (Nutridoma) proviene de Boehringer Mannheim (Alemania). α -bungarotoxina-[I¹²⁵] (α BTX, 120 μ Ci/ μ mol) es de New England Nuclear (PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc., Waltham, MA, EEUU). α BTX nativa, carbamilcolina (Carb.), SM, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS) provienen de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). DL-*threo*-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol.HCl (PDMP), Fumonisina B-1 (FB-1) y Miriocina (ISP-1) son de Biomol Res. Laboratorios (Plymouth Meeting, PA, EEUU). α BTX conjugada con Alexa Fluor⁴⁸⁸ (α BTX-Alexa⁴⁸⁸), α BTX conjugada con Alexa Fluor⁵⁹⁴ (α BTX-Alexa⁴⁸⁸), anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con Alexa Fluor⁴⁸⁸ o Alexa Fluor⁵⁴⁶, ER-trackerTM Blue-White DPX (ER-Tracker), LysoTracker[®] Red DND-99, 6-((N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoil)-esfingosina (NBD C₆-ceramida), provienen de Molecular Probes (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EEUU). Anticuerpo policlonal de conejo anti-calnexina y anticuerpo monoclonal de ratón anti-sintaxina 6 son de Stressgen Biotechnologies Corp. (Victoria, Canada). PolyFect transfection Reagent proviene de Qiagen (Hilden, Alemania). LipofectamineTM Transfection Reagent proviene de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EEUU). El anticuerpo monoclonal de ratón mAb 210, el cual reconoce la región inmunogénica mayor en la subunidad α del AChR fue gentilmente provisto por el Dr. J. Lindstrom, University of Pennsylvania School of Medicine (PA, EEUU). El anticuerpo contra la subunidad δ del AChR de ratón, MA3-043, proviene de ABR-Affinity BioReagents (Golden, CO, EEUU). El anticuerpo contra la proteína disulfuro isomerasa (PDI) fue gentilmente provisto por el Dr. D. Ferrari, Dept. Neurobiology, Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Alemania.

Células sensibles a la temperatura en el metabolismo de SL (SPB-1/SPH⁻) e inhibición de la biosíntesis de SL en células CHO-K1/A5 mediante el empleo de ISP-1, FB-1 y PDMP

Las células SPB-1/SPH⁻ se crecieron en medio Ham's F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) ("medio completo") por 48 h a la temperatura semipermissiva, 37°C. Posteriormente se crecieron en medio delipidado, Nutridoma, con 0.1% de SFB, a 37°C o 39°C por 24 h. La biosíntesis de SL en células CHO-K1/A5 fue inhibida mediante el empleo de diferentes drogas. Estas células primero se crecieron 48h en medio completo y luego 24 h en medio Nutridoma conteniendo 50 µM FB-1, 10-50 µM PDMP, o 5-40 µM ISP-1. El solvente etanol (vehículo de las drogas PDMP e ISP-1), fue mantenido por debajo del 0.1% en el medio de cultivo, tanto en células controles como en células tratadas con las drogas inhibitorias.

Transfecciones

El plásmido que codifica para la Proteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular conjugada con la Proteína Fluorescente Verde (VSVG-GFP) fue amablemente cedido por el Dr. Alfonso Gonzalez, Pontificia Universidad Católica de Chile. Para esto, las células CHO-K1/A5 se crecieron en medio completo por 24 h. y luego se transfectaron con 1.5 µg de DNA por cápsula de 35 mm usando un equipo de transfección, PolyFect transfection Reagent, por 24 h. de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En células que fueron tratadas con PDMP, el inhibidor, el DNA y los reactivos de transfección fueron incubados conjuntamente.

La transfección de VSVG-GFP en las células SPB-1/SPH⁻ se realizó de forma similar. Básicamente, estas células fueron crecidas en medio completo por 48 h a la temperatura semipermissiva, 37°C. Se transfectaron tal como mencionamos anteriormente y posteriormente se incubaron en medio Nutridoma, con 0.1% de SFB, a 37°C o 39°C por 24 h.

El plásmido que codifica para la proteína Rab 1b conjugada con la Proteína Fluorescente Verde (Rab 1b-GFP) fue amablemente cedido por La Dra. María Isabel Colombo, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Para esto, las células CHO-K1/A5 se crecieron en medio completo por 24 h. y luego se transfectaron con 1 μ g de DNA por cápsula de 35 mm usando un equipo de transfección, Lipofectamine™ Transfection Reagent de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Estas células se trataron 24 h posteriores a la transfección con PDMP 50 μ M y se incubaron 24 h más en presencia del inhibidor.

Tratamiento con SM exógena

El agregado de SM exógena a las células en cultivo fue realizado con un protocolo similar al utilizado por Furuya et al. (1998). Se usaron concentraciones de 5-10 μ M de SM y el vehículo fue etanol:decano (98:2 vol:vol), el cual no superó 0.16%.

Microscopía de Fluorescencia

Para observar el AChR en la membrana plasmática, las células crecidas sobre cubreobjetos se lavaron con PBS (150 mM de NaCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 10 mM de NaH₂PO₄, pH 7.4) o Medio 1 (M1) (140 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, pH 7.4), se marcaron con α BTX-Alexa⁴⁸⁸ por 1 h a 4°C, se lavaron nuevamente para eliminar el exceso de toxina no unida, y se montaron en portaobjetos para su observación *in vivo*. Para la visualización del AChR intracelular, los AChR de la membrana plasmática se bloquearon con exceso de α BTX nativa a 4°C. Las células entonces se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 20-30 min. a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron 20 min con CINH₄, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1%, y se marcaron con α BTX-Alexa⁵⁹⁴, o, alternativamente, con el anticuerpo mAb 210 seguido del anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Alexa⁴⁸⁸.

Para visualizar el RE, las células se incubaron con ER-Tracker por 40-45 min. en incubador a 37°C, se lavaron con PBS o M1, se incubaron en exceso de α BTX nativa a 4°C para bloquear los AChR de la superficie celular. Las células se fijaron, incubaron con CINH_4 , permeabilizaron con Tritón X-100 y se marcaron con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ (o anticuerpo mAb 210) como mencionamos anteriormente. Los anticuerpos anti-calnexina o anti-PDI se emplearon para marcar el RE. El anticuerpo anti-sintaxina 6 fue usado para marcar el *trans*-Golgi y red *trans*-Golgi (TGN, por *trans-Golgi network*). Los anticuerpos secundarios derivatizados con Alexa Fluor (IgG anti-conejo marcado con Alexa⁴⁸⁸ o IgG anti-ratón marcado con Alexa⁴⁸⁸) se aplicaron conjuntamente con α BTX-Alexa⁵⁹⁴. Alternativamente, el AChR fue identificado usando el anticuerpo mAb 210 seguido de su anticuerpo secundario.

Para visualizar los lisosomas, las células se incubaron con LysoTracker por 30 min. en incubador a 37°C, se lavaron con PBS o M1, se incubaron en exceso de α BTX nativa a 4°C para bloquear los AChR de la superficie celular. Las células se fijaron, incubaron con CINH_4 , permeabilizaron con Tritón X-100 y se marcaron con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ como mencionamos anteriormente.

Para visualizar VSVG-GFP o Rab 1b-GFP, las células CHO-K1/A5 se observaron vivas, o fueron sometidas a fijación, como citamos anteriormente.

Las células se examinaron con microscopios de fluorescencia Nikon Eclipse E-600 o E-300 (Nikon, Melville, NY, USA). Las imágenes se capturaron por medio de cámaras CCDs termostáticamente controladas, a -10°C, ST-7 (Santa Barbara Instrument Group, Santa Barbara, CA, USA) manipulada mediante el programa CCDOPS (Santa Barbara Instrument Group, Santa Barbara, CA, USA) o una cámara Hamamatsu Orca-ER (Hamamatsu Photonics, K.K., Hamamatsu, Japón) manipulada mediante el programa Metamorph (Meta Imaging Software, Downingtown, PA, USA). Imágenes de microscopía confocal fueron tomadas con un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania).

Determinación de la cantidad de AChR desensamblado mediante microscopía de fluorescencia

Para determinar la proporción de AChR intracelular ensamblado/desensamblado nosotros empleamos un método simple basado en la inhibición del ligamiento del antagonista α BTX al AChR. Para esto, los AChR de superficie fueron bloqueados con α BTX nativa (1h. a 4°C), las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con 10 mM de Carb. por una hora a temperatura ambiente, y posteriormente incubadas con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ en presencia o no de Carb. Células controles para AChR intracelular total se incubaron con PBS o M1 en lugar del buffer conteniendo exceso de Carb. Las mediciones cuantitativas de la intensidad de fluorescencia de α BTX fluorescente en presencia o ausencia de Carb. proveen así un medio para estimar la cantidad de subunidades α desensambladas (~ cantidad de AChR desensamblado).

Microscopía de fluorescencia cuantitativa

Las imágenes de fluorescencia fueron analizadas empleando el programa Scion Image, versión 4.0.2 (Scion Corp., Frederick, MD, USA). Las intensidades de fluorescencia fueron obtenidas de imágenes de 16 bits delimitando áreas de membrana plasmática (AChR y VSVG-GFP en membrana plasmática) o delimitando enteramente la célula (AChR intracelular, AChR desensamblado o VSVG-GFP total). Este análisis se realizó en diferentes células, en 10-30 campos diferentes, para cada condición experimental. La intensidad de fluorescencia obtenida como se describe anteriormente fue corregida por la intensidad de fluorescencia inespecífica, la cual se obtuvo de áreas adyacentes a las células (señal de fondo). Las intensidades de fluorescencia promedio para cada condición experimental fueron obtenidas a partir de la elección al azar de distintas células en imágenes de contraste de fase. Los resultados se expresan como el promedio \pm DS de tres o más experimentos independientes. Con propósitos de ilustración, las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe Photoshop 7 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA), escaladas con los

mismos parámetros, y pseudo coloreadas de acuerdo a la longitud de onda de emisión de la sonda fluorescente correspondiente.

Análisis de intermediarios del AChR mediante gradientes de densidad de sacarosa

Este ensayo fue realizado esencialmente como describe Kreienkamp et al. (1995). Células controles y tratadas con PDMP se incubaron 1h con α BTX con la finalidad de bloquear los AChR de la superficie celular. Posteriormente se permeabilizaron con buffer conteniendo 0.5% de Saponina (10 mM de Fosfato de Sodio, 10 mM EDTA, 0.1% SAB). Las células se marcaron con un exceso de α BTX-[I¹²⁵] por 1h a temperatura ambiente, se lavaron con M1, y finalmente se solubilizaron con 600 μ l de buffer de homogenización (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.5, conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas) por 3 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 g en función de eliminar el material particulado y el sobrenadante se sembró sobre un gradiente discontinuo de sacarosa del 3%-20% (el cual contiene el mismo buffer que las muestras). Las muestras fueron centrifugadas en un rotor Beckman SW41 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) por 22 h a 200000 g. Finalmente las muestras se colectaron, reuniéndolas desde la parte superior del gradiente, en fracciones de 250 μ l y contadas en un contador γ .

Experimentos de ligazón de superficie con α BTX-[I¹²⁵]

La expresión en superficie de AChR fue también estudiada mediante el uso de α BTX radioactiva. Para esto, cultivos con un 60% de confluencia se incubaron con un exceso de α BTX-[I¹²⁵] en el medio de cultivo por 1h. a 4°C. Las células fueron posteriormente lavadas con PBS o M1 y colectadas en NaOH 0.1N. La radioactividad fue medida utilizando un contador γ con una eficiencia del 80%. La unión inespecífica de la toxina radioactiva a las células en cultivo fue calculada mediante la preincubación de las células con 10 μ M de α BTX nativa o 2 mM de Carb. antes de la incubación con α BTX-[I¹²⁵].

Análisis lipídico

Las células CHO-K1/A5 se crecieron en medio completo por 48 h. Posteriormente, se trataron por 1h con 10-50 μ M de PDMP en medio Nutridoma con 0.1% de SFB (las células controles se incubaron solo con el vehículo de la droga). Luego, las células fueron incubadas por 24 h con NBD-C₆-ceramida en presencia de 10-50 μ M de PDMP. Finalmente, las células se desprendieron por raspaje con espátula y los lípidos fueron extraídos con cloroformo/metanol (CHCl₃/CH₃OH) 2:1 (vol./vol.) (Folch et al., 1957). Los extractos lipídicos fueron analizados esencialmente como en Lipsky y Pagano (1983) con algunas modificaciones: la cromatografía en capa fina (TLC, por *thin-layer chromatography*) se desarrolló con CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:25:4 por vol.) y con estándares apropiados. Los lípidos fluorescentes se visualizaron utilizando iluminación UV. Las manchas correspondientes a las diferentes especies lipídicas se rasparon y extrajeron de la sílica según Arvidson (1968). Finalmente los lípidos fluorescentes se cuantificaron empleando un espectrofluorímetro SLM 4800 ISC (SLM Instruments, Urbana, IL, USA).

Estudio de las características biofísicas de la membrana del RE

Espectroscopia de fluorescencia. Los liposomas multilaminares se prepararon mezclando cantidades apropiadas de lípidos individuales con la finalidad de obtener sistemas lipídicos de composición definida (PS:PC 50:50; PS:PC:SM 45:45:10), conjuntamente con la sonda fluorescente ER-TrackerTM Blue-White DPX. Esta mezclas, teniendo como solvente cloroformo: metanol, se evaporaron, con rotación, bajo corriente de N₂. Las muestras una vez evaporadas, se colocaron 1h más bajo flujo de N₂ con la finalidad de eliminar cualquier resto de solvente. En este estado los lípidos se encuentran formando una película muy fina sobre la pared del tubo. A cada muestra se le agregó buffer PBS hasta una concentración de lípido de 0.5 mg/ml, se calentaron las muestras hasta 45 °C, se vortexearon y finalmente se sometieron a ultrasonificación por 30 min. Las suspensiones lipídicas obtenidas hasta aquí se llevaron a una concentración final de lípidos de 50 μ M, la

concentración final de la sonda fluorescente fue de 1 μM . Los espectros de emisión fueron obtenidos empleando un espectrofluorímetro SLM 4800 ISC, con una lámpara de Mercurio/Xenón de 200W. Los espectros de emisión se colectaron empleando cubetas de Cuarzo de 1 cm de espesor y excitando la muestra a 370 nm, colectando la emisión en un rango de 400-600 nm.

Cuando esta experiencia se realizó en células CHO-K1/A5, las mismas se marcaron previamente 45 min a 37 °C con 1 mM de ER-Tracker, se lavaron tres veces con buffer PBS con la finalidad de eliminar el exceso de sonda fluorescente no unida y finalmente se resuspendieron empleando una solución de PBS-5 mM de EDTA. Las células se resuspendieron en buffer PBS y se llevaron al espectrofluorímetro para su estudio. Desde aquí, el tratamiento de las muestras fue idéntico al descrito para los liposomas.

Anisotropía de fluorescencia. Para estudiar el estado biofísico de las membranas del RE analizamos la anisotropía de la sonda ER-Tracker, lo cual informa acerca de la movilidad de esta molécula en el entorno en la cual se encuentra. Para esto, las células vivas se marcaron con ER-Tracker como mencionamos anteriormente y se analizaron empleando el instrumento *dual viewer* (Fig. 1.6; construido en el Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Department of NanoBiophotonics, Göttingen, Alemania). Para lograr mediciones cuantitativas de anisotropía mediante imágenes de fluorescencia, la muestra conteniendo las células marcadas fueron visualizadas en un microscopio E-300, con un objetivo 40x, 0.65 AN (Nikon, Melville, NY, USA), las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara CCD Hamamatsu Orca-ER manipulada mediante el programa Metamorph. Entre la cámara y el microscopio se colocó el *dual viewer* (Fig. 1.6 A). La luz de excitación de la muestra (la cual pasa a través de un polarizador a la salida de la lámpara UV del microscopio) se logró mediante un filtro de pasaje de banda de 365 nm, colocado en el cubo de filtros del microscopio de fluorescencia. El módulo *dual viewer* (Fig. 1.6 A-B) divide la luz de emisión de la sonda fluorescente mediante un espejo dicróico el cual refleja la luz con una longitud de onda menor a 465 nm en dos haces separados, los cuales pasan a través

de polarizadores (\perp , perpendicular al haz incidente; \parallel , paralelo al haz incidente, respectivamente). Las imágenes correspondientes a cada polarizador son enfocadas en el detector CCD de la cámara, el cual está configurado como detector de dos canales (Fig. 1.6 B), registrando la imagen correspondiente a la luz polarizada perpendicular (izquierda) y la luz polarizada paralela (derecha) respecto a la luz de excitación. Las imágenes posteriormente son analizadas digitalmente para obtener el valor de anisotropía para cada condición. Para ello se utilizó la fórmula:

$$r = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp})}{(I_{\parallel} + 2I_{\perp})}$$

Donde r es el valor de anisotropía, I_{\parallel} corresponde a la imagen paralela e I_{\perp} a la imagen perpendicular de la muestra, respecto a la luz de excitación proveniente de la misma.

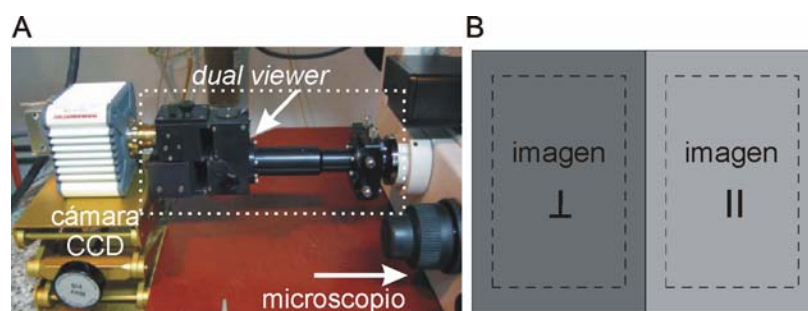


Fig. 1.6. *dual viewer*.

Fraccionamiento subcelular para obtención de fracciones enriquecidas en membranas de RE

1. Estos experimentos se llevaron a cabo como describen Vidugiriene et al., (1999) con algunas modificaciones. Brevemente, las células CHO-K1/A5 se crecieron en cápsulas de 10 cm. y los cultivos, con un 70% de confluencia, se desprendieron por raspaje con espátula. La suspensión celular fue resuspendida y homogeneizada en buffer de homogenización (10 mM de HEPES buffer, pH 7.4, conteniendo 1 mM de EDTA y 0.25 M de Sacarosa, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas). Las células se disgregaron mediante 15 golpes en homogenizador Thomas, seguido de 15 pasajes a

través de una aguja de 21G. Los núcleos y las células no disgregadas se separaron mediante una centrifugación a 660 x g 10 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 8000 x g para separar la fracción mitocondrial. El sobrenadante de esta última fracción fue centrifugado en un rotor Beckman TLA 100.1 a 100000 x g por 1 h y el pellet, constituyendo la fracción microsomal cruda, se resuspendió en buffer de homogenización y se lo sembró sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (1 mL al 30% y 2 mL al 45% de sacarosa en buffer 10 mM de Hepes, 1 mM de EDTA, pH 7.4), y se centrifugaron en un rotor Beckman TLA 100.1 a 100000 x g por 2 h. Se colectaron 4 fracciones: a) fracción de sacarosa al 30%, b) interfase, c) fracción de sacarosa al 45% y d) pellet. Todas estas operaciones se llevaron a cabo a 4°C.

2. Otra serie de experimentos se realizaron como fue descrito por Zhang et al. (1998). Brevemente, las células CHO-K1/A5 se crecieron en cápsulas de 10 cm. y los cultivos, con un 70% de confluencia, se desprendieron por raspaje con espátula. La suspensión celular fue resuspendida y homogeneizada en buffer de homogenización (10 mM de Hepes buffer, pH 7.4, conteniendo 1 mM de EDTA y 0.25 M de sacarosa, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas). Las células se disgregaron mediante 15 golpes en homogenizador Thomas, seguido de 5 pasajes a través de una aguja de 27G. Los núcleos y las células no disgregadas se separaron mediante una centrifugación a 3000 x g 10 min. El pellet obtenido fue resuspendido en buffer de homogenización y centrifugado nuevamente a 3000 x g 10 min. El sobrenadante fue centrifugado en un rotor Beckman TLA-100.4 a 100000 x g por 1 h y el pellet resuspendido en buffer de homogenización y sembrado en la parte superior de un gradiente de sacarosa del 5-40% y centrifugado en un rotor Beckman SW 50.1 a 200000 x g por 3h. Las fracciones fueron colectadas desde la parte superior del gradiente. Los marcadores para organelas subcelulares, calnexina y syntaxina 6, marcadores de RE y Golgi (TGN), respectivamente, fueron utilizados para analizar la distribución de las organelas en cada fracción del gradiente mediante Wester Blot. Todas las operaciones se realizaron a 4°C.

Ensayos de solubilidad en detergente

Aquí empleamos el ensayo de solubilidad en detergente tal como Schroeder et al. (1998). De los experimentos de fraccionamiento descritos anteriormente (1 y 2) se procedió de la siguiente manera:

1) Las fracciones obtenidas mediante fraccionamiento subcelular *a(1)* y *b(2)* (30% de sacarosa e interfase), enriquecidas en el marcador syntaxina 6 (TGN), y las fracciones *c(3)* y *d(4)* (45% de sacarosa y pellet), enriquecidas en el marcador calnexina (ER) se agruparon separadamente y se extrajeron con Tritón X-100 al 1% en buffer de homogenización por 30 min. a 4°C.

2) Las fracciones enriquecidas en el marcador de RE, calnexina, (11-14) fueron agrupadas, homogenizadas, y extraídas con Tritón X-100 en buffer de homogenización por 30 min.

Para ambas condiciones experimentales (1 y 2), se realizó la separación del material soluble del insoluble mediante centrifugación de las muestras en un rotor Beckman TLA 100.1 a 120000 x g por 30 min. Se separó el pellet (fracción insoluble) del sobrenadante (fracción soluble) y la distribución del AChR en las mismas se analizó mediante *Western Blot*.

Western Blot

Las diferentes muestras fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) al 5% toda la noche a 4°C. Las muestras se centrifugaron 10 min en centrifugas Eppendorf (Hamburgo, Alemania) de mesa a 140000 rpm (~ 13000 x g) para separar las proteínas, y el pellet fue lavado 2 veces con acetona para eliminar los restos de TCA o Tritón X-100. Así, las muestras se secaron en hielo, para eliminar los restos de acetona, y el pellet resultante se lo resuspendió en buffer Laemmli, o se les agregó NaOH 0.1N cuando se determinó la concentración de proteínas de las mismas. Diferentes alícuotas de las muestras (en Laemmli) se sembraron en geles de Poliacrilamida (9-12.5%) -SDS-PAGE-. Posteriormente las muestras se transfirieron a membranas de Immobilon (Millipore Corp., San Francisco,

CA, USA) y las diferentes proteínas de interés se revelaron mediante ensayos de inmunoblot con anticuerpos específicos.

Análisis de la solubilidad en Tritón X-100 de la proteína VSVG-GFP transfectada en células CHO-K1/A5

Las células CHO-K1/A5 fueron transfectadas con el plásmido que codifica para VSVG-GFP tal como mencionamos anteriormente. Brevemente, 24 h posteriores a la transfección, las células se desprendieron por raspaje con espátula. La suspensión celular fue resuspendida y homogeneizada en buffer de homogenización (10 mM de buffer Hepes, pH 7.4, conteniendo 1 mM de EDTA y 0.25 M de sacarosa, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas). Las células se disgregaron mediante 15 golpes en homogenizador Thomas, seguido de 15 pasajes a través de una aguja de 21G. Los núcleos y las células no disgregadas se separaron mediante una centrifugación a 660 x g 10 min. El sobrenadante se extrajo con Tritón X-100 al 1% en buffer de homogenización por 30 min. a 4°C, y posteriormente el material soluble e insoluble se separó mediante centrifugación empleando un rotor Beckman TLA-100.4 a 120000 x g por 1h. El pellet (fracción insoluble) y el sobrenadante (fracción soluble) se separaron y la VSVG-GFP presente en cada fracción fue cuantificada mediante espectroscopia de fluorescencia. Los espectros de emisión fueron obtenidos empleando un espectrofluorímetro SLM 4800 ISC, con una lámpara de Mercurio/Xenón de 200W. Los espectros de emisión se colectaron empleando cubetas de Cuarzo de 1 cm de espesor y excitando la muestra a 488 nm, colectando la emisión en un rango de 500-600 nm. El pico de emisión de la proteína VSVG-GFP en el sistema fue de 556 nm.

RESULTADOS

La expresión del AChR en membrana plasmática disminuye en células CHO-K1 SPB1/SPH⁻, deficientes en SL

La línea celular SPB-1 es una mutante de las células CHO-K1 que poseen una mutación termosensible en la primer enzima de la vía biosintética de los SL, la SPT (Hanada et al., 1990). La actividad de la enzima SPT a 37°C es aproximadamente de un 8% comparada con la de su línea parental, las CHO-K1. Cuando estas células son crecidas a 37°C los niveles de ceramida y SM caen a un 9 y a un 50% de los de sus parentales (Hanada et al., 1990). Las células SPB-1/SPH⁻ es una línea derivada de las línea SPB-1 producida en nuestro laboratorio, la cual fue establemente transfectada con los cuatro ADNc que codifican para el AChR adulto de ratón (Roccamo et al., 1999). En una primera serie de experimentos, se emplearon las células SPB-1/SPH⁻ con el objeto de estudiar el efecto de la deficiencia de SL en el tráfico del AChR a la superficie celular.

De esta manera las células SPB-1/SPH⁻ se crecieron en medio completo (Ham's F12 con el agregado de 10% de SFB) a 36-37°C por 48 h, y luego se crecieron 24 h más en medio Nutridoma (medio de cultivo condicionado) conteniendo 0.1% de SFB (Hanada et al., 1992). Cuando analizamos los niveles de AChR en membrana plasmática mediante microscopía de fluorescencia cuantitativa, la señal de α BTX-Alexa⁴⁸⁸ en la superficie celular disminuyó un 40% (Fig. 1.7 A), cuando se las comparó con la línea parental, CHO-K1/A5, en concordancia con lo reportado por Roccamo et al. (1999).

Con el objetivo de evaluar la especificidad o generalidad de este fenómeno, las células CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH⁻ se transfectaron con el plásmido que codifica para la proteína VSVG-GFP y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia cuantitativa. Como se observa en la Fig. 1.7 B, no existen diferencias ni en los niveles de VSVG-GFP totales o de membrana plasmática entre las células CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH⁻, y la

distribución intracelular de esta proteína fue similar entre las dos líneas celulares (Fig. 1.7 B).

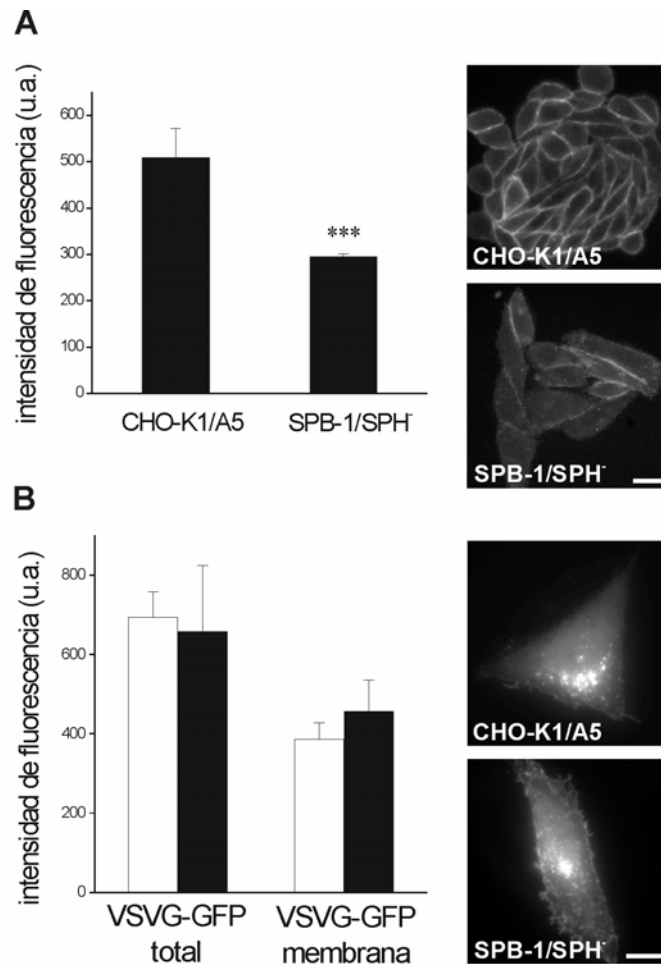


Fig. 1.7. Expresión en membrana plasmática del AChR en células SPB-1/SPH⁻ crecidas a 37°C.

A) El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁴⁸⁸ en la superficie de células control, CHO-K1/A5, y en células deficientes en SL, SPB-1/SPH⁻, crecidas a 37°C en medio Nutridoma conteniendo 0.1% de SFB. Barra, 20 μ m. B) Las células CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH⁻ se transfectaron con VSVG-GFP y se crecieron en medio Nutridoma a 37°C por 24h. El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia correspondiente a VSVG-GFP total y VSVG-GFP asociada a la membrana plasmática, en células CHO-K1/A5 (barras blancas) y en células SPB-1/SPH⁻ (barras negras), respectivamente. Barra, 10 μ m. Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres o más experimentos independientes. El triple asterisco, (***) denota un valor de $p < 0.001$, obtenido mediante el test de Student.

Hanada et al. (1990) encontraron que en esta línea celular la mayor inhibición en la biosíntesis de SL se produce a 39°C, temperatura a la cual ellos denominan “no permisiva”. A 39-40°C la actividad de la enzima SPT cae a menos de un 1% de la de su línea parental. La velocidad de síntesis de ceramida y la de SM caen a menos de un 3% y un 4%, respectivamente, comparado con la velocidad de síntesis en las células parentales. El contenido de SM bajo estas condiciones experimentales cae a un tercio de la encontrada en las células controles. Si bien estas condiciones serían las más apropiadas para nuestro estudio, encontramos que a 39°C la cantidad de AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, la cual corresponde a la condición control (sin la mutación en la SPT), es de alrededor de un 50% del encontrado en las mismas células a 37°C (comparar Fig. 1.7 A y 1.8 A). Los niveles de AChR en la línea SPB-1/SPH⁻ a 39°C son similares a la de la línea parental incubadas a temperaturas no permisivas (Fig. 1.8 A) y prácticamente el mismo nivel que el encontrado en las células mutantes a 37°C (Fig. 1.7 y Fig. 1.8).

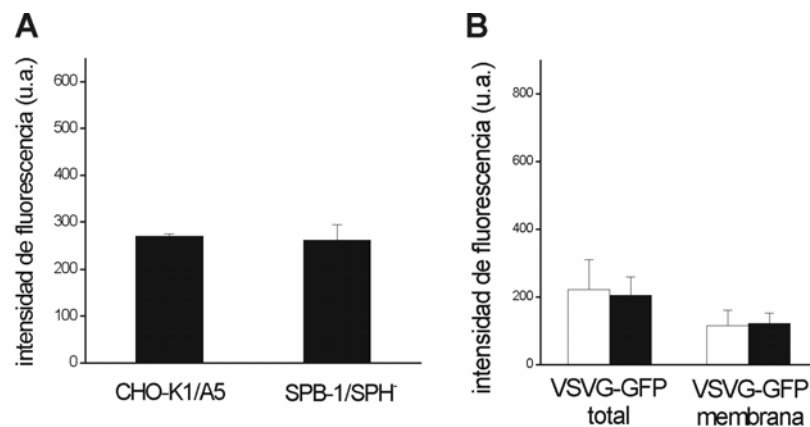


Fig. 1.8. Expresión en membrana plasmática del AChR en células CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH⁻ crecidas a 39°C. A) El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁴⁸⁸ en la superficie de células control, CHO-K1/A5, y en células deficientes en SL, SPB-1/SPH⁻, crecidas a 39°C en medio Nutridoma conteniendo 0.1% de SFB. B) Las células CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH⁻ se transfectaron con VSVG-GFP y se crecieron en medio Nutridoma a 39°C por 24h. El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia correspondiente a VSVG-GFP total y VSVG-GFP asociada a la membrana plasmática, en células CHO-K1/A5 (barras blancas) y en células SPB-1/SPH⁻ (barras negras), respectivamente. Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres o más experimentos independientes.

Trabajos de Paulson y Claudio (1990), Ross et al. (1991), determinaron que altas temperaturas son inapropiadas para la correcta expresión del AChR. Este resultado no nos permite utilizar las temperaturas no permisivas, ya que no podemos discernir que factor esta determinando, principalmente, la expresión del AChR, temperatura o niveles de SL (ver discusión).

Igualmente, a modo de control, las células CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH⁻ se transfectaron con el plásmido que codifica para la proteína VSVG-GFP y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia cuantitativa. Como se observa en la Fig. 1.8 B, la temperatura afecta los niveles de VSVG-GFP aunque la relación de esta proteína entre total y en membrana parece mantenerse. En base a estos resultados descartamos la posibilidad de utilizar 39°C para estudiar la relación AChR-SL en este sistema celular.

Evaluación del AChR en la superficie celular de células CHO-K1/A5 bajo la inhibición farmacológica de la SPT

Con el objeto de verificar que la disminución del AChR en la membrana plasmática en las células sensibles a la temperatura SPB-1/SPH⁻ fue causado por una alteración en la actividad de SPT, empleamos Miriocina (ISP-1), un potente inhibidor de esta enzima (Miyake et al., 1995), en células control CHO-K1/A5, las cuales poseen un metabolismo normal de SL. Para esto, las células CHO-K1/A5 se crecieron por 48 h en medio completo y luego se incubaron por 24h con 5 μ M ISP-1 en medio Nutridoma y posteriormente se marcaron con α BTX-Alexa⁴⁸⁸. Así nosotros hallamos que la señal de fluorescencia del AChR en la membrana plasmática disminuyó en ~30% (Fig. 1.9), en concordancia con los resultados obtenidos con la línea celular mutante sensible a la temperatura SPB-1/SPH⁻ (Figura 1.7).

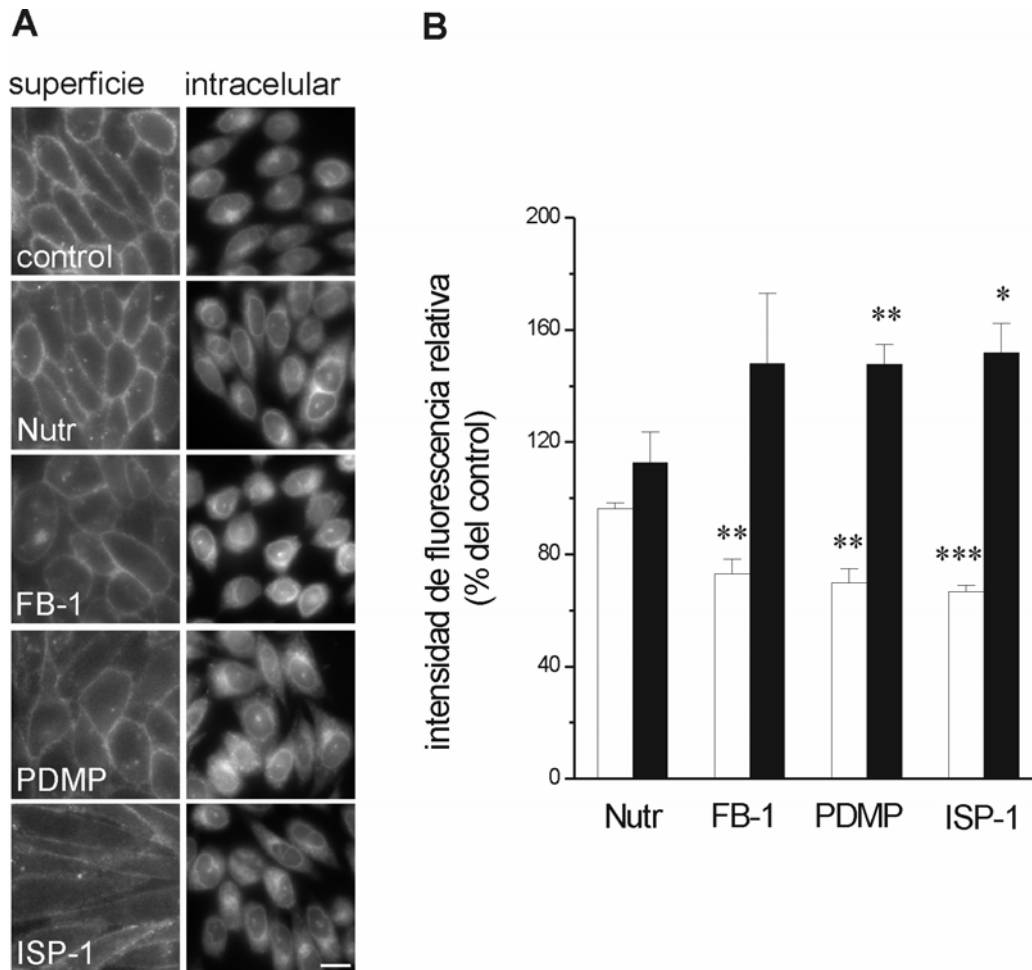


Fig. 1.9. Efecto de la inhibición de la biosíntesis de SL causada por FB-1, PDMP e ISP-1 sobre la expresión en membrana plasmática del AChR. A) Las células CHO-K1/A5 se crecieron en medio completo Ham's F-12 (suplementado con 10% de SFB) por 48 h y luego en medio completo Ham's F-12 (control), Nutridoma (Nutr), y medio Nutridoma conteniendo 50 μ M de FB-1, 10 μ M de PDMP y 5 μ M de ISP-1, respectivamente, por 24 h. Las células se marcaron con α BTX-Alexa⁴⁸⁸ (superficie), o se fijaron, permeabilizaron y marcaron con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ (intracelular), y finalmente se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. B) El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁴⁸⁸ en superficie (barras blancas) y de α BTX-Alexa⁵⁹⁴ intracelular (barras negras) de las distintas condiciones referidas al control, crecido en medio completo Ham's F-12. Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres o más experimentos independientes. Simple (*), doble (**) o triple (***) asterisco denota valores de p : <0.05 , <0.01 o <0.001 , respectivamente, obtenido mediante la aplicación del test de Student para cada condición (serie de datos de AChR en superficie comparados entre si y serie de datos de AChR intracelular comparados entre si). La ausencia de marca denota la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas ($p>0.05$). Barra, 10 μ m

Inhibición en estadios tardíos de la biosíntesis de SL

La serie subsiguiente de experimentos fue diseñada para inhibir la biosíntesis de SL en pasos posteriores de la vía, al nivel de la biosíntesis de dihidroceramida (ver Fig. 1.2 y 1.5). Esto se realizó incubando las células CHO-K1/A5 con Fumonisina B-1 (FB-1), una toxina fúngica de *Fusarium moniliforme* que altera la biosíntesis de SL por inhibir la enzima (dihidro)ceramida sintasa (Wang et al., 1991). La intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁴⁸⁸ disminuyó en un ~30% bajo la incubación de las células CHO-K1/A5 con 50 μ M de FB-1 en medio Nutridoma por 24 h (Fig. 1.9 A-B).

La biosíntesis de SL complejos puede ser inhibida al nivel de la glicosilación de la ceramida, por bloqueo de la enzima GluCer sintasa mediante el empleo de PDMP (Radin et al., 1993). La incubación de células CHO-K1/A5 con 10 μ M de PDMP por 24 h resultó en una reducción de la intensidad de fluorescencia de α BTX en la membrana plasmática en forma similar a la observada con ISP-1 o FB-1, ~30% (Fig. 1.9 A-B).

El bloqueo de la biosíntesis de SL conduce a una acumulación intracelular del AChR

Una pregunta que surge de los resultados descritos anteriormente es si la disminución observada en la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁴⁸⁸ en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 se corresponde a una disminución en la biosíntesis de esta proteína o, por otro lado, si la inhibición de la biosíntesis de SL podría afectar el tráfico del AChR hacia la membrana plasmática, lo que conduciría a una concomitante acumulación del receptor en el interior celular, tal como ocurre tras la depleción en forma crónica del colesterol (Pediconi et al., 2004). Con el objeto de medir la cantidad de AChR intracelular, se trataron las células CHO-K1/A5 con las drogas inhibitorias por 24 h como describimos en la secciones precedentes (5 μ M de ISP-1, 50 μ M de FB-1, o 10 μ M de PDMP), se fijaron, permeabilizaron y se marcó el AChR intracelular con α BTX-Alexa⁵⁹⁴. Como mostramos en la Fig. 1.9 A-B, en todos los casos en los cuales la biosíntesis de SL

fue alterada y la cantidad de AChR en la superficie celular disminuyó, los niveles de AChR intracelulares aumentaron en un ~50%, lo cual nos permitiría descartar la posibilidad de que una disminución del AChR en la membrana plasmática ocurriría como resultado de un defecto en la biosíntesis del AChR.

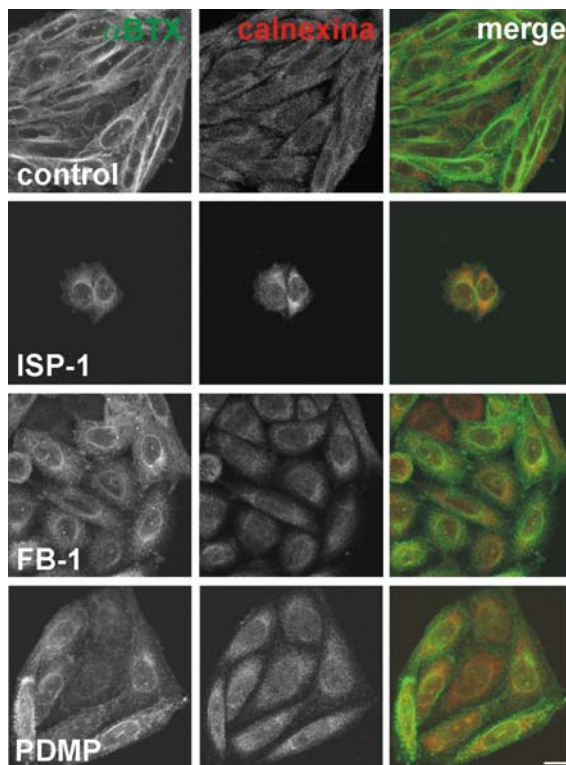


Fig. 1.10. Colocalización del AChR intracelular con calnexina, marcador del RE. Imágenes de microscopía confocal de células CHO-K1/A5 crecidas en medio Nutridoma conteniendo 10 μM de ISP-1, 50 μM de FB-1 y 10 μM PDMP por 24 h. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con $\alpha\text{BTX-Alexa}^{488}$ (para marcar el AChR, columna izquierda) y con anti-calnexina (marcador del RE, columna central). La superposición de las imágenes (merge) se muestra en la columna derecha. Barra, 10 μm .

El AChR intracelular está predominantemente localizado en el RE en células que poseen la biosíntesis de SL inhibida

En base a los datos anteriores, decidimos evaluar donde se acumula intracelularmente el AChR cuando se inhibe la biosíntesis de SL. Observando las imágenes correspondientes a AChR intracelular en la Fig. 1.9 se observa una marca del receptor a través de todo el citoplasma, a diferencia de lo observado en células en las cuales se produjo una depleción crónica de los niveles de colesterol (Pediconi et al., 2004). El AChR, marcado tanto con $\alpha\text{BTX-Alexa}^{488}$ o con el anticuerpo mAb 210, se encontró distribuido a través de todo el citoplasma, mostrando un patrón de marca perinuclear, como es el caso del marcador de

RE, calnexina (Fig. 1.10). Así mismo, cierta fracción del AChR colocaliza con marcadores de la red *trans* Golgi (TGN), como es el caso de syntaxina 6 (Fig. 1.11). Este dato era de esperar, ya que si bien la inhibición de la biosíntesis de SL afecta la llegada de AChR a la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, parte llega a la superficie celular y por consiguiente atraviesa la vía secretoria.

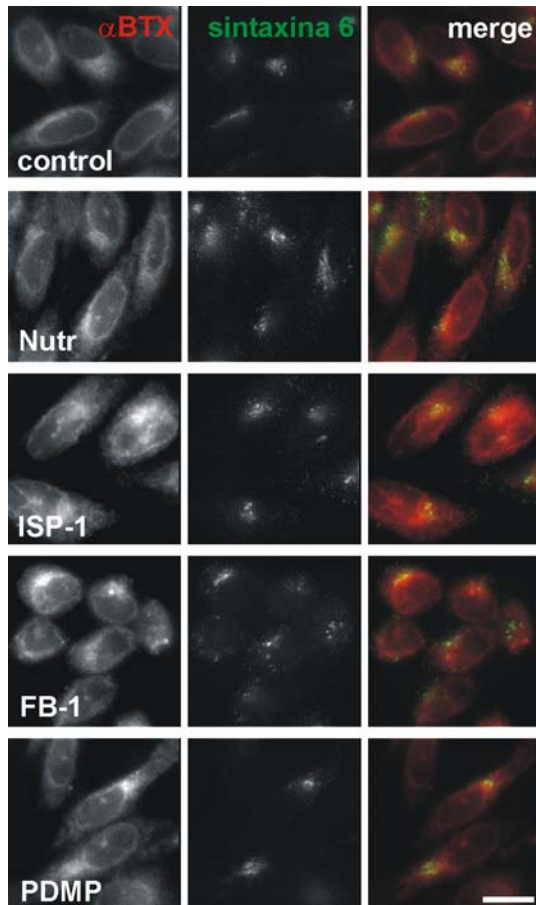


Fig. 1.11. Colocalización del AChR intracelular con syntaxina 6, marcador del TGN. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células CHO-K1/A5 crecidas en medio Nutridoma conteniendo 10 μ M de ISP-1, 50 μ M de FB-1 y 10 μ M PDMP por 24 h. Las células fueron marcadas con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ (para marcar el AChR, columna izquierda) y con anti-syntaxina 6 (marcador del TGN, columna central) como mencionamos en Materiales y Métodos. La superposición de las imágenes (merge) se muestra en la columna derecha. Las imágenes fueron deconvolucionadas como en Pediconi et al., (2004). Barra, 10 μ m.

A diferencia de lo encontrado aquí, Pediconi et al. (2004) hallaron que el AChR es retenido a nivel del TGN como consecuencia de la depleción del contenido de colesterol en células CHO-K1/A5. Otros autores encontraron también acciones diferenciales del colesterol y SL en el tráfico de una misma proteína (Sarnataro et al., 2004; Harikumar et al., 2005). Esto es sumamente interesante, ya que implica que el AChR a través de su viaje por la vía secretoria interactúa con el colesterol y los SL, teniendo estos lípidos papeles diferentes en la biología del AChR.

Reversión de los efectos de la inhibición de la biosíntesis de SL por la adición de SM exógena

Posteriormente estudiamos si la SM agregada en forma exógena podría modificar los efectos ejercidos por los inhibidores de la biosíntesis de SL sobre el AChR. Seleccionamos a la SM porque este lípido posee una afinidad mayor por el AChR que los GSL (Bonini et al., 2002; Mantipragada et al., 2003). Para esto, se trataron células CHO-K1/A5 por 24 h con FB-1, PDMP o ISP-1 en la presencia de 10 μ M SM exógena, y la cantidad de AChR en la superficie celular se evaluó usando ensayos de unión de α BTX- $[^{125}$ I] en la membrana plasmática. De esta manera observamos que la cantidad de α BTX- $[^{125}$ I]-AChR en la membrana plasmática no solo fue restaurada en todos los casos, sino que en algunos fue mayor que en las células controles crecidas en medio completo (Fig. 1.12 A). El efecto de los inhibidores de la biosíntesis de SL es por lo tanto abolido por suministrar SM exógena a células que poseen una reducción de la biosíntesis de SL inducida farmacológicamente.

Paralelamente analizamos las cantidades de AChR intracelular en células tratadas con las drogas inhibitorias conjuntamente con SM exógena usando microscopía de fluorescencia cuantitativa. Como mostramos en la Fig. 1.12 B, la intensidad de fluorescencia del marcaje con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ difiere de los observados en células tratadas solo con los inhibidores (ver Fig. 1.9), y alcanzaron niveles más bajos aún que el correspondiente a las células control no tratadas con las drogas inhibitorias. Estos resultados indican que la SM posee un efecto de “bypass” sobre la acción de las drogas, restaurando los niveles normales de la relación AChR superficie/intracelular cuando las células CHO-K1/A5 son coincubadas con SM y las drogas inhibitorias.

En acuerdo con estos resultados, recientemente Gallegos et al. (2008) observaron que administración de ceramidas exógenas en bajas concentraciones (similares a las de SM utilizadas en este trabajo) a células CHO-K1/A5 en cultivo conduce a un aumento de la

expresión del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 con una concomitante disminución de los niveles de AChR intracelular.

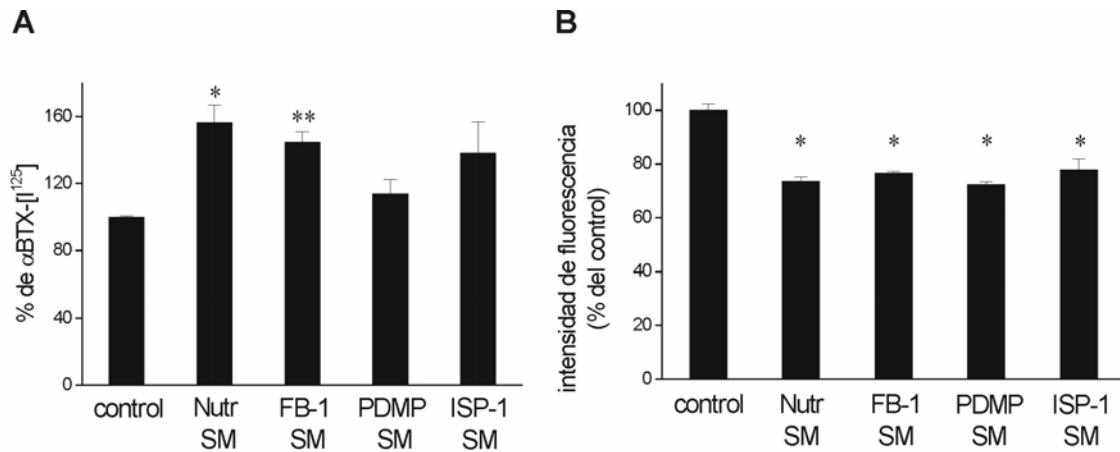


Fig. 1.12. El agregado de SM exógena bloquea el efecto de ISP-1, FB-1 o PDMP sobre el tráfico del AChR. A) Gráfico mostrando la unión de α BTX-[125 I], como porcentaje, en células CHO-K1/A5 tratadas con 50 μ M de FB-1, 10 μ M de PDMP o 10 μ M de ISP-1 conjuntamente con 10 μ M de SM exógena, en medio Nutridoma por 24 h. La SM exógena fue vehiculizada en EtOH/decano (98/2 v/v). La cantidad de solvente agregado como vehículo de SM fue mantenido por debajo del 0.16%. B) Gráfico mostrando la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁵⁹⁴ intracelular en células tratadas con las drogas inhibitorias conjuntamente con 5 μ M de SM exógena. La cantidad de solvente agregado como vehículo de SM fue mantenido por debajo del 0.08%. Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres experimentos independientes. Simple (*) o doble (**) asterisco denota valores de p: <0.05 o <0.01, respectivamente, obtenido mediante la aplicación del test de Student para cada condición. La ausencia de marca denota la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas (p>0.05).

La acumulación intracelular del AChR esta asociada con un ensamblaje deficiente del AChR

Como mencionamos en la Introducción, el RE es la organela donde se sintetiza y se ensambla el AChR (Smith et al., 1987). Recién cuando el AChR se encuentra completamente ensamblado continua su viaje a través de la vía secretoria (Blount et al., 1990; Gu et al., 1991; Kreienkamp et al., 1995). Las subunidades no ensambladas, así como las formas inmaduras del AChR son retenidas en el RE para su ulterior

procesamiento o degradación (ver revisión Wanamaker et al., 2003). Nosotros nos preguntamos si la retención del AChR en el RE podría ser una consecuencia de un proceso deficiente de ensamblaje de esta proteína. Para contestar esta pregunta nosotros desarrollamos un nuevo ensayo, en el cual se explota la propiedad farmacológica de la unión del antagonista competitivo α BTX en la presencia o ausencia del agonista Carb (ver Fig. 1.13). La base de este ensayo es la siguiente: Carb reconoce y se une a subunidades α del AChR asociadas con las subunidades ε (o γ en el AChR embrionario) o δ en la forma de dímeros, o trímeros con la subunidad β (así como al pentámero completo), pero no se une a subunidades α desensambladas (Blount y Merlie, 1988). En contraste, α BTX reconoce ambas, subunidades α ensambladas y desensambladas. Así, por lo tanto, exposición de células a Carb seguida por la adición de α BTX permite distinguir si las subunidades α se encuentran ensambladas o no (Keller et al., 2001a). En la Fig. 1.14 A mostramos como se observa la marca intracelular de α BTX-Alexa⁵⁹⁴ cuando se la incubaba en presencia de un exceso de Carb. La distribución difusa a través de todo el citoplasma se corresponde con la distribución típica del RE, como se observa en la Fig. 1.10, ya que las subunidades no ensambladas, como describimos anteriormente, no salen del RE.

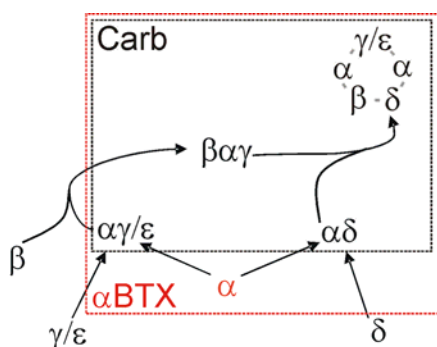


Fig. 1.13. Determinación de la cantidad de AChR desensamblado mediante microscopía de fluorescencia. Carb reconoce y se une a subunidades α del AChR asociadas con las subunidades ε (o γ en el AChR embrionario) o δ en la forma de dímeros, o trímeros con la subunidad β (así como al pentámero completo), pero no se une a subunidades α desensambladas (zona gris). En contraste, α BTX reconoce ambas, subunidades α ensambladas y desensambladas (recuadro rojo punteado). Por lo tanto, exposición de células a Carb seguida por la adición de α BTX permite cuantificar la cantidad de subunidades α desensambladas.

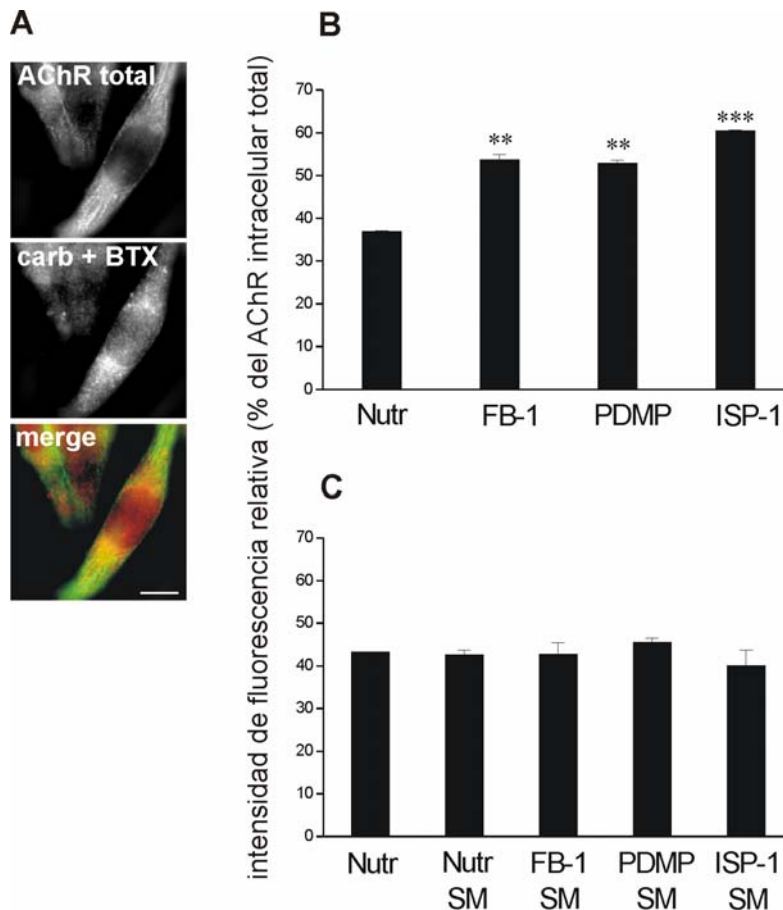


Fig. 1.14. Determinación del ensamblaje del AChR mediante microscopía de fluorescencia. A) Células CHO-K1/A5 se marcaron con el anticuerpo H-101 y su anticuerpo secundario derivatizado con Alexa⁴⁸⁸ (imagen superior), seguida por incubación con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ en presencia de 10 mM de Carb (imagen media). La superposición de ambas imágenes se muestra en el panel inferior. Las imágenes fueron deconvolucionadas como en Pediconi et al. (2004). B) Las células se trataron por 24 h en medio Nutridoma conteniendo 50 μ M de FB-1, 10 μ M de PDMP o 10 μ M de ISP-1. En estas células se bloqueo el AChR de la superficie celular con α BTX nativa, se fijaron, permeabilizaron, se incubaron con 10 mM de Carb. por 1 h a temperatura ambiente y finalmente se marcaron α BTX-Alexa⁵⁹⁴ en presencia del exceso de Carb. C) Las células fueron tratadas como en A) pero en presencia de 5 μ M de SM exógena. Esta última fue vehiculizada en EtOH/decano (98/2 v/v). La cantidad de solvente agregado como vehículo de SM fue mantenido por debajo del 0.08%. Las intensidades de fluorescencia son relativas a las células control crecidas en medio completo Ham's F12 y marcadas con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ en ausencia de Carb. Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres o más experimentos independientes. Doble (**) o triple (***) asterisco denota valores de p: <0.01 o <0.001, respectivamente, obtenido mediante la aplicación del test de Student para cada condición. La ausencia de marca denota la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas ($p > 0.05$). Barra, 10 μ m

Tratamos las células CHO-K1/A5 con FB-1, PDMP o ISP-1 por 24 h en medio Nutridoma, y marcamos AChR intracelular con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ en la presencia de un exceso (10 mM) de Carb, tal como describimos en Materiales y Métodos. Bajo estas condiciones, nosotros observamos un incremento del 30-40% en la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁵⁹⁴ intracelular (ver Fig. 1.14 B), la cual corresponde la población de subunidades α no apareadas, que corresponde a receptores no ensamblados, indicando así que una alteración o perjuicio de la biosíntesis de SL afecta la eficiencia de ensamblaje del AChR.

Posteriormente estudiamos si la adición de SM exógena, la cual restauró los niveles de AChR en membrana plasmática e intracelular en células con la biosíntesis de SL afectada (ver Fig. 1.12), ejerce algún efecto en el ensamblaje del AChR. Para este fin, células CHO-K1/A5 fueron coincubadas con las drogas inhibitorias de la biosíntesis de SL (FB-1, PDMP o ISP-1) y 5 μ M de SM por 24 h en medio Nutridoma, y luego marcadas con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ en presencia o ausencia de 10 mM de Carb, y analizadas por microscopía de fluorescencia cuantitativa. El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia mostraron que el agregado de SM exógena fue efectiva en restaurar los niveles de AChR ensamblado en células con inhibición de la biosíntesis de SL a aquellos característicos de las células CHO-K1/A5 controles (~40% respecto del AChR intracelular total), ver Fig. 1.14 C.

Efecto de las altas concentraciones de PDMP en el tráfico del AChR a la membrana plasmática

En la siguiente serie de experimentos decidimos utilizar altas concentraciones de PDMP como Rosenwald et al. (1992). La utilización de esta droga bajo estas condiciones inhibe tanto la síntesis de SM así como la de GSL (ver Fig. 1.2 y 1.5). El análisis lipídico de células CHO-K1/A5 (ver Materiales y Métodos) tratadas con 10 y 50 μ M de PDMP confirmó los datos publicados por Rosenwald et al. (1992), Fig. 1.15. Básicamente, las células

controles y tratadas con 10 y 50 μM de PDMP se incubaron por 24 h en presencia de NBD- C_6 -ceramida (en presencia de PDMP o del vehículo de la droga en el caso del control), posteriormente las células se rasparon de las cápsulas y se extrajeron con $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (Folch et al., 1957), los lípidos fluorescentes se separaron mediante una TLC (Fig. 1.15 A) como Lipsky y Pagano (1983) y fueron cuantificados mediante fluorimetría (Fig. 1.15 B).

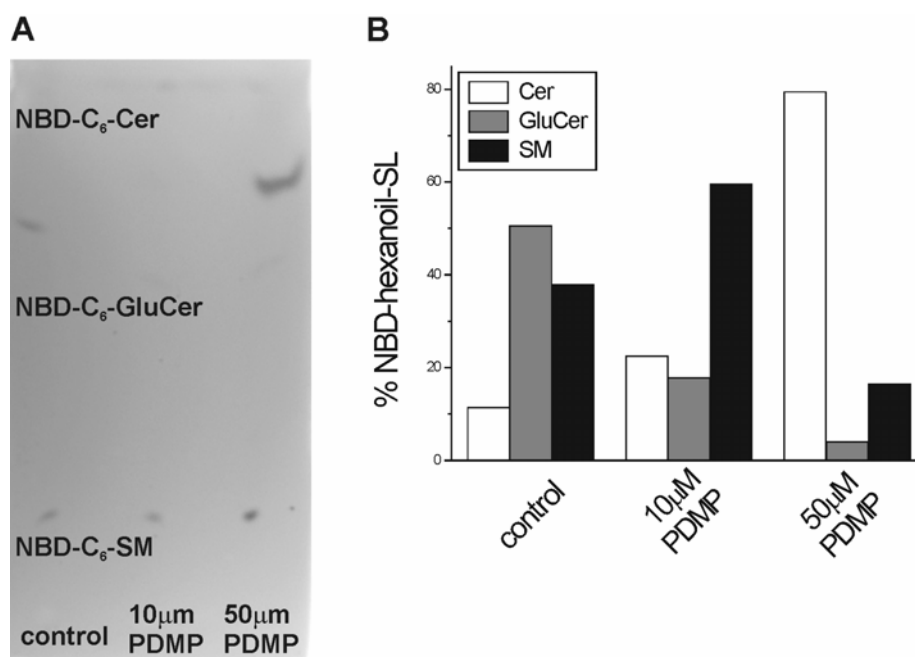


Fig. 1.15. Biosíntesis de NBD-SL en células CHO-K1/A5 bajo inhibición con PDMP. Células CHO-K1/A5 se incubaron por 24 h con 10 o 50 μM de PDMP (o solo el vehículo en el caso de las células control) en medio Nutridoma conteniendo 0.1% de SFB y en presencia de NBD- C_6 -ceramida. Los extractos lipídicos fueron separados mediante TLC (A), las especies lipídicas individuales, identificadas con estándares apropiados, se rasparon y cuantificaron mediante espectroscopia de fluorescencia (B). Las cantidades de cada lípido se expresan como porcentaje del total para cada condición.

Como puede observarse en la Fig. 1.15 B la síntesis de GluCer disminuyó un 65 y un 90%, con respecto a células controles, a 10 y 50 μM de PDMP, respectivamente. La síntesis de SM se incrementó a bajas concentraciones de PDMP y disminuyó más de un 50% a altas concentraciones de PDMP (nótese en la Fig. 1.15 A que si bien la mancha correspondiente a NBD- C_6 -SM parece ser más intensa que en el resto de las condiciones,

ésta condición posee una cantidad de lípido fluorescente total mayor). Por otro lado, los niveles de ceramida, precursor de los SL, se incrementaron conjuntamente como la inhibición de la biosíntesis de SL se hizo mayor: 200 y 700% con respecto a células no tratadas, a 10 y 50 μM de PDMP, respectivamente (Fig. 1.15 B). Estos resultados se encuentran totalmente en concordancia con los publicados por Rosenwald et al. (1992), en el cual los autores utilizaron un análogo radiactivo de la ceramida (hexanoil-ceramida [C^{14}]) para estudiar el metabolismo de SL en presencia de PDMP.

Cuando analizamos la cantidad relativa de AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 mediante ensayos de unión de αBTX -[I^{125}] (Fig. 1.16 A) o utilizando microscopía de fluorescencia cuantitativa empleando αBTX -Alexa⁴⁸⁸ (Fig. 1.9, 1.16 B-C) encontramos que el AChR disminuyó a un 80 y 70%, respectivamente, a bajas concentraciones de PDMP, y a un 50 y 35%, respectivamente, a altas concentraciones de PDMP. La adición de SM exógena (5 μM) conjuntamente con PDMP a alta concentración (50 μM) no pudo revertir el efecto de la droga (Fig. 1.16 B-C), a diferencia de lo observado para bajas concentraciones de PDMP (Fig. 1.12), en la cual la biosíntesis de SM no es inhibida.

En base a estos resultados podemos considerar que, cuando las células son incubadas a altas concentraciones de PDMP el esqueleto esgingoide, proveniente de reutilización de SL por la vía de salvataje o reciclaje de SL (Tettamanti et al., 2003; Chigorno et al., 2005; ver Fig. 1.5 y discusión) no podría ser reutilizado. Las Figs. 1.9 B y 1.16 A muestran que la cantidad de AChR en la membrana plasmática disminuye a medida que la concentración de PDMP aumenta; notablemente, la disminución del AChR en la superficie celular es acompañada con una concomitante disminución de los niveles de GluCer (Fig. 1.15 B). Conjuntamente, estos resultados sugieren que la GluCer juega un rol crítico en el tráfico del AChR.

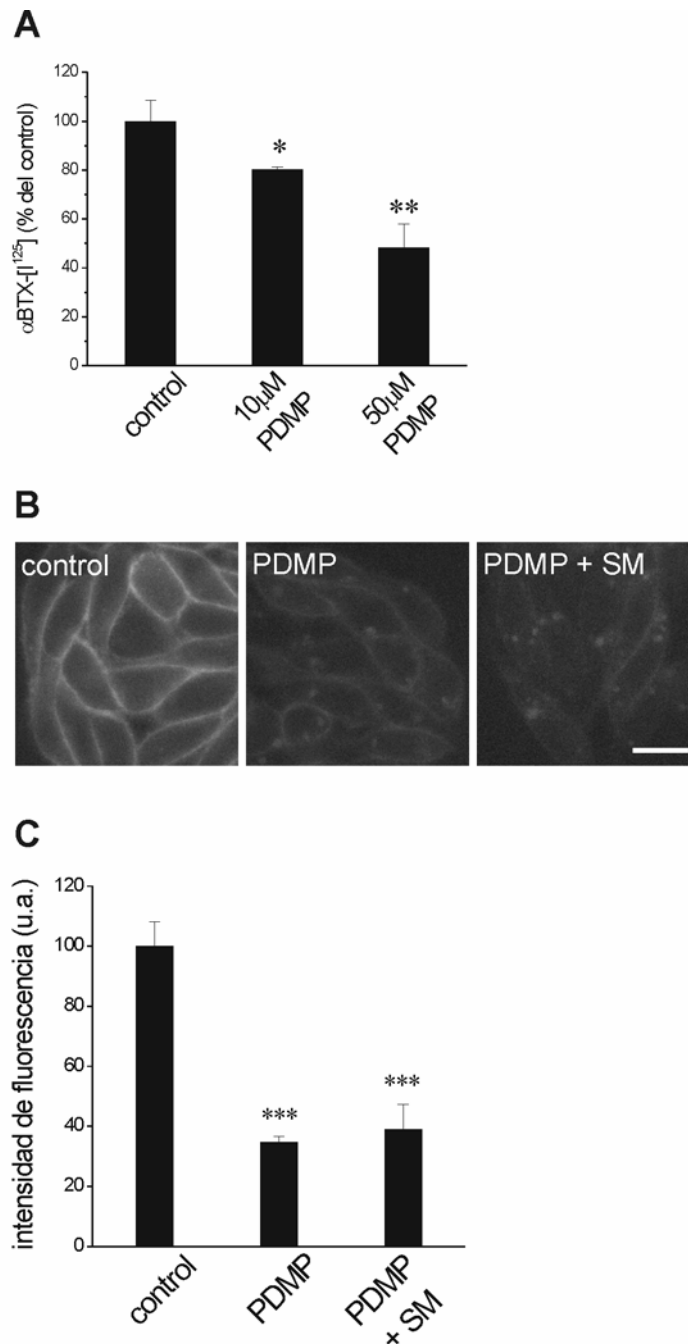


Fig. 1.16. Efecto de altas concentraciones de PDMP sobre la expresión en membrana del AChR. A) Porcentaje de unión de α BTX-[¹²⁵I] a la superficie celular de células CHO-K1/A5 tratadas con 10 y 50 μ M de PDMP en medio Nutridoma conteniendo 0.1% de SFB por 24 h. B) Células CHO-K1/A5 se incubaron con 50 μ M de PDMP en medio Nutridoma conteniendo 0.1% de SFB por 24 h (centro) o incubadas con 50 μ M de PDMP conjuntamente con 5 μ M de SM exógena (derecha). Las células control se incubaron en medio completo (izquierda). El AChR presente en la superficie celular se marcó con α BTX-Alexa⁴⁸⁸ por 1 h a 4°C. D) Intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁴⁸⁸ presente en la superficie celular de células controles y tratadas como se menciona en B). Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres o más experimentos independientes. Simple (*), doble (**) o triple (***) asterisco denota valores de p: <0.05, <0.01 o <0.001, respectivamente, obtenido mediante la aplicación del test de Student para cada condición. Barra, 10 μ m

Es el efecto de PDMP sobre el tráfico del AChR consecuencia de la acumulación de ceramida? (Fig. 1.15 B) Para intentar contestar esta pregunta tratamos las células CHO-K1/A5 con 50 μM de PDMP en presencia o ausencia de 40 μM de ISP-1 como Maceyka y Machamer (1997). Si la ceramida es el efector de los efectos causados por PDMP, el bloqueo de la biosíntesis *de novo* de SL conduciría a una disminución en los niveles endógenos de ceramida, una menor acumulación de este intermediario (porque la vía se encuentra bloqueada “río arriba”) y por lo tanto un menor efecto de PDMP sobre el tráfico del AChR.

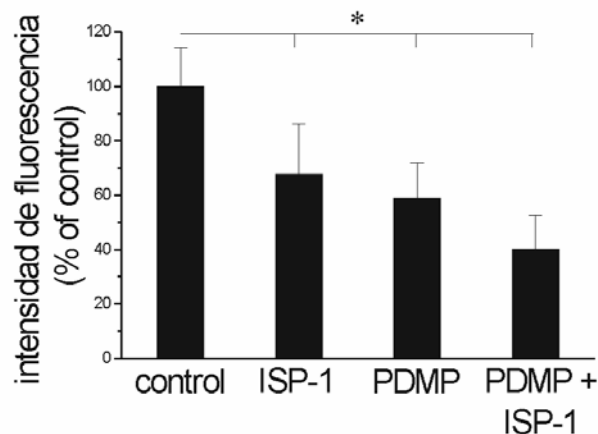


Fig. 1.17. El efecto de PDMP sobre la expresión en membrana plasmática del AChR no se debe a acumulación de ceramida endógena. Intensidad de fluorescencia relativa, expresada como porcentaje del control (crecido en medio completo), en células tratadas por 24 h en medio Nutridoma 0.1% de SFB conteniendo 40 μM de ISP-1 (ISP-1), 50 μM de PDMP (PDMP) o 40 μM de ISP-1 conjuntamente con 50 μM de PDMP (PDMP + ISP-1). Simple (*) asterisco denota valores de $p < 0.05$, obtenido mediante la aplicación del test de Student para cada condición.

Cuando los niveles relativos de AChR en la membrana plasmática fueron analizados mediante microscopía de fluorescencia cuantitativa no observamos ningún grado de atenuación del efecto, y por el contrario, los niveles de AChR en la superficie celular disminuyeron aún más cuando se emplearon las dos drogas en forma conjunta (Fig. 1.17) que cuando las drogas fueron utilizadas por separado. Estos resultados indicarían que la acumulación de ceramida, consecuencia del tratamiento de las células con PDMP, no

media los efectos observados causados por esta droga en el tráfico del AChR, sino que los productos finales de la vía biosintética estarían involucrados.

Cuando analizamos la cantidad de AChR intracelular en células tratadas con 50 μ M de PDMP encontramos que corresponde a aproximadamente un 70% (Fig. 1.18 A, barras blancas) de los niveles de AChR intracelular presentes en las células controles. Estos resultados son similares a los informados por Quiram et al. (1999) como resultado de la inadecuada interacción entre las subunidades β y δ del AChR. Es interesante señalar que el tratamiento con altas concentraciones de PDMP incrementó los niveles de AChR desensamblado en un 30% (Fig. 1.18 A, barras negras). Teniendo en cuenta que la cantidad de AChR intracelular total disminuyó (Fig. 1.18 A), el actual incremento de AChR desensamblado es aún más pronunciado, aumentando de un 40% del AChR intracelular total en células controles a un 80% en las células tratadas con 50 μ M de PDMP, lo que corresponde a un aumento del 100% (Fig. 1.18 A).

Una serie de experimentos independientes fue empleada con la finalidad de confirmar los cambios observados en los niveles de intermediarios del AChR. Estos fueron analizados mediante la separación de los diferentes intermediarios del proceso de ensamblaje del AChR (así como los pentámeros completos del AChR) realizando un análisis de flotabilidad de los distintos componentes en gradientes discontinuos de sacarosa, como fue previamente descrito por Barrantes (1982) y Kreienkamp et al. (1995). Brevemente, células controles y tratadas con PDMP se incubaron con α BTX nativa, con la finalidad de bloquear los AChR de la superficie celular, se permeabilizaron con saponina y se incubaron con exceso de α BTX-[I¹²⁵] por 1h a temperatura ambiente. Las células se solubilizaron con buffer conteniendo Tritón X-100 y las muestras fueron sometidas finalmente a centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa. Como se observa en la Fig. 1.18 B, en células controles solo el pico de 1.7S es aparente al inicio del gradiente, el cual corresponde a α BTX radioactiva libre. Células tratadas con PDMP mostraron una banda más ancha la cual corresponde a toxina libre conjuntamente con la banda 3.3S

correspondiente a la subunidad α , reflejando el relativo incremento en subunidades α desensambladas provocado como consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de SL.

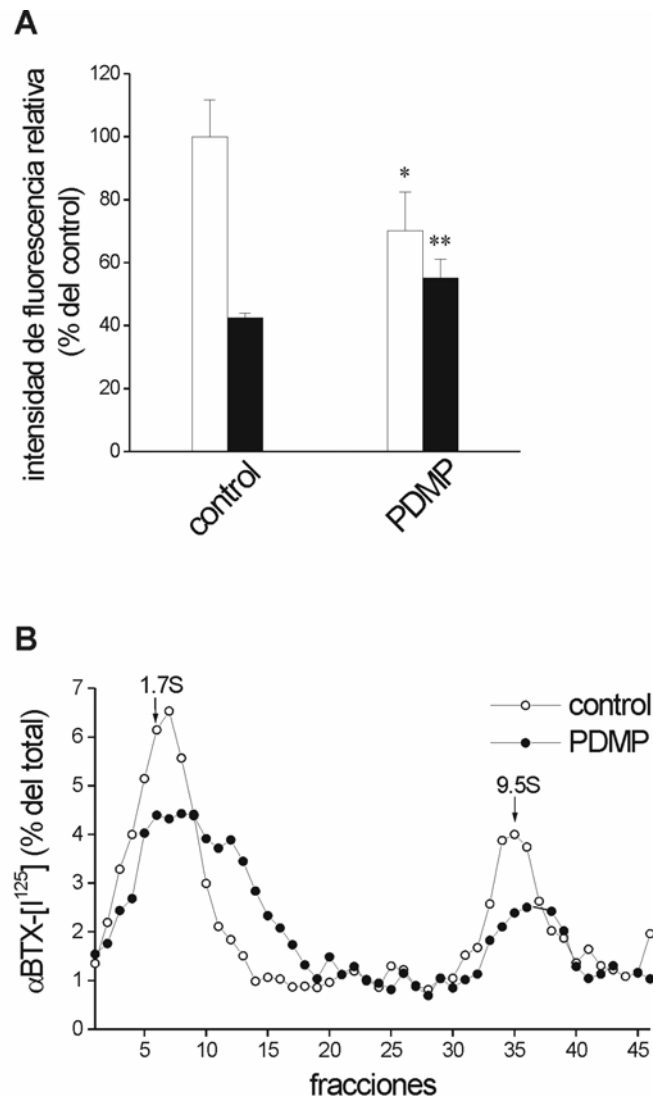


Fig. 1.18. Efecto de altas concentraciones de PDMP sobre la cantidad de AChR intracelular y de subunidades α desensambladas. A) Intensidad de fluorescencia relativa correspondiente a AChR intracelular (barras blancas) y a subunidades α desensambladas (barras negras) en células controles y tratadas con 50 μ M de PDMP, respectivamente. B) Análisis del AChR intracelular mediante gradientes de sacarosa en células controles y tratadas con 50 μ M de PDMP (ver Materiales y Métodos). Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres o más experimentos independientes, excepto para los resultados presentados en B), en el cual se muestra los resultados de un experimento representativo. Simple (*) o doble (**) asterisco denota valores de p : <0.05 , <0.01 , respectivamente, obtenido mediante la aplicación del test de Student para cada condición.

La depleción de SL afecta la salida del AChR en estadios tempranos de la vía secretoria

Los resultados anteriores indican que en células en las cuales la biosíntesis de SL es inhibida, el ensamblaje del AChR es menos eficiente que en condiciones controles, lo cual finalmente se traduce en una menor expresión del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5. Con la finalidad de analizar la localización intracelular del AChR marcamos células con: a) α BTX fluorescente para marcar AChR intracelular, b) ER-Tracker para marcar el RE, y c) sintaxina 6 para identificar el TGN en células controles y tratadas con 50 μ M PDMP por 24 h. Como mostramos en la Fig. 1.19, el AChR fue encontrado predominantemente en el RE, ya sea en células controles como en células tratadas con PDMP, como fue descrito por Ross et al. (1991) (ver también Fig. 1.10).

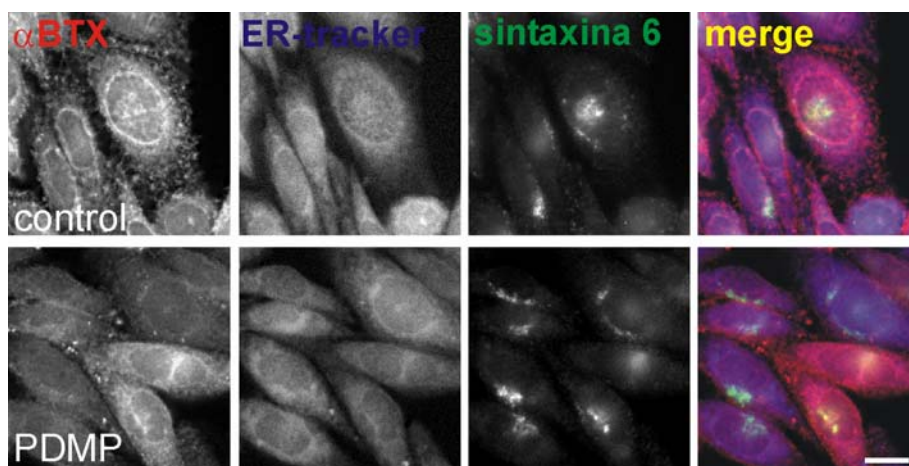


Fig. 1.19. Colocalización del AChR intracelular con marcadores del RE y TGN. Las células controles y tratadas con 50 μ M de PDMP por 24 h se marcaron con α BTX-Alexa⁵⁹⁴, ER-Tracker y anti-sintaxina 6 para marcar conjuntamente el AChR, RE y TGN, respectivamente, como describimos previamente en Materiales y Métodos. La superposición (merge) de las tres sondas se muestra en el panel derecho. Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron sometidas a deconvolución como en Pediconi et al., 2004. Barra, 10 μ m.

Para determinar si el AChR puede continuar su tránsito normal a través de la vía secretoria en células en las que la biosíntesis de SL se encuentra afectada, las células

CHO-K1/A5 fueron sometidas a una incubación a 20°C, lo cual resulta en acumulación del AChR en el TGN (Pediconi et al., 2004). Como se observa en la Fig. 1.20 en las células control se evidencia una clara acumulación del AChR en el TGN, mientras que esto no se observa en las células tratadas con altas concentraciones de PDMP, las cuales mostraron un patrón de distribución del AChR típico de RE.

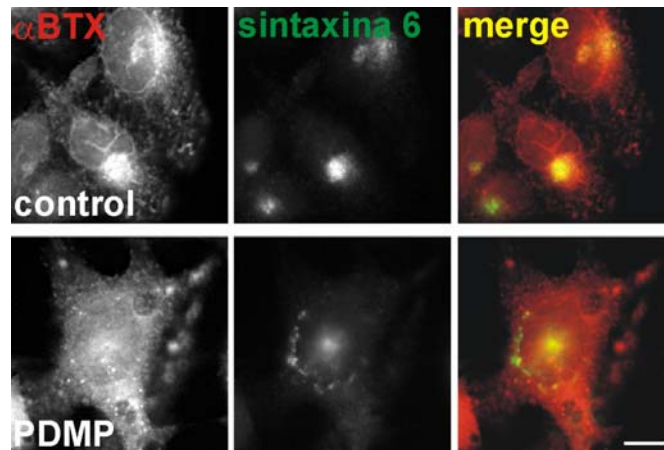


Fig. 1.20. La depleción en los niveles de SL afecta el tráfico del AChR en estadios tempranos de la vía secretoria. Las células controles y tratadas con 50 μ M de PDMP por 24 h se incubaron posteriormente por 2.5 h a 20°C para detener el tráfico de proteínas a nivel del TGN. Finalmente se marcaron con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ y anti-syntaxina 6 para marcar conjuntamente el AChR y el TGN, respectivamente, como describimos previamente en Materiales y Métodos. La superposición (merge) de las dos sondas se muestra en el panel derecho. Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron sometidas a deconvolución como en Pediconi et al., 2004. Barra, 10 μ m.

Para confirmar además la localización del AChR en el RE, las células CHO-K1/A5 se marcaron con anti-calnexina (Fig. 1.21 A) o anti-PDI (Fig. 1.21 B) [marcadores de estas proteínas residentes del RE], y con α BTX-Alexa⁴⁸⁸, para marcar el AChR. Como se muestra en la Fig. 1.21 A-B, las dos proteínas (AChR y marcadores del RE) mostraron una distribución intracelular similar en células tratadas con alta concentración de PDMP, lo cual se condice con los resultados presentados en la Fig. 1.18 A, la cual muestra que

prácticamente todo el AChR intracelular se encuentra desensamblado, y por lo tanto retenido en el RE.

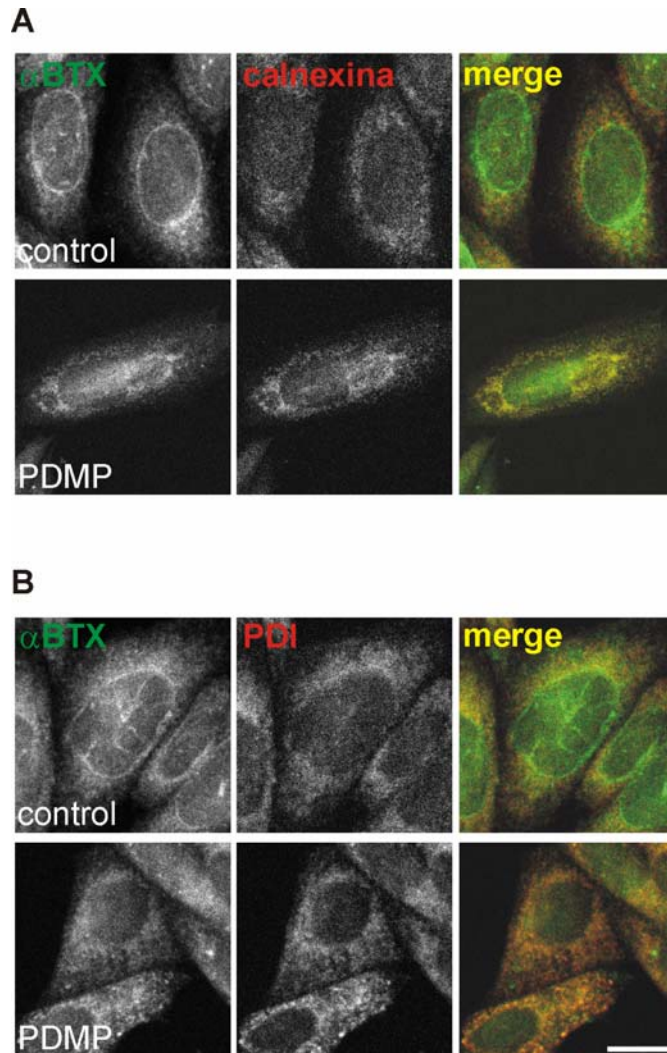


Fig. 1.21. En células tratadas con altas concentraciones de PDMP el AChR colocaliza principalmente con proteínas residentes del RE. Imágenes de microscopía confocal de células CHO-K1/A5 controles y tratadas con 50 μ M de PDMP por 24 h. Estas se marcaron con α BTX-Alexa⁴⁸⁸ y anti-calnexina (A) o anti-PDI (B) para marcar el AChR total, calnexina y PDI respectivamente, como describimos previamente en Materiales y Métodos. La superposición de las imágenes (merge) se muestra en el panel derecho. Barra, 10 μ m.

Las proteínas Rab pertenecen al grupo de pequeñas GTPasas, las cuales están involucradas en varios pasos de transporte en las vías de tráfico vesicular celular. Las dos isoformas de la proteína Rab 1 (Rab 1a/b) se localizan en las membranas del RE y Golgi y regulan el transporte exocítico desde el RE hacia el aparato de Golgi (Tisdale et al., 1992; Saraste et al., 1995). Analizamos la distribución intracelular de la proteína Rab 1b mediante microscopía de fluorescencia con el objeto de evaluar si su distribución se encuentra afectada como consecuencia del tratamiento con PDMP. Para esto, transfectamos células CHO-K1/A5 con Rab 1b-GFP, y estas células se trataron por 24 h con PDMP 50 μ M. Como

mostramos en la Fig 1.22, la proteína muestra una localización que se corresponde al aparato de Golgi, como ya fuera descrito previamente (Moyer et al., 2001; Alvarez et al., 2003). Como se observa en la Fig. 1.22, no existe diferencia en la distribución intracelular de la proteína Rab 1b entre la condición control y la que se incubó por 24 h con PDMP 50 μ M. En base a estos resultados podemos concluir que la retención del AChR en estadios tempranos de su biogénesis, en el RE (como consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de SL), no es un fenómeno generalizable a otras proteínas.

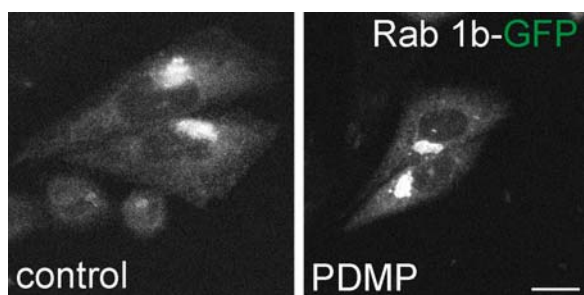


Fig. 1.22. Distribución de la proteína Rab 1b-GFP en células CHO-K1/A5 controles y tratadas con PDMP. Imágenes de microscopía confocal de células CHO-K1/A5 controles y tratadas con 50 μ M de PDMP por 24 h, transfectadas previamente con Rab 1b-GFP, como describimos en Materiales y Métodos. Barra, 10 μ m.

El ensamblaje ineficiente del AChR no es una consecuencia de una disponibilidad disminuida de la proteína chaperona calnexina

Calnexina es una proteína chaperona que contribuye en la biogénesis del AChR (Gelman et al., 1995; Chang et al., 1997) y que se asocia con subunidades no ensambladas del AChR en el RE (Keller et al., 1996; Wanamaker y Green, 2005, 2007). Para evaluar si los efectos observados con altas concentraciones de PDMP fueron una consecuencia indirecta de una disminución de los niveles endógenos de calnexina, tratamos las células CHO-K1/A5 con 50 μ M PDMP por 24 h y medimos tanto AChR intracelular como niveles de calnexina mediante microscopía de fluorescencia cuantitativa. Para esto, se marcaron intracelularmente células controles y tratadas con PDMP (ver Materiales y Métodos) con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ y anti-calnexina, con su correspondiente anticuerpo secundario fluorescente, para identificar AChR intracelular y calnexina, respectivamente. Observamos que los niveles de calnexina no se encontraban disminuidos (Fig. 1.23 A-B), descartando así la

posibilidad de que el tratamiento con PDMP provoque un ineficiente ensamblaje del AChR como consecuencia secundaria de una baja disponibilidad de esta proteína chaperona.

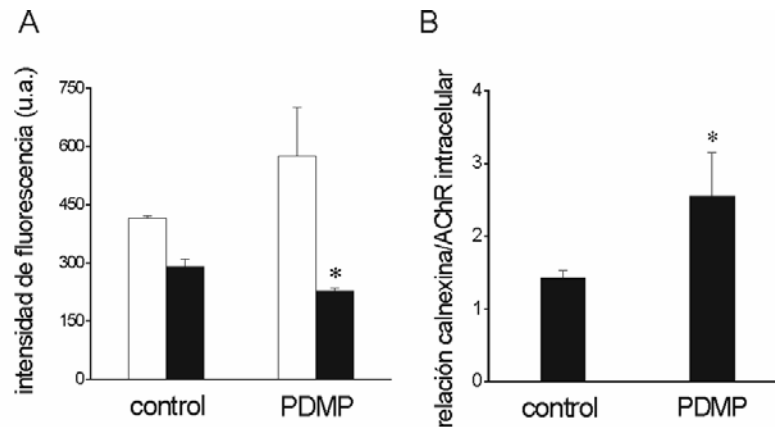


Fig. 1.23. Los niveles de la proteína chaperona calnexina no son afectados por el tratamiento con altas concentraciones de PDMP en células CHO-K1/A5. A) Intensidad de fluorescencia correspondiente a los niveles intracelulares de calnexina (barras blancas) y AChR (barras negras), en células controles y tratadas con 50 μ M de PDMP por 24 h, respectivamente. B) relación calnexina/AChR intracelular en células controles y tratadas con PDMP, respectivamente. Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres o más experimentos independientes. Simple (*) asterisco denota valores de $p < 0.05$ obtenido mediante la aplicación del test de Student para cada condición.

Análisis de las características biofísicas de las membranas del RE tras la depleción de SL

Ya que desde su biogénesis temprana las distintas subunidades del AChR se encuentran inmersas en la membrana del RE, y teniendo en cuenta que los lípidos de la misma interaccionan activamente con el AChR (Barrantes 1992, 1993, 2002, 2003, 2004) decidimos analizar si cambios en las propiedades biofísicas generales de estas membranas podrían ser las responsables de las alteraciones en el proceso de ensamblaje del AChR. Para el estudio de las características biofísicas de la membrana del RE empleamos la sonda ER-TrackerTM Blue-White DPX (Fig. 1.24), la cual marca selectivamente el RE en células vivas (Fig. 1.19). Esta sonda es sensible a la polaridad del ambiente (Diwu et al., 1997). El máximo de emisión se corre a longitudes de onda más largas y su rendimiento

quántico disminuye con el incremento de la polaridad del solvente en el cual se encuentra la sonda.

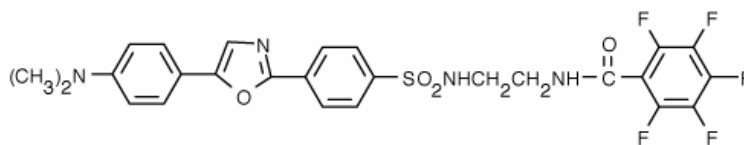


Fig. 1.24. Estructura de la sonda ER-Tracker™ Blue-White DPX.

Empleamos dos técnicas para el estudio de las propiedades biofísicas de esta sonda, espectroscopia de fluorescencia, para analizar las características espectrales de la sonda en diferentes condiciones, y anisotropía de fluorescencia, la cual informa acerca de la movilidad de la sonda en un ambiente dado.

En primer lugar analizamos las características espectrales de la sonda en sistemas de membranas modelo. Empleamos liposomas constituidos por PS y PC (PS:PC 50:50 mol %) (Fig. 1.25 A) ya que estos son componentes representativos de las caras citosólica y lumenal de las membranas del RE, respectivamente (Eidelman et al., 2002). Para analizar si esta sonda es sensible a la presencia de SM en las membranas, agregamos SM a la muestra constituida por PS y PC (PS:PC:SM 45:45:10 mol %). Como se observa en la Fig. 1.25 A, la presencia de SM en las membranas conduce a un aumento del 25% en el rendimiento cuántico de la sonda fluorescente, así como a un corrimiento de la longitud máxima de emisión a valores más pequeños, 480 nm en liposomas de PS:PC, 476 nm en liposomas de PS:PC:SM.

En base a estos resultados decidimos estudiar que ocurre con las propiedades de esta sonda fluorescente en membranas de RE en células vivas. Para esto tratamos las células CHO-K1/A5 con PDMP 50 μ M e ISP-1 60 μ M por 24 h, posteriormente se marcaron con 1 μ M de ER-Tracker 45 min. en incubador a 37°C, se resuspendieron en buffer PBS y se tomaron los espectros de la sonda fluorescente en el espectrofluorímetro (ver Materiales y Métodos).

En la Fig. 1.25 B se muestran espectros de emisión de ER-Tracker en membranas de RE de células CHO-K1/A5 controles y tratadas con PDMP. No observamos ningún cambio en el espectro de emisión de ER-Tracker, el rendimiento cuántico no cambió, así como tampoco su longitud máxima de emisión, la cual se mantuvo constante en 468 nm. Como puede observarse en la Fig. 1.25, el máximo de emisión de la sonda en células se encuentra desplazado hacia la izquierda, comparado con los liposomas de PS:PC o PS:PC:SM (12 y 8 nm respectivamente), lo que indicaría que las membranas del RE son menos fluidas, o más ordenadas, que las existentes en los sistemas modelos.

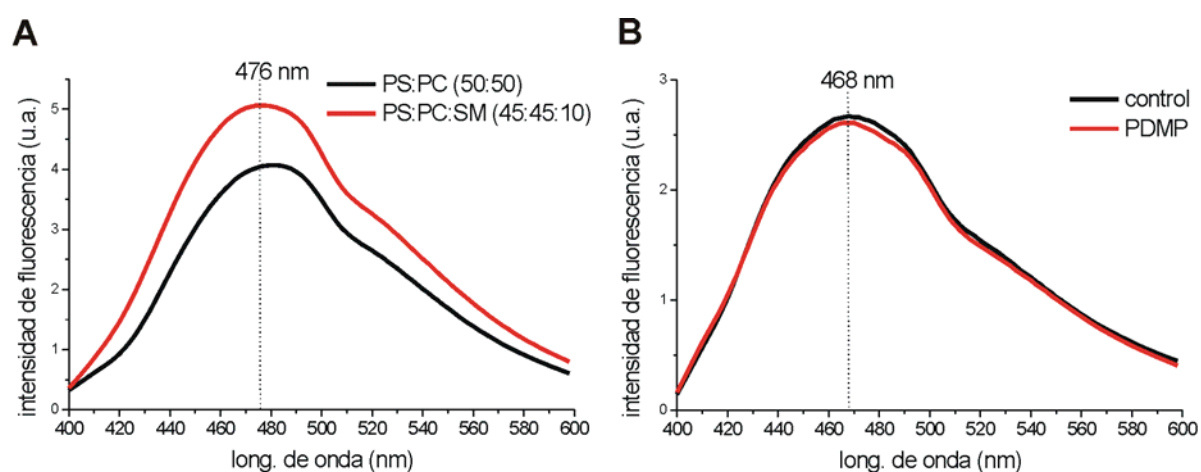


Fig. 1.25. Análisis de las características espectroscópicas de la sonda ER-Tracker en la membrana de las células CHO-K1/A5, controles y tratadas con PDMP. A) Espectro de emisión de la sonda fluorescente ER-Tracker en liposomas constituidos por DPPS:DPPC (50:50 mol%) (línea color negro) o DPPS:DPPC:SM (45:45:10 mol%) (línea color rojo). La longitud de onda máxima de emisión de ER-Tracker en liposomas de DPPS:DPPC:SM se marca en línea punteada. B) Espectro de emisión de la sonda fluorescente ER-Tracker en células controles y tratadas con 50 μ M de PDMP por 24 h. La longitud de onda máxima de emisión de ER-Tracker en estas células se marca en línea punteada. Las condiciones experimentales para ambos experimentos se detallan en Materiales y Métodos.

En segundo lugar analizamos la movilidad de ER-Tracker en la membrana del RE mediante anisotropía de fluorescencia. Para esto utilizamos un microscopio de epifluorescencia estándar el cual posee acoplado un sistema que permite la obtención de imágenes provenientes de dos canales en forma simultánea (“*dual viewer*”), similar al

empleado por Taniguchi et al. (2006) (ver Materiales y Métodos). Primeramente analizamos si nuestro sistema era lo suficientemente sensible como para detectar diferencias en la movilidad del ER-Tracker y determinar si esta sonda reporta cambios de movilidad en diferentes entornos. Analizamos como se comporta el ER-Tracker frente a disoluciones con diferentes porcentajes de glicerol. En la Fig. 1.26 A se muestran los canales de detección perpendicular y paralelo (con respecto a la polaridad de la luz de excitación) para dos situaciones: 0% de glicerol y 100% de glicerol y en la Fig. 1.26 B se muestra como la movilidad de la sonda ER-Tracker es función del contenido de glicerol en la muestra.

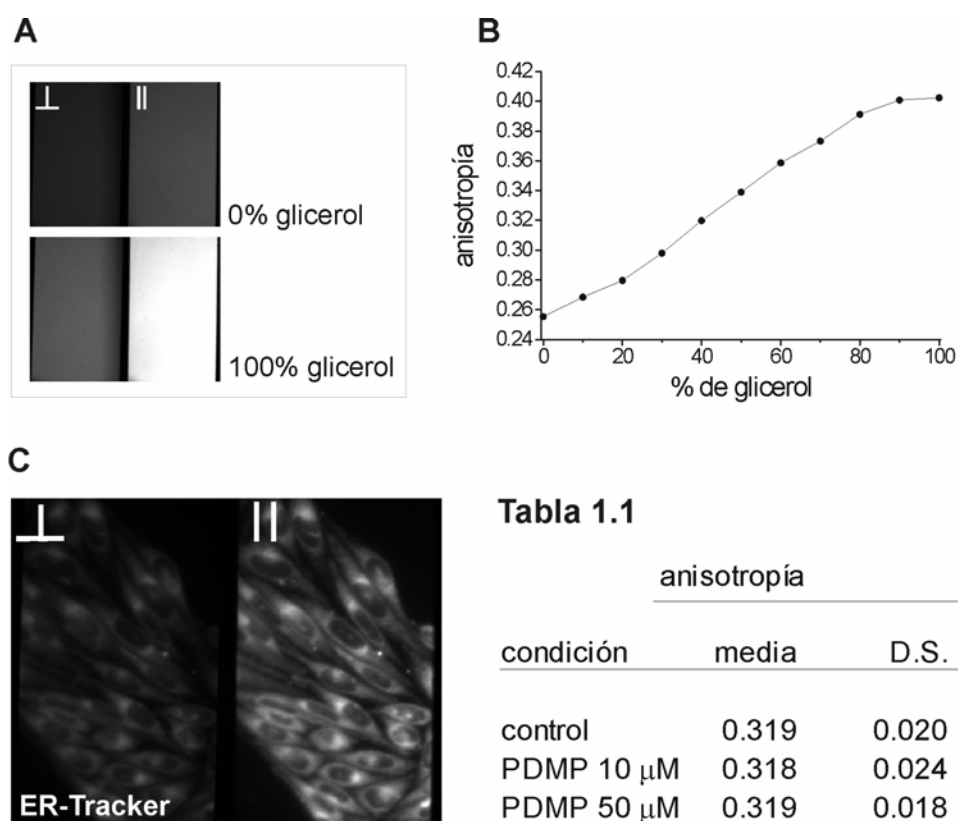


Fig. 1.26. La movilidad de la sonda ER-Tracker en la membrana del RE de las células CHO-K1/A5 no se ve afectada por la depleción de SL. A) Imágenes correspondientes a ER-Tracker disuelto en DMSO con diferentes porcentajes de glicerol (ver texto para detalles). B) Gráfico mostrando la relación entre los valores de anisotropía de la sonda fluorescente ER-Tracker vs. la concentración de glicerol del medio (dado en porcentaje). C) Imágenes de células CHO-K1/A5 marcadas con ER-Tracker (ver texto para detalles). Tabla 1.1, valores de anisotropía de ER-Tracker en células controles y tratadas con 10 y 50 μ M de PDMP por 24 h. \parallel e \perp indican los canales paralelo y perpendicular, respectivamente, con respecto a la polaridad de la luz de excitación.

Por lo tanto las mediciones de anisotropía de esta sonda fluorescente proveen información acerca de la movilidad de la misma en su entorno, lo que está relacionado con el estado de las membranas del RE, y por lo tanto permiten analizar si existen cambios en las mismas cuando las células son tratadas con drogas que afecten la biosíntesis de SL. Para esto se trataron las células CHO-K1/A5 con PDMP 10 y 50 μM por 24 h, y posteriormente se marcaron con 1 μM de ER-Tracker durante 45 min en incubador a 37°C, analizándose finalmente mediante anisotropía de fluorescencia. En la figura 1.26 C se muestran las imágenes correspondientes a los canales de detección perpendicular y paralelo para la condición control. Del análisis cuantitativo de las imágenes no surgieron cambios en los valores de anisotropía de esta sonda en las diferentes condiciones estudiadas (Fig. 1.26, Tabla 1.1).

En base a los resultados obtenidos mediante espectroscopia y anisotropía de fluorescencia de ER-Tracker en membranas modelo y de RE de las células CHO-K1/A5, y teniendo en cuenta que el contenido de SL (así como el de colesterol) en membranas de RE es muy baja (Holthuis et al., 2001, Holthuis y Levine, 2005) es de esperar que cambios en los niveles de estos lípidos en dicha organela no afecten las propiedades biofísicas de sus membranas. Concluyendo sobre este punto, los cambios en los niveles de SL no afectarían las membranas del RE en una forma general.

Estudio de la asociación del AChR con membranas resistentes a la extracción con detergente (DRMs, *detergent-resistant membranes*) en los compartimentos iniciales de la vía secretoria

Ya que el AChR no es ensamblado correctamente en el RE cuando se altera la biosíntesis de SL, y teniendo en cuenta que las características generales de las membranas de dicha organela no se ven afectadas, como surge de los estudios con la sonda ER-Tracker, analizamos la posibilidad de que el AChR se particione o interactúe con DRMs en el RE. Recientemente, la asociación del AChR con dominios (“rafts”) lipídicos ha

sido documentada por varios autores (Bruses et al., 2001; Marchand et al., 2002, Zhu et al., 2006; Campagna y Fallon 2006; Stetzkowski-Marden et al., 2006; Willmann et al., 2006), pero aún no se conoce si esta interacción ocurre en estadios tempranos de la vía secretoria, en la biogénesis del AChR. Es plenamente aceptado que los DRMs no son exclusivos a la membrana plasmática. Estudios pioneros encontraron que estos dominios lipídicos se asociarían a proteínas en estadios tempranos de la vía secretoria, ya a nivel del Golgi (Brown y Rose, 1992; Fra et al., 1994; Paladino et al., 2004). Si bien el Golgi contiene importantes niveles de colesterol y SL, no ocurre lo mismo con el RE, ya que es la organela de la vía secretoria con menor niveles de estos lípidos (Holthuis et al., 2001; van Meer y Lisman, 2002; Holthuis y Levine, 2005). Como consecuencia de esto, se ha considerado al RE como un sitio improbable de existencia de balsas o “rafts” lipídicos (o DRMs). Sin embargo varios autores postulan la existencia de DRMs en el RE (Sevlever et al., 1999; Hayashi y Su, 2003, 2004; Paladino et al., 2004; Sarnataro et al., 2004; Campana et al., 2006; Browman et al., 2006).

Analizamos la solubilidad en Tritón X-100 a 4°C, la definición operacional de los denominados DRMs, en fracciones de RE y Golgi de las células CHO-K1/A5. El fraccionamiento subcelular fue realizado como Vidugiriene et al., (1999) (ver Materiales y Métodos). Mediante Wester Blot encontramos que las fracciones enriquecidas en RE obtenidas de las células CHO-K1/A5, identificadas por el marcador calnexina, se encontraron en las fracciones más pesadas, 3-4 (Fig.1.27 A). Las membranas enriquecidas en Golgi, identificadas por el marcador syntaxina 6, se encontraron en las fracciones más livianas, 1-2, en concordancia a lo reportado por Vidugiriene et al. (1999), Fig. 1.27 A. En base a los resultados anteriores, se combinaron y homogenizaron las fracciones 3 y 4, al igual que las fracciones 1 y 2, con la finalidad de realizar los experimentos de solubilidad en Triton X-100 en dichos grupos. Denominamos dichas fracciones “enriquecidas en RE” (fracciones 3-4), y fracciones “enriquecidas en Golgi” (fracciones 1-2), respectivamente.

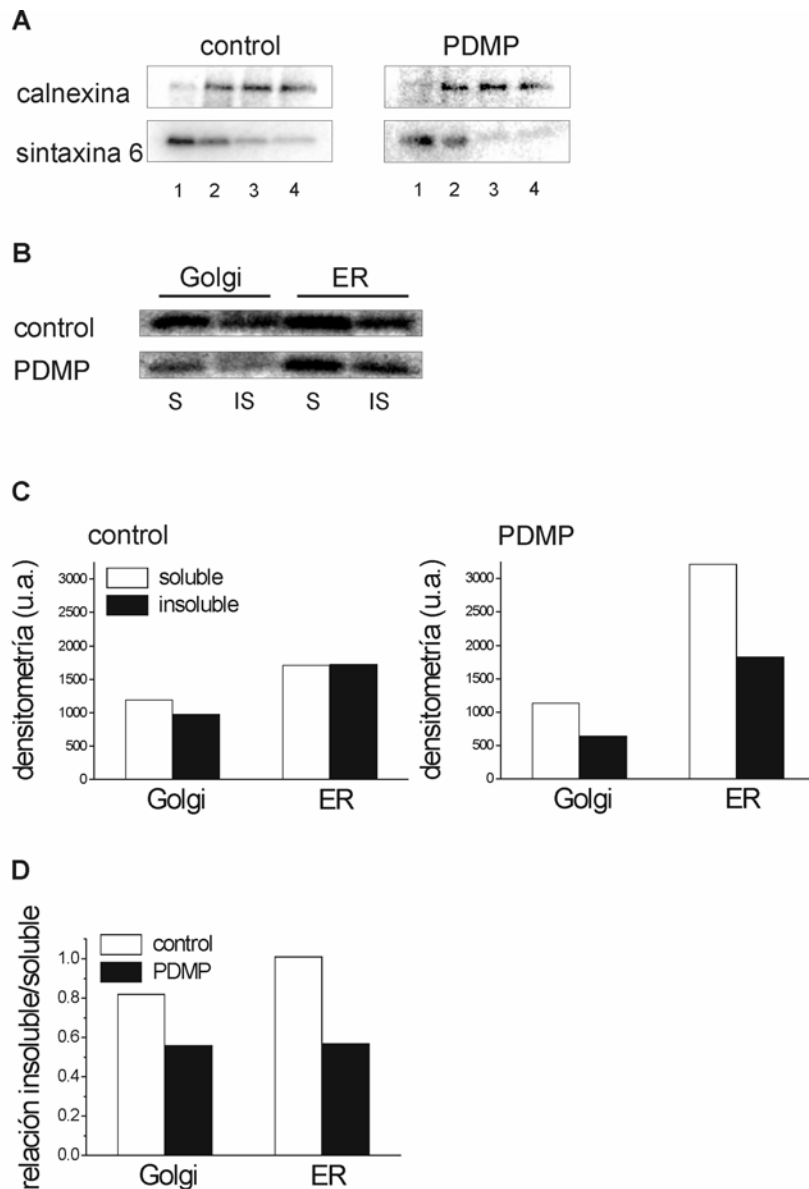


Fig. 1.27. La distribución del AChR en DRMs de RE y Golgi se altera como consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de SL. Las células CHO-K1/A5 se trataron con 50 μ M de PDMP por 24 h, se homogenizaron y las fracciones microsomales se cargaron sobre gradientes discontinuos de sacarosa (30 y 45%). A) Análisis de *Western Blot* de las distintas fracciones del gradiente (1-4) e inmunoblot con los diferentes marcadores: calnexina (ER) y sintaxina 6 (TGN) en células controles y tratadas con PDMP. B) Las fracciones 1-2, fracción enriquecida en Golgi, y las fracciones 3-4, fracciones enriquecida en ER, fueron combinadas separadamente y extraídas con Tritón X-100 al 1% por 30 min. a 4°C, posteriormente centrifugadas para separar el material soluble del insoluble y analizadas mediante *Western Blot*. C) Análisis densitométrico de los inmunoblots mostrados en B) para las condiciones control y tratadas con PDMP, respectivamente. Barras blancas, fracción soluble; barras negras, fracción insoluble. D) La relación AChR insoluble/ AChR soluble se muestra para las condiciones control (barras blancas) y tratada con PDMP (barras negras). Los datos mostrados en esta figura corresponden a un experimento representativo.

Los DRMs fueron obtenidos por extracción con Tritón X-100 por 30 min. a 4°C de las fracciones enriquecidas en RE y de las fracciones enriquecidas en Golgi obtenidas a partir de células controles y tratadas con 50 μ M de PDMP por 24 h. Las fracciones solubles e insolubles en detergente posteriormente se separaron por centrifugación como en Schroeder et al. (1998). La presencia del AChR se analizó mediante *Western Blot* usando el anticuerpo mAb 210 (Fig. 1.27 B).

Encontramos que en células controles, aproximadamente el 50% del AChR fue encontrado en fracciones insolubles en Tritón X-100 proveniente fracciones enriquecidas en RE o Golgi (Fig. 1.27 C). Interesantemente, el tratamiento con PDMP se tradujo en cambios en la distribución del AChR: i) la partición del AChR en la fracción soluble se incrementó, tanto en las fracciones enriquecidas en RE así como en las de Golgi, ii) la cantidad de AChR en el RE se incrementó (Fig. 1.27 C, panel derecho), en concordancia con los resultados que discutimos anteriormente. En células con la biosíntesis de SL inhibida, la relación de AChR presente en DRMs/ AChR soluble en detergente, proveniente de fracciones enriquecidas en RE y Golgi, disminuyó un 40-50% con respecto a células controles (Fig. 1.27 D).

Para confirmar los datos anteriores, realizamos experimentos de fraccionamiento subcelular siguiendo esencialmente el procedimiento de Zhang et al. (1998) (ver Materiales y Métodos) con la finalidad de obtener DRMs de membranas enriquecidas en RE. Encontramos, mediante ensayos de *Western Blot*, que las fracciones enriquecidas en RE, identificadas nuevamente por el marcador calnexina, se entendían sobre varias fracciones del gradiente de sacarosa (Fig. 1.28 A), pero las fracciones más pesadas del mismo, estaban relativamente libres del marcador de Golgi, syntaxina 6 (Fig. 1.28 A). Así, los DRMs fueron obtenidos de las fracciones más pesadas del gradiente, para lo cual agrupamos y homogenizamos las fracciones 12-14 (Fig. 1.28 A) de células CHO-K1/A5 controles y tratadas por 24 h con 40 μ M de ISP-1 o 50 μ M de PDMP. Nuevamente, los DRMs fueron separados como mencionamos anteriormente, mediante extracción con Tritón X-100 a 4°C

por 30 min. Las fracciones “soluble” e “insoluble en detergente” se separaron por centrifugación y la presencia del AChR en las mismas se analizó mediante *Western blot* usando un anticuerpo distinto al empleado en el experimento anterior, el anticuerpo MA3-043, el cual reconoce la subunidad δ del AChR. Como mostramos en la Fig. 1.28 B, la proporción de AChR insoluble en detergente respecto al receptor presente en la fracción soluble disminuyó en células donde la biosíntesis de SL fue afectada (a 70% y a 45% en células CHO-K1/A5 tratadas con ISP-1 y PDMP, respectivamente), en concordancia con los resultados presentados anteriormente.

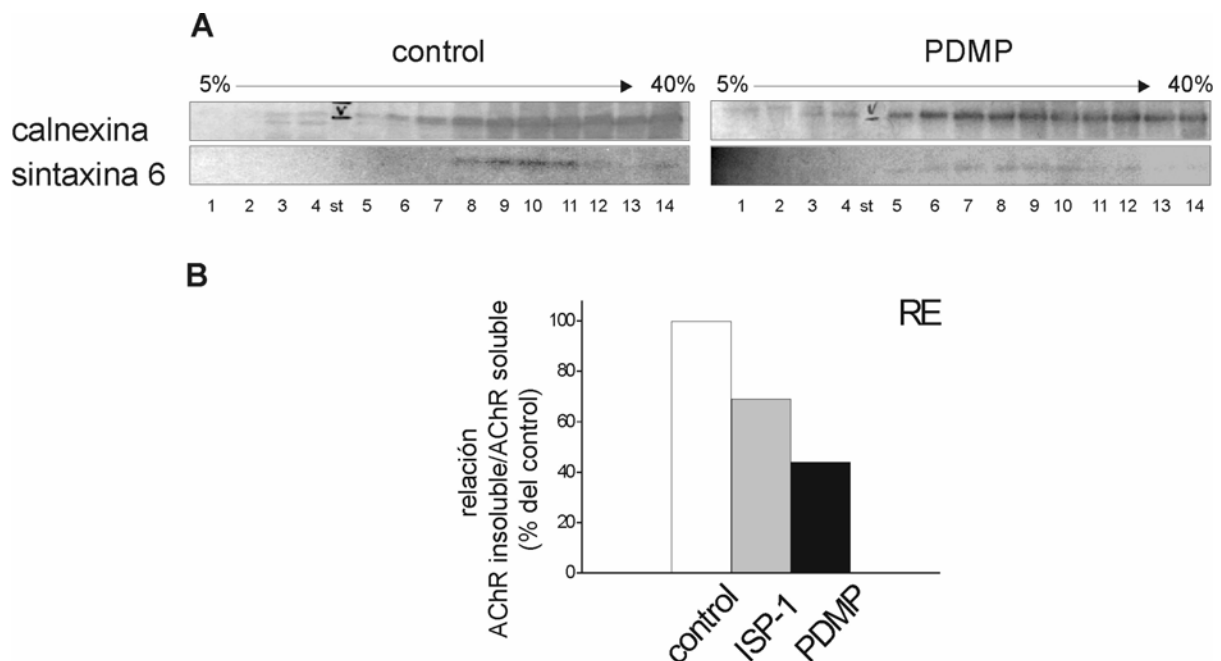


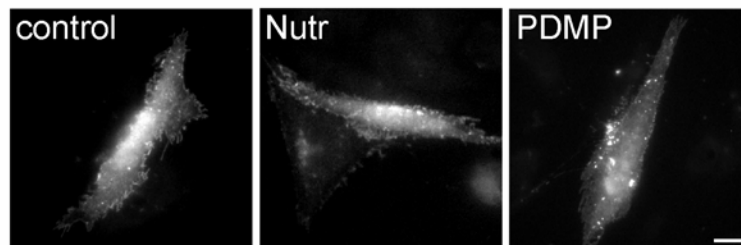
Fig. 1.28. Distribución del AChR en DRMs de membranas enriquecidas en RE en células que poseen la biosíntesis de SL inhibida. Las células CHO-K1/A5 se trataron con 50 μ M de PDMP o con 40 μ M de ISP-1 por 24 h, se homogenizaron y las fracciones microsomales se cargaron sobre gradientes de sacarosa (5-40%). A) Análisis de *Western Blot* de las diferentes fracciones del gradiente (1-14 se corresponde con 5-40%) e inmunoblot con los marcadores de organelas calnexina para RE y syntaxina 6 para Golgi. Las fracciones enriquecidas en el marcador calnexina (12-14) se agruparon y extrajeron con Tritón X-100 por 30 min a 4°C, posteriormente se centrifugaron para separar el material soluble del insoluble, y finalmente se analizaron por *Western Blot*. B) Gráfico correspondiente al análisis densitométrico del AChR en las fracciones insoluble y soluble en detergente. Se muestra la relación AChR insoluble / AChR soluble.

Estos resultados muestran, por primera vez, que una cierta proporción del AChR adquiere asociación con dominios lipídicos resistentes a la extracción con detergentes muy tempranamente en la vía secretoria, ya a nivel del RE, demostrándose además que esta asociación es sensible a los contenidos de SL celulares.

Los niveles celulares y la expresión en membrana plasmática de la proteína VSVG-GFP no son afectados por la inhibición de la biosíntesis de SL

Finalmente empleamos la proteína fluorescente VSVG-GFP con la finalidad de analizar si la inhibición de la biosíntesis de SL sobre el tráfico proteico afectaba a una proteína distinta del AChR. Rosenwald et al. (1992) mostraron que el tratamiento con PDMP en células CHO-K1 no afecta el arribo de la proteína VSV-G al compartimento *cis*-Golgi, pero que los subsecuentes pasos en la vía secretoria de esta proteína se ven afectados.

A



B

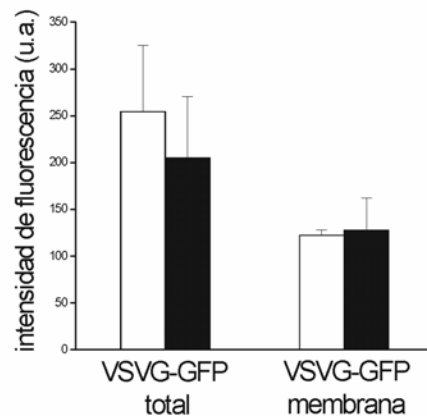


Fig. 1.29. La expresión en la membrana plasmática de VSVG-GFP no se ve afectada por el tratamiento de células las CHO-K1/A5 con PDMP por 24 h. Las células CHO-K1/A5 se transfectaron con VSVG-GFP y se trataron con 50 μ M de PDMP por 24 h. A) Imágenes de células expresando VSVG-GFP en células controles, Nutridoma y tratadas con PDMP, respectivamente. B) Gráfico mostrando las intensidades de fluorescencia correspondientes a VSVG-GFP total y VSVG-GFP presente en la membrana plasmática para las condiciones Nutridoma (barras blancas) y para células tratadas con PDMP (barras negras). Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de tres o más experimentos independientes. Barra, 10 μ m.

Transfectamos células CHO-K1/A5 en forma transiente con el ADNc de la proteína VSVG-GFP y crecimos estas células en medio Ham's F12 completo, Nutridoma, y Nutridoma conteniendo 50 μ M de PDMP por 24 h, respectivamente (Fig. 1.29 A). No hallamos diferencias estadísticamente significativas cuando medimos la intensidad de fluorescencia de VSVG-GFP total en células CHO-K1/A5 crecidas en medio Nutridoma, conteniendo o no PDMP (Fig. 1.29 B). En forma similar, los niveles de VSVG-GFP asociados a la membrana plasmática no fueron estadísticamente significativos entre células controles y tratadas con PDMP. Estos resultados están totalmente de acuerdo con los presentados en la Fig. 1.7 B, e indican que la alteración en el tráfico del AChR en su vía secretoria hacia la membrana plasmática, causada por inhibición de la biosíntesis de SL, no es un fenómeno general.

Se ha descrito que la proteína VSVG-GFP no particiona en balsas o "rafts" lipídicos (Kenworthy et al., 2004) y existe bibliografía documentando su solubilidad en Tritón X-100 (de Vries et al., 1998; Scheiffele et al., 1999, Keller et al., 2001b; Brown y Lyles, 2005). Analizamos la solubilidad de VSVG-GFP en nuestro sistema experimental mediante transfección de las células CHO-K1/A5 con el ADNc de la proteína VSVG-GFP, posterior extracción con Tritón X-100 a 4°C por 30 min, y separación del material "soluble" del "insoluble en Tritón X-100" mediante centrifugación, como se detalla en Materiales y Métodos. La presencia de VSVG-GFP en cada fracción se analizó mediante espectroscopia de fluorescencia. Como esperábamos, la proteína VSVG-GFP se distribuyó, casi absolutamente (96%), en la fracción soluble en Tritón X-100 (Fig. 1.30). En base a estos

datos podemos concluir que en nuestro sistema la proteína VSVG-GFP se comporta como una proteína que no particiona en DRMs o “rafts” lipídicos.

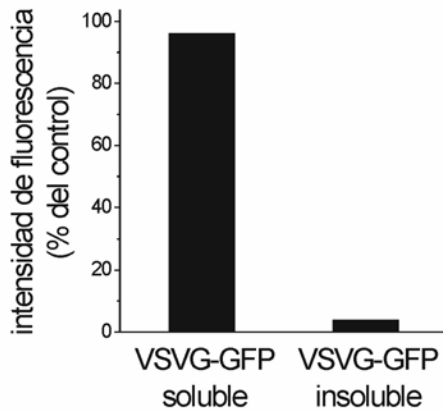


Fig. 1.30. La proteína VSVG-GFP no particiona en DRMs en células CHO-K1/A5. Las células CHO-K1/A5 transfectadas con VSVG-GFP fueron sometidas a extracción con Tritón X-100 por 30 min a 4°C. La cantidad de VSVG-GFP presente en la fracción soluble e insoluble en detergente se determinó mediante espectroscopia de fluorescencia (ver Materiales y Métodos).

DISCUSIÓN

En la sección precedente estudiamos el efecto de la privación de SL sobre el tráfico hacia la membrana plasmática del AChR en un sistema de células no polarizadas de mamífero. Demostramos que la inhibición de la biosíntesis de SL altera el transporte normal del AChR hacia la membrana plasmática y promueve su acumulación en el interior celular. Además, demostramos que los SL intervienen en estadios tempranos de la vía exocítica de esta proteína y que su déficit causa la retención y acumulación de receptores desensamblados en el RE. En base a estos resultados podemos hipotetizar que los SLs tendrían una actividad similar a chaperonas proteicas, en calidad de “chaperonas lipídicas”, tal como ha sido sugerido por algunos autores (ver revisión en Fantini, 2003, 2007), en el ensamblaje y tráfico del AChR (ver Figs. 1.31 y 1.32).

Como describimos en la introducción de este capítulo, los SLs comprenden los GSLs y la SM, los cuales difieren en la presencia de carbohidratos y fosfocolina en su cabeza polar, respectivamente. Los SLs contienen el residuo hidrofóbico ceramida, formada por la base esfingosina y un ácido graso (Fig. 1.1). La biosíntesis de SL comienza en la cara citoplasmática del RE y es iniciada por la condensación de L-serina con palmitoil-CoA, reacción catalizada por la enzima SPT, seguida por la biosíntesis de ceramida. La misma se transporta del RE hacia el aparato de Golgi por transporte mediado por vesículas y no mediado por vesículas, y luego es convertida en SM por la enzima SM sintasa en la cara lumenal del aparato de Golgi, o a GluCer por la enzima GluCer sintasa, en el lado citosólico del aparato de Golgi. Luego de su traslocación al lumen del aparato de Golgi, GluCer es convertida a lactosilceramida y GSL más complejos (por revisiones ver van Meer y Lisman, 2002).

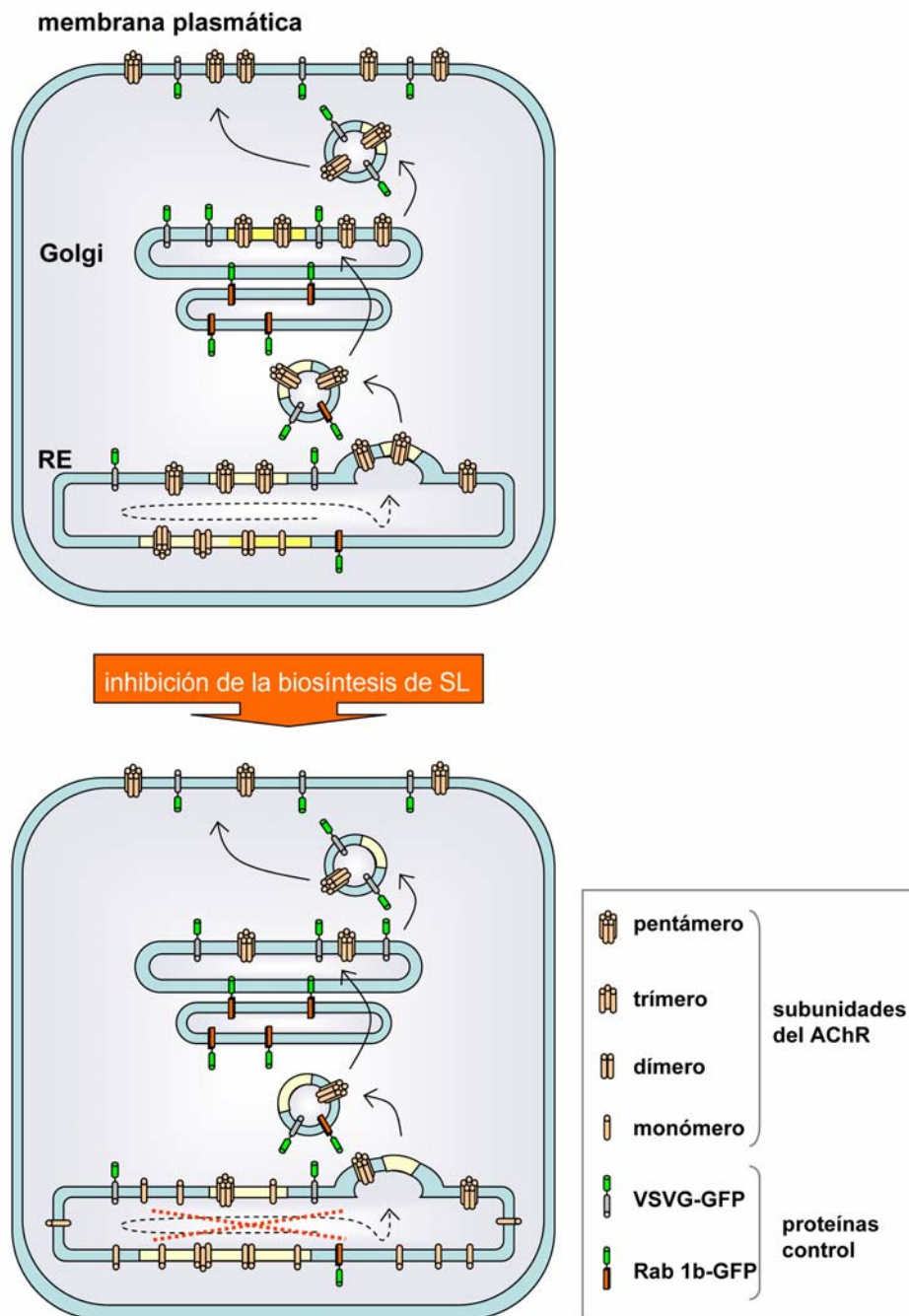


Fig. 1.31. Biogénesis y tráfico del AChR hacia la membrana plasmática y su relación con los SL. *Panel superior;* las distintas subunidades del AChR son sintetizadas en el RE, donde son ensambladas para formar el pentámero maduro, así el AChR se incorpora en vesículas de salida del RE y es transportado hacia el Golgi, para finalmente alcanzar la membrana plasmática. En su camino exocítico, las distintas subunidades del AChR, así como el receptor completo, interaccionan con distintos dominios lipídicos, sensibles al contenido de SL (zonas amarillas) o insensibles al contenido de SL (zonas amarillas claras). La proteína VSVG-GFP transita la vía exocítica hacia la membrana plasmática sin asociarse a dominios lipídicos sensibles al contenido de SL. La proteína Rab 1b-GFP trafica entre el RE y el Golgi (ver esquema por referencias). *Panel inferior;* cuando se inhibe la

biosíntesis de SL, se afecta el tráfico del AChR en estadios tempranos de la vía secretoria, a nivel del RE, ya que se afecta el ensamblaje del mismo. De esta manera una menor cantidad de AChRs son ensamblados, con lo cual la expresión en membrana plasmática del mismo disminuye. Bajo estas circunstancias, el tráfico de las proteínas VSVG-GFP y Rab 1b-GFP no se encuentran afectados.

En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se observó que una clase de GSL, el gangliósido GM1, colocaliza con el AChR en la cara inervada ventral del electrocito (Marcheselli et al., 1993). Más recientemente, se demostró que la SM se distribuye asimétricamente en membranas ricas en AChR en electrocitos de *Torpedo*, estas están formadas predominantemente por cadenas de ácidos grasos saturados, y exhiben una selectividad moderada por al AChR (Bonini et al., 2002). Al igual que proteínas ancladas a GPI, los SLs residirían en dominios lipídicos denominados “rafts” (Simons e Ikonen, 1997).

Primeramente determinamos que los niveles de AChR en la superficie celular disminuyeron en células CHO/SPB-1/SPH⁻, deficientes en la biosíntesis de SL, crecidas en condiciones semipermissivas (37°C y en medio deficiente en SL). Cuando estas células se desarrollan a 37°C los niveles de ceramida y SM caen a un 9 y a un 50% de los de sus parentales (Hanada et al., 1990). La incubación de estas células en condiciones no permisivas resulta en una disminución en los niveles de SM y de gangliósido GM3 a un 20-25% de aquellos correspondientes a la línea celular parental, CHO-K1 (Hanada et al., 1992). Como mencionamos en la sección de resultados, nosotros elegimos para el estudio la condición de incubación a temperaturas semipermissivas (37°C), ya que a temperaturas no permisivas (39°C) la expresión del AChR se ve afectada aún en las células parentales, CHO-K1/A5. Trabajos de Paulson y Claudio (1990), Ross et al. (1991), determinaron que altas temperaturas son inapropiadas para la correcta expresión del AChR.

El mismo efecto en la expresión en membrana plasmática del AChR, así como la acumulación intracelular del AChR, fue observado con las tres drogas inhibitorias de la biosíntesis de SL empleadas independientemente (ISP-1, FB-1 y PDMP) en las células CHO-K1/A5 (Fig. 1.9).

Si bien ha sido demostrado que tanto FB-1 como PDMP pueden causar acumulación de compuestos bioactivos como esfinganina, esfinganina-1P o ceramida (Radin et al., 1993; Merrill et al., 1997, 2001), el hecho de que ISP-1 inhibe la biosíntesis de SL sin provocar acumulación de estos compuestos bioactivos (Miyake et al., 1995; Hanada et al., 2000b) excluye la posibilidad de que intermediarios metabólicos afecten el tráfico normal del AChR a la membrana plasmática (ver Fig. 1.17). Los efectos observados por lo tanto serían causados por la deficiencia de los productos finales de la vía biosintética de SL, SM y GSL.

Cuando agregamos un SL exógeno como la SM, conjuntamente con FB-1, PDMP (a baja concentración) o ISP-1, observamos que la cantidad de AChR en la membrana plasmática fue similar o aún mayor que las células controles; los niveles de AChR intracelular también fueron similares. El efecto de la depleción de SL es por lo tanto, reversible.

La comparación de los experimentos con bajas y altas concentraciones de PDMP nos ayudaron a comprender la relación entre la inhibición de la biosíntesis de SL y la alteración en el tráfico del AChR. A concentraciones bajas de PDMP esta droga solo bloquea la actividad de la GluCer sintasa (Fig. 1.2 y Fig. 1.5), con lo cual, la restauración del tráfico del AChR hacia la membrana plasmática observada cuando se agrega un exceso de SM (conjuntamente con las drogas inhibitorias) puede ser logrado por la restauración de la biosíntesis de SM por la reutilización del esqueleto esfingoide en la vía metabólica de SL (ver Tettamanti et al., 2003; Chigorno et al., 2005).

Hipotetizamos que un exceso de SM exógena restaura el tráfico del AChR porque permite la síntesis de SM por un mecanismo indirecto. Para esto, la SM exógena es primero degradada en el compartimiento lisosomal (Chigorno et al., 2005) y el esqueleto esfingoide es enviado al RE, donde posteriormente es reutilizado en la síntesis de SM. Altas concentraciones de PDMP, por otro lado, bloquean tanto la SM sintasa como la GluCer sintasa (ver Fig. 1.2 y Fig. 1.5), con lo cual la SM exógena es ahora incapaz de poder ser reutilizada mediante la vía de de reciclaje, y restaurar el tráfico del AChR (Fig. 1.16). Esto ocurriría porque el esqueleto esfingoide en el RE no podría ser utilizado para la biosíntesis

de SL, ya que la vía está cortada en los pasos superiores. De los experimentos que mostramos en las Figs. 1.9 B, 1.15 B y 1.16 A se observa que la cantidad de AChR en la membrana plasmática disminuye a medida que la concentración de PDMP aumenta; notablemente, la disminución del AChR en la superficie celular es acompañada por una concomitante disminución de los niveles de GluCer. Conjuntamente, estos resultados sugieren que la GluCer juega un papel crítico en el tráfico del AChR. La GluCer, aparte de ser el precursor de GSL complejos y de participar en la formación de dominios de membrana resistentes a la extracción con detergentes, puede participar en diferentes procesos celulares en localizaciones no usuales para este lípido (Halter et al., 2007). Su localización en la faz citosólica del Golgi interviene en el transporte de proteínas a los melanosomas (Sprong et al., 2001). Se han encontrado enzimas que degradan GluCer en el RE y en el citosol, y la ausencia de las mismas resulta en elevados niveles de GluCer intracelulares (Yildiz et al., 2006; Boot et al., 2007). Smith et al. (2006) encontraron que la SLTx (*Shiga-like toxin-1*) particiona en dominios lipídicos sensibles a los niveles de GluCer en el RE, y esto es particularmente importante en la citotoxicidad de la misma. Recientemente se encontró una proteína que transporta GluCer hacia el RE, FAPP2 (Halter et al., 2007; D'Angelo et al., 2007; ver comentarios de Levine, 2007). Tuuf y Mattjus (2007) determinaron que la proteína que transfiere glicolípidos, GLTP (*glycolipid transfer proteins*), de la cual no se conocía su actividad biológica precisa, sería un sensor de los niveles celulares de GluCer y posiblemente también actúe como una proteína con capacidad de transferir GluCer entre distintas membranas celulares (ver revisión en Brown y Mattjus, 2007). El hecho de que a bajas concentraciones de PDMP el tráfico del AChR se restaure mediante el agregado de SM exógena quizás se deba a que este lípido, en exceso, pueda suplir o reemplazar el defecto de GluCer (u otro GSL superior), lo cual ya no sucede a altas concentraciones de PDMP.

Ya que la inhibición de la biosíntesis de SL resultó en una acumulación intracelular del AChR, analizamos la posibilidad de que exista un problema a nivel del ensamblaje del AChR en el RE para formar el oligómero maduro. Esta hipótesis la estudiamos mediante un

ensayo que se basa en la protección de los sitios de unión de α BTX del AChR por el agonista carbamoilcolina (Carb) (Blount y Merlie, 1988; Kreienkamp et al., 1995; Chang et al., 1997; Keller et al., 2001). En células en las cuales se inhibió la biosíntesis de SL la cantidad de α BTX-Alexa⁵⁹⁴ unida en presencia de Carb fue mayor que en células controles (ver Fig. 1.14), indicando que existe mayor cantidad de subunidades α desensambladas, lo cual se relacionaría con una menor eficiencia de ensamblado de la proteína. Este resultado está de acuerdo con los experimentos de microscopía de fluorescencia en los cuales se observa colocalización de AChR intracelular con sondas del RE (Figs. 1.10, 1.19 y 1.21) y una mayor cantidad del AChR en las fracciones de RE en células tratadas con PDMP (Fig. 1.27 C, ver resumen en Figs. 1.31 y 1.32). Los mecanismos de control de calidad podrían reconocer señales de tráfico en subunidades desensambladas, las cuales se ocultarían cuando la proteína se encuentra completamente ensamblada (Keller et al., 2001, Wang et al., 2002).

Recientemente se publicó un trabajo en el cual los autores postulan que existe un control de calidad a nivel del Golgi, que controla la biogénesis del AChR y opera luego del ensamblaje del mismo (Eimer et al., 2007). Este sistema regularía la cantidad de AChR en membrana plasmática enviando receptores ensamblados hacia la vía degradativa, lisosomal, o permitiendo su viaje hacia la membrana plasmática. Nosotros observamos que la distribución del AChR en DRMs se altera tanto a nivel del RE como del Golgi (Fig. 1.27). Ya que en células que exhiben la biosíntesis de SL inhibida cierta fracción del AChR aún se ensambla en el RE y continúa su tránsito en la vía secretoria, quizás la partición diferencial del AChR en otros dominios lipídicos altere su relación con proteínas regulatorias del tráfico proteico, a nivel del Golgi, y conduzcan a su retiro de la vía secretoria y posterior degradación lisosomal.

Cuando agregamos SM a las células tratadas conjuntamente con FB-1, PDMP (a baja concentración) o ISP-1, no observamos diferencias cuando analizamos la cantidad de receptor ensamblado con respecto a células controles no tratadas (Fig. 1.14). Estos

resultados eliminarían la posibilidad de que las drogas utilizadas afecten la síntesis o la cinética de plegado o degradación de las distintas subunidades del AChR en el RE, ya que si este fuera el caso, la adición de SM a células con inhibición farmacológica de la biosíntesis de SL no debería tener efecto en estos parámetros.

En el caso de altas concentraciones de PDMP, nosotros analizamos la cantidad de calnexina intracelular en función de explorar la posibilidad de que la menor eficiencia en el ensamblaje del AChR en células tratadas con PDMP podría ser una consecuencia indirecta de una disponibilidad disminuida de esta chaperona como consecuencia del tratamiento con la droga, pero no fue el caso (Fig. 1.23). La calnexina se asocia rápidamente con subunidades del AChR recién sintetizadas (Gelman et al., 1995; Keller et al., 1996; Chang et al., 1997; Wanamaker y Green, 2005, 2007) y prolonga la vida media de las estas subunidades por aproximadamente 10 veces (Wanamaker y Green 2007). La función de esta proteína, al igual que otras chaperonas que participan en la biogénesis del AChR (como ERp57 y BiP, ver Wanamaker et al., 2003; Wanamaker y Green, 2005, 2007) es controlar el índice de plegamiento y ensamblaje del AChR.

Como puede afectar la disminución en la biosíntesis de SL el ensamblaje del AChR? Una posibilidad sería que el ambiente lipídico de las membranas del RE en las que se encuentran inmersas las subunidades del AChR se distorsione, como producto de la inhibición de la biosíntesis de SL, y esto en consecuencia afecte las interacciones proteína–proteína de las distintas subunidades del AChR generando los defectos observados en el ensamblaje del mismo. Nosotros analizamos las propiedades de las membranas del RE explotando dos propiedades biofísicas de una sonda fluorescente específica para el RE, la sonda ER-Tracker. Mediante espectroscopia y anisotropía de fluorescencia no observamos ningún cambio en las propiedades espectrales y de movilidad de esta sonda, con lo cual podemos inferir que el estado general de las membranas del RE no se ve afectado luego del tratamiento con PDMP. Teniendo en cuenta que los niveles de SL son muy bajos en esta organela (Holthuis et al., 2001; Holthuis y Levine, 2005), es coherente que cambios en sus niveles no afecten las propiedades generales de estas membranas. A pesar de esto, en

los últimos años se han publicado varios trabajos sobre el papel de los SL en el RE, y se ha evidenciado la intervención o participación de los mismos en diferentes eventos celulares. Dos proteínas ancladas a GPI, Cwp2 y Gas1/Gpg1, no son transportadas normalmente desde el RE al Golgi cuando la biosíntesis de SL es inhibida (Skrzypek et al., 1997). Proteínas ancladas a GPI fueron encontradas a estar asociadas con DRMs en el RE de células HeLa (Sevlever et al., 1999), desafiando artículos previos en los cuales se reportaba que este tipo de proteínas adquieren insolubilidad en detergentes recién en el aparato de Golgi (Brown y Rose, 1992). Más recientemente, la existencia de asociaciones que estabilizan proteínas fue encontrada entre la proteína priónica PrP^C y “rafts” lipídicos en el RE (Sarnataro et al., 2004; Campana et al., 2006; Fantini, 2007). Dos proteínas de la familia de las prohibitinas, Erlin-1 y Erlin-2, se localizan en el RE y se asocian a dominios similares a rafts en esta organela (Browman et al., 2006). Una forma mutante de la proteína PrP, asociada con una forma genética de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, PrPT182A, es retenida en el RE principalmente asociada a DRMs. Alteraciones en esta asociación, producida por depleción de colesterol, conduce al mal plegamiento de la proteína y su acumulación en el RE, con lo cual los autores proponen un rol protector de los DRMs en el correcto plegamiento de la proteína (Campana et al., 2006). Smith et al. (2006) encontraron que una fracción de la SLTx (*Shiga-like toxin-1*) se encuentra normalmente en DRMs de RE, y esta asociación es abolida por NB-DGJ, una droga que inhibe la GluCer sintasa. Li et al. (2006) encontraron presencia de caveolina 3 en DRMs de RE.

En base a lo mencionado anteriormente, pensamos que los SL también podrían interactuar con las subunidades del AChR mediante partición en DRMs o “rafts” a nivel del RE, como ocurre con PrP (Sarnataro et al., 2004; Campana et al., 2006). Nosotros encontramos que el AChR particiona en DRMs ya a nivel del RE, y que esta partición se ve afectada cuando se inhibe la biosíntesis de SL. Se considera que existen diferentes poblaciones de rafts lipídicos en diferentes tipos celulares, así como dentro de la misma célula (Pike, 2004; Wilson et al., 2004). Más aún, la cara citoplasmática de la membrana está organizada en dominios ordenados, pero su composición es diferente de los dominios

del lado extracelular (Gri et al., 2004; Mishra y Joshi, 2007), y existen autores que definen a los DRMs de RE como dominios similares a *rafts* lipídicos en base al bajo contenido de SL en esta organela (Pielsticker et al., 2005; Browman et al., 2006; Hendrich et al., 2007). Nosotros obtuvimos que, si bien la partición del AChR en DRMs de fracciones enriquecidas en RE disminuyó en células tratadas con PDMP o ISP-1 (Figs. 1.27 y 1.28), el AChR se encuentra aún en fracciones que son insolubles en detergente. Esto podría indicar que esta proteína se encuentra en diferentes poblaciones de DRMs en el RE, una fracción es sensible al contenido de SL de esta organela, y otra es insensible a los niveles de estos lípidos, y quizás esta partición en dominios lipídicos separados juegue un rol importante en la biogénesis del AChR (Figs. 1.31 y 1.32).

Se ha propuesto que los SL podrían actuar como chaperonas en el plegamiento de proteínas (Fantini, 2003), en base al análisis de la influencia de los SL en la conformación de las proteínas HIV gp-120, PrP y el péptido β -amiloide. Estas proteínas experimentan un notable cambio conformacional cuando interactúan con SLs (Fantini et al., 2002; Mahfoud et al., 2002). Estas proteínas comparten un motivo denominado “dominio de unión a SL” (SBD, *sphingolipid binding domain*), el cual se encontró también en otras proteínas (Aubert-Jousset et al., 2004; Fantini et al., 2006). De forma similar, los fosfolípidos también han sido propuestos a actuar como chaperonas moleculares. La presencia de fosfatidiletanolamina en membranas de *E. coli* es necesaria para el correcto ensamblaje de la lactosa permeasa (Bogdanov et al., 1996; Bogdanov y Dowhan, 1999). Más recientemente, actividad de chaperonas mediada por fosfolípidos fue reportada a jugar un rol importante en la patogenia de la fibrosis quística por participar en el tráfico de CFTR (Eidelman et al., 2002).

Varios factores intervienen en el proceso de plegamiento y ensamblado del AChR (Wanamaker et al., 2003). Estos procesos son dependientes de chaperonas residentes en el RE (Gelman et al., 1995; Keller et al., 1996; Chang et al., 1997; Wanamaker y Green, 2005, 2007), y las interacciones AChR-chaperonas, podrían ser, en parte, responsables de la cinética lenta del proceso de ensamblaje del AChR (Wanamaker y Green, 2007). La mayoría de las subunidades del AChR sintetizadas son degradadas (Merlie y Lindstrom,

1983), y el sistema de degradación asociado al RE (ERAD, *ER-associated degradation*) juega un papel clave en este proceso, ya que cuando se inhibe el ERAD se aumenta la expresión de AChR maduros (Wanamaker et al., 2003; Christianson y Green, 2004). Los niveles de AMPc son importantes también en el proceso de ensamblaje, ya que un aumento del AMPc citoplasmático incrementa la expresión en superficie del AChR (Ross et al., 1991).

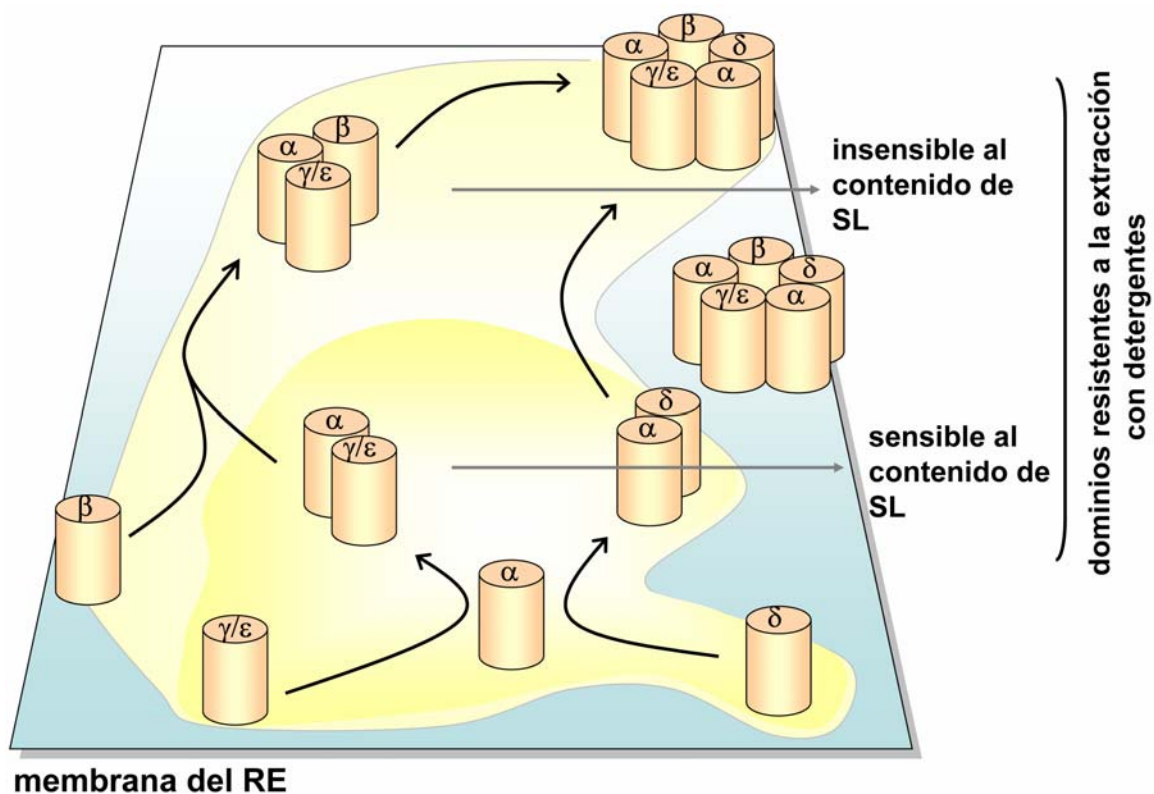


Fig. 1.32. Modelo hipotético de distribución de los distintos intermediarios del AChR así como el receptor completo en membranas del RE. Esquema que representa la distribución diferencial del AChR, así como los distintos intermediarios que participan en su biogénesis, en dominios lipídicos diferentes presentes en la membrana del RE (verde). En este modelo las diferentes poblaciones de intermediarios del AChR se particionarían en DRMs de RE con diferentes características biofísicas y funcionales. Uno de los dominios es sensible al contenido de SL (amarillo), el cual jugaría un rol importante en los estadios iniciales del proceso de ensamblaje, y otro dominio es insensible a los niveles de SL (amarillo más claro), el cual participaría en los estadios más tardíos del proceso. Cierta fracción de AChRs no se particiona en estos dominios. Ver texto para más detalles.

Nosotros observamos en nuestro sistema que cuando inhibimos la biosíntesis de SLs, aumenta la cantidad de AChR desensamblado, ya que experimentalmente encontramos que aumenta la cantidad de subunidades α desensambladas, tanto mediante experimentos de ligazón de α BTX en presencia de Carb, como en experimentos de gradientes continuos de sacarosa para separar intermediarios del AChR. A qué nivel del proceso de ensamblaje intervienen los SL en el RE?. En base a los datos experimentales podríamos concluir que se afecta principalmente la formación de dímeros entre las subunidades α - δ y α - ϵ , es decir, los estadios más tempranos de la biogénesis del AChR (Figs. 1.31 y 1.32). Esto podría ocurrir porque los SLs favorecerían la formación de estas asociaciones o bien porque la subunidad α , así como la δ o ϵ , no se encuentran completamente plegadas o maduras como para asociarse entre ellas cuando la biosíntesis de SL es inhibida. Se sabe que el dominio N terminal de las subunidades α , γ/ϵ y δ contienen la información necesaria para la asociación entre estas subunidades en los estadios tempranos de la biogénesis del AChR (Verrall y Hall, 1992; Sumikawa, 1992; Chavez et al., 1992; Sumikawa y Nishizaki, 1994; Kreienkamp et al., 1995). Subunidades α truncadas después del segmento M1 forman heterodímeros $\alpha\delta$ y heterotrimeros $\alpha\delta\beta$ (Yu y Hall, 1994a). Shtrom y Hall (1996) lograron el plegamiento de la subunidad α en un sistema *in vitro*. Esta subunidad, la cual posee el sitio de unión de α BTX, se asocia con la subunidad δ , obtenida en el mismo sistema, formando un heterodímero que contiene el sitio de unión colinérgico de alta afinidad. Se observó que mutaciones en el segmento transmembrana expuesto a los lípidos de la bicapa, el segmento M4, poseen diferentes consecuencias en la biología del AChR, desde su biogénesis, hasta su actividad funcional (Tamamizu et al., 2000). Empleando el segmento γ M4, de Almeida et al. (2006) hallaron que las propiedades de la membrana en la que este segmento se encuentra inserto, intervienen o modulan la interacción péptido-péptido. La proteína chaperona calnexina se une tempranamente a la subunidad α en su biogénesis, así como al resto de las subunidades del AChR (Gelman et al., 1995; Keller et al., 1996; Wanamaker y Green, 2005, 2007). Lo mismo ocurre con las

chaperonas ERp57 y BiP (Wanamaker y Green, 2007). ERp57, BiP y calnexina se asocian con las subunidades recién sintetizadas del AChR, permitiendo el ensamblaje inicial entre ellas, pero no se asocian con las subunidades en los estadios finales del proceso de ensamblaje (Wanamaker y Green, 2007). Inferimos que en los estadios iniciales del proceso de ensamblaje los SL podrían actuar como chaperonas lipídicas, como propone Fantini (2003), o quizás también generando un ambiente de membrana adecuado, el cual favorecería o estabilizaría la estructura de las subunidades recién sintetizadas, actuando en conjunto con las proteínas chaperonas, para lograr finalmente el ensamblaje del AChR pentámero, el cual puede proseguir a lo largo de la vía secretoria hasta la membrana plasmática (Figs. 1.31 y 1.32). Transiciones conformacionales del AChR, desde su estado cerrado al abierto y al desensibilizado, son influenciadas profundamente por la composición lipídica de la membrana (ver revisión en Barrantes, 2004; Fernández-Carvajal et al., 2006). Experimentos de microscopía electrónica demostraron que el 50% de la proteína corresponde a la parte extracelular de la misma, mientras que el ~25% corresponde a los segmentos transmembrana (Zingsheim et al., 1982; Mitra et al., 1989; Toyoshima y Unwin 1990, ver revisión en Barrantes, 2004). Un 30% de la porción transmembrana es la que se encuentra en contacto con los lípidos de bicapa lipídica (Toyoshima y Unwin, 1990). Así, cambios estructurales en los segmentos transmembrana, consecuencia de una interacción lipídica diferencial, podrían conducir a alteraciones a nivel del dominio extracelular y de esta manera alterar los procesos de plegamiento y ensamblaje del AChR.

Finalmente, del análisis global de los resultados anteriores, podríamos pensar que durante la biogénesis del AChR en el RE, las distintas subunidades, como así también los diferentes intermediarios y el receptor completamente ensamblado, se distribuirían en dominios de membrana con diferentes propiedades biofísicas y con distinta capacidad funcional (Figs. 1.31 y 1.32). Considerando los resultados y bibliografía discutidos previamente, los estadios iniciales de la biogénesis estarían relacionados con dominios de membrana sensibles al contenido de SL, los cuales estabilizarían o participarían activamente en los procesos de plegamiento o maduración de las distintas subunidades

nacientes del AChR en el RE. Los SL, podrían mediar, conjuntamente con las proteínas chaperonas residentes en el RE, los procesos iniciales de la biogénesis del AChR.

De lo expuesto, los niveles de SL en el RE, aunque bajos, podrían jugar un papel importante en la estabilización de proteínas maduras que salen de esta organela. Los mecanismos detallados de esta interacción no han sido dilucidados aún, pero se podría hipotetizar que los SLs participarían como chaperonas lipídicas, formando asociaciones proteína-lípido en microdominios de membrana, actuar como plataformas de direccionamiento y/o participar en la formación de vesículas de transporte anterógrado en el RE. En nuestro caso, niveles intracelulares deficientes de SLs conducen a una retención de subunidades no ensambladas de una proteína transmembrana, el AChR, en el RE, y esto reduce significativamente el tránsito de la proteína madura hacia la membrana plasmática en el sistema celular no polarizado utilizado en este trabajo de Tesis.

CAPÍTULO II

INFLUENCIA DEL COLESTEROL EN LA DISTRIBUCIÓN Y MOVILIDAD LATERAL DEL ACHR EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS CHO-K1/A5

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con lo que se discutiera previamente, la rápida transmisión sináptica como lo es la mediada por el neurotransmisor acetilcolina impone requerimientos espaciales y de concentración para lograr una alta eficiencia (Barrantes, 2007). La alta densidad del AChR, acumulado en forma de agrupamientos de esta proteína, en el orden de micrómetros, es una característica distintiva de las membranas postsinápticas de las uniones neuromusculares (UNM) adultas inervadas (Sanes y Lichtman, 2001).

Cuando los mioblastos se fusionan formando miotubos, varios genes sinápticos, incluyendo los que codifican las subunidades del AChR, son activados. Así, las distintas subunidades del AChR son sintetizadas, ensambladas en el RE en forma de pentámeros, y los receptores completamente ensamblados son insertados en la membrana plasmática donde pueden alcanzar una densidad de $\sim 1000/\mu\text{m}^2$. En adultos los AChR están concentrados a alta densidad ($10000-20000/\mu\text{m}^2$) en una pequeña área de la membrana, yuxtapuesta a la terminal nerviosa, mientras que en el resto de la membrana la densidad del receptor es $<10 \text{ AChR}/\mu\text{m}^2$ (Barrantes, 1983; Kummer et al., 2006).

La formación de la UNM es un proceso que resulta de múltiples pasos que requieren la acción coordinada entre las terminales nerviosas y el músculo (Sanes y Lichtman, 2001). La maduración postsináptica puede ocurrir, y los *acúmulos* de AChR pueden formarse en ausencia de inervación (Kummer et al., 2004). De todos modos, se desconoce hasta ahora cómo estos agregados supramoleculares son construidos en la superficie celular en ausencia de inervación (Sanes y Lichtman, 2001; Willmann y Fuhrer, 2002). Antes del establecimiento de estas especializaciones postsinápticas, la distribución de AChR varía desde una distribución en la que éstos están difusamente dispersos hasta formar agregados en el orden de décimas de micrón durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario de la UNM (Sanes y Lichtman, 2001; Willmann y Fuhrer, 2002). Estos cambios

marcados en la organización supramolecular ocurren dentro de una ventana temporal muy angosta en la ontogenia, entre los estadios embrionarios E13 y E14 (Sanes y Lichtman, 2001; Barrantes, 2007). Posteriormente, estos micro-agregados de AChR son reorganizados por el axón de la motoneurona para formar el sitio de contacto sináptico (Flanagan et al., 2005; ver revisiones de Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006). Posteriormente la sinapsis neuromuscular queda estabilizada y alrededor del estadio embrionario E17 el patrón de innervación maduro queda establecido (Witzemann, 2006). Luego las múltiples innervaciones de las fibras musculares son reducidas a un solo sitio de contacto, la forma fetal del AChR (conteniendo la subunidad γ) es reemplazada por el AChR adulto (conteniendo la subunidad ϵ) y se adquiere la morfología característica en forma de “*pretze*” en el caso de las UNM de vertebrados, o en forma elongada, con longitud de varios micrones, en el caso de la UNM de anfibios (ver revisiones Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006). Éste es un proceso muy complejo en el cual intervienen varios factores provenientes tanto del músculo (AChR, MuSK, rapsina, factores nucleares, etc.) así como del nervio (agrina, neuregulina, acetilcolina, etc.), discutidos en la Introducción de la presente Tesis.

Recientemente se ha observado que los lípidos, particularmente el colesterol y los SL, también participarían en el proceso de biogénesis y mantenimiento de la UNM (Campagna y Fallon, 2006; Zhu et al., 2006; Stetzkowski-Marden et al., 2006; Willmann et al., 2006). Estos estudios determinaron que la partición del AChR en “rafts” lipídicos es necesaria para el agrupamiento inicial del AChR así como para la posterior estabilidad de estas agrupaciones (ver más adelante).

El colesterol es un componente abundante de las membranas postsinápticas (Barrantes, 1989) y ha sido ampliamente demostrado cómo este lípido afecta las propiedades funcionales y de distribución del AChR (ver revisiones en Barrantes, 2004, 2007). Según lo señalado anteriormente, la descripción de la estructura de la membrana plasmática como un mosaico fluido por Singer y Nicholson (1972) ha sido revisada desde

entonces y numerosos estudios demuestran que su arquitectura espacial es mucho más compleja (ver revisión de Edidin, 2003a,b). Muchos de estos estudios indican que la membrana plasmática es en realidad una suerte de mosaico de compartimentos que están mantenidos e interrelacionados por una activa red del citoesqueleto. La teoría de los “rafts” o balsas lipídicas propone otro tipo de distribución (Simons y van Meer, 1988; Simons e Ikonen, 1997), en la cual, especies de lípidos específicos pueden asociarse entre sí para formar plataformas que determinarían o influirían en la partición diferencial de distintas proteínas y servirían también como plataformas para cascadas de señalización.

Usando sistemas de AChR reconstituido o membranas de *Torpedo* ricas en AChR se ha logrado conocer en buen grado cómo los lípidos interactúan con el AChR. Desde los estudios pioneros de Marsh y Barrantes (1978) en membranas nativas, en los que se determinara que los lípidos que rodean al AChR están relativamente “inmovilizados” con respecto al resto de la membrana, esta observación experimental ha contribuido a indagar acerca de las implicancias funcionales de los lípidos que rodean al receptor. Criado et al. (1982a) determinaron que la presencia de colesterol es necesaria para conservar los estados transicionales del AChR inducidos por agonista. Fong y McNamee (1986) observaron que la presencia de fosfolípidos negativamente cargados así como de colesterol es necesaria para conservar la funcionalidad del AChR y su estructura secundaria (Fong y McNamee, 1987). Leibel et al. (1987) determinaron que en membranas de *T. californica* ricas en AChR existen dos poblaciones diferentes de colesterol, una que es fácilmente extraíble y condiciona la fluidez general de la membrana y otra, difícilmente extraíble, que posiblemente rodea a las moléculas del AChR. Utilizando técnicas de extinción de fluorescencia, Narayanaswami y McNamee (1993) postularon que existen sitios accesibles al colesterol en los segmentos transmembrana del AChR que no lo son para fosfolípidos. Posteriormente, Corbin et al. (1998) establecieron que el dominio de unión del AChR para el colesterol se encuentra en los segmentos $\alpha M1$ y $\alpha M4$ y $\gamma M4$, es decir, en la interfase lípido-proteína del AChR. Wenz y Barrantes (2005), en forma similar a lo determinado por Poveda et al. (2002), encontraron que el AChR organiza su entorno lipídico inmediato formando

dominios más ordenados y rígidos que el resto de la membrana. La presencia de colesterol en liposomas de POPC favorece la interacción proteína-proteína de segmentos γ M4 formando agregados del péptido (Barrantes et al., 2000; de Almeida et al., 2004, 2006).

Paralelamente a los estudios en sistemas modelo, varias líneas de investigación abordaron el tema de las interacciones lípido-proteína a nivel celular. En 1983, Pumplin y Bloch sugirieron que el estado o composición de los lípidos que rodean a las agrupaciones del AChR en miotubos de rata difieren de los del resto de la membrana. Se observó que las agrupaciones de AChR generan dominios de membrana que difieren del resto de la bicapa lipídica, y que estos “dominios de membrana” se alteran por tratamientos que dispersaban las agrupaciones de AChR o removían proteínas periféricas (Scher y Bloch, 1991). Estos autores postularon que las interacciones proteico-proteicas, así como las interacciones lipídicas mantienen o participan en la organización de estos dominios. Brusés et al., (2001) determinaron que los dominios o “rafts” lipídicos participan en las agrupaciones de AChR en espinas somáticas de neuronas ciliares. Marchand et al. (2002) encontraron que el AChR y la rapsina son recuperados de fracciones de baja densidad, enriquecidas en marcadores de “rafts” lipídicos cuando las células se extraen con Tritón X-100. Más recientemente, Pediconi et al. (2004) observaron que el colesterol participa en la vía excítrica del AChR y que es particularmente importante en el tráfico post Golgi.

Recientemente se ha determinado la importancia de los “rafts” lipídicos en la biogénesis (estimulada por agrina) así como en el mantenimiento o estabilidad de los acúmulos de AChR en miotubos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Campagna y Fallon (2006), empleando la línea celular C2C12, determinaron que el tratamiento con agrina promueve la partición del AChR a “rafts” lipídicos y que la disrupción de estos dominios lipídicos antes del tratamiento con agrina impide la formación de agrupamientos del AChR inducidos por la misma. También observaron que las agrupaciones del AChR son desestabilizadas cuando se alteran los dominios lipídicos. Zhu et al. (2006), utilizando el mismo modelo, también encontraron que la agrina estimula la partición del AChR en “rafts” lipídicos y que este proceso es precedido por la partición de MuSK a “rafts” y requiere su activación. La

alteración de estos dominios lipídicos impide la activación de MuSK y por lo tanto la cascada de señales “río abajo” que desencadenan el agrupamiento de AChR inducido por agrina. La rapsina se halla constitutivamente en “rafts” lipídicos (Marchand et al., 2002, Zhu et al., 2006) y la perturbación de “rafts” lipídicos altera la interacción entre la rapsina y el AChR (Zhu et al., 2006). Estos autores proponen que los “rafts” lipídicos participarían como plataformas que facilitan la vía de agrina/ MuSK y la interacción entre la rapsina y el AChR. Utilizando la misma línea celular, Stetzkowski-Marden et al. (2006), también sugieren que los “rafts” lipídicos participan en el agrupamiento del AChR pero señalan que el AChR particiona constitutivamente en estos dominios, como ya lo habían reportado anteriormente (Marchand et al., 2002). Utilizando microscopía de dos fotones y polarización generalizada de la sonda Laurdan, estos autores (Stetzkowski-Marden et al., 2006) demostraron que las agrupaciones de AChR residen en dominios ordenados de membrana, la cual es una propiedad biofísica de los “rafts”. Como resultado de experimentos *in vivo*, *ex vivo* y con cultivos celulares, Willmann et al. (2006) postularon que los dominios lipídicos enriquecidos en colesterol, en los cuales se particionan varias proteínas postsinápticas de microtubos (tales como AChR, MuSK, rapsina, familia de quinasas Src (SKFs), miembros del complejo de urotrofina), participarían en la estabilización de las agrupaciones de AChR conjuntamente con las SKFs, a través de interacciones mutuas. Estas últimas son cruciales para la partición en estos dominios lipídicos de las proteínas postsinápticas y estos dominios proporcionarían el ambiente ideal a las SKFs para mantener las interacciones y fosforilaciones entre los distintos componentes que forman el aparato postsináptico.

En este Capítulo estudiamos la distribución del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 utilizando diferentes técnicas de microscopía de fluorescencia, desde la microscopía convencional de campo ancho hasta una microscopía de última generación, STED (*stimulated emission depletion*), realizada en el marco de un proyecto de colaboración entre el grupo que dirige el Dr. Stefan W. Hell, en el Department of NanoBiophotonics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Alemania, y el

del Dr. Barrantes. Las células CHO-K1/A5, que han sido ampliamente utilizadas en el laboratorio del Dr. Barrantes para estudiar las interacciones lípido-AChR, constituyen un modelo minimalista, en el cual la expresión del AChR es aneural y está desprovista de proteínas de anclaje del AChR tales como la rapsina y tirosina quinasas (Barrantes, 2007).

Este capítulo se divide en tres partes:

Parte I: Análisis de la distribución del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 basado en microscopía de epifluorescencia (campo ancho, *wide-field microscopy*).

Parte II: Análisis de la distribución del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 mediante depleción estimulada de la emisión, microscopía STED (*stimulated emission depletion*).

Parte III: Estudio de la movilidad del AChR en la membrana plasmática mediante la técnica de recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueado (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*).

Cada una ellas recurren a diferentes técnicas de estudio, las cuales serán brevemente descritas en cada sección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El medio Nutridoma-SP (Nutridoma) proviene de Boehringer Mannheim (Alemania). La esfingomielina (SM) dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), el colesterol, la metil- β -ciclodextrina (CDx) provienen de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). La α BTX conjugada con Alexa Fluor⁴⁸⁸ (α BTX-Alexa⁴⁸⁸), la α BTX conjugada con Alexa Fluor⁵⁹⁴ (α BTX-Alexa⁵⁹⁴), la α BTX conjugada con Alexa Fluor⁶⁴⁷ (α BTX-Alexa⁶⁴⁷), los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con Alexa Fluor⁴⁸⁸, Alexa Fluor⁵⁴⁶, Alexa Fluor⁵⁵⁵, N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-pentanoil) esfingosil fosfocolina (BODIPY FL C₅-SM), 22-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-colen-3 β -ol (NBD cholesterol), el 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno p-toluensulfonato (TMA-DPH), el DiIC₁₂ (1,1'-didodecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianine perclorato) provienen de Molecular Probes (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EEUU). El reactivo de transfección *PolyFect* proviene de Qiagen (Hilden, Alemania). *Mowiol* se obtuvo de Hoechst (Frankfurt, Alemania). La sonda fluorescente Atto⁵³² fue provista por K.H. Drexhage del Departamento de Química, Universidad de Siegen, Alemania, y fue acoplada a un anticuerpo IgG anti-ratón de oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EEUU) en el laboratorio del Dr. Stefan W. Hell del Department of NanoBiophotonics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Alemania. El anticuerpo monoclonal de ratón mAb 210, el cual reconoce la región inmunogénica mayor en la subunidad α del AChR, fue gentilmente provisto por el Dr. J. Lindstrom de la Escuela de Medicina de la Universidad de Pennsylvania (PA, EEUU). La transferrina fluorescente (Tf-Cy5) y la droga Latrunculina A fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Satyajit Mayor del National Centre for Biological Sciences, Bangalore, India. El plásmido que codifica para la proteína rapsina conjugada con la Proteína Fluorescente Verde (rapsina-

GFP) fue gentilmente cedido por el Dr. Jonathan Cohen, Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard, Boston, EEUU. La sonda fPEG-colesterol fue provista por los Drs. Toshihide Kobayashi y Satoshi B. Sato del Institute of Physical and Chemical Research, Discovery Research Institute, Saitama, Japón y el Department of Biophysics, Universidad de Kyoto, Japón.

Cultivo celular

La descripción de las condiciones de cultivo de las células CHO-K1/A5 se realiza en el Capítulo 1 de esta Tesis.

Transfecciones

Para la transfección de las células CHO-K1/A5 con rapsina conjugada con la proteína fluorescente verde (rapsina-GFP), éstas se crecieron en medio completo durante 24 hs y luego se transfectaron con 1.5 µg de DNA por cápsula de 35 mm usando el reactivo de transfección PolyFect, aplicado durante 24 h. de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Preparación de “láminas” de membranas plasmática

Para la preparación de membranas plasmáticas aisladas, las células CHO-K1/A5 crecieron en cubreobjetos cubiertos con poli-lisina y tratadas según Avery et al. (2000) utilizando un único pulso (100-300 ms) de ultrasonido en *buffer* KGlu (20 mM Hepes, pH 7.2, conteniendo 120 mM de glutamato de potasio y 20 mM de acetato de potasio).

Remoción del colesterol y marcaje con sondas fluorescentes de membranas plasmáticas aisladas y células enteras

Microscopía de epifluorescencia (campo ancho). En el caso de la extracción de colesterol en membranas plasmáticas aisladas, éstas se incubaron durante 20-30 min. a

37°C en *buffer* KGlu conteniendo 10-15 mM de metil-β-ciclodextrina (CDx), luego se lavaron con el mismo *buffer*. Posteriormente se marcaron con αBTX-Alexa⁵⁹⁴ (1 μg/ml) en *buffer* KGlu conteniendo 3% de albúmina, se lavaron con *buffer* KGlu, se fijaron en PFA 4% durante 30 min. a temperatura ambiente, se lavaron con M1 o PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) y finalmente se incubaron con 50 mM de CINH₄ durante 20 min., también a temperatura ambiente. El marcaje con los anticuerpos H-101 o mAb 210 y con los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón marcados con fluoróforos se realizó a 4°C durante 1 h en M1 conteniendo 1-3% albúmina. En algunos experimentos la fijación con PFA precedió a la marcación con αBTX-Alexa⁵⁹⁴ (ver sección de resultados). Para visualizar los receptores de transferrina (Tf), se obtuvieron membranas aisladas, se marcaron con TMA-DPH, αBTX-Alexa⁴⁸⁸ y transferrina fluorescente (Tf-Cy5) 1 h a 4°C y se montaron para visualizar en el microscopio.

Cuando la remoción del colesterol fue realizada antes de la obtención de membranas plasmáticas aisladas, las células CHO-K1/A5 se trataron con 10-15 mM de CDx en solución Ringer (130 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 48 mM glucosa, 10 mM Hepes, pH 7.3) durante 30 min. a 37°C. Luego de la incubación, las células fueron lavadas, ultrasonicadas, marcadas y fijadas como describimos anteriormente en esta sección.

Microscopía STED. Las células CHO-K1/A5 y las membranas plasmáticas aisladas, en el mismo cubreobjetos, se trataron con 10 mM de CDx en *buffer* KGlu durante 20 min. a 37°C con el objeto de remover el colesterol de la membrana. El marcaje de AChR de la membrana plasmática se realizó empleando el anticuerpo mAb 210, seguido por el anticuerpo secundario unido a Atto⁵³². Este último fluoróforo fue acoplado a un anticuerpo IgG anti-ratón de oveja. Las células y membranas plasmáticas aisladas se marcaron con mAb 210 durante 1h a 4°C en *buffer* KGlu con 1% albúmina, luego se lavaron e incubaron con el anticuerpo anti-mouse-Atto⁵³² también durante 1h a 4°C en *buffer* KGlu con 1%

albúmina. Las muestras se fijaron con PFA antes o después del procedimiento de marcaje (ver sección de resultados), finalmente se montaron en Mowiol y se fotografiaron.

Experimentos de FRAP. Las células se trataron con 10-15 mM de CDx en M1 durante 20-30 min. a 37°C. Cuando se utilizó Mevinolina para inhibir la biosíntesis de colesterol, las células CHO-K1/A5 se crecieron en medio Ham's F-12 suplementado con 10% de SFB durante 48 h, posteriormente se incubaron en medio delipidado, Nutridoma, con 0.1% de SFB, a 37°C durante 24 h en presencia de 1µM de Mevinolina. Para los experimentos de incubación con complejos CDx-colesterol, éstos se prepararon según Christian et al. (1997). Las células CHO-K1/A5 se incubaron con 3.5 – 10 mM de complejos CDx-colesterol (CDx/colesterol = 6) a 37°C durante 20 min. Con el objeto de alterar el citoesqueleto cortical de actina, las células CHO-K1/A5 se incubaron con 20 mM de Latrunculina A conjuntamente con 10-15 mM de CDx (las células control se incubaron sólo con el vehículo de CDx, M1). Para los experimentos con sondas lipídicas, las células control o las tratadas se marcaron con fPEG-colesterol (0.25-1 µM) o BODIPY FL C₅-SM (0.3 µM) durante 5-10 min. a temperatura ambiente, luego fueron lavadas y montadas en portaobjetos para su observación. Para los experimentos con αBTX fluorescente (Alexa^{488, 555 ó 647}) las células control o tratadas se marcaron durante 1 h a 4°C con dicha sonda en M1, se eliminó el exceso de sonda por sucesivos lavados con M1 y se montaron las muestras para microscopía. Para los ensayos de entrecruzamiento del AChR, las células se marcaron durante 1 h a 4°C con el anticuerpo mAb 210, posteriormente fueron lavadas e incubadas durante 1 h a 4°C con el anticuerpo secundario fluorescente. Este último protocolo se utilizó también para analizar la relación del AChR con rapsina-GFP en la membrana plasmática.

Microscopía de epifluorescencia (campo ancho)

La obtención de imágenes se realizó en PBS o M1 conteniendo una solución saturada de TMA-DPH. Esta sonda se utilizó para identificar y visualizar las membranas plasmáticas en el canal azul. Esta marcación también sirve para la selección imparcial de

membranas ya que no se tiene en cuenta la emisión en el canal rojo (correspondiente al de α BTX-Alexa⁵⁹⁴). Para la obtención de imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 100 TV (Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Alemania) con un objetivo 100x 1.4 AN de inmersión en aceite y equipado con una cámara CCD (2x 512 x 512-EEV chip, 13 x 13 μ m tamaño de píxel, Princeton Instruments Inc., Trenton, NJ, EEUU). Con este sistema se usó un lente magnificador (1.6x Optovar) para evitar la sub-estimación como consecuencia del tamaño de píxel de la cámara. Alternativamente se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon E-300 (Nikon, Melville, NY, USA) con un objetivo 100x 1.4 AN inmersión en aceite y empleando una cámara CCD Hamamatsu ORCA ER (Hamamatsu Photonics, K.K., Hamamatsu, Japón). Ambos microscopios cuentan con un sistema de nanoposicionamiento piezoeléctrico (Physik Instrumente (PI), Alemania) y con el programa Metamorph (Meta Imaging Software, Downingtown, PA, EEUU) para la captura y procesamiento de las imágenes. Se emplearon filtros adecuados y espejos dicróicos para cada fluoróforo en particular.

Análisis de datos. La medición de las intensidades de fluorescencia de las imágenes se realizó delimitando las regiones de interés (ROI) con el programa ScionImage versión 4.0.2 (Scion Corp., Frederick, MD, EEUU) o Metamorph. El promedio de intensidad de fluorescencia para cada ROI fue medido dentro de una región positiva para la marca de α BTX (en células o membranas aisladas) a la cual se le restó la intensidad de fluorescencia de un área igual pero negativa para α BTX, por fuera de la célula o membrana aislada. Estas mediciones provienen de células o membranas aisladas tomadas al azar, seleccionadas mediante las respectivas imágenes en contraste de fase o provenientes de la señal de TMA-DPH. El análisis de las partículas de AChR en las membranas aisladas se realizó mediante el escaneo densitométrico de cada partícula, a la cual se la aproximó con una función de Gauss, utilizando el programa Origin 5 (OriginLab, MA, EEUU) (Fig. 2.5). Este análisis fue llevado a cabo en más de 30 campos individuales, y se emplearon aproximadamente 200

partículas en cada condición para la cuantificación de los distintos parámetros. Los valores se expresan como la media \pm D.S. de al menos tres experimentos independientes.

Microscopía STED

Las imágenes de microscopía STED fueron obtenidas por el Dr. Robert Kellner, miembro del laboratorio que dirige el Dr. Stefan W. Hell, en el Department of NanoBiophotonics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry. Para las especificaciones técnicas del equipo y condiciones utilizadas remitirse a Kellner et al. (2007).

Análisis de datos. La intensidad y el diámetro, tomando la altura de la curva (corregida por el ruido) y el ancho máximo a la altura media de la curva (FWHM por *full-width-half-maximum*) de nano-agregados de AChR individuales, respectivamente, se evaluaron utilizando macros desarrollados por miembros del grupo del Dr. S. Hell en el marco del programa MatLab (The Mathworks Inc., Natick, MA, EEUU) en imágenes de 7.5 x 7.5 μm con un tamaño de píxel de 15 x 15 nm. Para esto se definieron regiones que rodean a cada partícula fluorescente en la imagen. Los niveles de fondo y los FWHM fueron obtenidos a partir de las curvas ajustadas a una función de Lorentz. Los promedios de los valores para cada punto en la dirección x-y fueron obtenidos y exportados para su posterior análisis estadístico. Los histogramas de diámetro (FWHM) e intensidad media \pm DS para las diferentes condiciones experimentales fueron realizados con $n > 500$ partículas (ver resultados). Para mayor información ver Kellner et al. (2007).

El análisis de recuento de partículas de imágenes de STED (Fig. 2.24) se realizó con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU).

Mediciones de recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueado (FRAP)

Los experimentos de FRAP se realizaron empleando un microscopio confocal Leica TCS SP2 microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) de acuerdo con los protocolos del fabricante (para más información ver <http://www.confocal-microscopy.com>).

Se usó un objetivo de 63X de inmersión en agua, 1.4 AN. Se utilizaron diferentes líneas de láser de excitación según la sonda empleada (fPEG-colesterol, BODIPY FL C₅-SM y Alexa⁴⁸⁸ con láser de 488nm, Alexa⁶⁴⁷ con láser 633nm). El tamaño de la apertura fue de 1 disco de Airy. El tiempo y potencia del láser para el fotoblanqueado (100%) fue determinado para cada sonda en particular. El tamaño de ROI utilizado para las mediciones fue de 6 μm² aproximadamente. La adquisición de las imágenes se realizó a una potencia menor para minimizar el daño por fotoblanqueado de las sondas fluorescentes. La intensidad de fluorescencia dentro del ROI fue normalizada a la intensidad inicial (previa al fotoblanqueado) para cada tiempo. La cinética de recuperación fue determinada empleando una aproximación exponencial con los datos normalizados:

$$f(x) = \sum_{i=1}^n A_i (1 - e^{(-t/\tau_i)})$$

donde A_i es la amplitud de cada componente, t es el tiempo y τ_i es la constante de tiempo para cada componente. La fracción móvil (FM) fue calculada como:

$$FM = \frac{(F_{\infty} - F_0)}{(F_i - F_0)}$$

donde F_{∞} es la intensidad de fluorescencia al final del experimento de FRAP, F_i es la intensidad de fluorescencia inicial antes del fotoblanqueado y F_0 es la intensidad de fluorescencia inmediatamente después del fotoblanqueado.

La determinación de los coeficientes de difusión, D , se realizó según Ellenberg et al. (1997). Para esto, los datos experimentales de recuperación de fluorescencia fueron graficados según la ecuación:

$$I_{(t)} = I_{(f)}(1 - (w^2 / (w^2 + 4\pi Dt))^{1/2}) + I_0$$

en la que $I_{(t)}$ es la intensidad en función del tiempo, $I_{(f)}$ es la intensidad de fluorescencia al final del experimento, w es la medida longitudinal del ROI, D es el coeficiente de difusión, e I_0 es la intensidad de fluorescencia inmediatamente después del fotoblanqueado. El análisis de imágenes fue realizado con el programa Leica Confocal Software versión 2.61, LCS Lite (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) y Origin 5.

El cálculo del área de membrana de células CHO-K1/A5 se realizó esencialmente según Sieber et al. (2007). El diámetro celular fue calculado en imágenes de células despegadas del cubreobjetos usando el programa Scion Image versión 4.0.2.

Preparación de vesículas unilaminares gigantes (GUVs, por *giant unilamellar vesicles*)

Las GUVs fueron obtenidas como describe Akashi et al. (1996), utilizando el sistema lipídico empleado por Vidal y McIntosh (2005), compuesto de DOPC/SM/colesterol (1:1:1). Primeramente los lípidos se solubilizaron en cloroformo:metanol (2:1) en una concentración de lípido de 10 mg/ml. A esta solución se le agregaron los lípidos fluorescentes, en una concentración del 0.1%. Se evaporaron los solventes bajo corriente de N_2 , el tubo de vidrio se mantuvo a 45° para obtener una película de lípido en la porción inferior del tubo (2-3 cm inferiores). Al tubo se le agregó una solución de sacarosa al 0.1M y se lo colocó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se obtuvo una “nube” lipídica que flota en el centro del tubo, la cual se separa y se la diluye con solución de glucosa 0.1M o agua destilada. Las vesículas (que contienen la solución 0.1 sacarosa en su interior) se depositaron sobre el portaobjetos y se observaron así bajo el microscopio de fluorescencia.

PARTE I

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL AChR EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS CHO-K1/A5 BASADO EN MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA (CAMPO ANCHO, *WIDE-FIELD MICROSCOPY*)

El estudio de la distribución de proteínas en la membrana plasmática mediante microscopía de fluorescencia convencional (*wide-field*) presenta el inconveniente de la interferencia de la señal de fluorescencia proveniente de planos focales que se encuentran por encima y por debajo del plano en estudio (Fig. 2.1 A).

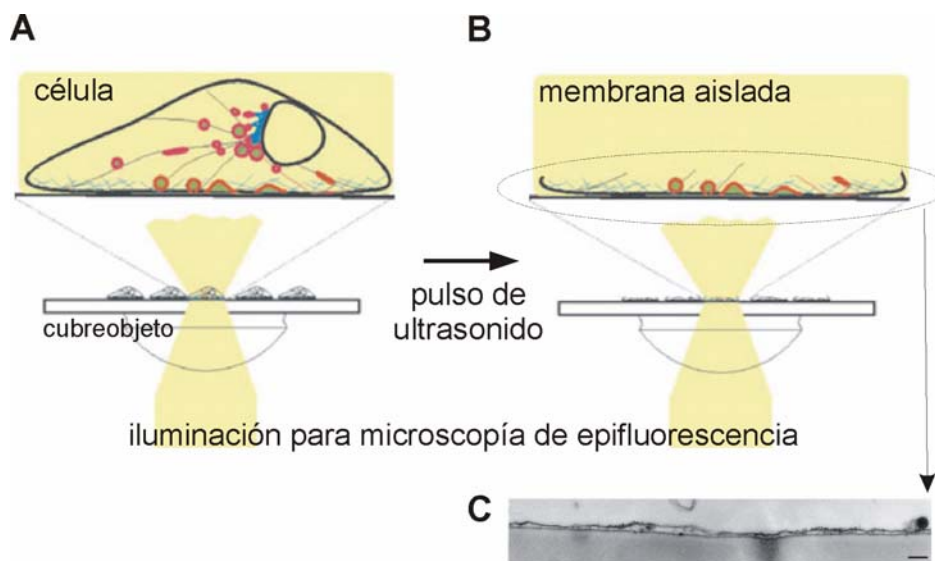


Fig. 2.1. Obtención de membranas plasmáticas para el estudio de la distribución de proteínas en la membrana plasmática. A) En microscopía de fluorescencia convencional las sondas fluorescentes son excitadas a través de una sección celular importante, con lo cual, la información recogida en la imagen proviene de distintos planos focales B) Empleando membranas plasmáticas aisladas se mejora mucho la resolución debido a que sólo la membrana adherida al cubreobjetos es fotografiada en la imagen. C) Fotografía de microscopía electrónica proveniente de membranas aisladas de células PC12 (Lang et al., 2001). Adaptado de Jaiswal y Simon (2007) *Nature Chemical Biology* **3**, 92-98.

La obtención de membranas plasmáticas aisladas, adheridas a la superficie de un cubreobjetos, como fue descrita por Avery et al. (2000), provee una muestra donde sólo la membrana plasmática es posicionada en el plano focal de objetivo y así toda la membrana puede ser fotografiada en una sola imagen, sin interferencia de señal de fluorescencia proveniente de otros planos focales (Fig. 2.1 B, C) (Heuser, 2000; Lang et al., 2001, Lang, 2003). Las membranas plasmáticas aisladas son generadas fácilmente mediante la aplicación de un pulso corto de ultrasonido a células que crecen sobre un cubreobjetos. Así se obtienen membranas planas, fácilmente analizables mediante microscopía de fluorescencia, y que nos permitieron, como comentamos a continuación, comprender cómo se distribuye el AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, y estudiar cómo el colesterol participa en este fenómeno.

RESULTADOS

La disminución del AChR de la superficie celular dependiente de colesterol requiere integridad celular

En un intento por mejorar la resolución de la microscopía óptica y mejorar así el estudio de la distribución del AChR en la superficie celular, se generaron láminas de membrana plasmática aisladas mediante la aplicación de un pulso corto de ultrasonido a células en cultivo que crecen sobre un cubreobjetos. Este tratamiento provoca el “destechado” de las células (Avery et al., 2000) ocasionando la ruptura celular, como consecuencia de la cual, queda adherida al vidrio la parte distal de la célula, lo cual es ideal para el análisis microscópico ya que el objeto entero puede ser observado en el mismo plano focal, sin señal fuera de foco (Lang, 2003).

En nuestro laboratorio se estableció previamente que la remoción del colesterol de la membrana plasmática en forma aguda produce una disminución de los niveles de AChR en

la membrana plasmática como consecuencia de un aumento en la internalización del AChR (Borroni et al., 2007). En una primera serie de experimentos, las células CHO-K1/A5 se trataron con CDx para disminuir el contenido de colesterol de sus membranas y luego se marcaron con α BTX-Alexa⁵⁹⁴. Posteriormente, las células se sometieron a un pulso de ultrasonido (100-200 ms) y finalmente se fijaron con PFA. Las membranas se marcaron para la visualización con TMA-DPH, una sonda hidrofóbica fluorescente inespecífica que marca las membranas celulares. Las láminas de membrana plasmática aisladas se enfocaron en primer lugar en el canal azul (TMA-DPH), se obtuvieron imágenes y seguidamente se obtuvieron imágenes en el canal rojo (α BTX-Alexa⁵⁹⁴).

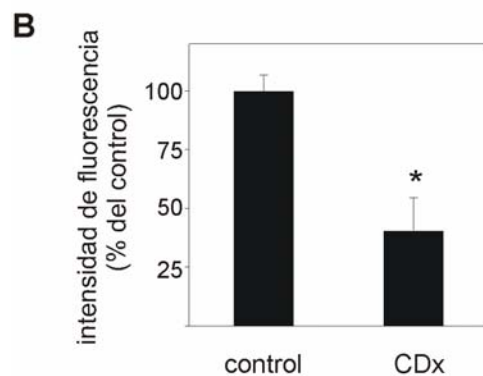
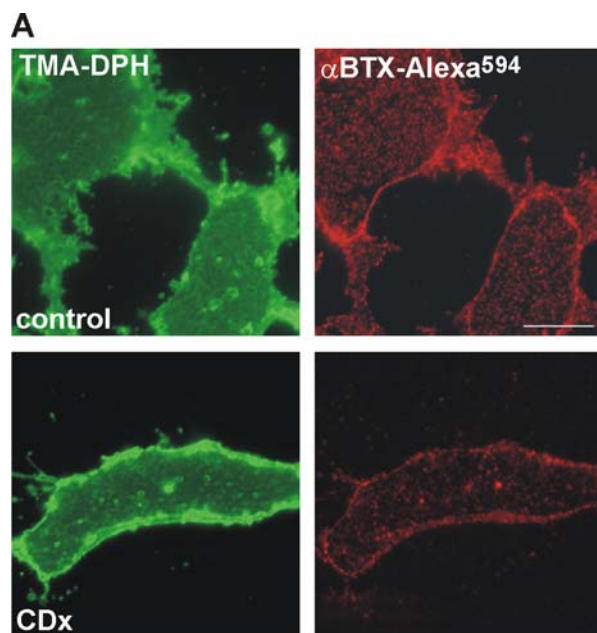


Fig. 2.2. Membranas plasmáticas aisladas de células CHO-K1/A5 generadas luego del tratamiento con CDx y posteriormente marcadas con α BTX-Alexa⁵⁹⁴. A) Las membranas fueron visualizadas en el canal azul empleando el marcaje con TMA-DPH (columna izquierda, pseudo coloreado en verde) y en el canal rojo para visualizar α BTX-Alexa⁵⁹⁴ (panel derecho, coloreado en rojo), tanto en las células control como en las tratadas con CDx. B) Análisis estadístico que muestra la disminución en el marcaje con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ como consecuencia del tratamiento con CDx previo a la obtención de las membranas aisladas. Los datos representan la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes. El asterisco (*) denota una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.001$. Barra, 10 μ m.

Como muestran las Figs. 2.2, 2.3, las membranas generadas por sonicación fueron esencialmente planas. A diferencia de la distribución observada en preparados de célula entera (ver Figs. AChR superficie en Capítulo I), la marca de AChR proveniente de la señal de α BTX-Alexa⁵⁹⁴ aparece como puntos o partículas fluorescentes de tamaño más o menos uniforme, distribuidos por sobre toda la membrana (Figs. 2.2, 2.3).

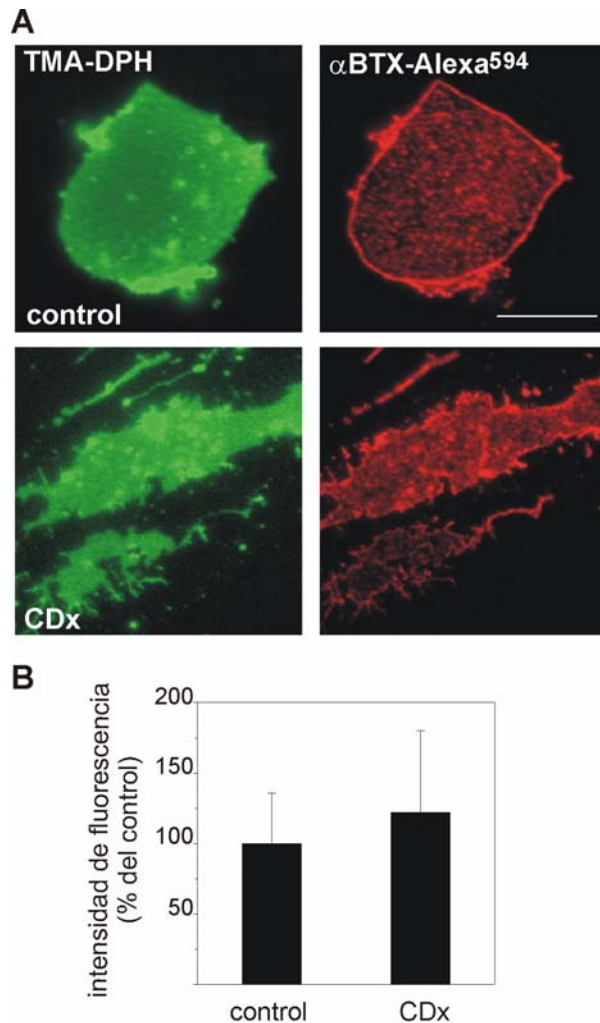


Fig. 2.3. Membranas plasmáticas aisladas de células CHO-K1/A5 generadas previas al tratamiento con CDx y posteriormente marcadas con α BTX-Alexa⁵⁹⁴. A) Las membranas fueron visualizadas en el canal azul empleando el marcaje con TMA-DPH (columna izquierda, pseudo coloreado en verde) y en el canal rojo para visualizar α BTX-Alexa⁵⁹⁴ (panel derecho, coloreado en rojo), tanto en las células control como en las tratadas con CDx. B) Análisis estadístico que muestra la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁵⁹⁴ de membranas aisladas controles y tratadas con CDx. Los datos representan la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones comparadas ($p > 0.05$). Barra, 10 μ m.

Las membranas obtenidas de células que fueron tratadas con CDx (Fig. 2.2 A) exhibieron una disminución en la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁵⁹⁴ (~60%, Fig. 2.1 A-B), en concordancia con lo que fue observado en las células enteras (Borroni et al., 2007), y corroborando que la disminución de la intensidad de fluorescencia medida luego del tratamiento con CDx refleja una disminución de los receptores asociados a la membrana

en la superficie celular, lo cual ocurre sólo cuando las membranas aisladas son generadas luego del tratamiento con CDx (ver más adelante).

Por el contrario, en las membranas aisladas que se generaron previamente al tratamiento con CDx y posteriormente marcadas con α BTX-Alexa⁵⁹⁴, la intensidad de fluorescencia de las membranas en las que se produjo la remoción del colesterol no difiere de las membranas control (Fig. 2.3 A-B). Esto indica que las partículas fluorescentes de AChR no son extraídas de la membrana plasmática por el tratamiento con CDx. Así, la disminución del AChR en membrana plasmática producida por el tratamiento agudo con CDx requiere la integridad celular.

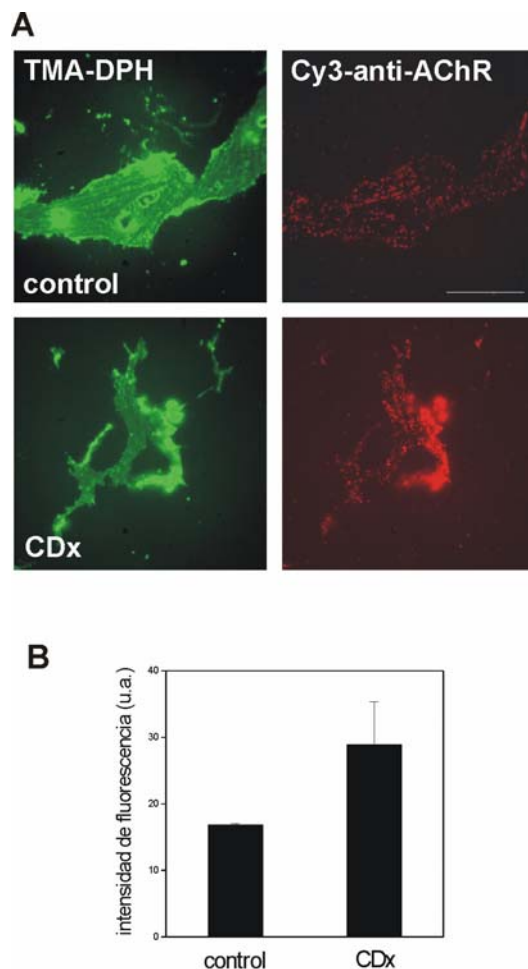


Fig. 2.4. Los dominios de AChR pueden visualizarse también empleando anticuerpos contra el dominio citoplasmático del AChR. A) Las membranas plasmáticas aisladas generadas previo al tratamiento con CDx (como en la figura 2.3) fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo H-101, seguido de su anticuerpo secundario correspondiente marcado con Cy3, IgG anti-conejo derivatizado con Cy3 (panel derecho, rojo) y TMA-DPH (panel izquierdo, verde) en las membranas control y en las tratadas con CDx. B) Intensidad de fluorescencia en las membranas control y en las tratadas con CDx. Los datos representan la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes. Barra, 10 μ m.

Con la finalidad de descartar la posibilidad de que la unión de la α BTX es afectada por la remoción del colesterol, decidimos usar otra sonda para verificar los resultados

obtenidos hasta el momento. Para ésto, tratamos membranas aisladas obtenidas por ultrasonificación con CDx y las fijamos con PFA (para evitar el entrecruzamiento producido por los anticuerpos). *A posteriori* las membranas se marcaron con H-101, un anticuerpo que está dirigido contra el epítopo intracelular de la subunidad β del AChR, seguido del anticuerpo secundario marcado con Cy3 (Fig. 2.4 A). Los resultados obtenidos de esta manera, marcando el AChR con anticuerpos, no difieren de los obtenidos al marcar al AChR con α BTX -Alexa⁵⁹⁴ (Fig. 2.3 A-B), lo cual indica que los cambios en la cinética de unión de α BTX-AChR no están involucrados en este fenómeno (como también se evidenció por curvas de unión de α BTX-[I¹²⁵] con y sin agregado de CDx, Borroni et al., 2007).

Estructura de los dominios de AChR en membrana plasmática analizados por microscopía de epifluorescencia

Con la eliminación de la señal de fluorescencia fuera de foco, en las preparaciones de membrana plasmática obtenidas por ultrasonificación, se obtiene una notable mejora en la resolución. Esto es de suma importancia para el estudio de la distribución del AChR en la membrana plasmática (compare estas imágenes con las obtenidas en células enteras, donde existe señal proveniente de otros planos focales). Esta señal de fluorescencia proviene de los AChRs marcados con α BTX -Alexa⁵⁹⁴ que están concentrados en pequeños acúmulos fluorescentes en el orden del sub-micrón (Figs. 2.2 A, 2.3 A, 2.5 A). El patrón de marca característico del AChR no fue observado en las mismas membranas cuando se las observó mediante la tinción de lípidos con TMA-DPH en el canal azul (Figs. 2.2 A, 2.3 , 2.5 A). El análisis estadístico de las partículas fluorescentes reveladas por α BTX -Alexa⁵⁹⁴ fue realizado como se indica en Materiales y Métodos y en la Fig. 2.5 B. Partículas individuales fueron analizadas mediante densitometría y los perfiles de intensidad obtenidos experimentalmente se ajustaron a una distribución de Gauss (Fig. 2.5 B). Se analizaron más de 30 campos por condición y se observó que el diámetro de las partículas es de 239 ± 40 nm, $n = 120$ en las muestras control y de 238 ± 47 , $n = 120$ en las tratadas con CDx (Fig. 2.5

C). Al igual que lo que ocurre con los diámetros, la intensidad de fluorescencia de los agregados de AChR no mostró diferencias significativas luego de la remoción del colesterol (Fig. 2.5 C). Sin embargo, disminuyó claramente el número de partículas fluorescentes (40% aproximadamente) en membranas aisladas obtenidas luego de la remoción del colesterol (Fig. 2.5 C), con lo cual, la disminución en la intensidad de fluorescencia observada en membranas aisladas provenientes de células tratadas con CDx (Fig. 2.2 A-B) es consecuencia de la disminución en el número de agregados de AChR.

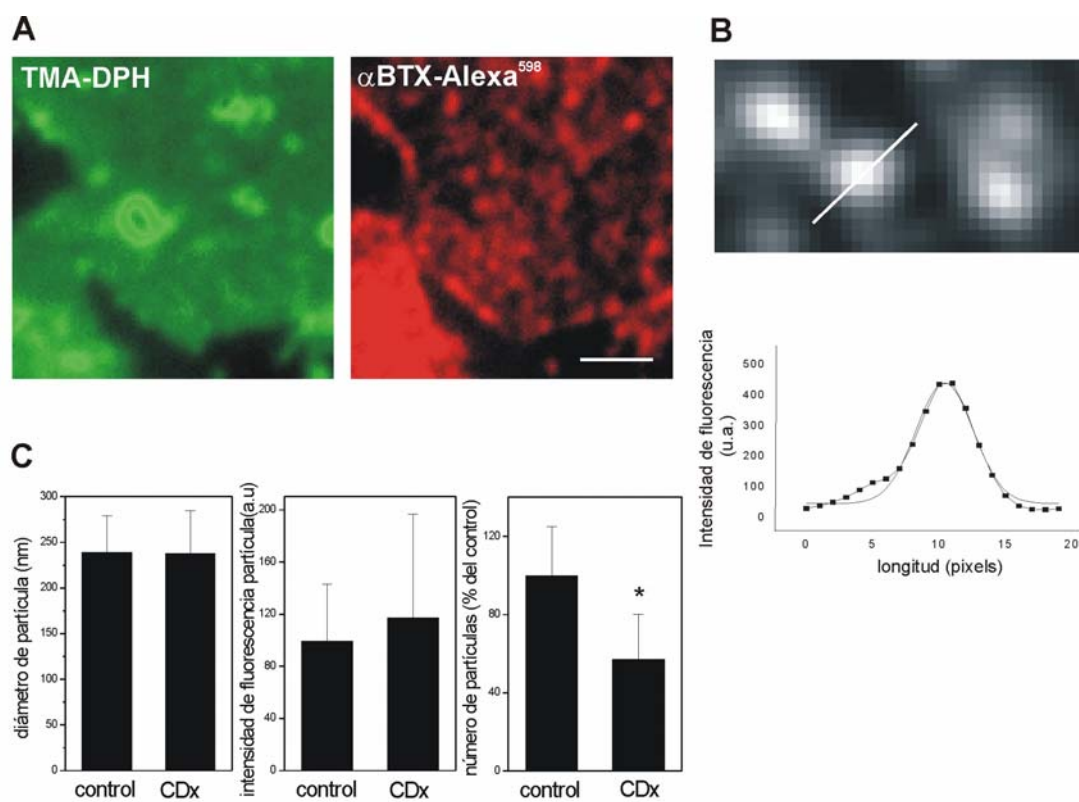


Fig. 2.5. Las membranas plasmáticas aisladas permiten la visualización de agregados del AChR en el orden del sub-micrón. A) Membranas plasmáticas aisladas generadas por ultrasonificación marcadas con TMA-DPH (columna izquierda, verde) y marcadas con α BTX-Alexa⁵⁹⁴ (columna derecha, rojo). B) Imagen magnificada (~ 1/10) de un campo mostrando el escaneo lineal de una partícula de AChR (panel superior) con su correspondiente perfil de intensidad (panel inferior), el cual posee una distribución que se ajusta a una curva de Gauss (línea entera que ajusta los datos experimentales). C) Comparación del diámetro de partícula, intensidad de partícula, y número de partículas entre muestras provenientes de membranas aisladas obtenidas luego del tratamiento con CDx. Aproximadamente 120 partículas fueron analizadas para cada condición. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.001$. Barra, 2 μ m.

Los acúmulos del AChR inducidos por anticuerpos son facilitados por la remoción de colesterol

Posteriormente estudiamos si el estado de agregación inducido por anticuerpos del AChR es modificado por la remoción de colesterol en la membrana plasmática. Por esta razón, las membranas aisladas obtenidas por ultrasonificación fueron tratadas con CDx, posteriormente fueron marcadas con el anticuerpo primario mAb 210 y con el anticuerpo secundario derivatizado con Alexa⁴⁸⁸, y finalmente fueron fijadas con PFA (Fig. 2.6 A).

A

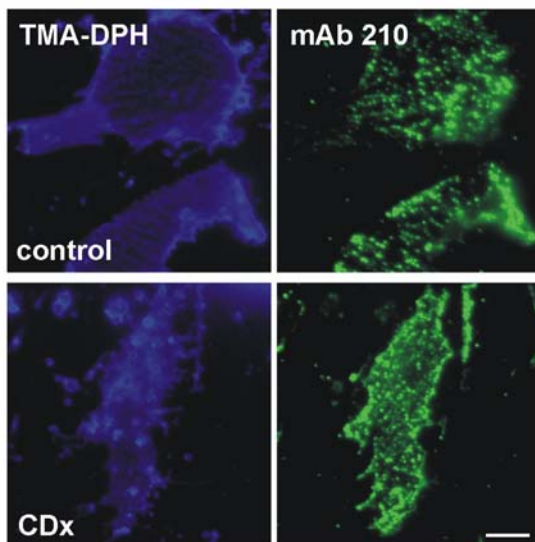
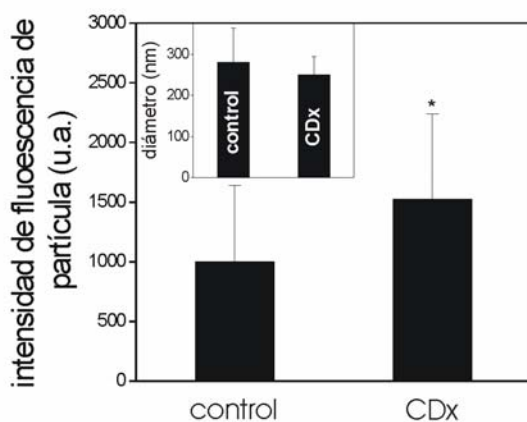


Fig. 2.6. Los agregados de AChR en membranas aisladas tratadas con CDx poseen mayor intensidad de fluorescencia que en las membranas control A) Las membranas plasmáticas aisladas generadas de células CHO-K1/A5 previamente al tratamiento con CDx (como en la figura 2.3) fueron visualizadas empleando TMA-DPH (panel izquierdo, azul) o con anticuerpos mAb 210 y su correspondiente anticuerpo secundario marcado con Alexa⁴⁸⁸ (panel derecho, verde), en las membranas control y en las tratadas con CDx. B) Gráfico mostrando la intensidad de fluorescencia promedio de partículas individuales en membranas control y en membranas tratadas con CDx. En el inserto del gráfico anterior se muestra la comparación del tamaño de las partículas para las dos condiciones evaluadas. Más de 200 partículas fueron analizadas para cada condición. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.001$. Barra, 5 μm .

B



El promedio de intensidad de las partículas individuales en membranas tratadas con CDx aumentó en un 50% aproximadamente, cuando se lo comparó con las membranas control (Fig. 2.6 B). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las partículas de AChR marcadas como citamos anteriormente entre las membranas control y las tratadas con CDx (283 ± 82 nm y 252 ± 54 nm en controles y tratadas con CDx, respectivamente, $n=200$) (inserto en Fig. 2.6 B). La mayor intensidad de fluorescencia en las partículas de AChR provenientes de membranas en la cuales se produjo la remoción del colesterol podría explicarse por un mayor reclutamiento de moléculas de AChR por parte de los anticuerpos, en partículas aún por debajo del límite de resolución. Inicialmente postulamos que este mayor reclutamiento de AChRs mediado por anticuerpos en membranas aisladas tratadas con CDx podría ser el resultado de la mayor fluidificación de las membranas (Borroni et al., 2007), lo cual podría afectar la movilidad lateral de moléculas de AChR.

Distribución del receptor de transferrina en membranas aisladas de células CHO-K1/A5

Recientemente Lillemeier et al. (2006) postularon que la mayoría de las proteínas asociadas a la membrana plasmática se encuentran formando “islas”, las cuales están separadas por áreas de membrana libre de proteínas. Para determinar si la distribución del AChR en forma de partículas fluorescentes dispersas en la membrana plasmática es específica del AChR o es una característica general a otras proteínas se realizaron estudios controles con otra proteína, el receptor de transferrina. Para esto, se obtuvieron membranas aisladas, se marcaron con TMA-DPH, α BTX-Alexa⁴⁸⁸ y transferrina fluorescente (Tf-Cy5) y se obtuvieron las imágenes de microscopía de fluorescencia (conjuntamente de las tres sondas). Como se observa en la figura Fig. 2.7, si bien la distribución del receptor de transferrina guarda similitud con el de AChR, respecto a que también se distribuye no homogéneamente en la membrana plasmática, no existe colocalización entre las dos sondas, como se observa en el panel derecho de la Fig. 2.7, ya que no existen zonas de

superposición entre los dos canales (que aparecerían de color amarillo). Este resultado indica que el patrón de distribución del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 es específico y diferente al de otras proteínas de membrana.

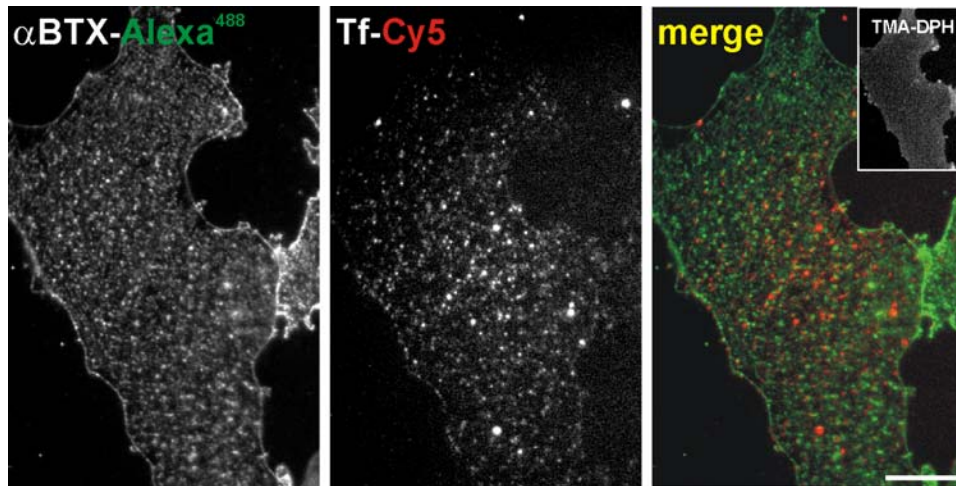


Fig. 2.7. El patrón de distribución del AChR en membrana plasmática de células CHO-K1/A5 no es común a otras proteínas. Las membranas aisladas generadas a partir de células CHO-K1/A5 fueron marcadas conjuntamente con TMA-DPH (inserto en panel derecho), α BTX-Alexa⁴⁸⁸ (panel izquierdo) y Tf-Cy5 (panel medio) con el objeto de marcar la membrana plasmática aislada, AChRs y receptores de transferrina, respectivamente. La superposición de los canales verde (α BTX-Alexa⁴⁸⁸) y rojo (Tf-Cy5) se muestra en el panel derecho. Barra, 5 μ m.

PARTE II

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL AChR EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS CHO-K1/A5 MEDIANTE DEPLECIÓN ESTIMULADA DE LA EMISIÓN, MICROSCOPIA STED (*STIMULATED EMISSION DEPLETION*)

Como consecuencia de los límites del poder de resolución impuestos por la difracción, los microscopios de epifluorescencia y confocales no pueden resolver aquellos objetos más cercanos a 250-200 nm (Heintzmann y Ficz, 2007). Sin embargo, recientes avances en óptica física han demostrado que la barrera de difracción de microscopios de fluorescencia puede ser superada mediante la aplicación de los principios de agotamiento estimulado de la emisión (STED, *stimulated emission depletion*) (Hell y Wichmann, 1994; Klar et al., 2000; Hell, 2003).

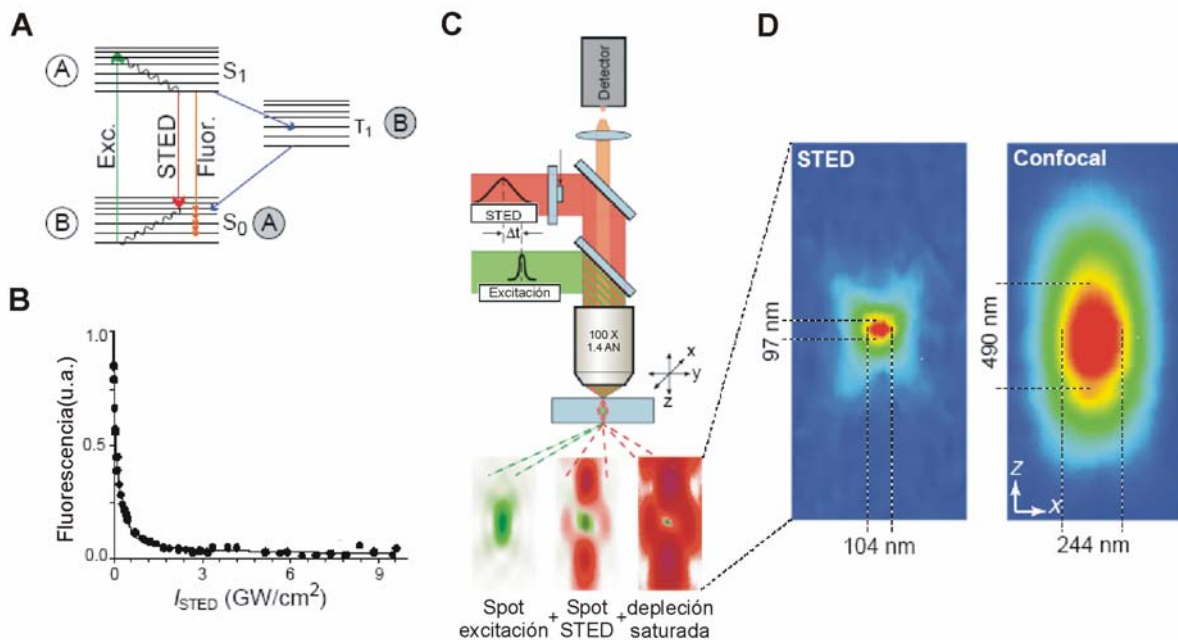


Fig. 2.8. Fundamentos de microscopía STED. Adaptado de Hell (2003), *Nat. Biotechnol.* **21**, 1347-1355.

STED es un miembro de la nueva familia de conceptos de microscopía que, a pesar de usar lentes regulares conlleva a una mejora en resolución óptica (Hell, 1997, 2004). La Fig. 2.8 A muestra el diagrama de energía de un fluoróforo orgánico. Las moléculas en el estado excitado S1 retornan al estado basal, S₀, mediante emisión espontánea de fluorescencia. El retorno al nivel S₀ puede ser forzado por aplicación de luz mediante el fenómeno de emisión estimulada (ver revisión de Hell, 2003). Para que prevalezca este fenómeno sobre el espontáneo, STED requiere de un intenso pulso de luz con una duración de una fracción de la vida media del estado S1. Mediante longitudes de onda de STED situadas hacia el rojo en el espectro de emisión del fluoróforo se impide la re-excitación por los mismos pulsos. En la Fig. 2.8 B se muestra la saturación de la depleción del estado S1 en función del incremento de la intensidad del pulso STED, I_{STED}, midiendo la fluorescencia remanente del fluoróforo orgánico. La depleción de S1 es saturable con el incremento de I_{STED} y se establece así la relación no lineal entre la emisión de fluorescencia y la intensidad del pulso de STED. La Fig. 2.8 C muestra un esquema de un microscopio STED. La luz de excitación y la de STED son sincronizadas y enfocadas en la muestra por medio de lentes, esquematizados aquí como haces verde y rojo, respectivamente. La fluorescencia es registrada por medio de un detector. En la parte inferior del esquema se muestra los diferentes haces en el plano focal: el haz de excitación (izquierda) es superpuesto con el haz de STED (centro), el cual posee intensidad cero en el centro del foco. La depleción de la emisión causada por el foco de STED reduce la región de moléculas excitadas (derecha) sólo al centro del mismo, formando así un foco fluorescente que posee dimensiones por debajo del límite de difracción, tal como se muestra en el panel 2.8 D. En la Fig. 2.8 D se muestra a modo de comparación el *spot* fluorescente resuelto mediante microscopía STED y confocal, en el cual se observa claramente la ganancia en resolución lateral y axial mediante esta nueva microscopía.

Incrementando la intensidad del haz de-excitante más allá de un umbral de saturación, la resolución del microscopio STED, en principio, podría llegar hasta la escala molecular (Hell, 1997, 2003).

Nosotros empleamos esta tecnología desarrollada por el grupo del Dr. S. Hell con la finalidad de visualizar agregados supramoleculares del AChR que están por debajo del límite de resolución. Para ello, utilizamos una sonda fluorescente verde, Atto⁵³², acoplada a un anticuerpo secundario. El AChR fue marcado con el anticuerpo monoclonal mAb 210 seguido del anticuerpo secundario unido a la sonda Atto⁵³² en células CHO-K1/A5. Según señaláramos anteriormente, esta línea celular expresa el AChR muscular adulto en forma estable y heteróloga (Roccamo et al., 1999), estando desprovisto de proteínas de anclaje del AChR, lo cual constituye un excelente modelo para estudiar las propiedades endógenas de agregación del AChR (Barrantes, 2007).

RESULTADOS

El AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 se encuentra en forma de “nano – agregados”, según lo evidencia la microscopía STED

Según lo señalado en la sección anterior, la obtención de imágenes del AChR en membranas plasmáticas aisladas de células CHO-K1/A5 permitió determinar, mediante microscopía de epifluorescencia convencional, que esta proteína se encuentra distribuida en forma de pequeños agregados con dimensiones en el orden del sub-micrón, con un diámetro de 250 nm aproximadamente (Borroni et al., 2007). El tamaño de estas partículas de AChR se encuentra en el límite de resolución de la microscopía óptica convencional (ver revisión de Heintzmann y Ficz, 2007). Con la finalidad de determinar el tamaño real de estas agrupaciones de AChR se realizaron experimentos de microscopía STED en el marco de un proyecto de colaboración con el Dr. S. Hell. El STED tiene la capacidad de resolver partículas que se encuentran por debajo del límite de resolución de las microscopías convencionales (Hell, 2007).

El AChR en membrana plasmática de células CHO-K1/A5 fue analizado en células enteras y en láminas de membrana aisladas, por medio de microscopía confocal y STED. Para esto, utilizamos tres metodologías experimentales. En la primera, la fijación fue seguida del marcaje (*fij-marc*), para lo cual, las muestras fueron fijadas con PFA al 4% y entonces marcadas con mAb 210 y el anticuerpo secundario fue marcado con Atto⁵³². De esta manera se evita el entrecruzamiento de largo alcance producido por los anticuerpos (Tzartos et al., 1987).

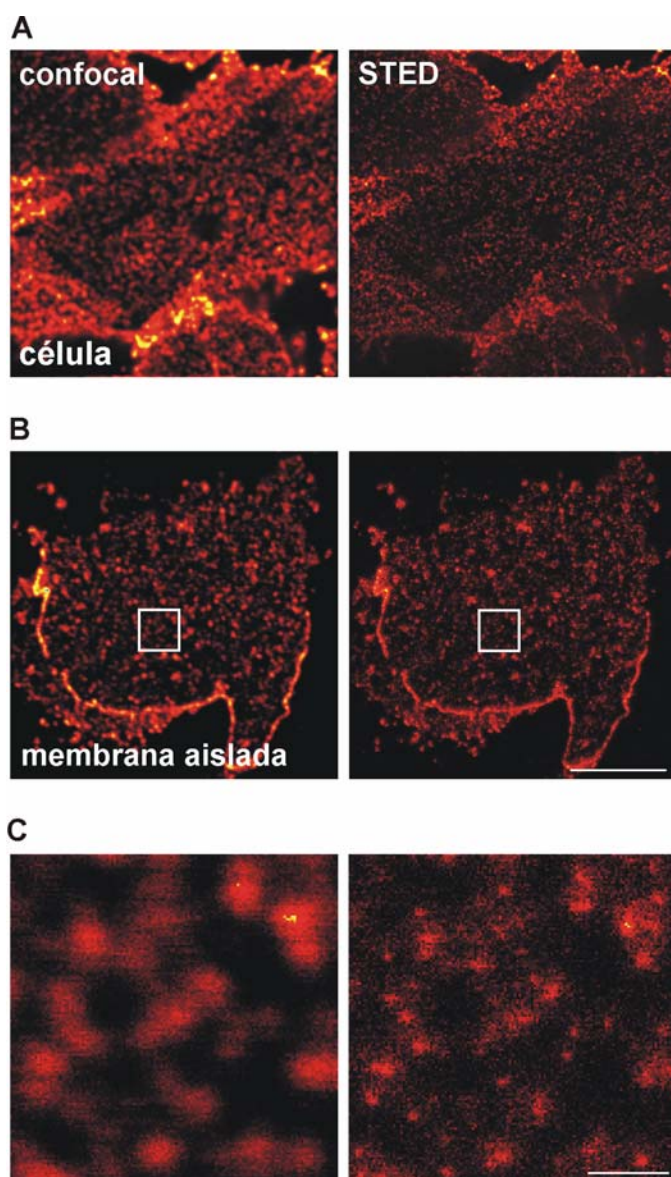


Fig. 2.9. Los nano-agregados del AChR pueden ser directamente visualizados en la superficie celular y en membranas aisladas de células CHO-K1/A5. Las imágenes a baja amplificación, 20 x 20 μm (A, B) muestran tres células diferentes (A) o una membrana aislada (B) que fueron fijadas y marcadas con el anticuerpo mAb 210 y su correspondiente anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Atto⁵³². A modo de comparación de la resolución obtenida, se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (columna izquierda) y STED (columna derecha). Barra, 5 μm . C) Imagen magnificada de 2 x 2 μm correspondiente a una sección de la imagen de membrana aislada mostrada en B) (marcada por un recuadro blanco en B). Barra, 0.5 μm . Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas por el Dr. R. Kellner y forman parte de la publicación *Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy*. Kellner, Baier, Willig, Hell y Barrantes (2007). *Neuroscience* 144, 135-143.

En el segundo método, el procedimiento de marcaje precedió a la fijación (*marc-fij*) para permitir de esta manera el entrecruzamiento producido por la reacción del anticuerpo de AChRs vecinos.

Mediante microscopía confocal se observó una distribución de acúmulos de AChR en la superficie celular tanto en células CHO-K1/A5 (Fig. 2.9 A) como en membranas aisladas (Fig. 2.9 B). Esto fue similar a lo observado mediante microscopía de fluorescencia convencional en membranas aisladas (Figs. 2.2 y 2.3). Mediante microscopía confocal determinamos que los diámetros de las partículas fluorescentes existentes en las membranas aisladas fue de 199 ± 34 nm y 191 ± 33 nm cuando las muestras fueron marcadas con los anticuerpos luego de fijar (*fij-marc*) o antes de fijar (*marc-fij*), respectivamente (Figs. 2.10). Estos datos están de acuerdo con lo observado en las membranas aisladas analizadas por microscopía de epifluorescencia.

El examen de las muestras mediante microscopía STED, obtenidas por el Dr. R. Kellner, indicó que la medida de las partículas se redujo a 77.1 ± 32.9 nm y 91.3 ± 40.7 en las dos condiciones experimentales citadas anteriormente (Fig. 2.10). La notable ganancia en resolución de la microscopía STED es aparente mediante la comparación de las imágenes a alta resolución comparando la imagen confocal con la correspondiente de STED ya sea en células enteras así como en membranas aisladas (Fig. 2.9). Debido a que las partículas medidas representan una convolución de las mismas, las cuales poseen una determinada función de dispersión puntual (*PSF, point spread function*), la medida real de estas agrupaciones de AChR es aún menor (ver Kellner et al., 2007). De esta manera, cuando el entrecruzamiento inducido por el anticuerpo es inhibido por la fijación, las imágenes de STED resuelven partículas de tamaño relativamente uniformes, como las obtenidas mediante microscopía confocal, en partículas de menor tamaño de AChR de tamaño variable, las cuales poseen un diámetro promedio de 55 nm, a las que nos referiremos aquí como “nano-acúmulos” o “nano-agregados” del AChR (Kellner et al., 2007). Los histogramas que describen el tamaño e intensidad de las partículas medidas en

membranas aisladas se muestran en las Figs. 2.10 y 2.11, y están resumidos en la Tabla 2.1.

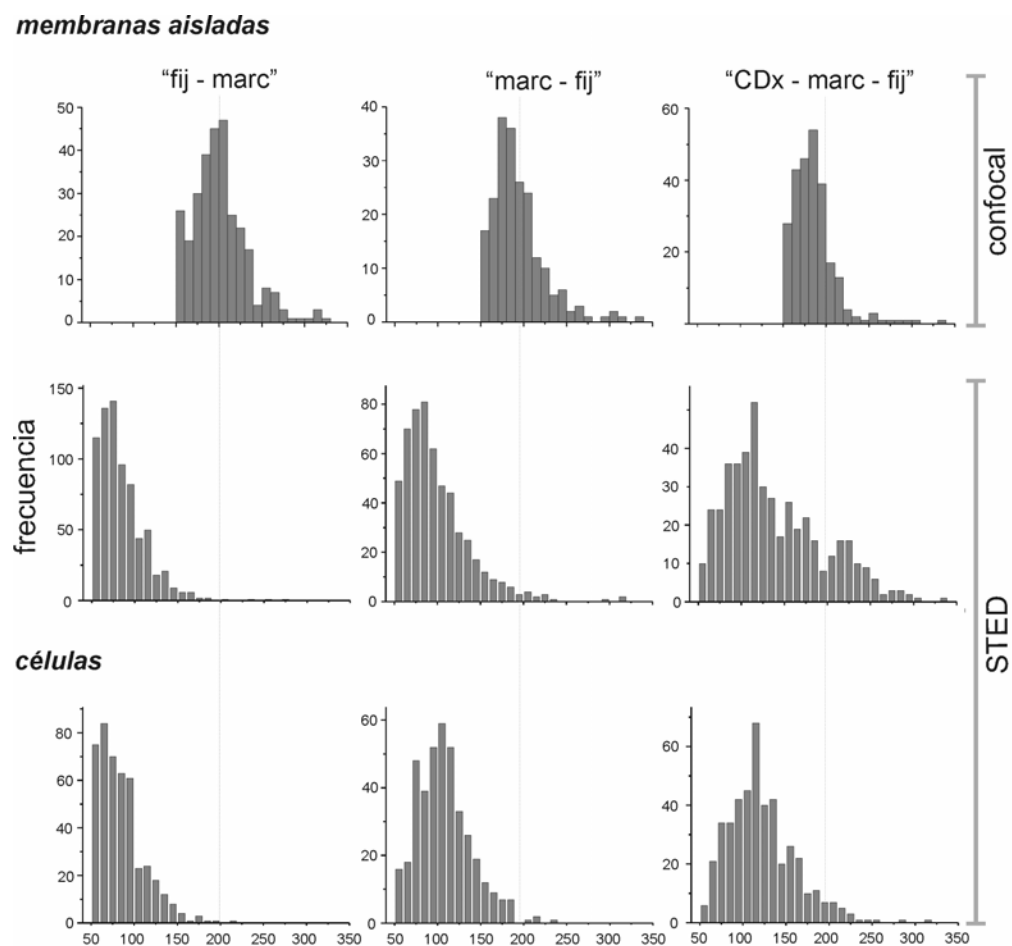


Fig. 2.10. Distribución de tamaños de acúmulos del AChR en membrana plasmática determinados mediante microscopía confocal (panel superior) y STED (panel inferior). Las tres columnas se refieren a las tres condiciones experimentales empleadas en este capítulo, las cuales se indican en la parte superior, y los histogramas representan los datos de cinco experimentos independientes. El número de partículas analizadas está indicado en la Tabla 2.1. Se muestra el análisis de las imágenes de membranas aisladas obtenidas mediante microscopia confocal (panel superior) y STED (panel inferior). A modo de comparación, también se muestra el análisis de imágenes de células enteras obtenidas mediante STED.

Comparando las condiciones “fij-marc” y “marc-fij”, el pequeño incremento en la distribución de tamaños de los nano-agregados de AChR refleja la agregación inducida por la combinación del anticuerpo primario (mAb 210, anti AChR) y del secundario (IgG), lo cual

resulta en el agrupamiento de proteínas en la superficie celular (Prior et al., 2003), y, en nuestro caso, en un aumento del tamaño de la nano-partícula de un 60% (ver Tabla 2. 1).

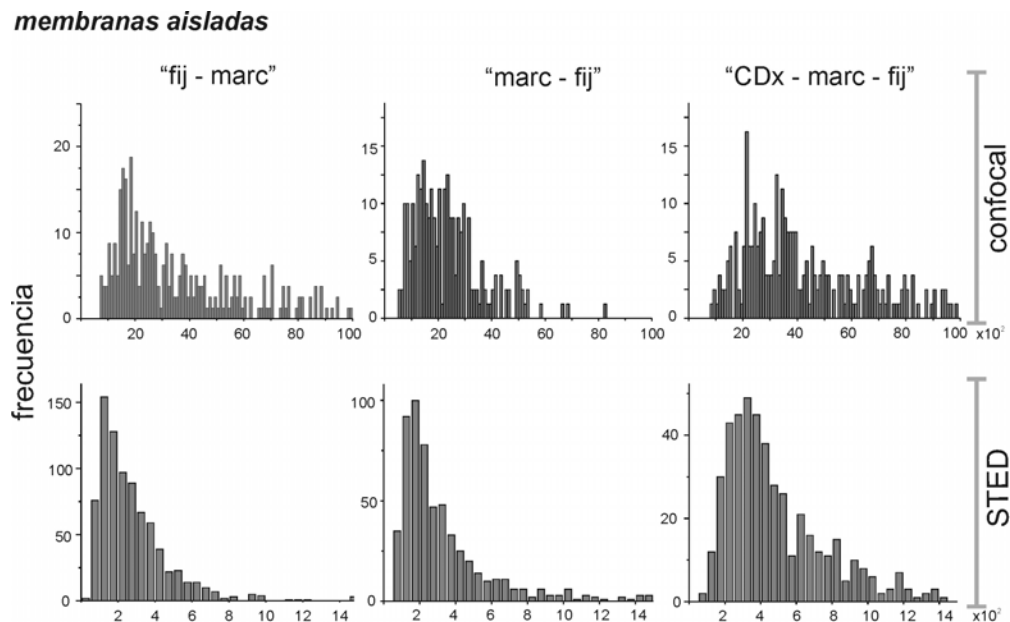


Fig. 2.11 Distribución de intensidades de agregados del AChR obtenidas mediante microscopía confocal y STED. Las tres columnas se refieren a las tres condiciones experimentales empleadas en este capítulo, las cuales se indican en la parte superior, y los histogramas representan los datos de cinco experimentos independientes. El número de partículas analizadas está indicado en la Tabla 2.1. Se muestra el análisis de las imágenes de membranas aisladas obtenidas mediante microscopia confocal (panel superior) y STED (panel medio).

La comparación en la distribución de tamaños e intensidad de los nano-agregados de AChR en células y los correspondientes en láminas de membranas aisladas, revela que mayormente no existen diferencias entre los dos sistemas estudiados. Esto indicaría que la distribución de tamaños de las partículas de AChR en membranas aisladas y en células es esencialmente similar (Figs. 2.9, 2.10 y Tabla 2. 1).

<i>condición</i>	diámetro de partícula (nm)		diámetro de partícula estimado (nm)		
	media	D.S.	media	99.90%	
<i>células</i>					
"fij-marc"	75.8	32.4	38.8	53.8	(n=609)
"marc-fix"	109.7	35.7	92.1	95.3	(n=541)
"CDx-marc-fix"	120.0	44.7	106.0	110.1	(n=734)
<i>membranas aisladas</i>					
"fij-marc"	77.1	32.9	41.1	55.1	(n=1075)
"marc-fix"	91.3	40.7	63.3	69.4	(n=817)
"CDx-marc-fix"	131.1	60.1	118.8	123.1	(n=616)

Tabla 2. 1. Distribución de tamaños de nano-agregados del AChR presentes en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 determinados mediante microscopía STED en células enteras y en membranas aisladas.

La depleción de colesterol en la membrana plasmática favorece la formación de acúmulos del AChR inducido por anticuerpos

Según se mencionara anteriormente, el colesterol es un componente clave en la funcionalidad del AChR (Barrantes, 2003, 2004, 2007). Por otro lado el uso de CDx es un procedimiento establecido para disminuir el contenido de colesterol de las membranas plasmáticas (Pichler y Riezman, 2004) así como para estudiar los efectos del colesterol en la organización de agrupamientos de proteínas en la membrana plasmática (Prior et al., 2003). Con el objeto de confirmar que el colesterol es importante en la organización de los agrupamientos de AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, enunciada en la sección anterior empleando microscopía de epifluorescencia convencional, nos propusimos realizar experimentos similares con microscopía confocal y STED.

Para estudiar el efecto de la remoción del colesterol en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, éstas, o láminas de membrana plasmática aisladas, fueron tratadas con CDx 10 mM durante 20 min. a 37°C. Posteriormente se marcaron con el anticuerpo

monoclonal mAb 210 (Tzartos et al., 1987), con el anticuerpo secundario marcado con Atto⁵³², y finalmente se fijaron con PFA (condición “CDx-marc-fij”). Usando esta condición experimental en membranas plasmáticas aisladas, mediante microscopía de epifluorescencia, observamos un incremento en la intensidad de las partículas fluorescentes, lo cual es indicativo de un aumento en el tamaño de los agrupamientos de AChR con respecto a las membranas control, consecuencia de una mayor facilidad de los anticuerpos para entrecruzar AChR vecinos (Fig. 2.6; Borroni et al., 2007). Sin embargo, con esta técnica no pudimos observar ningún cambio en el tamaño de las partículas entre las membranas control y las tratadas con CDx. De forma similar, empleando microscopía confocal, no se encontraron diferencias significativas en los tamaños de los agrupamientos de AChR entre las muestras control y las tratadas con CDx (Fig. 2.10). Sólo pudimos evidenciar cambios en la distribución de la intensidad de las partículas fluorescentes, detectando una mayor intensidad en las muestras tratadas con CDx (Fig. 2.11). Nuevamente, la pregunta de si la remoción del colesterol facilita la agregación supramolecular de AChR inducida por anticuerpos continúa sin respuesta, razón por la cual necesitamos una resolución espacial mayor para poder contestarla.

De acuerdo con las Figs. 2.10 y 2.12, y la Tabla 2.1, la microscopía STED demuestra cambios en la distribución de tamaños en las partículas de AChR luego del tratamiento con CDx, la cual no fue aparente mediante microscopía confocal. El análisis del tamaño e intensidad de la distribución de las partículas de AChR en las imágenes de STED muestra un ensanchamiento en la distribución de tamaños. Este ensanchamiento en la curva de distribución de tamaños provendría de la agregación de partículas más pequeñas de AChR, resultando en nano-agregados de AChR de mayor tamaño, lo que conduce al aumento intensidad de las partículas de AChR observadas con microscopía de epifluorescencia (Fig 2.6) y confocal (Fig 2.11). Como se evidencia en la Tabla 2.1, el incremento en el diámetro de los agregados del AChR inducido por anticuerpos no es tan notable en células enteras, comparadas con las membranas aisladas. Posiblemente, las interacciones con el citoesqueleto son las responsables de estas diferencias (ver discusión).

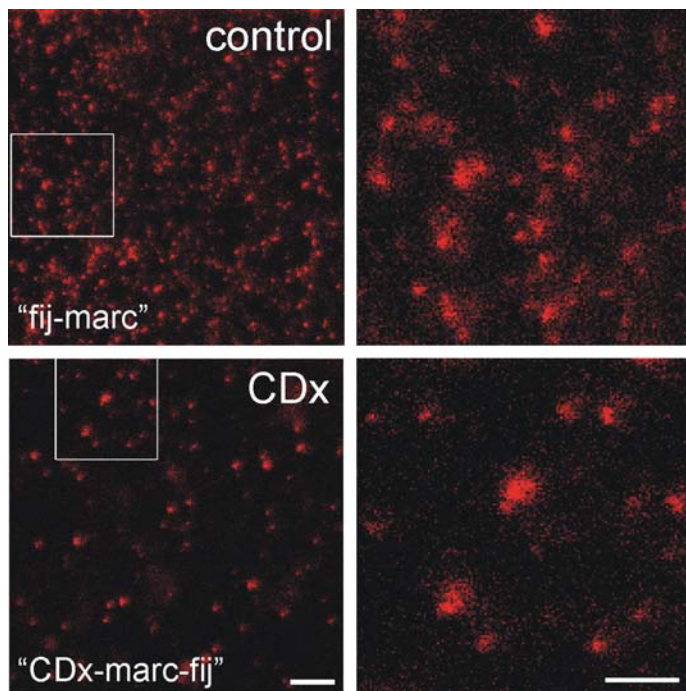


Fig. 2.12. La microscopía STED revela diferencias en la organización del AChR ocasionadas por la remoción de colesterol de la membrana plasmática. Imágenes de nano-agregados de AChR obtenidas mediante microscopía STED en membranas plasmáticas aisladas provenientes de células CHOK1/A5, en las condiciones “fij-marc” (panel superior) y “CDx-marc-fij” (panel inferior). A la derecha de cada imagen se muestra una imagen ampliada correspondiente al recuadro marcado en la imagen correspondiente de la izquierda. Panel izquierdo, barra: 1 μ m; panel derecho, barra: 0.5 μ m. Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas por el Dr. R. Kellner.

PARTE III

ESTUDIO DE LA MOVILIDAD DEL ACHR EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS CHO-K1/A5 MEDIANTE LA TÉCNICA DE RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA LUEGO DEL FOTOBLANQUEADO (FRAP, *FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING*)

La técnica de FRAP es una metodología clásica para estudiar la movilidad de proteínas y lípidos en células o sistemas de membrana modelo. En tales mediciones, la recuperación de moléculas marcadas con alguna sonda fluorescente es monitoreada dentro de un área en la cual moléculas han sido irreversiblemente fotoblanqueadas (Fig. 2.13). Esta técnica fue inicialmente designada por Axelrod et al. (1976a) para mediciones de difusión en dos dimensiones de moléculas unidas a la membrana. Básicamente, en un experimento de FRAP un pulso de luz de alta intensidad proveniente de un láser es utilizado para fotoblanquear fluoróforos en una pequeña región (Fig. 2.13 A). A partir de ese instante la fluorescencia comienza a recuperarse debido a la difusión lateral de fluoróforos no fotoblanqueados a la región fotoblanqueada, así como por movimiento de fluoróforos fotoblanqueados hacia fuera de esta región. En condiciones óptimas, la cinética de recuperación depende sólo de la movilidad molecular de la molécula en cuestión, la cual a su vez es determinada por la difusión, así como por la cinética de unión de las moléculas marcadas a anclajes o estructuras con menor movilidad (ver Edidin 1994; Lippincott-Schwartz et al., 2003; Chen et al., 2006a).

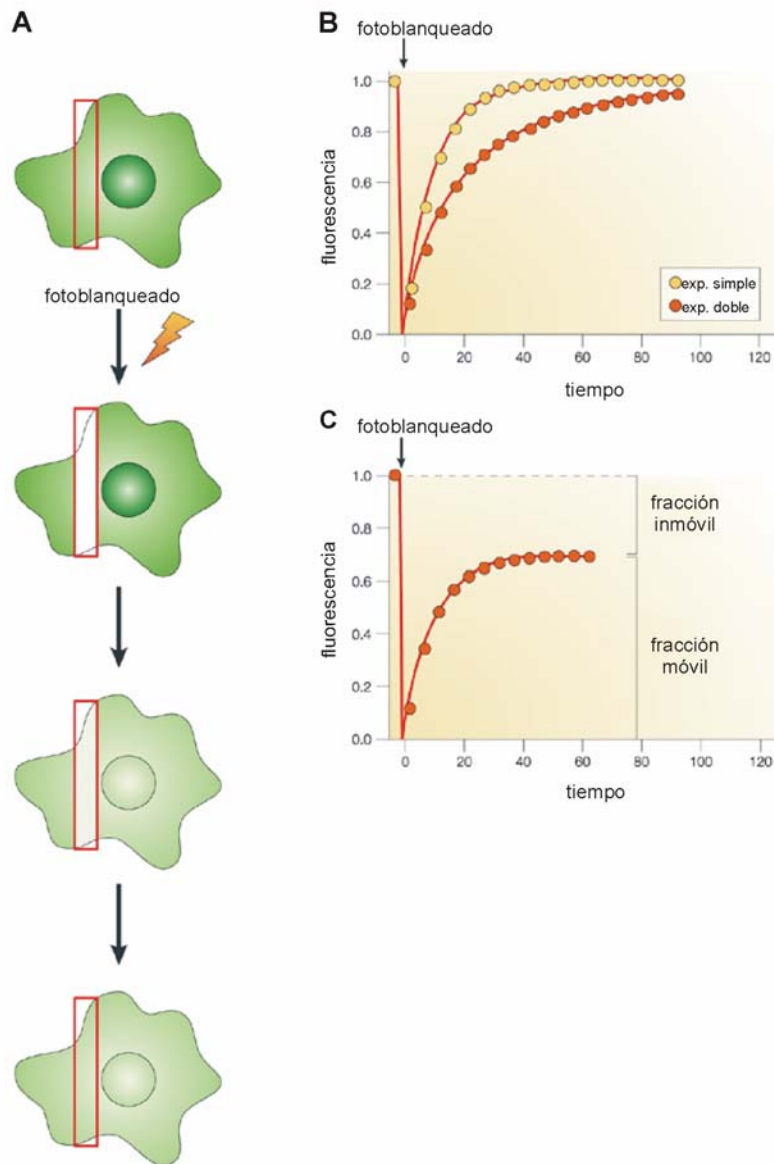


Fig. 2.13. Recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueado. A) Una célula marcada endógena (p. ej. GFP) o exógenamente con una molécula fluorescente es fotografiada a bajos niveles de iluminación antes y después del proceso de fotoblanqueado. La recuperación de la fluorescencia producto de la difusión de moléculas desde los alrededores del área fotoblanqueada es monitoreada en función del tiempo. B) Curva representativa de un experimento de FRAP (ver Materiales y Métodos). En los gráficos se muestra la recuperación de la fluorescencia de una sola población de moléculas (simulada por una curva exponencial simple, círculos amarillos) o por una cinética que representa a dos poblaciones de moléculas, las cuales poseen dos velocidades de recuperación diferentes (simulada por una curva exponencial doble, círculos naranjas). C) El nivel de recuperación de la fluorescencia en la región fotoblanqueada revela las fracciones móvil e inmóvil del fluoróforo en la célula. Adaptado de Lippincott-Schwartz et al., (2003) *Nat Cell Biol.* **5**, S7–S14.

El fotoblanqueado interfiere con la adquisición de las imágenes en microscopía de fluorescencia ya que es deletéreo para las sondas, lo que resulta en detrimento de la relación señal/ruido. Sin embargo, en experimentos de FRAP, selectivamente se fotoblanquea un área específica de la célula con un pulso de láser de alta intensidad. Posteriormente la cinética de recuperación de la fluorescencia se sigue mediante la adquisición de imágenes a intervalos de tiempo regulares a una baja iluminación (en idénticas condiciones a aquéllas en las que se registraron las imágenes previas al fotoblanqueado).

Básicamente, un experimento de FRAP consta de los siguientes pasos (ver Fig. 2.13): en primer lugar, se selecciona la región de interés (en adelante ROI, *region of interest*) y se mide la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos localizados en ella, a baja iluminación. En segundo lugar, se aplica a esta región un/os pulso/s de luz de excitación, el cuál fotoblanquea una importante cantidad de fluorescencia de la ROI. Inmediatamente después, se mide la intensidad de fluorescencia remanente en esta región (en idénticas condiciones a las iniciales) la cual es definida como la intensidad a $t=0$. Así, la recuperación de la fluorescencia dentro del área fotoblanqueada es registrada en función del tiempo.

Midiendo la cinética de recuperación, es posible caracterizar las siguientes propiedades de la molécula (ver cálculos de parámetros en Materiales y Métodos de esta sección):

- relación entre fracción móvil e inmóvil,
- el coeficiente de difusión efectiva (D_{eff}),
- continuidad de organelas intracelulares,
- formación de complejos proteicos (resultando en disminución de D_{eff} y fracción móvil).

RESULTADOS

Dinámica de sondas lipídicas fluorescentes en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5

En primer lugar, estudiamos si la remoción del colesterol de la membrana plasmática afecta a la movilidad de dos sondas lipídicas que poseen un comportamiento diferencial. Primero utilizamos la sonda fPEG-colesterol, cedida por los Drs. Toshihide Kobayashi y Satoshi B. Sato. Esta sonda es un polietilenglicol-esteril eter (PEG-colesterol), Fig. 2.14, el cual tiene unido una molécula de fluoresceína para hacerla fluorescente (fPEG-colesterol). Cuando es agregada a células vivas, esta sonda marca exclusivamente la membrana plasmática, y posee la particularidad de marcar sitios enriquecidos en colesterol (Sato et al., 2004; Ishitsuka et al., 2005).

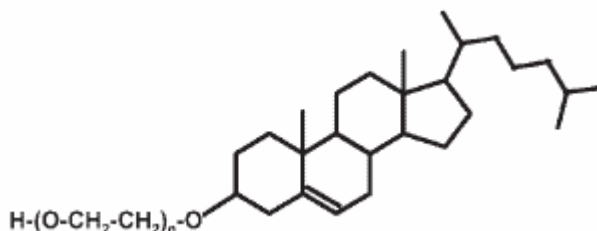


Fig. 2.14. Estructura del fPEG-colesterol

En primer lugar, analizamos la especificidad de la marca de esta sonda evaluando su distribución en vesículas unilaminares gigantes (GUVs, *giant unilamellar vesicles*). Para esto las GUV se realizaron según Akashi et al. (1996) utilizando el sistema lipídico empleado por Vidal y McIntosh (2005), compuesto de DOPC/SM/colesterol (1:1:1), un sistema que está bien caracterizado, el cual contiene dominios “rafts” y “no rafts” (Dietrich et al., 2001; Samsonov et al., 2001). Como marcador de fase fluida utilizamos la sonda fluorescente DiIC₁₂ (Hao et al., 2001). En la Fig. 2.15 se muestran los resultados de los

experimentos. En la Fig. 2.15 A, se observa claramente que las dos sondas fluorescentes empleadas, fPEG-colesterol y DiIC₁₂, se distribuyen principalmente en distintos dominios de membrana. Para controlar la especificidad de la sonda analizamos la distribución de una sonda fluorescente análoga al colesterol, NBD-colesterol, la cual según un estudio de Loura et al. (2001), no se distribuye en dominios ricos en colesterol. La Fig. 2.15 B muestra que el NBD-colesterol se distribuye prácticamente en los mismos dominios que el DiIC₁₂.

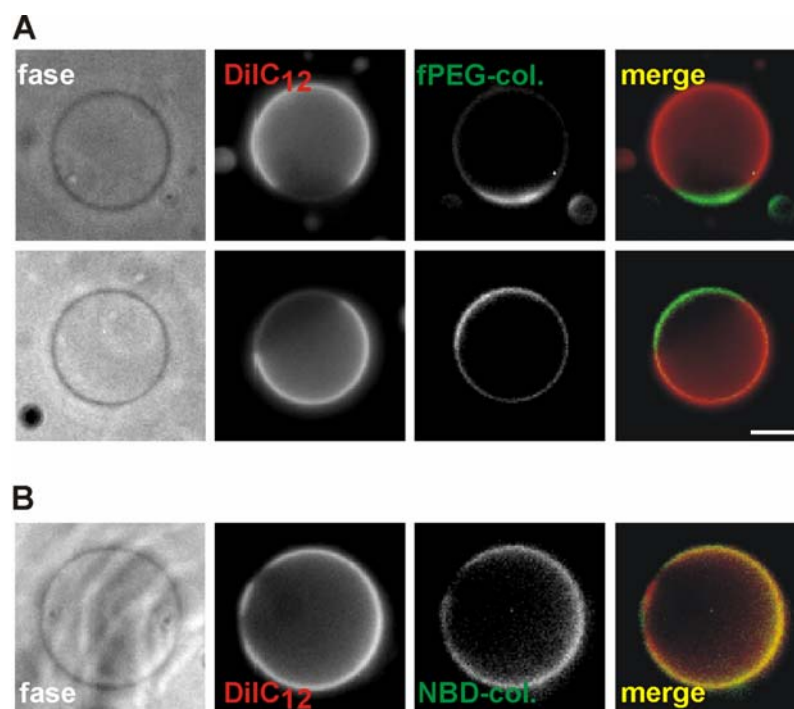


Fig. 2.15. Distribución de las sondas fluorescentes DiIC₁₂, fPEG-colesterol y NBD-colesterol en vesículas unilaminares gigantes (GUVs) formadas por DOPC/SM/colesterol (1:1:1). A) Imágenes de fluorescencia de GUVs constituidos por DOPC/SM/colesterol (1:1:1) y marcados con DiIC₁₂ y fPEG-colesterol (fPEG-col.), marcadores de fase fluida y sitios enriquecidos en colesterol, respectivamente. A la izquierda se muestran las imágenes de contraste de fase, las imágenes correspondientes a cada sonda en las imágenes centrales, y la superposición de las imágenes correspondientes a ambas sondas a la derecha (merge). B) Imágenes de fluorescencia de GUVs constituidos por DOPC/SM/colesterol (1:1:1) y marcados con DiIC₁₂ y NBD-colesterol (NBD-col.). Las imágenes se muestran como en A). Barra, 5 μ m.

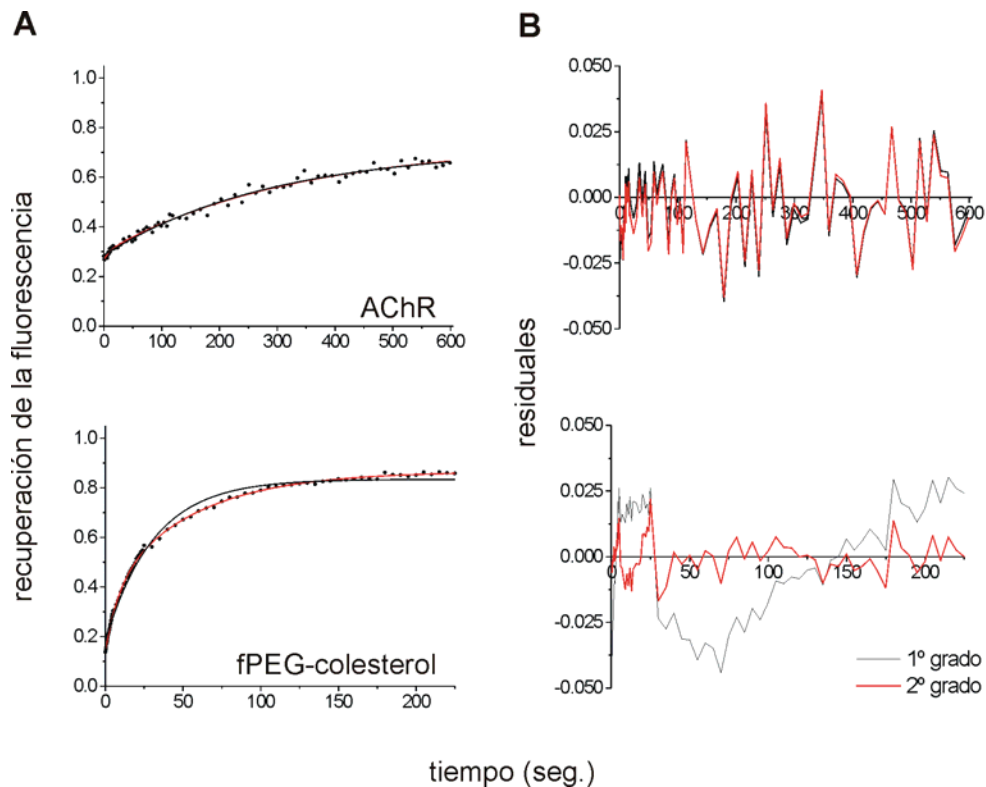


Fig. 2.16. La cinética de recuperación de la fluorescencia se describe mediante funciones exponenciales. A) Datos experimentales (círculos negros) provenientes de experimentos de FRAP realizados en células CHO-K1/A5, donde se observa la recuperación de la fluorescencia de AChR marcado con α BTX fluorescente (panel superior) o una sonda lipídica como el fPEG-colesterol (panel inferior). Estos datos pueden ajustarse empleando exponenciales simples (línea color negro) o una suma de dos exponenciales (línea color rojo), ver también Materiales y Métodos. A la derecha se muestran los residuales para cada aproximación.

Posteriormente, las células CHO-K1/A5 se trataron con 10-15 mM de CDx tal como se describe en secciones anteriores y luego se marcaron con fPEG-colesterol (0.25-1 μ M) durante 5-10 min. a temperatura ambiente. Como se observa en la Fig. 2.17 A-B, la intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de fPEG-colesterol, determinada mediante microscopía confocal cuantitativa, disminuyó un 70% en las células tratadas con CDx con respecto a las células control (incubadas sólo con el vehículo de la droga). Este resultado está de acuerdo con lo publicado por Sato et al. (2004).

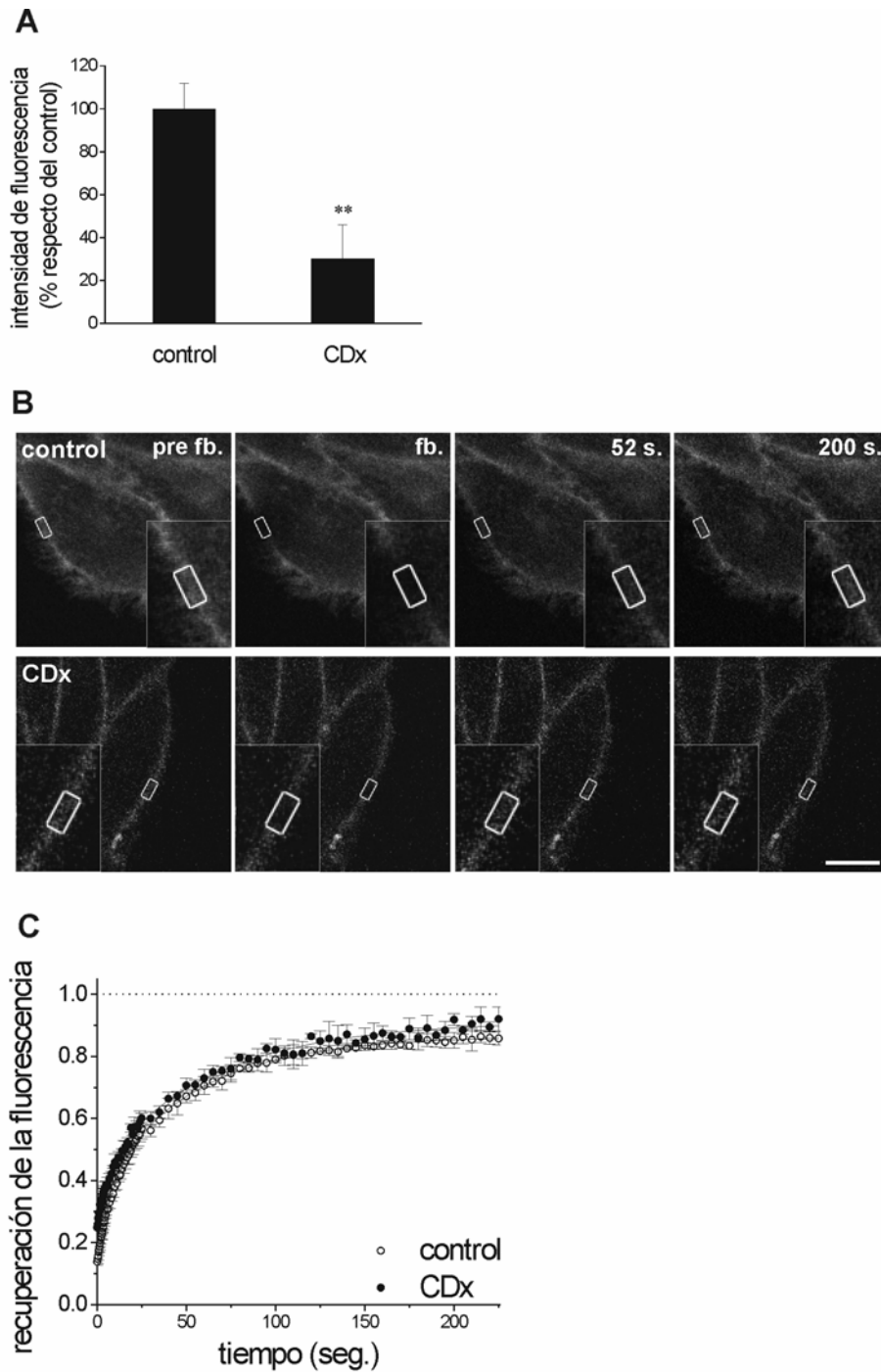


Fig. 2.17. Experimentos de FRAP realizados con la sonda lipídica fPEG-colesterol. A) Intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 marcadas con fPEG-colesterol en células control y en células tratadas con CDx. B) Imágenes de una serie de FRAP en células CHO-K1/A5, control y tratadas con CDx, marcadas con fPEG-colesterol (ver Materiales y Métodos). La región delimitada por el rectángulo blanco ($\sim 6\mu\text{m}^2$) fue fotoblanqueada y luego la recuperación de la fluorescencia fue seguida en función del tiempo por aproximadamente 4 minutos. Se muestra una imagen magnificada del área fotoblanqueada en el inserto existente en cada fotografía. C) Curva promedio de la recuperación de la fluorescencia de fPEG-colesterol en células control y en células tratadas con CDx. La fluorescencia a cada tiempo posterior al fotoblanqueo ($t=0$) fue normalizado a

la intensidad de fluorescencia previa al fotoblanqueado (ver Materiales y Métodos). Los datos corresponden a la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes (en cada uno de los cuales al menos 10 células individuales fueron analizadas). La línea entera corresponde a la aproximación de una función doble exponencial a los datos obtenidos experimentalmente (ver Materiales y Métodos y Fig. 2.16). Abreviaturas: pre fb., pre-fotoblanqueado; fb., fotoblanqueado. El doble asterisco (**) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.01$. Barra, 10 μm .

Los resultados de las Figs. 2.15 y 2.17 A indican que en nuestro sistema esta sonda es un buen reportero del contenido de colesterol en la membrana (ver Borroni et al., 2007). En general, la cinética de recuperación de la fluorescencia de diferentes moléculas se describe mediante funciones exponenciales (Fig. 2.13, ver Materiales y Métodos). En la Fig. 2.16 se puede observar cómo los datos experimentales de la sonda fPEG-colesterol son descritos mejor por una exponencial doble que por una simple (comparar los residuales a la derecha de las curvas de recuperación). En la Fig. 2.17 C se grafican la cinética de recuperación de la fluorescencia del fPEG-colesterol para la condición control y para las células tratadas con CDx. La fracción móvil de fPEG-colesterol en la membrana plasmática es de ~85% y no existen diferencias entre las células control y las tratadas con CDx, ver la Tabla 2.2.

En experimentos subsiguientes utilizamos un derivado fluorescente comercial de la SM, la sonda BODIPY FL C₅-SM (ver Fig. 2.18)

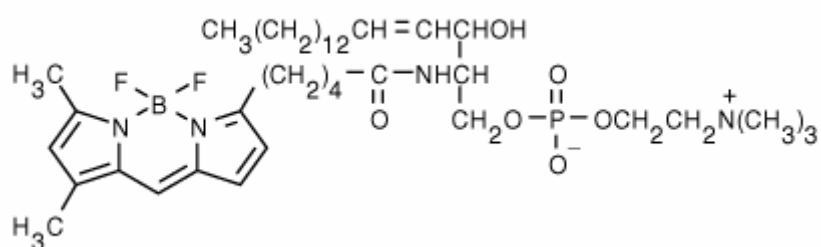


Fig. 2.18. Estructura de la sonda BODIPY FL C₅-SM

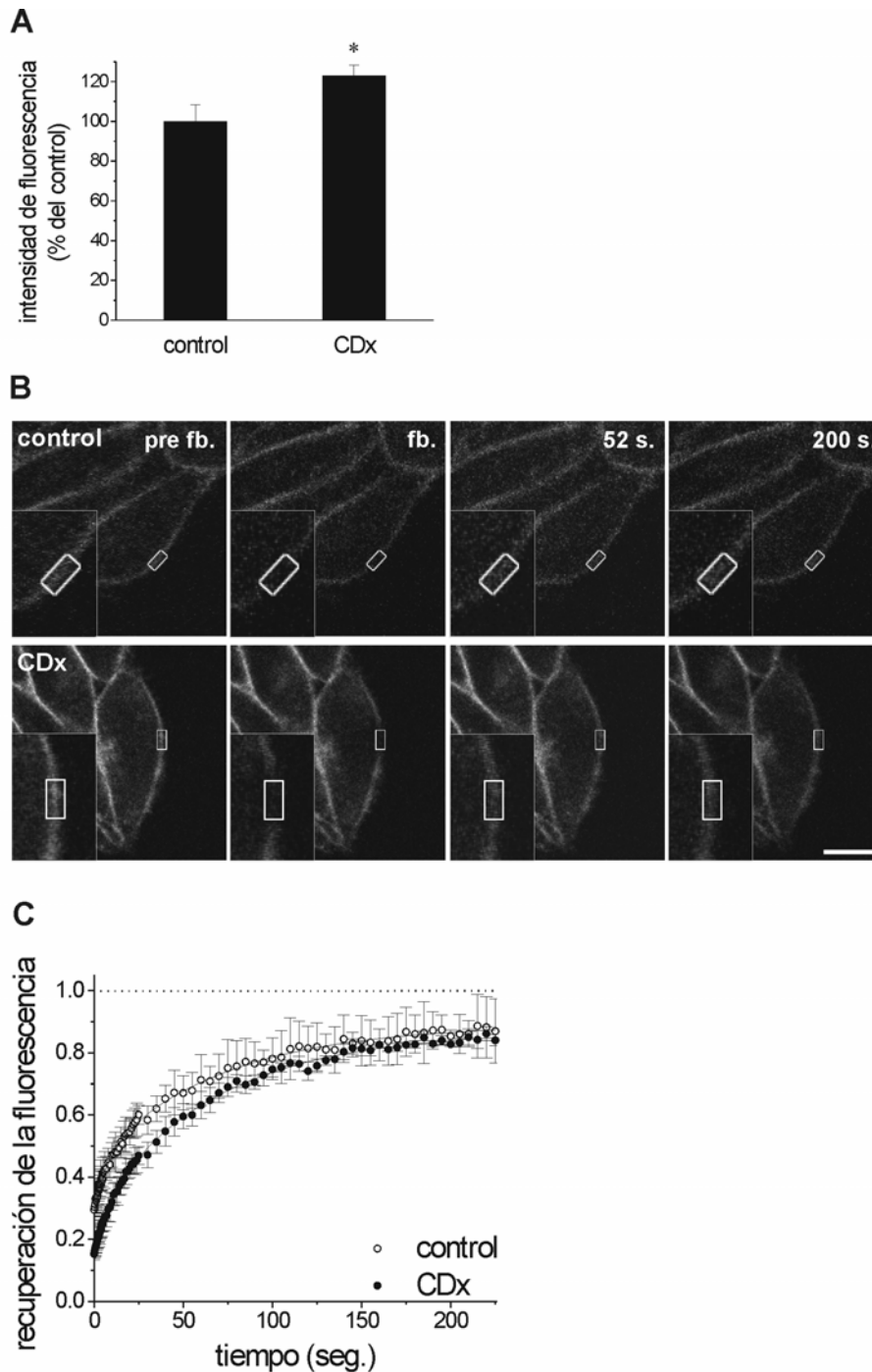


Fig. 2.19. Experimentos de FRAP realizados con la sonda lipídica BODIPY FL C₅-SM. A) Intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 marcadas con BODIPY FL C₅-SM en células control y tratadas con CDx. B) Imágenes de una serie de FRAP en células CHO-K1/A5, control y tratadas con CDx, marcadas con BODIPY FL C₅-SM (ver Materiales y Métodos). La región delimitada por el rectángulo blanco (~6µm²) fue fotoblanqueada y luego la recuperación de la fluorescencia fue seguida en función del tiempo por aproximadamente 4 minutos. Se muestra una imagen magnificada del área fotoblanqueada en el inserto existente en cada fotografía. C) Curva promedio de la recuperación de la fluorescencia de BODIPY FL C₅-SM en células control y en células tratadas con CDx. La fluorescencia a cada tiempo posterior al

fotoblanqueado ($t=0$) fue normalizado a la intensidad de fluorescencia previa al fotoblanqueado (ver Materiales y Métodos). Los datos corresponden a la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes (en cada uno de los cuales al menos 10 células individuales fueron analizadas). La línea entera corresponde a la aproximación de una función doble exponencial a los datos obtenidos experimentalmente (ver Materiales y Métodos y Fig. 2.16). Abreviaturas: pre fb., pre-fotoblanqueado; fb., fotoblanqueado. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$. Barra, 10 μm .

Esta sonda ha sido identificada como marcador de fase fluida (Hao et al., 2001). Marcamos células control y las tratadas con CDx con 0.3 μM de BODIPY FL C₅-SM durante 10 min. a temperatura ambiente. La Fig. 2.19 A-B muestra un leve aumento, pero significativo, de aproximadamente un 25% en la intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de la SM fluorescente. Este resultado estaría de acuerdo con los cambios en los valores de GP de Laurdan hacia valores más bajos (“más fluidos”) en membranas de células CHO-K1/A5 tratadas con CDx (Borroni et al., 2007). Al igual que para el caso del fPEG-colesterol, los datos experimentales de la recuperación de fluorescencia para el caso de la SM fluorescente se describen mejor con una exponencial de segundo grado (Fig. 2.19 C). En la Fig. 2.19 C se grafica la cinética de recuperación de la fluorescencia de BODIPY FL C₅-SM para la condición control y para las células tratadas con CDx. La fracción móvil de BODIPY FL C₅-SM en la membrana plasmática es de ~80% y no existen diferencias entre las células control y las tratadas con CDx, ver la Tabla 2.2, como ocurrió para la sonda fPEG-colesterol. Estos resultados son comparables con los presentados por Hao et al., 2001.

	<u>condición</u>	<u>FM</u>
Tabla 2.2. Fracción móvil (FM) de las sondas de fPEG-colesterol y BODIPY FL C ₅ -SM en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 obtenidas mediante FRAP.	<u>fPEG-colesterol</u>	
	control	0.83 ± 0.02
	CDx	0.86 ± 0.03
	<u>BODIPY FL C₅-SM</u>	
	control	0.82 ± 0.09
	CDx	0.82 ± 0.02

La movilidad lateral del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 es afectada por el contenido de colesterol

Posteriormente analizamos la movilidad lateral del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 y su relación con el contenido de colesterol en las mismas. Para tal fin, las células control y las tratadas con CDx se marcaron con α BTX-Alexa⁴⁸⁸ y posteriormente se analizaron por FRAP.

En las células control la cinética de recuperación de la fluorescencia (Fig. 2.20) puede ser graficada casi invariablemente siguiendo una cinética de primer o segundo grado (ver residuales en Fig. 2.16). Elegimos la de primer grado con la finalidad de simplificar los cálculos de los parámetros y también porque éstos se determinan con menor error con esta función. Como se observa en la Fig. 2.20 la movilidad del AChR es mucho más lenta que la encontrada para las sondas lipídicas (Figs. 2.17 y 2.19).

En las células control, la recuperación de la fluorescencia del AChR marcado con α BTX fluorescente a los 10 min. es de un 50% aproximadamente (la cual corresponde a la fracción móvil del AChR, Fig. 2.20 A-B y Tabla 2.3).

Posteriormente analizamos qué ocurre con el tratamiento de las células con CDx. En primer lugar, y a modo de control interno, cuantificamos la cantidad de AChR en la membrana plasmática de las células control y las tratadas mediante microscopía confocal cuantitativa. Según lo comentado anteriormente, tras la depleción de colesterol con CDx el nivel de receptor en la membrana disminuyó un 50% (Fig. 2.20 A). De este modo, cuando las células fueron previamente tratadas con CDx, marcadas con α BTX fluorescente y analizadas por FRAP observamos un notorio cambio en la curva de recuperación de la fluorescencia (Fig. 2.20 B-C). Como se observa directamente de las curvas de recuperación, la depleción del contenido de colesterol de la membrana afecta críticamente la movilidad del AChR, a diferencia de lo observado con las sondas lipídicas (Fig. 2.17 B-C y Fig. 2.19 B-C). La Tabla 2.3 muestra los valores correspondientes a la fracción móvil para ambas condiciones.

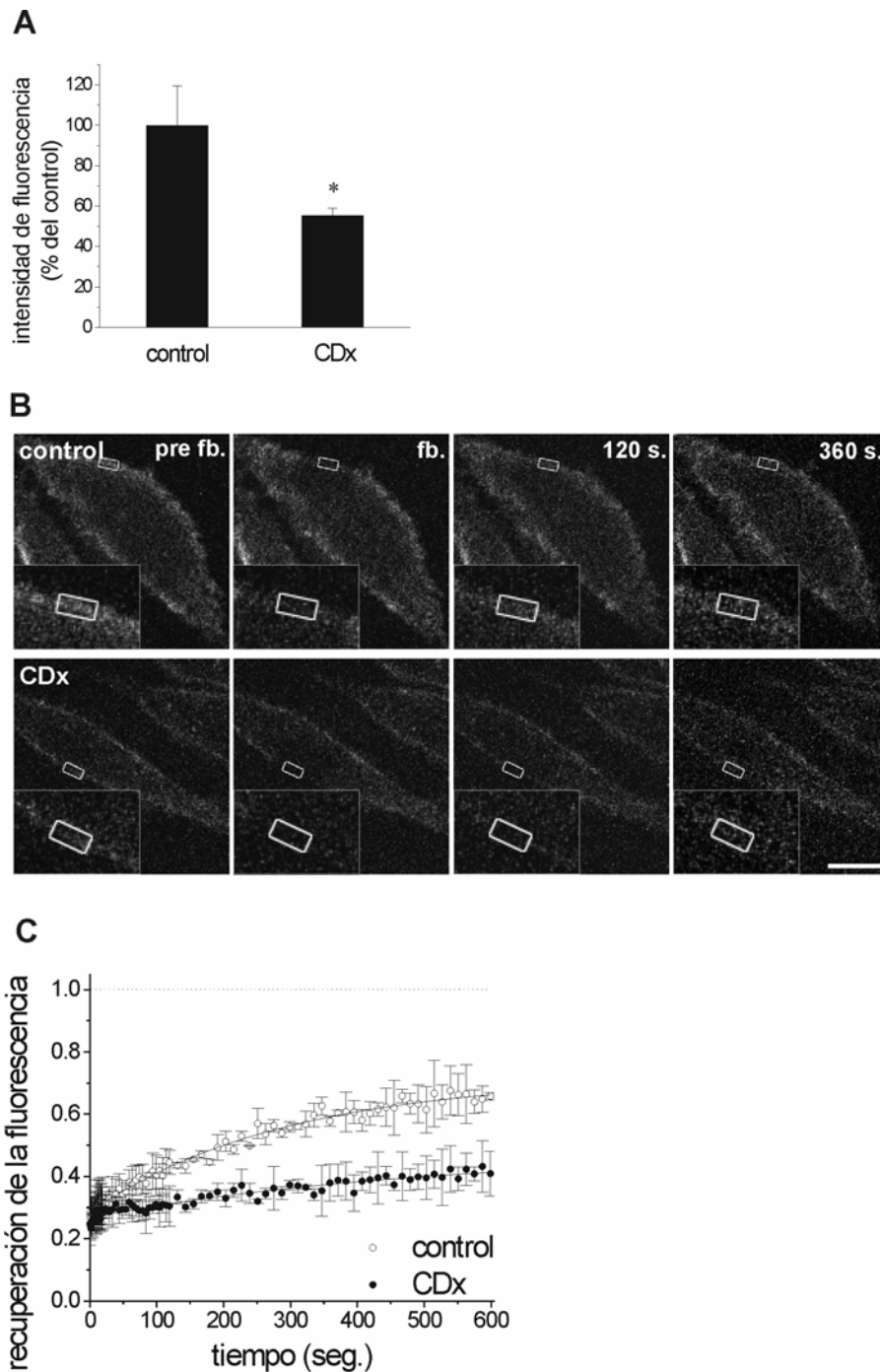


Fig. 2.20. Experimentos de FRAP correspondientes al AChR marcado con α BTX fluorescente en células control y tratadas con CDx. A) Intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 marcadas con α BTX fluorescente en células controles y tratadas con CDx. B) Imágenes de una serie de FRAP en células CHO-K1/A5, controles y tratadas con CDx, marcadas con α BTX fluorescente (ver Materiales y Métodos). La región delimitada por el rectángulo blanco ($\sim 6\mu\text{m}^2$) fue fotoblanqueada y luego la recuperación de la fluorescencia fue seguida en función del tiempo durante 10 minutos aproximadamente. Se muestra una imagen magnificada del área fotoblanqueada en el inserto existente en cada fotografía. C) Curva promedio de la recuperación de la fluorescencia de AChR marcado con α BTX fluorescente en células controles y tratadas con CDx. La fluorescencia

a cada tiempo posterior al fotoblanqueado ($t=0$) fue normalizada a la intensidad de fluorescencia previa al fotoblanqueado (ver Materiales y Métodos). Los datos corresponden a la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes (en cada uno de los cuales al menos 10 células individuales fueron analizadas). La línea entera corresponde a la aproximación de una función exponencial a los datos obtenidos experimentalmente (ver Materiales y Métodos y Fig. 2.16). Abreviaturas: pre- fb., pre-fotoblanqueado; fb., fotoblanqueado. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$. Barra, 10 μm .

Es significativo el cambio observado en la fracción de receptores móviles en la membrana plasmática tras la depleción del colesterol de la misma: en células tratadas con CDx, la fracción de AChR móviles en la membrana plasmática cae a un ~20%, una disminución de más del 50% comparado con las células control, en las cuales la fracción de AChR móviles es aproximadamente de un 50% (ver Fig. 2.20 y Tabla 2.3).

A modo de control, evaluamos qué ocurre con la movilidad del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 cuando estas células son tratadas con la droga Mevinolina, la cual inhibe la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, HMGR, enzima limitante en la biosíntesis de colesterol, y que ha sido empleada en trabajos previos de nuestro laboratorio para disminuir el contenido de colesterol en células CHO-K1/A5 (Pediconi et al., 2004). Las células CHO-K1/A5 se incubaron durante 24 hs. con 1 μM de Mevinolina en medio Nutridoma con 0.1% de SFB, al término de la incubación se marcaron con $\alpha\text{BTX-Alexa}^{488}$ y se realizaron los experimentos según lo describimos en la sección precedente. En primer lugar, y a modo de control interno, cuantificamos la cantidad de AChR en la membrana plasmática de las células control y las tratadas con Mevinolina mediante microscopía confocal cuantitativa. Observamos que el AChR en la membrana plasmática de células tratadas con Mevinolina disminuyó a un 60%, comparadas con las células de la condición control (Fig. 2.21 A) en coincidencia con lo reportado previamente por Pediconi et al. (2004). La Fig. 2.21 B muestra las curvas de recuperación de la fluorescencia para la condición control y para la tratada con Mevinolina durante 24 hs. Según se puede observar a través de dichas curvas, la depleción crónica de colesterol afecta de forma negativa la movilidad del AChR en la membrana plasmática de células

CHO-K1/A5. La fracción móvil de los AChR en la membrana plasmática de las células tratadas con Mevinolina es de un ~32% (0.32 ± 0.01), la cual es significativamente menor ($p < 0.05$) que la fracción móvil de AChR de la condición control (ver Tabla 2.3). Estos resultados demuestran que la depleción de colesterol, ya sea aguda o crónica, afecta de forma negativa a la movilidad del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5.

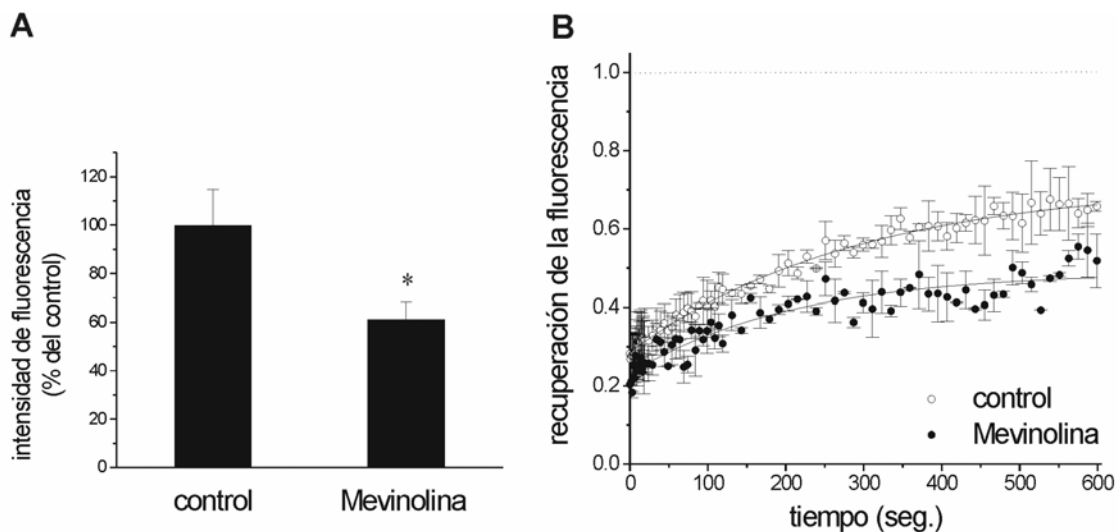


Fig.a 2.21. Experimentos de FRAP correspondientes al AChR marcado con α BTX fluorescente en células tratadas con Mevinolina por 24 hs. A) Intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 marcadas con α BTX fluorescente en células control y tratadas con Mevinolina ($1\mu\text{M}$ por 24 hs.). B) Curva promedio de la recuperación de la fluorescencia de AChR marcado con α BTX fluorescente en células control y en células tratadas con Mevinolina ($1\mu\text{M}$ por 24 hs.). La fluorescencia a cada tiempo posterior al fotoblanqueado ($t=0$) fue normalizada a la intensidad de fluorescencia previa al fotoblanqueado (ver Materiales y Métodos). Los datos corresponden a la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes (en cada uno de los cuales al menos 10 células individuales fueron analizadas). La línea entera corresponde a la aproximación de una función exponencial a los datos obtenidos experimentalmente (ver Materiales y Métodos y Fig. 2.16). El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$.

La alteración observada en la movilidad en la membrana plasmática del AChR tras la depleción de colesterol se relaciona con la integridad del citoesqueleto de actina

De acuerdo con lo concluido en un estudio previo de nuestro laboratorio, cuando disminuye el contenido de colesterol en membranas de células CHO-K1/A5, aumenta la fluidez de la membrana (Borroni et al., 2007). En consecuencia, entendíamos que tras el tratamiento con CDx la movilidad del AChR aumenta ya que la membrana se vuelve más fluida. El comportamiento inesperado observado en los experimentos de FRAP con el AChR ocurre también para otras proteínas (Kenworthy et al., 2004).

Muchos estudios relacionan el contenido de colesterol de las membranas biológicas con el citoesqueleto (Maxfield, 2002; Meiri, 2005; Plowman et al., 2005; Chen et al., 2006b; Head et al., 2006; Sun et al., 2007). Hemos informado previamente que con el tratamiento con CDx los nano-agregados del AChR inducidos por anticuerpos aumentan de tamaño y se reorganizan (Kellner et al., 2007), por lo cual postulamos que el citoesqueleto podría estar involucrado en este proceso.

condición	FM
control	0.56 ± 0.09
<i>depleción de colesterol</i>	
CDx 10 mM	* 0.19 ± 0.12
<i>incubación con CDx-colesterol</i>	
CDx-colesterol (6:1) 3.5mM	0.62 ± 0.08
CDx-colesterol (6:1) 10 mM	0.54 ± 0.10
<i>participación del citoesqueleto</i>	
control + Latrunculina A 20 µM	0.44 ± 0.04
CDx 10 mM + Latrunculina A 20 µM	0.28 ± 0.10

Tabla 2.3. Valores correspondientes a la fracción de AChR móviles en la membrana plasmática (FM) de células CHO-K1/A5 para cada condición experimental analizada. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$.

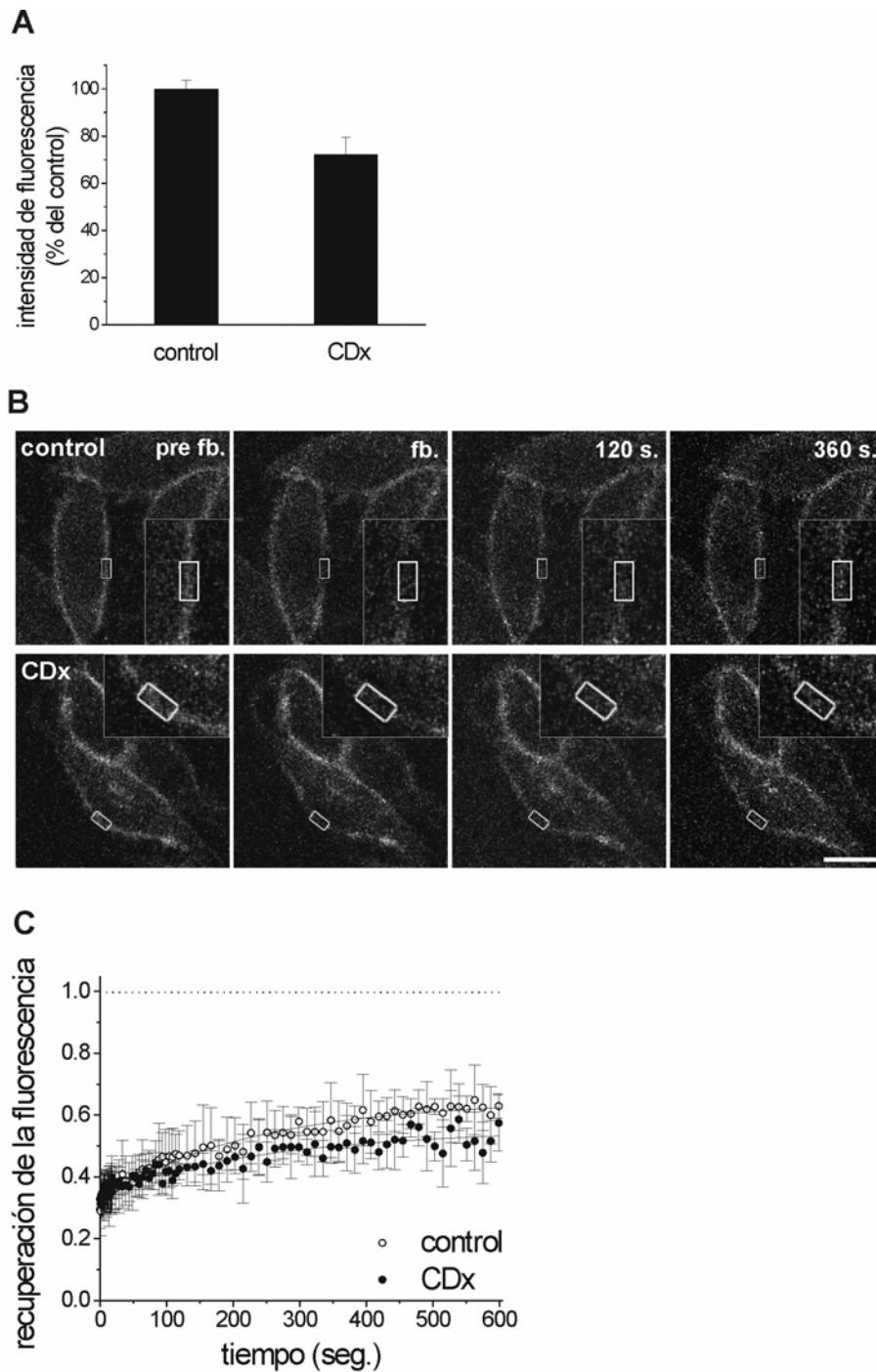


Fig. 2.22. Experimentos de FRAP correspondientes al AChR marcado con α BTX fluorescente en células control y en células tratadas con CDx en presencia de Latrunculina A. A) Intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 marcadas con α BTX fluorescente en células control y en células tratadas con CDx en presencia de Latrunculina A. B) Imágenes de una serie de FRAP en células CHO-K1/A5, células control y células tratadas con CDx en presencia de Latrunculina A, marcadas con α BTX fluorescente (ver Materiales y Métodos). La región delimitada por el rectángulo blanco ($\sim 6\mu\text{m}^2$) fue fotoblanqueada y luego la recuperación de la fluorescencia fue seguida en función del tiempo durante 10 minutos aproximadamente. Se muestra

una imagen magnificada del área fotoblanqueada en el inserto existente en cada fotografía. C) Curva promedio de la recuperación de la fluorescencia de AChR marcado con α BTX fluorescente en células control y en células tratadas con CDx en presencia de Latrunculina A. La fluorescencia a cada tiempo posterior al fotoblanqueado ($t=0$) fue normalizado a la intensidad de fluorescencia previa al fotoblanqueado (ver Materiales y Métodos). Los datos corresponden a la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes (en cada uno de los cuales al menos 10 células individuales fueron analizadas). La línea entera corresponde a la aproximación de una función exponencial a los datos obtenidos experimentalmente (ver Materiales y Métodos y Fig. 2.16). Abreviaturas: pre- fb., pre-fotoblanqueado; fb., fotoblanqueado. Barra, 10 μ m.

Para confirmar esta hipótesis, las células se trataron con un agente que altera el citoesqueleto de actina, un inhibidor de la polimerización de actina, la droga Latrunculina A (Coué et al., 1987; Spector et al., 1989). Así, incubamos conjuntamente células con CDx y Latrunculina (las células control fueron incubadas sólo con Latrunculina y el vehículo de CDx, M1). Aquí también analizamos la cantidad de AChR en la membrana plasmática mediante microscopía confocal cuantitativa (Fig. 2.22 A). Observamos que si bien el AChR disminuye en la membrana, la diferencia no es significativa, a diferencia de lo que ocurre cuando se incuban las células sólo con CDx.

Después del tratamiento las células fueron marcadas con α BTX fluorescente y se realizaron los estudios de FRAP. La figura Fig. 2.22 B-C muestra que las curvas de recuperación de la fluorescencia en las células control y en las tratadas con CDx son similares cuando se las incuban en presencia de Latrunculina (a ambas condiciones). La Tabla 2.3 también indica que la fracción móvil del AChR en la membrana plasmática de las células tratadas con CDx más Latrunculina A aumenta con respecto a lo que ocurre cuando las células son incubadas solamente con CDx. Si bien la condición CDx más Latrunculina A no alcanza los valores de la condición control, existe una recuperación parcial de la movilidad del AChR en la membrana plasmática de las células tratadas con CDx más Latrunculina A (ver Fig. 2.22). Estos resultados sustentan la hipótesis según la cual el citoesqueleto interviene, al menos en parte, en la relación colesterol-AChR en la membrana plasmática como lo habíamos planteado previamente (ver discusión).

La incubación con complejos CDx-colesterol no afecta negativamente la movilidad del AChR en la membrana plasmática

Analizamos también cómo se comporta el AChR cuando se realiza el experimento en presencia de CDx acomplejada con colesterol. Para esto preparamos CDx-colesterol según Christian et al. (1997) quienes demuestran que usando diferentes relaciones CDx:colesterol es posible manipular el contenido de colesterol celular.

Usamos una relación CDx:colesterol 6:1 e incubamos las células con 3.5-10 mM de esta mezcla. En primer lugar, analizamos qué ocurre con el AChR en la membrana plasmática tras el agregado de CDx-colesterol mediante microscopía confocal cuantitativa. Como se puede observar en la Fig. 2.23 A-B, no existen diferencias entre las células control y las tratadas con CDx-colesterol (comparar con lo que ocurre con la incubación de CDx sola, Fig. 2.20). Cuando analizamos la cinética de recuperación de la fluorescencia del AChR marcado con α BTX fluorescente entre las células control y las tratadas con CDx-colesterol (Fig. 2.23 B-C) observamos que difiere totalmente de lo observado cuando se incuban las células solo en presencia de CDx. La Tabla 2.3 muestra que la fracción de AChR móviles en la membrana plasmática de las células tratadas no se vio afectada (ver también más adelante los coeficientes de difusión).

condición	coeficiente de difusión, D ($\text{cm}^2/\text{seg.}$)
<hr/> <i>fPEG-colesterol</i> <hr/>	
control	$8.3 \pm 1.3 \times 10^{-10}$
CDx	* $5.9 \pm 0.6 \times 10^{-10}$
<hr/> <i>BODIPY FL C₅-SM</i> <hr/>	
control	$5.2 \pm 0.4 \times 10^{-10}$
CDx	$4.2 \pm 1.1 \times 10^{-10}$

Tabla 2.4. Coeficientes de difusión, D , determinados según Ellenberg et al. (1997), ver Materiales y Métodos, de las sondas fPEG-colesterol y BODIPY FL C₅-SM. Los datos corresponden a la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$.

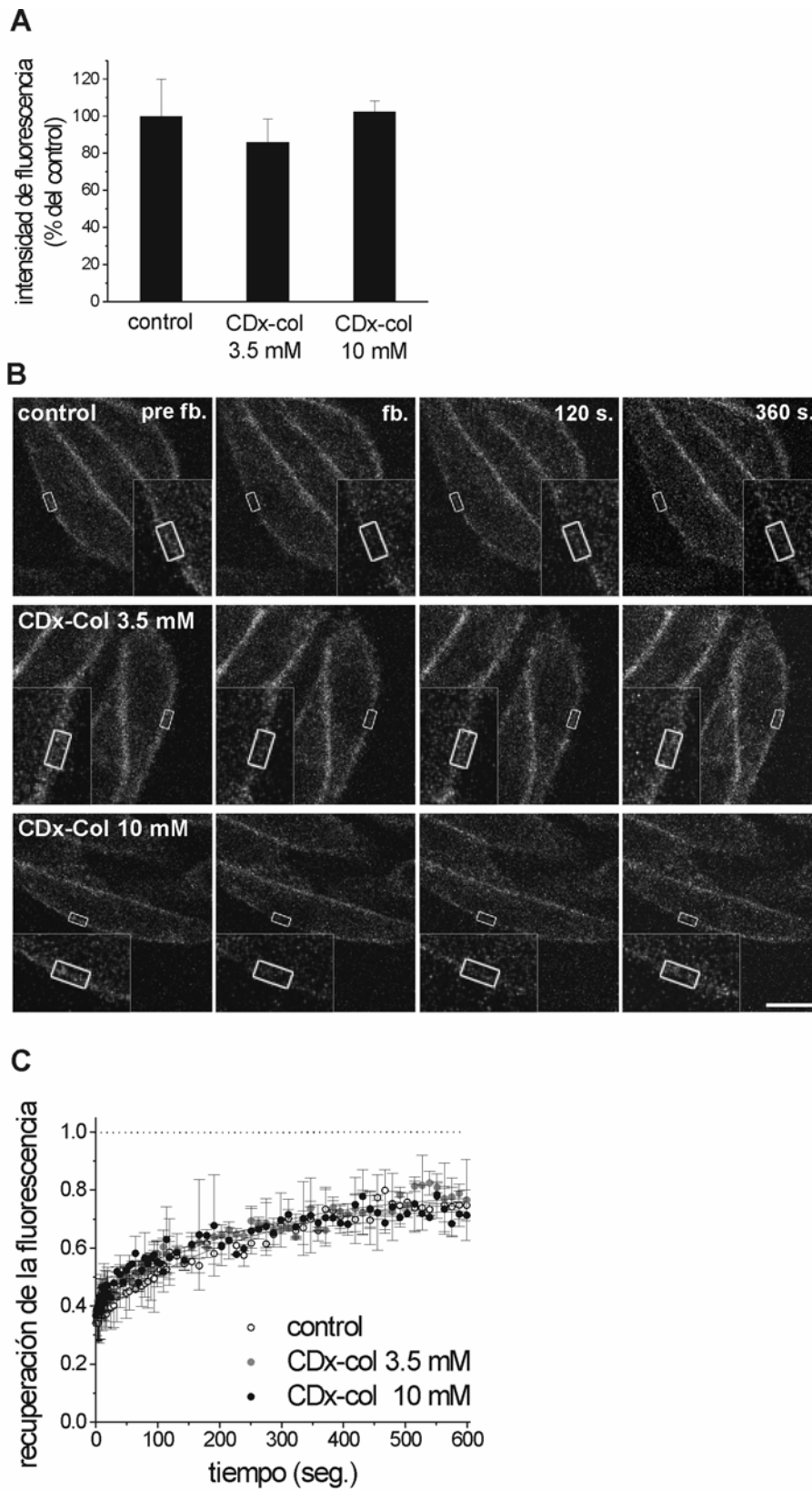


Fig. 2.23. Experimentos de FRAP correspondientes al AChR marcado con α BTX fluorescente en células control y en células tratadas con CDx-colesterol. A) Intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 marcadas con α BTX fluorescente en células control y

en células tratadas con CDx-colesterol 3.5 y 10 mM (relación CDx:colesterol 6:1). B) Imágenes de una serie de FRAP en células CHO-K1/A5, control y tratadas con CDx-colesterol, marcadas con α BTX fluorescente (ver Materiales y Métodos). La región delimitada por el rectángulo blanco ($\sim 6\mu\text{m}^2$) fue fotoblanqueada y luego la recuperación de la fluorescencia fue seguida en función del tiempo por aproximadamente 10 minutos. Se muestra una imagen magnificada del área fotoblanqueada en el inserto existente en cada fotografía. C) Curva promedio de la recuperación de la fluorescencia de AChR marcado con α BTX fluorescente en células controles y tratadas con CDx-colesterol. La fluorescencia a cada tiempo posterior al fotoblanqueado ($t=0$) fue normalizada a la intensidad de fluorescencia previo al fotoblanqueado (ver Materiales y Métodos). Los datos corresponden a la media y el D.S. de al menos tres experimentos independientes (en cada uno de los cuales al menos 10 células individuales fueron analizadas). La línea entera corresponde a la aproximación de una función exponencial a los datos obtenidos experimentalmente (ver Materiales y Métodos y Fig. 2.16). Abreviaturas: pre- fb., pre-fotoblanqueado; fb., fotoblanqueado. Barra, 10 μm .

El coeficiente de difusión del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 es sensible al contenido de colesterol de la misma

Para la determinación de los coeficientes de difusión empleamos el método de Ellenberg et al. (1997). En primer lugar, calculamos el coeficiente de difusión de las sondas lipídicas en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 (Tabla 2.4). Observamos que el valor de D para estas sondas en nuestro sistema es de $\sim 8.3 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{seg}$. para la sonda fPEG-colesterol y de $\sim 5.2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{seg}$. para la sonda BODIPY FL C₅-SM. Estos valores de D caen en el rango de los valores publicados para sondas lipídicas en membranas, determinados por FRAP, los cuales varían de 10^{-8} a $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{seg}$. (Vaz et al., 1982; Ladha et al., 1994; Schootemeijer et al., 1994 ; Johnson et al., 1996; Pucadyil y Chattopadhyay, 2006 ; Pucadyil et al., 2007). De acuerdo con la Tabla 2.4, tras la depleción de colesterol en la membrana plasmática, el valor de D para la sonda fPEG-colesterol disminuye en aproximadamente un 30%, no encontrándose cambios significativos en el valor de D para la sonda BODIPY FL C₅-SM (Tabla 2.4). De lo expuesto, la sonda fPEG-colesterol, la cual particionaría en dominios ricos en colesterol, es más sensible a los niveles de este lípido en la membrana. De igual modo, mediante experimentos de FRAP en membranas de hipocampo, Pucadyil y Chattopadhyay (2006), encontraron que la sonda DiIC₁₈, la cual

particionaría en dominios ordenados, evidencia mayor sensibilidad al contenido de colesterol que la sonda *FAST Dil*, la cual particionaría en dominios más fluidos.

Seguidamente determinamos los valores de D para el AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 para cada condición analizada anteriormente. Los valores de D obtenidos pueden observarse en la Tabla 2.5. En un trabajo muy pionero, Axelrod et al. (1976b) determinaron los coeficientes de difusión del AChR insertado en la membrana de miotubos en cultivo primario. Determinaron que existen dos poblaciones de AChR, una prácticamente inmóvil, formando grandes agrupaciones (en el orden de decenas de μm) y otra móvil, que se encuentra difusamente distribuida en la membrana plasmática. Observaron además que el valor de D para estos receptores móviles es de $5 \pm 2 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{seg}$. Este valor coincide con el encontrado en nuestro laboratorio en membranas de células CHO-K1/A5 ($\sim 4.6 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{seg}$). Este valor se reduce prácticamente a la mitad cuando las células son tratadas con CDx ($2.7 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{seg}$), lo que se refleja claramente en la curva de recuperación de la fluorescencia del AChR (Fig. 2.20 C). Estas diferencias en el valor de D desaparecen cuando las células son tratadas conjuntamente con Latrunulina A (Tabla 2.5), así como el valor de D para el AChR se hace ligeramente mayor, lo que podría indicar que en células CHO-K1/A5, como ocurre con el AChR en miotubos, esta proteína en la membrana plasmática se encuentra relacionada con el citoesqueleto (Bloch et al., 1989; Pumplin 1989; Dai et al., 2000). Llamativamente, cuando las células son tratadas con CDx-colesterol, aumenta el valor de D a medida que la concentración de dicho complejo aumenta, como ocurre para EGFR (Orr et al., 2005).

Determinamos también los coeficientes de difusión según la metodología de Pouwels et al. (2004) para ROIs rectangulares. Con éste método, los valores de D hallados son similares a los obtenidos según Ellenberg et al. (1997) (datos no mostrados).

condición	coeficiente de difusión, <i>D</i> (cm ² /seg.)
control	4.6 ± 0.9 x10 ⁻¹¹
<i>depleción de colesterol</i>	
CDx 10 mM	* 2.7 ± 0.8 x10 ⁻¹¹
<i>incubación con CDx-colesterol</i>	
CDx-colesterol (6:1) 3.5mM	6.3 ± 2.6 x10 ⁻¹¹
CDx-colesterol (6:1) 10 mM	* 11.7 ± 4.4 x10 ⁻¹¹
<i>participación del citoesqueleto</i>	
control + Latrunculina A 20 μM	6.7 ± 1.8 x10 ⁻¹¹
CDx 10 mM + Latrunculina A 20 μM	4.9 ± 2.1 x10 ⁻¹¹

Tabla 2.5. Coeficientes de difusión, *D*, determinados según Ellenberg et al. (1997), ver Materiales y Métodos, del AChR en cada condición estudiada. Los valores expresados representan el ajuste según Ellenberg et al. (1997) de las curvas promedio para cada condición (± el error de ajuste). El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$.

Análisis de la naturaleza de la fracción de AChR móviles en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5

Según lo señalado anteriormente, los AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, están presentes en forma de pequeños agregados de AChR con un tamaño que se encuentra por debajo del límite de resolución del microscopio óptico (Borroni et al., 2007), con un diámetro de ~55 nm (Kellner et al., 2007). En un trabajo reciente, Sieber et al. (2007) determinaron que las agrupaciones de sintaxina en la membrana plasmática dependen de interacciones débiles proteína–proteína, y que las moléculas de sintaxina en dichas agrupaciones son dinámicamente intercambiadas con moléculas libres en la membrana. En el presente capítulo, nosotros demostramos que la movilidad del AChR en la membrana plasmática es dependiente del colesterol, y que el citoesqueleto cortical de actina estaría involucrado, al menos en parte, en dicho fenómeno. Debido a que el AChR se encuentra en forma de nano–agregados, estas agrupaciones son móviles o la fracción móvil del AChR en la membrana corresponde a moléculas individuales del AChR que difunden libremente, tal como es el caso de las moléculas de sintaxina?

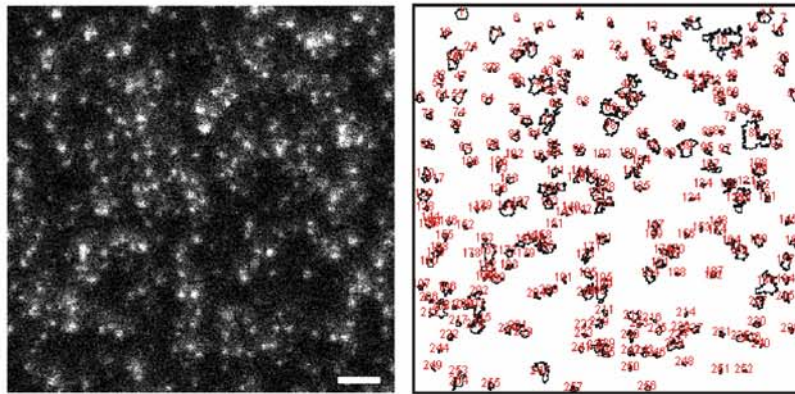
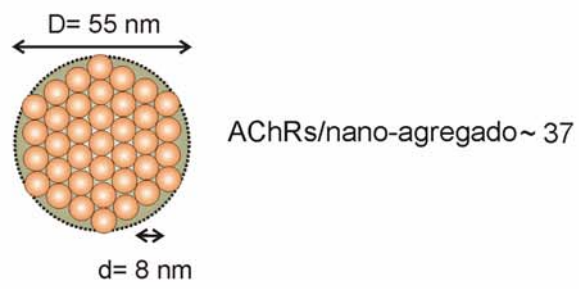
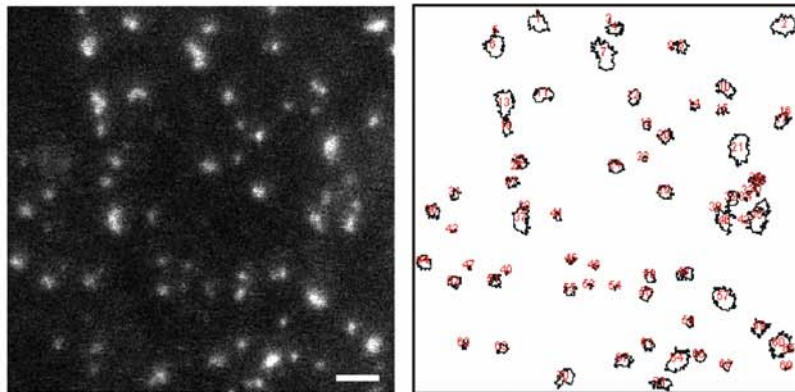
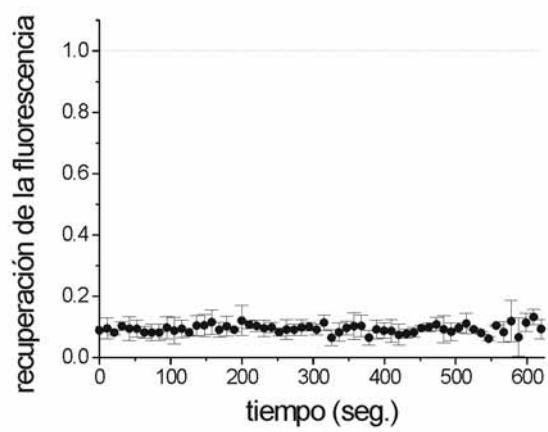
A**B****C****D**

Fig. 2.24. Naturaleza de la fracción móvil de AChRs. A) Izquierda, imagen de STED correspondiente a AChRs presentes en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 fijadas previo al marcaje con mAb 210 y su anticuerpo secundario derivatizado con la sonda Atto532. Derecha, cuantificación del número de partículas en la imagen previa realizada con el programa Image J (ver Materiales y Métodos). B) Esquema representando el número máximo de moléculas de AChR (con un diámetro de 8 nm; Unwin, 1993) comprendidas en un área de 55 nm de diámetro, correspondiente a un nano-agregado del AChR (Kellner et al., 2007). C) Izquierda, imagen de STED de nano-agregados del AChR en la membrana plasmática inducido por anticuerpos. La incubación con el anticuerpo primario más el secundario fluorescente se realizó en células vivas, previa a la fijación, lo que resultó en el entrecruzamiento de AChRs (Kellner et al., 2007). Derecha, cuantificación del número de partículas en la imagen previa realizada con el programa Image J. D) Gráfico de la recuperación de la fluorescencia de AChR marcado con el anticuerpo primario mAb 210 y el anticuerpo secundario fluorescente. La fluorescencia a cada tiempo posterior al fotoblanqueo ($t=0$) fue normalizado a la intensidad de fluorescencia previa al fotoblanqueo (ver Materiales y Métodos). Los datos corresponden a la media y al D.S. de al menos tres experimentos independientes. Barra, 0.5 μm .

Mediante el análisis de imágenes de STED del AChR en la membrana plasmática observamos que la densidad de los nano-agregados del AChR es de ~ 10.4 nano-agregados/ μm^2 (Fig. 2.24 A). La superficie de la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5, determinada mediante el análisis de imágenes de fluorescencia de células marcadas con αBTX fluorescente, es de $\sim 525 \mu\text{m}^2$ (el diámetro celular es $\sim 12.9 \pm 1.5 \mu\text{m}$, $n=86$, ver Materiales y Métodos). De esta manera, considerando la densidad de nano-agregados del AChR y la superficie de la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5, el número de nano-agregados del AChR por célula es de ~ 5460 . El diámetro de una molécula de AChR, determinado mediante microscopía electrónica, es de $\sim 8 \text{ nm}$ (Unwin, 1993). Debido a que el diámetro medio de los nano-agregados del AChR es de aproximadamente 55 nm (Kellner et al., 2007), el número máximo de AChR por agregado es de ~ 37 (Fig. 2.24 B), llevando a un número total de ~ 200000 moléculas de AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5.

Diseñamos un experimento con la finalidad de entrecruzar los AChR presentes en la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 con el objeto de secuestrar moléculas libres del AChR. Por esta razón, las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal

mAb 210 y posteriormente con el anticuerpo secundario marcado con Alexa⁴⁸⁸. Luego se realizaron los experimentos de FRAP tal como se habían realizado anteriormente. En la Fig. 2.24 C se muestran las correspondientes imágenes de STED de nano-agregados de AChR inducidos por anticuerpo, mAb 210 y el correspondiente anticuerpo secundario marcado con Atto⁵³². El análisis de las imágenes análogo al descrito para la Fig. 2.24 A indicó que la densidad de los agregados de AChR en la membrana plasmática es aproximadamente tres veces menor (~ 3.3 nano-agregados/ μm^2 , Fig. 2.24 C) que la hallada en las células control (Fig. 2.24 A). Según lo mostráramos anteriormente, el entrecruzamiento inducido por anticuerpos incrementa el diámetro de los nano-agregados del AChR de ~ 55 a 95 nm (Kellner et al., 2007). De este modo, el área de los nano-agregados del AChR inducidos por anticuerpo se incrementó aproximadamente tres veces (7088 nm²) comparado con el área de los agregados del AChR en las células control (2376 nm²). En virtud de que el número de AChRs en la membrana plasmática se mantiene constante (la densidad de los nano-agregados del AChR inducido por anticuerpos disminuye ~ 3 veces, pero el área de los mismos se incrementa ~ 3 veces), el incremento en el área de los agregados de AChR inducido por anticuerpo sugiere el reclutamiento de agregados de menor tamaño o moléculas libres de AChR dentro de estructuras de mayor tamaño (ver Barrantes, 1983).

La dinámica de los AChRs entrecruzados mediante incubación con anticuerpos fue analizada por FRAP. La Fig. 2.24 D muestra que la fluorescencia no se recupera en el curso del experimento (10 min. en Fig. 2.24 D), tampoco observamos recuperación de la fluorescencia en experimentos de hasta 20 min. De esta manera, la ausencia de recuperación de la fluorescencia bajo estas condiciones experimentales, sugiere que la fracción móvil de los AChRs presentes en la membrana plasmática corresponde a moléculas de AChR que difunden libremente y que se intercambian con los AChR presentes en los nano-agregados, los cuales podrían ser considerados inmóviles para la escala temporal utilizada en los experimentos.

Rapsina-GFP se asocia con el AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 y reduce la movilidad del receptor en la misma

Con la finalidad de analizar si la unión a proteínas afecta a la movilidad del AChR en la membrana plasmática, transfectamos células CHO-K1/A5 con rapsina-GFP, la cual interactúa con la porción citoplasmática del AChR (Ramarao y Cohen, 1998). Primeramente analizamos los niveles de expresión de AChR y rapsina-GFP mediante microscopía de fluorescencia cuantitativa (Fig. 2.25 A). De acuerdo con la Fig. 2.25 A, la sobre-expresión de rapsina-GFP afecta negativamente los niveles de AChR en la membrana plasmática (Fig 2.25 B), en concordancia con resultados publicados por Han et al. (2000). Evaluamos la movilidad del AChR mediante experimentos de FRAP como en las secciones previas. Para realizar estos experimentos elegimos las células que expresan ambas proteínas en la membrana plasmática. Como se observa en la Fig. 2.25 C, la movilidad del AChR en células que expresan rapsina-GFP está severamente reducida, así como también la fracción de AChRs móviles, que disminuye a ~15%. Para evaluar si la rapsina-GFP interactúa con el AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, realizamos experimentos de entrecruzamiento de AChRs mediante el uso de anticuerpos. Para esto, las células se incubaron con el anticuerpo mAb 210 y luego con el anticuerpo secundario derivatizado con Alexa⁶⁴⁷. La Fig 2.25 A muestra que las células que expresan conjuntamente AChR y rapsina-GFP presentan una marca difusa de ambas proteínas por toda la membrana (muy pocas células que expresaban rapsina-GFP presentaban acúmulos del AChR en la membrana). Sin embargo, cuando realizamos el experimento de entrecruzamiento de AChRs mediante anticuerpos (Fig 2.25 D) se observa que la formación de acúmulos de AChRs en la membrana plasmática conduce a la formación de acúmulos de rapsina-GFP, los cuales poseen una buena colocalización (Fig 2.25 D). De esta manera, como es de esperar, la interacción del AChR con proteínas asociadas a la membrana plasmática, en este caso rapsina-GFP, conduce a una menor movilidad lateral del receptor, la cual es evidenciada mediante ensayos de FRAP.

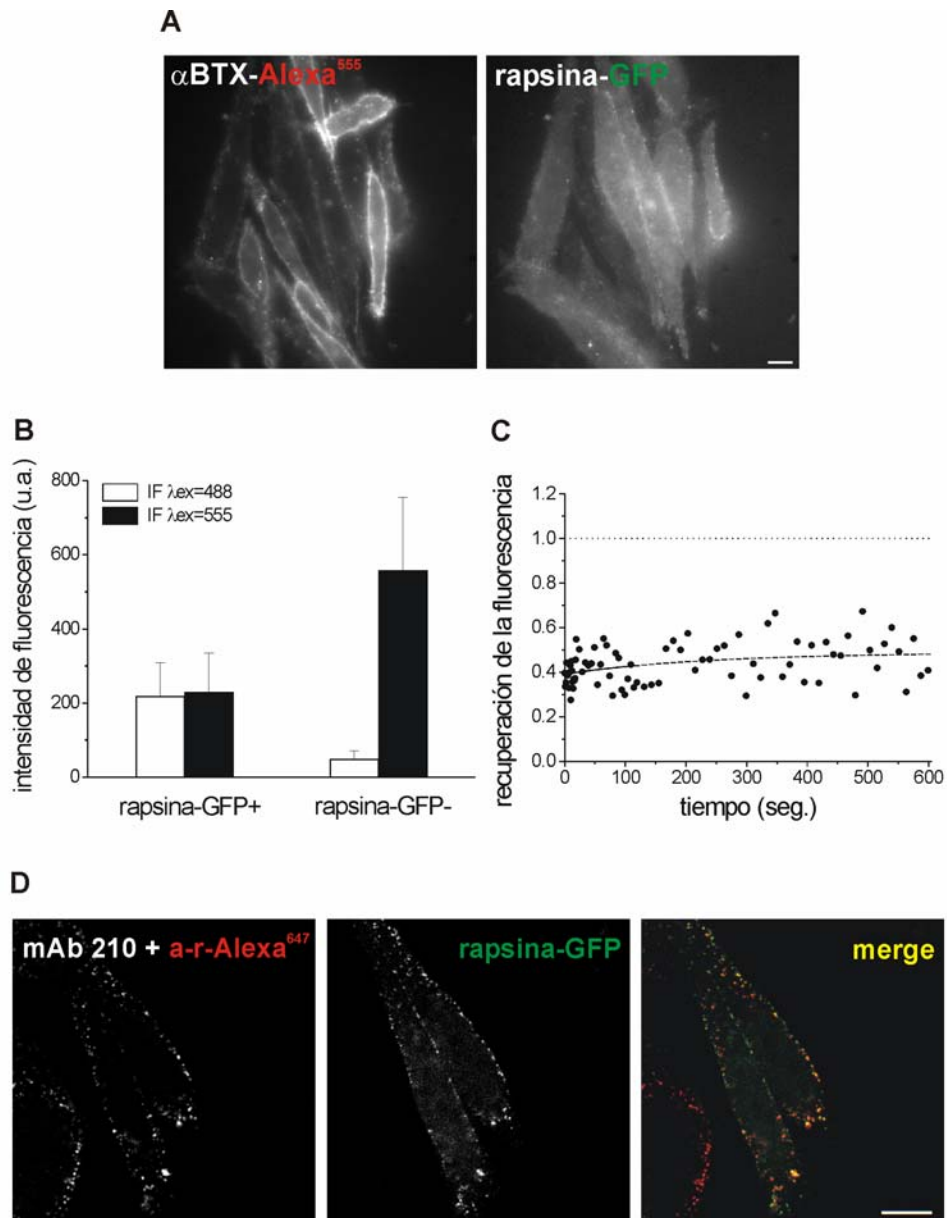


Fig. 2.25. Relación rapsina-GFP y AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5. A) Imagen de células CHO-K1/A5 expresando AChR y rapsina-GFP. Para visualizar el AChR en la membrana plasmática, las células fueron marcadas con α BTX-Alexa⁵⁵⁵. B) Gráfico mostrando la intensidad de fluorescencia del AChR en la membrana plasmática (barras negras) en células que expresan o no rapsina-GFP en su superficie (barras blancas). C) Curva promedio de la recuperación de la fluorescencia de AChR marcado con α BTX fluorescente en células que expresan conjuntamente AChR y rapsina-GFP. La fluorescencia a cada tiempo posterior al fotoblanqueado ($t=0$) fue normalizada a la intensidad de fluorescencia previa al fotoblanqueado (ver Materiales y Métodos). La línea entera corresponde a la aproximación de una función exponencial a los datos obtenidos experimentalmente (ver Materiales y Métodos y Fig. 2.16). D) La formación de acúmulos de AChR mediante la incubación con anticuerpos primario y secundario para esta proteína (izquierda), conduce al agrupamiento de la proteína rapsina-GFP en la membrana plasmática (centro). A la derecha se observa la imagen de colocalización de ambas proteínas (merge). Barra, 10 μ m.

DISCUSIÓN

En este capítulo hemos estudiado cómo se distribuye el AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 y cómo esta distribución es sensible al contenido de colesterol de la misma. Mediante microscopía de fluorescencia convencional en combinación con las membranas plasmáticas aisladas generadas por ultrasonificación determinamos que la distribución del AChR no es en forma difusa, como lo sugieren las imágenes obtenidas de célula entera (ver imágenes de AChR en superficie del capítulo 1). Por el contrario, observamos que el AChR se encuentra distribuido en forma de pequeñas agrupaciones con un tamaño menor al que es capaz de resolver esta técnica (~250 nm, Borroni et al., 2007). Los experimentos realizados en colaboración con el Dr. S. Hell utilizando microscopías de última generación, como es el caso de STED, arrojaron nuevos datos acerca de la topografía del AChR en la superficie celular e hicieron posible, por primera vez, el estudio de la distribución de un canal iónico mediante microscopía óptica nano-resolutiva (Kellner et al., 2007). Pudimos determinar que el tamaño de los acúmulos del AChR en nuestro sistema es aproximadamente 5 veces menor al determinado mediante el uso de microscopías convencionales, aproximadamente de 55 nm, con lo cual denominamos a estas agrupaciones nano-agregados de AChR (Kellner et al., 2007). La hipótesis postulada en la primera sección de este capítulo (Borroni et al., 2007), según la cual el tamaño de estos agregados, inducidos por anticuerpos depende del contenido de colesterol en la membrana plasmática, fue confirmada con el uso de STED (Tabla 2.1). Analizando la distribución espacial del AChR (Kellner et al., 2007) se observó que las partículas del AChR se encuentran distribuidas al azar en la superficie de la membrana de células CHO-K1/A5, pero estas partículas son redistribuidas e interrelacionadas como consecuencia de la remoción parcial del colesterol de las mismas. Se observó que este cambio es más notable en las células enteras que en las membranas aisladas, lo que podría ser indicativo de la necesidad de contar con un citoesqueleto totalmente funcional (ver más

adelante). En la última sección de este capítulo estudiamos la dinámica del AChR en nuestro sistema mediante el uso de la técnica de FRAP. Pudimos observar que la difusión del AChR en el plano de la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 es comparable a la obtenida en la fracción móvil, difusamente distribuida de AChRs en miotubos de rata, descrita por Axelrod et al. (1976b) - la inmóvil corresponde a los agregados del AChR que están en el orden de varios μm -. Esta movilidad se encuentra severamente afectada cuando se elimina parcialmente el colesterol de las membranas, disminuyendo prácticamente a la mitad la fracción de AChR móviles en la misma (Fig. 2.20, Tabla 2.3). Mediante el uso de una droga que afecta el citoesqueleto de actina (Latrunculina A) y con la incubación de células con CDx-colesterol (forma en la cual se puede adicionar colesterol a la membrana) revertimos este fenómeno y aumentamos, con el último tratamiento, la movilidad del AChR en la membrana plasmática (Tabla 2.5). Todos estos hallazgos coinciden con los reportes que destacan la estrecha relación que existe entre el AChR y el colesterol en la membrana (ver revisión Barrantes, 2004, 2007) y podrían indicar que parte de los efectos sociales observados entre estas dos entidades podrían ser mediados, al menos en parte, por elementos de anclaje al citoesqueleto (ver más adelante).

Mediante experimentos de FRAP, observamos que la sonda fPEG-colesterol posee una fracción de moléculas móviles de ~85 % (al igual que la sonda BODIPY FL C₅-SM), la cual no se modifica luego de la depleción de colesterol (Tabla 2.2), pero llamativamente, en cambio, su coeficiente de difusión disminuye luego del tratamiento con CDx (Tabla 2.4). Se reportó que la depleción del colesterol de membrana disminuye el coeficiente de difusión, así como también la fracción móvil, de las sondas lipídicas DiIC₁₂ y DiIC₁₈ (Vrljic et al., 2005). Otros autores observaron, por el contrario, que la depleción de colesterol de las membranas aumenta la movilidad de sondas lipídicas fluorescentes, DiIC₁₈ y FAST DiI (Pucadyila y Chattopadhyay, 2006) o DiIC₁₂ (Sun et al., 2006). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la estructura molecular de los análogos lipídicos determina su localización diferencial en la membrana, y que cada sonda debe ser analizada en forma particular, aun para una misma especie lipídica (ver Fig. 2.15) y para el sistema en estudio (Wang y Silvius,

2000; Loura et al., 2001; Sharma et al., 2002; Sato et al., 2004; Ishitsuka et al., 2005; Omel'kov et al., 2006; Epanand, 2006).

La interacción lípido-proteína presupone contactos íntimos entre los segmentos transmembrana de la proteína y los lípidos que la rodean (ver revisión Barrantes, 2004). Toyoshima y Unwin en 1990 determinaron, mediante microscopía crioelectrónica de vesículas tubulares de *Torpedo*, qué fracción del AChR interactúa con los lípidos de la membrana: la porción transmembrana ocupa aproximadamente un 25% del volumen total de la proteína, del cual un 30% corresponde a la porción que se contacta con los lípidos de la membrana (la porción extracelular y el dominio intracelular ocupan aproximadamente un 55% y un 30% del volumen total de la proteína, respectivamente). Barrantes (2003) propuso un modelo basado en tres anillos concéntricos delimitados por los segmentos transmembrana del AChR, a saber: el anillo interno compuesto por cinco segmentos transmembrana M2; el anillo medio formado por diez segmentos M1 y M3, y el anillo más externo y en mayor contacto con los lípidos de la membrana, formado por los cinco segmentos M4. Esta región contendría el sitio de unión/interacción del colesterol con la proteína (Corbin et al., 1998). Aunque no forman parte de la vía de conducción de iones, la parte expuesta a los lípidos del anillo medio, y particularmente el anillo más externo, significativamente modulan la función del AChR (Barrantes, 2004), enfatizando la importancia de las interacciones lípido-AChR y principalmente colesterol-AChR en la funcionalidad del AChR (Barrantes, 2007). Recientemente, Nieves et al. (2007) encontraron que los sitios de interacción de esteroides (así como el de ácidos grasos libres) con el AChR, se encuentran en la interfase lípido-proteína y que la interacción de estas moléculas es sensible a cambios conformacionales del AChR.

Existen dominios proteicos que reconocen lípidos específicos. Uno de ellos es el denominado motivo de aminoácidos que interacciona o reconoce al colesterol, CRAC (por *cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*), que se localiza en la región de la proteína yuxtapuesta a la membrana. Este dominio fue desarrollado a través del análisis de secuencia de proteínas que reconocen al colesterol (ver revisión Epanand, 2006). La

secuencia CRAC posee el siguiente patrón: -L/V-X(1-5)-Y- X(1-5)-R/K- en el que X(1-5) representa entre uno y cinco residuos de cualquier aminoácido. Observamos que este motivo se encuentra en el segmento transmembrana M1 de todas las subunidades del AChR (Fig. 2.26). El segmento M1, conjuntamente con los segmentos transmembrana M3 y M4, componen la porción del AChR que interactúa con los lípidos de la membrana en la cual se encuentra inserto el AChR (ver Barrantes, 2003, 2004). Salvo en la subunidad γ , el dominio CRAC se encuentra particularmente en la región amino terminal del segmento M1. En la γ , el dominio CRAC se encuentra en la porción carboxilo terminal. En el dominio CRAC, los grupos aromáticos son importantes para la interacción con el colesterol, y su posición, en el dominio CRAC presente en el segmento M1 del AChR, se encuentra conservado en las distintas subunidades (salvo la subunidad γ), siendo su posición constante a partir de los aminoácidos con carga positiva (Fig. 2.26). El residuo Y central tendría un rol importante en estabilizar las interacciones con el colesterol a través de la formación de enlaces de H (su reemplazo por F, el cual sólo difiere de Y en que no posee el grupo OH, no es selectivo para colesterol). El requisito de la presencia de Y es importante pero no suficiente para la interacción con el colesterol. La presencia de aminoácidos cargados (K o R) son importantes ya que posicionan el dominio con respecto a la interfase entre la membrana y el medio acuoso (ver revisión Epan, 2006). La posición diferente del dominio CRAC entre la subunidad γ y la subunidad ε (así como con el resto de las subunidades que componen el AChR) quizás contribuya a la diferencia funcional entre el AChR maduro ($\alpha_2\beta\varepsilon\delta$) y embrionario ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) (Mishina et al., 1986), teniendo en cuenta que el colesterol es importante en la funcionalidad del AChR (ver revisiones Barrantes 2003, 2004, 2007). Este dominio también está presente en el AChR de *Torpedo* y en el AChR neuronal $\alpha 7$.

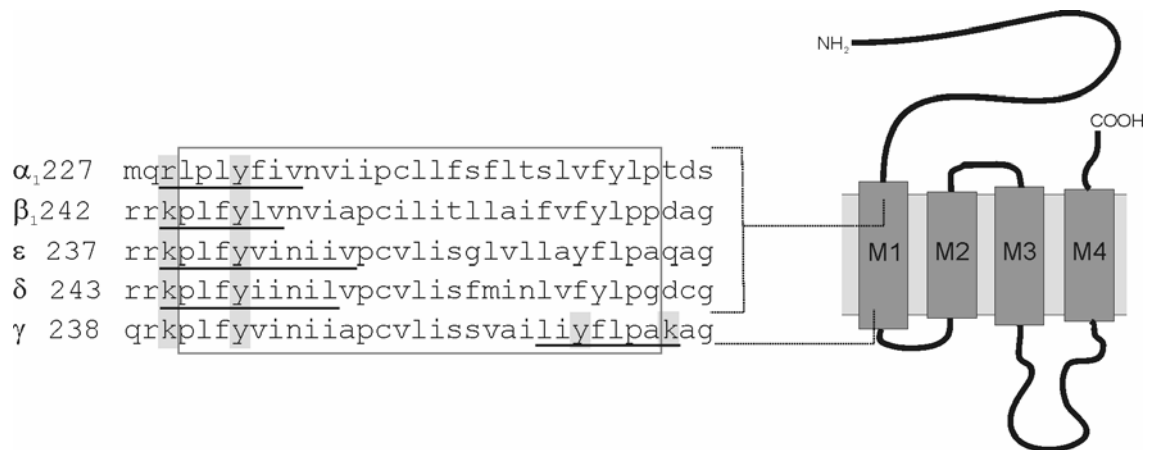


Fig. 2.26. Presencia del dominio CRAC en el segmento transmembrana M1 del AChR. A la izquierda se puede observar la secuencia de aminoácidos que corresponden al segmento transmembrana M1 (delimitado por el recuadro) de las distintas subunidades del AChR de ratón. La porción subrayada en cada segmento denota la localización del dominio CRAC. A la derecha se esquematiza una subunidad del AChR y la posición que ocuparían los dominios CRAC en la misma.

¿Qué ocurre en nuestro sistema cuando eliminamos parcialmente el colesterol de la membrana mediante el uso de CDx? De los experimentos realizados en las dos primeras secciones del presente capítulo podemos concluir que el colesterol de la membrana plasmática dictamina la distribución del receptor, sus interacciones intermoleculares así como su organización social (Borroni et al., 2007; Kellner et al., 2007). Si bien en las membranas plasmáticas aisladas el tamaño de los nano-agregados de AChR inducido por anticuerpo aumentan (tal como ocurre en las células enteras), la distribución topográfica de los mismos (que en células enteras pasa de distribuidos al azar a organizarse en el rango de 1-1.5 μm tras la depleción de colesterol) no se ve tan afectada (Kellner et al., 2007). Una posible explicación para esta observación es la interacción o participación del citoesqueleto. El AChR y la interacción con el citoesqueleto es un requerimiento en la formación y estabilidad de la unión neuromuscular (ver revisión de Hoch, 1999). También hay evidencia de la relación de los lípidos y los dominios lipídicos con el citoesqueleto (ver Niggli, 2001; Maxfield, 2002; Lenne et al., 2006). Esta relación se analizó a través de los experimentos

con Latrunculina A, un conocido agente que afecta la polimerización de actina cortical (Coué et al., 1987; Spector et al., 1989). Si bien nosotros hemos observado que el efecto de la depleción aguda de colesterol sobre la movilidad del AChR de la membrana plasmática fue parcialmente restaurado cuando se co-incubó CDx con Latrunculina A, la cinética de recuperación de la fluorescencia en estas células no alcanza a la de la condición control. De estos experimentos podemos concluir que si bien el citoesqueleto participaría en la movilidad del AChR, no es el único factor que media los efectos producidos por el colesterol sobre la difusión lateral del AChR. Quizás otras proteínas corticales del citoesqueleto o proteínas que se unen a la actina, así como interacciones directas del colesterol con el AChR, mediante los dominios CRAC, por ejemplo, puedan estar implicadas. Un ejemplo de que la interacción con proteínas subcorticales afecta a la movilidad del AChR en la membrana plasmática se observa en los experimentos de co-expresión de rapsina fluorescente con AChR en células CHO-K1/A5 (Fig. 2.25). Si bien varios autores reportaron que la co-expresión de rapsina con AChR en células no musculares conduce a la formación de agregados de AChR, que colocalizan con rapsina (Froehner et al., 1990; Phillips et al., 1991; Yu y Hall, 1994b; Ramarao y Cohen, 1998), nosotros no observamos dicho fenómeno. La distribución de AChR y rapsina-GFP observada en células CHO-K1/A5 (Fig. 2.25 A) es similar a la que se observa en miotubos que no han sido inducidos con agrina neural y que co-expresan ambas proteínas (Gervásio y Phillips, 2005). Sólo observamos la asociación entre estas dos proteínas cuando realizamos los experimentos de entrecruzamiento inducido por anticuerpos de AChRs de la membrana plasmática (Fig. 2.25 D). La fracción móvil de AChR en células que expresan rapsina-GFP es aproximadamente un 70% menor a la observada en células que expresan sólo AChR en la superficie celular. Así, la asociación de AChRs de membrana con proteínas subcorticales afecta notoriamente su movilidad en el plano de la misma.

Llamativamente, y contrario a las predicciones realizadas en función de trabajos realizados en sistemas de membranas modelo (Criado et al., 1982b; Bacia et al., 2004), la depleción de colesterol en membranas celulares disminuye la movilidad de proteínas

integrales de membrana, ya sea asociadas o no a dominios lipídicos (Kenworthy et al., 2004; Vrljic et al., 2005; O'Connell y Tamkun, 2005; Orr et al., 2005; Ewers et al., 2005; Corbett-Nelson et al. 2006; Lambert et al., 2006). Sin embargo, otros autores indican que la depleción de colesterol de la membrana plasmática favorece la movilidad lateral de proteínas de membrana (Pralle et al., 2000; Shvartsman et al., 2003; Adkins et al., 2007; Charalambous et al., 2008). Con respecto a los sistemas de membranas modelo, usando sistemas de AChR reconstituido, Criado et al. (1982b) determinaron que la difusión del AChR en vesículas de DMPC no es significativamente afectada por la presencia o ausencia de 45 mol % de un derivado del colesterol, colesterol hemisuccinato, a diferencia de lo que observamos en nuestro sistema (Fig. 2.20). Según Kenworthy et al. (2004), la asociación de proteínas a "rafts" lipídicos no parece ser el factor determinante en la movilidad de proteínas en el plano de la membrana celular.

Un factor importante en limitar la movilidad del AChR en la membrana plasmática es el citoesqueleto (Stya y Axelrod, 1983). Se ha postulado la existencia de relaciones entre el contenido de colesterol en las membranas y la estabilidad del citoesqueleto (Kwik et al., 2003). Estos autores proponen que la depleción de colesterol tiene efectos generales sobre la arquitectura y función de la membrana y que la disminución en la movilidad de las proteínas es consecuencia de la reorganización de la actina, lo cual tornaría más estable el esqueleto sub-membrana. Según estos autores, el secuestro de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂) de la membrana plasmática estaría relacionado con estos cambios. Este desplazamiento del PI(4,5)P₂ se debería a que esta molécula se distribuye en dominios lipídicos ricos en colesterol, con lo cual, al remover el colesterol celular, se perdería la compartimentalización del PI(4,5)P₂, la cual se recupera al incubar las células con CDx-colesterol (Pike y Millar, 1998). Este lípido ha sido relacionado con la regulación del citoesqueleto de actina y con el tráfico vesicular, y también se ha observado que los dominios lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos son plataformas para la polimerización de actina relacionada con la membrana (Rozelle et al., 2000; ver revisión de Yin y Janmey, 2003). Liu y Fletcher (2006) observaron en vesículas unilaminares que la polimerización de

actina en la superficie de la membrana conduce a la segregación de dominios lipídicos en vesículas. De lo expuesto, los “rafts” lipídicos actuarían como plataformas concentradoras de sitios de acción del PI(4,5)P2 y sitios de polimerización de actina, creando microdominios especializados de la membrana que se relacionarían estructuralmente con el citoesqueleto (Yin y Janmey, 2003). En cuanto a la relación entre el colesterol de membrana y el citoesqueleto, mediante microscopía de fuerza atómica, Sun et al. (2007) hallaron que la depleción de colesterol aumenta significativamente la interacción entre la membrana y el citoesqueleto, con lo cual disminuye la constante de difusión de la misma. El incremento en los niveles de colesterol celular produce efectos opuestos y el desensamblaje del esqueleto de actina, mediante Latrunculina A, revierte los efectos observados, sugiriendo que los efectos biomecánicos producidos por el colesterol son mediados a través del citoesqueleto submembrana (Sun et al., 2007).

Otros trabajos relacionan la disminución de la movilidad de proteínas, consecuencia de la depleción de colesterol en la membrana plasmática, con una alteración en la relación fosfolípidos-colesterol que conduciría, en el caso de la eliminación del colesterol, a la generación de dominios de fosfolípidos con un alto punto de fusión que limitarían la difusión lateral de componentes de membrana (Vrljic et al., 2005; Nishimura et al., 2006).

Se han desarrollado varias teorías o modelos para comprender la difusión de proteínas de membrana. Saffman y Delbrück (1975) desarrollaron el modelo hidrodinámico, según el cual, el coeficiente de difusión de una proteína embebida en una membrana posee una dependencia débil, logarítmica, con el radio de la misma. Existe controversia entre la relación entre el radio y la velocidad de difusión de partículas en membranas analizadas mediante simulación (Saxton, 1993; Guigas y Weiss, 2006), o en membranas modelo (Vaz et al., 1982; Doeven et al., 2005; Thoumine et al., 2005; Gambin et al., 2006). Si bien, Gambin et al. (2006) sostienen que el radio de la proteína posee un efecto más influyente (e inverso) sobre la velocidad de difusión de proteínas de membrana en membranas modelo, esta relación no se cumple cuando esto se analiza en células (Kucik et al., 1999). Kucik et al. (1999) determinaron que agregados de proteína, que varían desde 40 nm a 550 nm,

difunden casi tan rápido como proteínas simples de membrana. De esta manera, la ausencia de recuperación de fluorescencia en los ensayos de entrecruzamiento de AChR (Fig. 2.24 D) no puede deberse a un aumento en el radio de los nano-agregados del AChR, que conduciría a una disminución en la velocidad de difusión lateral de los mismos. Más aun, con un aumento al doble del radio de los nano-agregados inducidos por anticuerpo (55 nm a 95 nm, Kellner et al., 2007; - en los experimentos de Kucik et al. (1999) el radio aumenta unas ~14 veces -), si éstos fueran móviles, deberíamos observar recuperación, aunque más lenta, de la fluorescencia (Vaz et al., 1982; Doeven et al., 2005; Thoumine et al., 2006; Gambin et al., 2006). Estos resultados sustentan la hipótesis de acuerdo con la cual, la fracción móvil de AChRs corresponde a moléculas libres que se intercambian con receptores presentes en los nano-agregados del AChR a los cuales consideramos inmóviles en el transcurso de los experimentos (Figs. 2.24 D, 2.27).

Un mecanismo posible que podría explicar los resultados obtenidos en nuestro sistema podría ser que el tratamiento con CDx remueve el colesterol de la membrana y provoca el desplazamiento del PI(4,5)P2 y, como propuso Kwik et al. (2003), esto generaría áreas sub-membrana más rígidas, lo cual se refleja, en nuestro caso con una menor movilidad del AChR (Figs. 2.20, 2.27). A favor de esta idea, nosotros observamos una recuperación parcial de la movilidad del AChR tratando a las células con CDx y Latrunculina A (ver Fig. 2.22) y sin cambios significativos en las células tratadas con CDx-colesterol (de acuerdo con Kenworthy et al., 2004; Vrljic et al., 2005; Orr et al., 2005; Sun et al., 2007). El tratamiento con CDx-colesterol disminuye no sólo la interacción del citoesqueleto con la membrana plasmática sino también la viscosidad de la misma (Sun et al., 2007). Por otra parte, la reorganización supramolecular del AChR observada en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 tras la remoción del colesterol (Kellner et al., 2007) podría estar relacionada con la redistribución del PI(4,5)P2, que causaría una redistribución y/o reordenamiento del esqueleto sub-membrana de actina (Pike y Millar, 1998; Yin y Janmey, 2003; Kwik et al., 2003) con la consiguiente reorganización en la distribución del AChR.

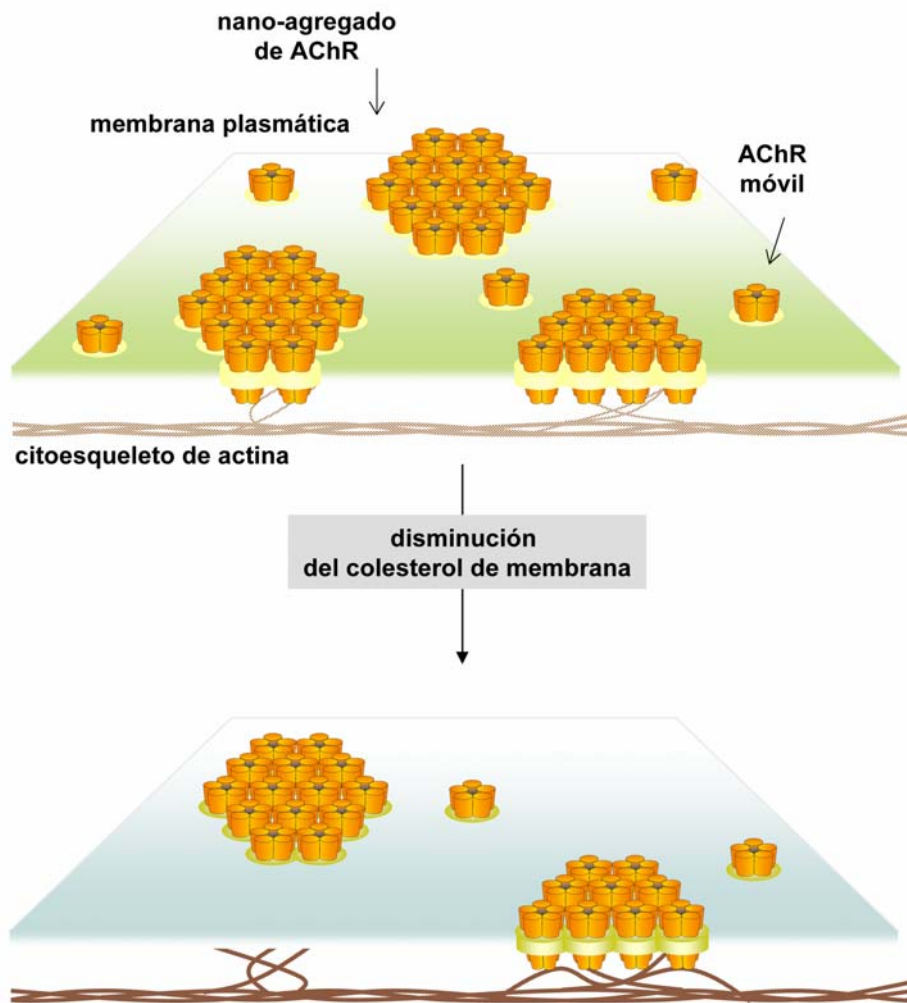


Fig. 2.27. Modelo hipotético del efecto de la depleción del colesterol en la membrana plasmática sobre la distribución y movilidad del AChR. El AChR se distribuye en forma de pequeños agregados (del orden de los nm, “nano-agregados”) en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5. La fracción móvil del AChR correspondería a AChRs que difunden libremente en la membrana, posiblemente intercambiándose entre agregados vecinos. Cada molécula de AChR posee un entorno lipídico característico (anillos amarillos), diferente al resto de la membrana. Los agregados de AChR estarían débilmente relacionados con el esqueleto subcortical de actina. La depleción de colesterol produce cambios generales en la arquitectura de la membrana (ver texto) así como probables alteraciones en el entorno inmediato del AChR (anillos verdes). Estas alteraciones producen: a) una disminución en el número de agregados del AChR; b) una disminución en el número de AChRs libres; c) una menor movilidad lateral de los AChRs en la membrana plasmática; d) una reorganización de los acúmulos de AChR remanentes en la membrana plasmática. Estas alteraciones estarían relacionadas con la redistribución del citoesqueleto cortical y con interacciones lípido-proteína específicas.

En base a experimentos de microscopía electrónica, Lillemeier et al. (2006) propusieron un modelo de “islas o agregados de proteínas”, según el cual, las proteínas se localizan en dominios de membrana “proteínfilicos” (como consecuencia de interacciones proteína–proteína o de su afinidad a ciertos lípidos o dominios lipídicos), las cuales poseen un diámetro de ~30-300 nm, unidos o relacionados con el citoesqueleto. En base a las velocidades de difusión de las proteínas de membrana los autores postulan, que estas uniones entre las proteínas y el citoesqueleto no son demasiado rígidas. Sieber et al. (2007) encontraron que las moléculas de syntaxina en la membrana plasmática se encuentra distribuida en agregados con un diámetro de ~50-60 nm. Hess et al. (2007) hallaron que las moléculas de HA se distribuyen en forma de agregados con un diámetro aproximado de 40 nm. Estos tamaños de agregados de proteína se encuentran en el rango hallado para el AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, ~55 nm (Kellner et al., 2007). En base a estos resultados, podría pensarse que quizás esta distribución de las proteínas en forma de nano-agregados es una característica general de todas las proteínas, como postulan Lillemeier et al. (2006). Sin embargo, al menos para el AChR, la distribución en forma de nano-agregados en la membrana plasmática, si bien no es exclusiva, no se superpone con otras proteínas, como el receptor de transferrina (Fig. 2.7), lo que indica una segregación lateral de estos dominios proteicos.

Según mencionáramos anteriormente, la fracción móvil del AChR correspondería a los AChRs libres que difunden libremente por la membrana, los cuales se intercambian con las moléculas relativamente inmóviles del AChR agregadas en los nano–agregados de ~55 nm de diámetro (Kellner et al., 2007). La depleción de colesterol, afectaría principalmente a los AChRs que difunden libremente (Fig. 2.25), favoreciendo las interacciones AChR–AChR, o con otra proteína incluida en los nano-agregados del AChR, lo cual se traduciría en un incremento de la vida media de los AChR en los nano–agregados (Barrantes, 2007). Recientemente, Sieber et al. (2007) propuso un modelo para la organización en la membrana plasmática de agregados de moléculas de syntaxina. En este modelo, las

interacciones débiles proteína–proteína serían las responsables del mantenimiento de los agregados de syntaxina.

Según observaciones de Vereb et al. (2003), puede imaginarse una unidad básica de dominio lipídico (“raft”) como el de una simple molécula rodeada por un grupo “selecto” de lípidos, los cuales poseen una fuerte interacción con los dominios transmembrana de la misma. Marsh y Barrantes (1978) determinaron que el AChR posee un entorno de lípidos inmovilizados. El sitio de unión del colesterol al AChR se localiza en la interfase lípido–proteína (Corbin et al., 1998; ver revisión Barrantes, 2004, 2007). Alteraciones a nivel de esta interacción, como la que podría producir el tratamiento con CDx, podría producir alteraciones estructurales, funcionales (ver revisión de Barrantes, 2007) o dinámicas en el AChR, como la descrita en este capítulo (Fig. 2.27).

La depleción de colesterol de la membrana de células CHO-K1/A5 produce una severa internalización de los nano–agregados del AChR (Borroni et al., 2007). Los AChR remanentes en la membrana presentan una ganancia de función del canal, lo cual actuaría como un mecanismo compensatorio de la pérdida de canales en la superficie celular. De alguna manera, la depleción de colesterol produciría un cambio conformacional en la proteína, que se refleja en el cambio de sus propiedades funcionales como canal iónico. Aún no se ha dilucidado si estas alteraciones son una consecuencia de la acción directa del colesterol sobre la proteína o si son una consecuencia indirecta relacionada con la partición del AChR en otros dominios de membrana.

De lo expuesto podemos concluir que diferentes propiedades del AChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 están estrechamente relacionadas, directa o indirectamente, con el colesterol presente en la misma, y que las variaciones en los niveles de colesterol son finamente controlados por este receptor. Considerando a nuestro sistema celular como un modelo aneural minimalista, podríamos considerarlo similar al del estadio embrionario temprano, discutido en la introducción de este capítulo. De esta manera, el colesterol sería de suma importancia en la UNM, participando en estadios embrionarios tempranos, durante su biogénesis y durante su posterior mantenimiento y estabilización.

CONCLUSIONES

Como mencionamos y demostramos a lo largo de esta Tesis, el AChR exhibe una estrecha relación con los lípidos de la membrana en todo su trayecto a la membrana plasmática. *Diferentes pasos de la vía secretoria del AChR son modulados diferencialmente por distintas clases de lípidos* (Fig. 7).

Ya desde su biogénesis, en el RE, los niveles de SL son cruciales en un estadio tan temprano como el ensamblaje de las distintas subunidades del AChR para formar el AChR maduro (Baier y Barrantes, 2007; Capítulo I de la presente tesis). Los SL, especialmente la GluCer y la SM, intervendrían en el proceso de ensamblaje del AChR en estadios iniciales de este proceso, i.e. en la formación de los dímeros α - δ y α - ϵ , actuando en conjunto con las proteínas chaperonas (ERp57, BiP y calnexina) para estabilizar las estructuras de las distintas subunidades así como de los intermediarios del AChR, y permitir el ensamblaje inicial entre ellas. Este proceso ocurriría, tal como se elabora en esta Tesis, en dominios lipídicos del RE. Se ha postulado que la partición diferencial de la proteína priónica PrP en DRMs impediría su conversión en la forma patológica de la misma, en la cual reemplaza las estructuras de α hélice por estructuras extendidas tipo β , termodinámicamente más estables (Kallberg et al., 2001; Fantini, 2003, 2007). Esto se debería a que los GSL podrían estabilizar la estructura α hélice, termodinámicamente inestable de la PrP, con un mínimo costo energético (Fantini, 2007).

El colesterol no participaría en el proceso de ensamblaje del AChR, pero es crucial en su tránsito a través de las membranas del Golgi, especialmente a nivel de la red del *trans* Golgi (TGN), como lo demostraron Pediconi et al. (2004). Recientemente se encontró en *Caenorhabditis elegans* que existe en el Golgi un sistema de control que regula el tráfico de AChRs ensamblados (Eimer et al., 2007), en el cual participa la proteína UNC-50. Posiblemente en células de mamífero exista un sistema similar que regule el tráfico post Golgi del AChR y el colesterol podría formar parte del mismo.

En las proteínas PrP y CCK, los SL y el colesterol intervienen o modulan también diferentes aspectos de su biología (Sarnataro et al., 2004; Harikumar et al., 2005).

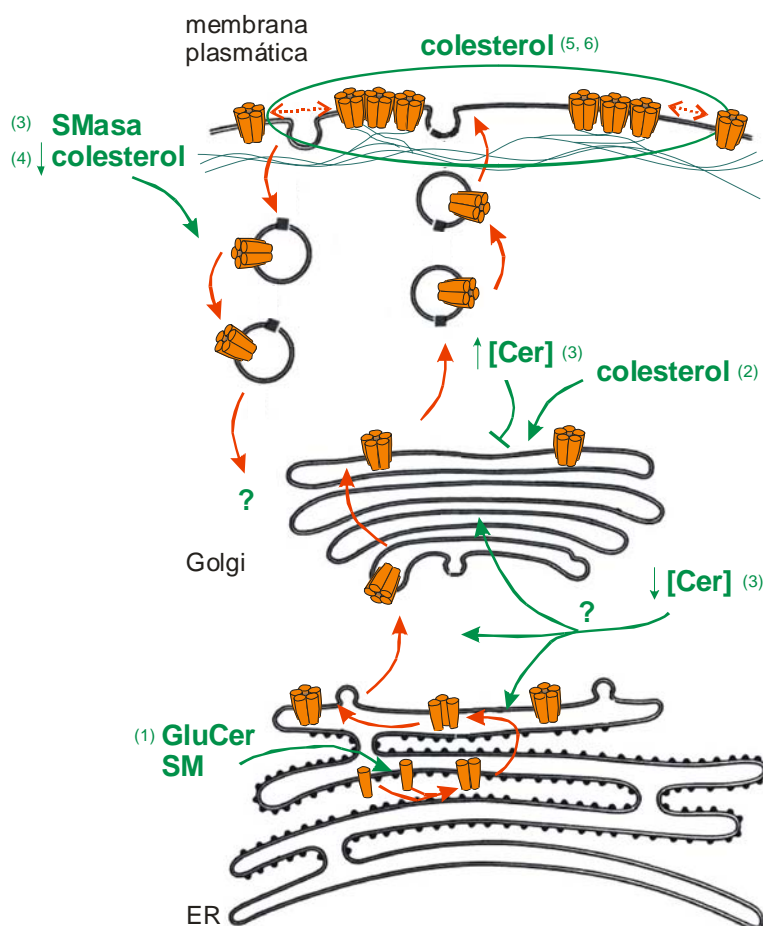


Fig. 7. Modulación lipídica de diferentes aspectos de la biología del AChR. El tráfico del AChR desde el RE hacia la membrana plasmática, así como sus propiedades funcionales, estructurales y de distribución en la misma, son influenciados por la presencia y concentración de distintos lípidos. La influencia de diferentes lípidos en distintos pasos de la vía secretoria del AChR ha sido estudiada en varios trabajos recientes del grupo del Dr. Barrantes: (1) Baier y Barrantes, 2007; (2) Pediconi et al., 2004; (3) Gallegos et al., 2008; (4) Borroni et al., 2007; (5) Kellner et al., 2007; (6) Baier et al., *en preparación*.

Las ceramidas también modulan el tráfico intracelular del AChR, y su efecto depende de la concentración (Gallegos et al., 2008). En efecto, a bajas concentraciones las ceramidas estimulan la vía exocítica del AChR, posiblemente a través de la síntesis de SL, mientras que a altas concentraciones bloquean el tráfico del AChR a nivel del Golgi, posiblemente al alterar la arquitectura de esta organela (Gallegos et al., 2008). La estabilidad y funcionalidad del AChR en la membrana plasmática es afectada por los niveles de colesterol (Borroni et al., 2007) y ceramidas (Gallegos et al., 2008) en la misma. Tanto la

depleción de colesterol en forma aguda (Borroni et al., 2007), como el aumento de ceramidas endógenas por acción de esfingomielinasa (SMasa) (Gallegos et al., 2008), conduce a un aumento en la internalización del AChR. Por otro lado, la movilidad lateral del AChR, así como su distribución topográfica (Capítulo II de la presente Tesis; Kellner et al., 2007, Baier et al., *en preparación*) son afectadas por los niveles de colesterol de la misma. Estas últimas propiedades del AChR en la membrana plasmática estarían ligadas a interacciones con el esqueleto de actina cortical así como a interacciones directas entre el AChR y el colesterol presente en la misma.

De qué manera el AChR sensa estos cambios en el ambiente lipídico de la membrana en la cual se encuentra inserto? La interacción del AChR con especies lipídicas se produce a nivel de interacciones lípido-proteína en la interfase proteína-membrana (ver revisiones Barrantes, 1992, 1993, 2002, 2003, 2004; 2007), y dicha interacción se produce a nivel de los anillos medios, formado por los 10 segmentos transmembrana M1 y M3, y por el anillo más externo, conformado por los 5 segmentos M4 (Barrantes, 2003). Un sitio potencial de reconocimiento e interacción del AChR con el colesterol fue postulado en el Capítulo II. Este dominio, denominado CRAC (ver revisión de Epanand, 2006), se encuentra en todas las subunidades del AChR en el dominio transmembrana M1, en el extremo amino terminal del mismo, salvo en la subunidad γ , en el cual se encuentra en el dominio carboxilo terminal. Esta diferencia entre las subunidades γ y ϵ podrían contribuir a las diferencias funcionales que exhiben el AChR embrionario y maduro, respectivamente (Mishina et al., 1986), teniendo en cuenta que el colesterol influye notablemente en la funcionalidad del AChR (ver revisiones Barrantes 2003, 2004, 2007). Fantini (2003) postuló la existencia de dominios de unión a SL (SBD, por *sphingolipid binding domain*, ver Capítulo I), los cuales mediarían la interacción entre los SL y los segmentos de las proteínas en contacto con ellos. En estos dominios es importante la presencia de aminoácidos con residuos aromáticos, los cuales se unirían por superposición a los anillos de azúcar de los

GSL, y también aminoácidos con carga positiva, los cuales estabilizarían el complejo de unión mediante interacciones electroestáticas con los grupos fosfatos de la SM cargados negativamente (Fantini, 2003, 2007). Estudios estructurales mediante simulación de estructuras y análisis de interacción entre los lípidos de interés y segmentos potenciales de interacción del AChR así como estudios de funcionalidad de dominios, mediante mutaciones de aminoácidos presentes en estos segmentos, son necesarios para confirmar estas hipótesis, y ayudar a comprender qué mecanismos moleculares están involucrados en la interacción y modulación lípido-proteína del AChR.

REFERENCIAS

- Adkins E.M., Samuvel D.J., Fog J.U., Eriksen J., Jayanthi L.D., Vaegter C.B., Ramamoorthy S. and Gether U. (2007) Membrane mobility and microdomain association of the dopamine transporter studied with fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **46**, 10484-10497.
- Ahmed S.N., Brown D.A. and London E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* **36**, 10944-10953.
- Aït Slimane T. and Hoekstra D. (2002) Sphingolipid trafficking and protein sorting in epithelial cells. *FEBS Lett.* **529**, 54-59.
- Akashi K., Miyata H., Itoh H. and Kinoshita K. Jr. (1996) Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys J.* **71**, 3242-3250.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. New York and London: Garland Science.
- Alvarez C., Garcia-Mata R., Brandon E. and Sztul E. (2003) COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* **14**, 2116-2127.
- Andreasen T.J. and McNamee M.G. (1980) Inhibition of ion permeability control properties of acetylcholine receptor from *Torpedo californica* by long-chain fatty acids. *Biochemistry* **19**, 4719-4726.
- Antollini S.S., Soto M.A., Bonini de Romanelli I., Gutiérrez-Merino C., Sotomayor P. and Barrantes F.J. (1996) Physical state of bulk and protein-associated lipid in nicotinic acetylcholine receptor-rich membrane studied by laurdan generalized polarization and fluorescence energy transfer. *Biophys J.* **70**, 1275-1284.

- Antollini S.S. and Barrantes F.J. (1998) Disclosure of discrete sites for phospholipid and sterols at the protein-lipid interface in native acetylcholine receptor-rich membrane. *Biochemistry* **37**, 16653-16662.
- Apel E.D., Lewis R.M., Grady R.M. and Sanes J.R. (2000) Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem.* **275**, 31986-31995.
- Arvidson G.A. (1968) Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. *Eur J Biochem.* **4**, 478-86.
- Aubert-Jousset E., Garmy N., Sbarra V., Fantini J., Sadoulet M.O. and Lombardo D. (2004) The combinatorial extension method reveals a sphingolipid binding domain on pancreatic bile salt-dependent lipase: role in secretion. *Structure* **12**, 1437-1447.
- Avery J., Ellis D.J., Lang T., Holroyd P., Riedel D., Henderson R.M., Edwardson J.M. and Jahn R. (2000) A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells. *J Cell Biol.* **148**, 317-324.
- Axelrod D., Koppel D.E., Schlessinger J., Elson E. and Webb W.W. (1976a) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J.* **16**, 1055-1069.
- Axelrod D., Ravdin P., Koppel D.E., Schlessinger J., Webb W.W. Elson E. and Podleski T.R. (1976b) Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4594-4598.
- Bacia K., Scherfeld D., Kahya N. and Schwille P. (2004) Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophys J.* **87**, 1034-43.
- Baier C.J. and Barrantes F.J. (2007) Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J Neurochem.* **101**, 1072-1084.

- Baier C.J, Gallegos C.E, Levi V. and Barrantes F.J. (2008) Cholesterol modulates nicotinic acetylcholine receptors mobility at the plasma membrane. Confocal FRAP and FCS study. (*en preparación*).
- Barrantes F.J. (1982) Oligomeric forms of the membrane-bound acetylcholine receptor disclosed upon extraction of the Mr 43,000 nonreceptor peptide. *J Cell Biol.* **92**, 60-68.
- Barrantes F.J. (1983) Recent developments in the structure and function of the acetylcholine receptor. *Int Rev Neurobiol.* **24**, 259-341.
- Barrantes F.J. (1989) The lipid environment of the nicotinic acetylcholine receptor in native and reconstituted membranes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**, 437– 478.
- Barrantes F.J. (1992) Structural and functional crosstalk between acetylcholine receptor and its membrane environment. *Mol Neurobiol.* **6**, 463-482.
- Barrantes F.J. (1993) Structural-functional correlates of the nicotinic acetylcholine receptor and its lipid microenvironment. *FASEB J.* **7**, 1460-1467.
- Barrantes F.J. (2002) Lipid matters: nicotinic acetylcholine receptor-lipid interactions *Mol Membr Biol.* **19**, 277-284.
- Barrantes F.J. (2003) Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **6**, 620-632.
- Barrantes F.J. (2004) Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res. Reviews* **47**, 71-95.
- Barrantes F.J. (2007) Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurochem.* **103** Suppl 1, 72-80.

- Barrantes F.J., Antollini S.S., Blanton M.P. and Prieto M. (2000) Topography of nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *J Biol Chem.* **275**, 37333-37339.
- Barz W.P. and Walter P. (1999) Two endoplasmic reticulum (ER) membrane proteins that facilitate ER-to-Golgi transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Biol Cell.* **10**, 1043-1059.
- Baumgart T., Hess S.T. and Webb W.W. (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* **425**, 821-824.
- Baumgart T., Hammond A.T., Sengupta P., Hess S.T., Holowka D.A., Baird B.A. and Webb W.W. (2007) Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 3165-3170.
- Bejaoui K., Wu C., Scheffler M.D., Haan G., Ashby P., Wu L., de Jong P. and Brown R.H. Jr. (2001) SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1. *Nat Genet.* **27**, 261-262.
- Bejaoui K., Uchida Y., Yasuda S., Ho M., Nishijima M., Brown R.H. Jr., Holleran W.M. and Hanada K. (2002) Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. *J Clin Invest.* **110**, 1301-1308.
- Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L. Biochemistry (2002) New York: W. H. Freeman and Co.
- Beroukhim R. and Unwin N. (1995) Three-dimensional location of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *Neuron* **15**, 323-331.
- Bezakova G. and Ruegg M.A. (2003) New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 295-308.

- Bhushan A. and McNamee M.G. (1993) Correlation of phospholipid structure with functional effects on the nicotinic acetylcholine receptor. A modulatory role for phosphatidic acid. *Biophys J.* **64**, 716-723.
- Bloch R.J. (1986) Loss of acetylcholine receptor clusters induced by treatment of cultured rat myotubes with carbachol. *J Neurosci.* **6**, 691-700.
- Bloch R.J., Velez M., Krikorian J.G. and Axelrod D. (1989) Microfilaments and actin-associated proteins at sites of membrane-substrate attachment within acetylcholine receptor clusters. *Exp Cell Res.* **182**, 583-596.
- Blount P. and Merlie J. P. (1988) Native folding of an acetylcholine receptor alpha subunit expressed in the absence of other receptor subunits. *J. Biol. Chem.* **263**, 1072-1080.
- Blount P., Smith M. M. and Merlie J. P. (1990) Assembly intermediates of the mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor in stably transfected fibroblasts. *J. Cell Biol.* **111**, 2601-2611.
- Bogdanov M., Sun J., Kaback H. R. and Dowhan W. (1996) A phospholipid acts as a chaperone in assembly of a membrane transport protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 11615-11618.
- Bogdanov M. and Dowhan W. (1999) Lipid-assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* **274**, 36827-36830.
- Bonini I. C., Antollini S. S., Gutiérrez-Merino C. and Barrantes F. J. (2002) Sphingomyelin composition and physical asymmetries in native acetylcholine receptor-rich membranes. *Eur. Biophys. J.* **31**, 417-427.
- Boot R.G., Verhoek M., Donker-Koopman W., Strijland A., van Marle J., Overkleeft H.S., Wennekes T. and Aerts J.M. (2007) Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2. *J Biol Chem.* **282**, 1305-1312.

- Borroni V., Baier C. J., Lang T., Bonini I., White M. M., Garbus I. G. and Barrantes F.J. (2007) Cholesterol depletion activates rapid internalization of diffraction-limited acetylcholine receptor domains at the cell membrane. *Mol Membr Biol.* **24**, 1 – 15.
- Botto L., Masserini M., Cassetti A. and Palestini P. (2004) Immunoseparation of Prion protein-enriched domains from other detergent-resistant membrane fractions, isolated from neuronal cells. *FEBS Lett.* **557**, 143-147.
- Brejč K., van Dijk W.J., Klaassen R.V., Schuurmans M., van Der Oost J., Smit A.B. and Sixma T.K. (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269-276.
- Bretscher M.S. and Munro S. (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* **261**, 1280-1281.
- Browman D.T., Resek M.E., Zajchowski L.D. and Robbins S.M. (2006) Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *J Cell Sci.* **119**, 3149-31460.
- Brown D. A. and Rose J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.
- Brown D.A and London E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* **275**, 17221-17224.
- Brown E. L. and Lyles D. S. (2005) Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with CD4 formed by clustering of membrane microdomains during budding. *J Virol.* **79**, 7077-7086.
- Brown R.E. and Mattjus P. (2007) Glycolipid transfer proteins. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 746-760.

- Brügger B., Sandhoff R., Wegehingel S., Gorgas K., Malsam J., Helms J.B., Lehmann W.D., Nickel W. and Wieland F.T. (2000) Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *J Cell Biol.* **151**,507-518.
- Brügger B., Graham C., Leibrecht I., Mombelli E., Jen A., Wieland F. and Morris R. (2004) The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition. *J Biol Chem.* **279**, 7530-7536.
- Bruses J. L., Chauvet N. and Rutishauser U. (2001) Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J. Neurosci.* **21**, 504-512.
- Campagna J. A. and Fallon J. (2006) Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* **138**, 123-132.
- Campana V., Sarnataro D., Fasano C., Casanova P., Paladino S. and Zurzolo C. (2006) Detergent-resistant membrane domains but not the proteasome are involved in the misfolding of a PrP mutant retained in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* **119**, 433-442.
- Chang W., Gelman M. S. and Prives J. M. (1997) Calnexin-dependent enhancement of nicotinic acetylcholine receptor assembly and surface expression. *J. Biol. Chem.* **272**, 28925-28932.
- Charalambous C., Gsandtner I., Keuerleber S., Milan-Lobo L., Kudlacek O., Freissmuth M. and Zezula J. (2008) Restricted collision coupling of the A2A-receptor revisited: Evidence for physical separation of two signaling cascades. *J Biol Chem.* **283**, 9276-9288.
- Chavez R.A., Maloof J., Beeson D., Newsom-Davis J. and Hall Z.W. (1992) Subunit folding and alpha delta heterodimer formation in the assembly of the nicotinic acetylcholine

- receptor. Comparison of the mouse and human alpha subunits. *J Biol Chem.* **267**, 23028-23034.
- Chen Y., Lagerholm B.C., Yang B. and Jacobson K. (2006a) Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* **39**, 147–153
- Chen Y., Thelin W.R., Yang B., Milgram S.L. and Jacobson K. (2006b) Transient anchorage of cross-linked glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins depends on cholesterol, Src family kinases, caveolin, and phosphoinositides. *J Cell Biol.* **175**, 169-178.
- Chigorno V., Giannotta C., Ottico E., Sciannamblo M., Mikulak J., Prinetti A. and Sonnino S. (2005) Sphingolipid uptake by cultured cells: complex aggregates of cell sphingolipids with serum proteins and lipoproteins are rapidly catabolized. *J. Biol. Chem.* **280**, 2668-2675.
- Christian A.E., Haynes M.P., Phillips M.C. and Rothblat G.H. (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* **38**, 2264-2272.
- Christianson J.C. and Green W.N. (2004) Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *EMBO J.* **23**, 4156-4165.
- Conti-Fine B.M., Milani M. and Kaminski H.J. (2006) Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest.* **116**, 2843-2854.
- Corbett-Nelson E.F., Mason D., Marshall J.G., Collette Y. and Grinstein S. (2006) Signaling-dependent immobilization of acylated proteins in the inner monolayer of the plasma membrane. *J Cell Biol.* **174**, 255-265.
- Corbin J., Wang H.H. and Blanton M.P. (1998) Identifying the cholesterol binding domain in the nicotinic acetylcholine receptor with [¹²⁵I]azido-cholesterol. *Biochim Biophys Acta* **1414**, 65-74.

- Coué M., Brenner S.L., Spector I. and Korn E.D. (1987) Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* **213**, 316-318.
- Criado M., Eibl H. and Barrantes F.J. (1982a) Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. *Biochemistry* **21**, 3622-3629.
- Criado M., Vaz W.L., Barrantes F.J. and Jovin T.M. (1982b) Translational diffusion of acetylcholine receptor (monomeric and dimeric forms) of *Torpedo marmorata* reconstituted into phospholipid bilayers studied by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **21**, 5750-5755.
- Criado M., Eibl H. and Barrantes F.J. (1984) Functional properties of the acetylcholine receptor incorporated in model lipid membranes. Differential effects of chain length and head group of phospholipids on receptor affinity states and receptor-mediated ion translocation. *J Biol Chem.* **259**, 9188-9198.
- Dai Z., Luo X., Xie H. and Peng H.B. (2000) The Actin-Driven Movement and Formation of Acetylcholine Receptor Clusters. *J. Cell Biol.* **150**, 1321–1334.
- D'Angelo G., Polishchuk E., Di Tullio G., Santoro M., Di Campli A., Godi A., West G., Bielawski J., Chuang C.C., van der Spoel A.C., Platt F.M., Hannun Y.A., Polishchuk R., Mattjus P. and De Matteis M.A. (2007) Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* **449**, 62-67.
- Dawkins J.L., Hulme D.J., Brahmabhatt S.B., Auer-Grumbach M. and Nicholson G.A. (2001) Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat Genet.* **27**, 309-312.

- de Almeida R.F., Loura L.M., Prieto M., Watts A., Fedorov A. and Barrantes F.J. (2004) Cholesterol modulates the organization of the gammaM4 transmembrane domain of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J.* **86**, 2261-2272.
- de Almeida R.F., Loura L.M., Prieto M., Watts A., Fedorov A. and Barrantes F.J. (2006) Structure and dynamics of the gammaM4 transmembrane domain of the acetylcholine receptor in lipid bilayers: insights into receptor assembly and function. *Mol Membr Biol.* **23**, 305-315.
- de Vries H., Schrage C. and Hoekstra D. (1998) An apical-type trafficking pathway is present in cultured oligodendrocytes but the sphingolipid-enriched myelin membrane is the target of a basolateral-type pathway. *Mol Biol Cell* **9**, 599-609.
- Dennis M., Giraudat J., Kotzyba-Hibert F., Goeldner M., Hirth C., Chang J.Y., Lazure C., Chrétien M. and Changeux J.P. (1988) Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochemistry* **27**, 2346-2357.
- Devaux P.F. and Morris R. (2004) Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* **5**, 241-246
- Dietrich C., Bagatolli L.A., Volovyk Z.N., Thompson N.L., Levi M., Jacobson K. and Gratton E. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J.* **80**, 1417-1428.
- Diwu Z., Lu Y., Zhang C., Klaubert D. H. and Haugland R. P. (1997) Fluorescent Molecular Probes II. The Synthesis, Spectral Properties and Use of Fluorescent Solvatochromic Dapoxyl Dyes. *Photochem Photobiol* **66**, 424-431.
- Doeven M.K., Folgering J.H., Krasnikov V., Geertsma E.R., van den Bogaart G. and Poolman B. (2005) Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys J.* **88**, 1134-1142.

- Dyck P.J. (1993) Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neuron. In *Peripheral neuropathies*. P.J. Dyck, P.K. Thomas, J.W. Griffin, P.A. Low, and J.F. Poduslo, editors. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1065–1093.
- Edidin M. (1994) Fluorescence photobleaching and recovery, FPR, in the analysis of membrane structure and dynamics. In: *Mobility and Proximity in Biological Membranes*, edited by S. Damjanovich, M. Edidin, J. Szollosi and L. Tron. Boca Raton: CRC Press, 109-135.
- Edidin M. (2003a) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414–418.
- Edidin M. (2003b) The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257-283.
- Eidelman O., BarNoy S., Razin M., Zhang J., McPhie P., Lee G., Huang Z., Sorscher E. J. and Pollard H. B. (2002) Role for phospholipid interactions in the trafficking defect of Delta F508-CFTR. *Biochemistry* **41**, 11161-11170.
- Eimer S., Gottschalk A., Hengartner M., Horvitz H.R., Richmond J., Schafer W.R. and Bessereau J.L. (2007) Regulation of nicotinic receptor trafficking by the transmembrane Golgi protein UNC-50. *EMBO J.* **226**, 4313-4323.
- Ellena J.F., Blazing M.A. and McNamee M.G. (1983) Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor. *Biochemistry* **22**, 5523-5535.
- Ellenberg J., Siggia E.D., Moreira J.E., Smith C.L., Presley J.F., Worman H.J. and Lippincott-Schwartz J. (1997) Nuclear membrane dynamics and reassembly in living

- cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol.* **138**, 1193-1206.
- Epand R.M. (2006) Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Prog Lipid Res.* **45**, 279-294.
- Escher P., Lacazette E., Courtet M., Blindenbacher A., Landmann L., Bezakova G., Lloyd K.C., Mueller U. and Brenner H.R. (2005) Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors. *Science* **308**, 1920-1923.
- Ewers H., Smith A.E., Sbalzarini I.F., Lilie H., Koumoutsakos P. and Helenius A. (2005) Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 15110-15115.
- Fantini J. (2003) How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1027-1032.
- Fantini J. (2007) Interaction of proteins with lipid rafts through glycolipid-binding domains: biochemical background and potential therapeutic applications. *Curr Med Chem.* **14**, 2911-2917.
- Fantini J., Garmy N., Mahfoud R. and Yahy N. (2002) Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert. Rev. Mol. Med.* **2**, 1-22.
- Fantini J., Garmy N. and Yahy N. (2006) Prediction of glycolipid-binding domains from the amino acid sequence of lipid raft-associated proteins: application to HpaA, a protein involved in the adhesion of *Helicobacter pylori* to gastrointestinal cells. *Biochemistry* **45**, 10957-10962.
- Fernández-Carvajal A.M., Encinar J.A., Poveda J.A., de Juan E., Martínez-Pinna J., Ivorra I., Ferragut J.A., Morales A. and González-Ros J.M. (2006) Structural and functional

- changes induced in the nicotinic acetylcholine receptor by membrane phospholipids. *J Mol Neurosci.* **30**, 121-124.
- Flanagan-Steet H., Fox M.A., Meyer D. and Sanes J.R. (2005) Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development* **132**, 4471-4481.
- Folch J., Lees M. and Sloane Stanley G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* **226**, 497-509.
- Fong T.M. and McNamee M.G. (1986) Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry* **25**, 830-840.
- Fong T. M. and McNamee M.G. (1987) Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry* **26**, 3871-3880.
- Fra A.M., Williamson E., Simons K. and Parton R.G. (1994) Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem.* **269**, 30745-30748.
- Froehner S.C., Luetje C.W., Scotland P.B. and Patrick J. (1990) The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* **5**, 403-410.
- Fukasawa M., Nishijima M. and Hanada K. (1999) Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* **144**, 673-685.
- Funato K., Riezman H. (2001) Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol.* **155**, 949-959.

- Furuya S., Mitoma J., Makino A. and Hirabayashi Y. (1998) Ceramide and its interconvertible metabolite sphingosine function as indispensable lipid factors involved in survival and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J. Neurochem.* **71**, 366-377.
- Futerman A. H. and Hannun Y. A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO J.* **5**, 777-782.
- Gallegos C.E., Pediconi M.F. and Barrantes FJ. (2008) Ceramides modulate cell-surface acetylcholine receptor levels. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 917-930.
- Gambin Y., Lopez-Esparza R., Reffay M., Sieracki E., Gov N.S., Genest M., Hodges R.S and Urbach W. (2006) Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 2098-2102.
- Gelman M.S., Chang W., Thomas D.Y., Bergeron J.J. and Prives J.M. (1995) Role of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin in subunit folding and assembly of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* **270**, 15085-15092.
- Gervásio O.L. and Phillips W.D. (2005) Increased ratio of rapsyn to ACh receptor stabilizes postsynaptic receptors at the mouse neuromuscular synapse. *J Physiol.* **562**, 673-685.
- Glick B.S., Elston T. and Oster G. (1997) A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack. *FEBS Lett.* **414**, 177-181.
- Grady R.M., Starr D.A., Ackerman G.L., Sanes J.R. and Han M. (2005) Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 4359-4364.
- Gri G., Molon B., Manes S., Pozzan T. and Viola A. (2004) The inner side of T cell lipid rafts. *Immunol Lett.* **94**, 247-252.

- Grimm M. O., Grimm H. S., Patzold A. J., Zinser E. G., Halonen R., Duering M., Tschape J. A., De Strooper B., Muller U., Shen J. and Hartmann T. (2005) Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1118–1123.
- Gu Y. and Hall Z.W. (1988) Immunological evidence for a change in subunits of the acetylcholine receptor in developing and denervated rat muscle. *Neuron* **1**, 117-125.
- Gu Y., Forsayeth J. R., Verrall S., Yu X. M. and Hall Z. W. (1991) Assembly of the mammalian muscle acetylcholine receptor in transfected COS cells. *J. Cell Biol.* **114**, 799-807.
- Guigas G. and Weiss M. (2006) Size-dependent diffusion of membrane inclusions. *Biophys J.* **91**, 2393-2398.
- Guillas I., Kirchman P.A., Chuard R., Pfefferli M., Jiang J.C., Jazwinski S.M. and Conzelmann A. (2001) C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J.* **20**, 2655-2665.
- Halter D., Neumann S., van Dijk S.M., Wolthoorn J., de Mazière A.M., Vieira O.V., Mattjus P., Klumperman J., van Meer G. and Sprong H. (2007) Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *J Cell Biol.* **179**, 101-115.
- Han H., Yang S.H. and Phillips W.D. (2000) Overexpression of rapsyn modifies the intracellular trafficking of acetylcholine receptors. *J Neurosci Res.* **60**, 155-163.
- Hanada K. (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1632**, 16-30.

- Hanada K., Nishijima M. and Akamatsu Y. (1990) A temperature-sensitive mammalian cell mutant with thermolabile serine palmitoyltransferase for the sphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem.* **265**, 22137-22142.
- Hanada K., Nishijima M., Kiso M., Hasegawa A., Fujita S., Ogawa T. and Akamatsu Y. (1992) Sphingolipids are essential for the growth of Chinese hamster ovary cells. Restoration of the growth of a mutant defective in sphingoid base biosynthesis by exogenous sphingolipids. *J. Biol. Chem.* **267**, 23527-23533.
- Hanada K., Hara T., Fukasawa M., Yamaji A., Umeda M. and Nishijima M. (1998) Mammalian cell mutants resistant to a sphingomyelin-directed cytolysin. Genetic and biochemical evidence for complex formation of the LCB1 protein with the LCB2 protein for serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem.* **273**, 33787-33794.
- Hanada K., Hara T. and Nishijima M. (2000a) Purification of the serine palmitoyltransferase complex responsible for sphingoid base synthesis by using affinity peptide chromatography techniques. *J Biol Chem.* **275**, 8409-8415.
- Hanada K., Nishijima M., Fujita T. and Kobayashi S. (2000b) Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipid biosynthesis, in intact cells. A novel evaluation system using an SPT-defective mammalian cell mutant. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 1211-1216.
- Hanada K., Kumagai K., Yasuda S., Miura Y., Kawano M., Fukasawa M. and Nishijima M. (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803-809.
- Hanada K., Kumagai K., Tomishige N. and Kawano M. (2007) CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 644-653.

- Hao M., Mukherjee S. and Maxfield F. R. (2001) Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13072-13077.
- Harikumar K.G., Puri V., Singh R.D., Hanada K., Pagano R.E. and Miller L.J. (2005) Differential effects of modification of membrane cholesterol and sphingolipids on the conformation, function, and trafficking of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *J Biol Chem.* **280**, 2176-85.
- Hartmann T., Kuchenbecker J. and Grimm M.O.W. (2007) Alzheimer's disease: the lipid connection. *J. Neurochem.* **103**, Suppl. 1, 159–170.
- Hayashi T. and Su T.P. (2003) Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J Pharmacol Exp Ther.* **306**, 718-725.
- Hayashi T. and Su T.P. (2004) Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 14949-14954.
- Head B.P., Patel H.H., Roth D.M., Murray F., Swaney J.S., Niesman I.R., Farquhar M.G. and Insel P.A. (2006) Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem.* **281**, 26391-26399.
- Hegde R.S., Voigt S., Rapoport T.A. and Lingappa V.R. (1998) TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* **92**, 621-631.

- Heinrich S.U., Mothes W., Brunner J., Rapoport T.A. (2000) The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* **102**, 233-244.
- Heintzmann R. and Ficz G. (2007) Breaking the resolution limit in light microscopy. *Methods Cell Biol.* **81**, 561-580.
- Hell S.W. (1997) Increasing the resolution of far-field fluorescence light microscopy by point-spread-function engineering. In: Topics in Fluorescence Spectroscopy (Lakowicz JR, ed) New York: Plenum Press 361-422.
- Hell S.W. (2003) Toward fluorescence nanoscopy. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1347-1355.
- Hell S.W. (2004) Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit. *Phys. Lett A* **326**, 140-145.
- Hell SW. (2007) Far-field optical nanoscopy. *Science* **316**, 1153-1158.
- Hell S.W. and Wichmann J. (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780-782.
- Hendrich A.B., Michalak K. and Wesolowska O. (2007) Phase separation is induced by phenothiazine derivatives in phospholipid/sphingomyelin/cholesterol mixtures containing low levels of cholesterol and sphingomyelin. *Biophys Chem.* **130**, 32-40.
- Hering H., Lin C.C. and Sheng M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci.* **23**, 3262-3271.
- Hermansson M., Käkelä R., Berghäll M., Lehesjoki A.E., Somerharju P. and Lahtinen U. (2005) Mass spectrometric analysis reveals changes in phospholipid, neutral sphingolipid and sulfatide molecular species in progressive epilepsy with mental retardation, EPMP, brain: a case study. *J Neurochem.* **95**, 609-617.

- Hess S.T., Gould T.J., Gudheti M.V., Maas S.A., Mills K.D. and Zimmerberg J. (2007) Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17370-17375.
- Heuser J. (2000) The production of 'cell cortices' for light and electron microscopy. *Traffic* **1**, 545-552.
- Hoch W. (1999) Formation of the neuromuscular junction. Agrin and its unusual receptors. *Eur. J. Biochem.* **265**, 1-10.
- Holthuis J. C., Pomorski T., Raggars R. J., Sprong H. and Van Meer G. (2001) The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol. Rev.* **81**, 1689-1723.
- Holthuis J.C., Levine T.P. (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 209-220.
- Huganir R.L. and Greengard P (1990) Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* **5**, 555-567.
- Ikonen E. and Simons K. (1998) Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol.* **9**, 503-509.
- Ishitsuka R, Sato S.B. and Kobayashi T. (2005) Imaging lipid rafts. *J Biochem (Tokyo)* **137**, 249-254.
- Jaiswal J.K. and Simon S.M. (2007) Imaging single events at the cell membrane. *Nat Chem Biol.* **3**, 92-98.

- Jeckel D., Karrenbauer A., Burger K.N., van Meer G. and Wieland F. (1992) Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol.* **117**, 259-267.
- Johnson M.E., Berk D.A., Blankschtein D., Golan D.E., Jain R.K. and Langer R.S. (1996) Lateral diffusion of small compounds in human stratum corneum and model lipid bilayer systems. *Biophys J.* **71**, 2656-2668.
- Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M. and Tzartos S.J. (2007) Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J.* **274**, 3799-3845.
- Kallberg Y., Gustafsson M., Persson B., Thyberg J. and Johansson J. (2001) Prediction of amyloid fibril-forming proteins. *J Biol Chem.* **276**, 12945-1250.
- Kao P.N. and Karlin A. (1986) Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem.* **261**, 8085-8088.
- Karlin A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci.* **3**, 102-114.
- Keller P., Toomre D., Diaz E., White J. and Simons K. (2001b) Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol.* **3**, 140-149.
- Keller S. H., Lindstrom J. and Taylor P. (1996) Involvement of the chaperone protein calnexin and the acetylcholine receptor beta-subunit in the assembly and cell surface expression of the receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 22871-22877.
- Keller S. H., Lindstrom J., Ellisman M. and Taylor P. (2001a) Adjacent basic amino acid residues recognized by the COP I complex and ubiquitination govern endoplasmic reticulum to cell surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor alpha-Subunit. *J. Biol. Chem.* **276**, 18384-18391.

- Kellner R.R., Baier C.J., Willig K.I., Hell S.W. and Barrantes F.J. (2007) Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy. *Neuroscience* **144**, 135-143.
- Kenworthy A. K., Nichols B. J., Remmert C. L., Hendrix G. M., Kumar M., Zimmerberg J. and Lippincott-Schwartz J. (2004) Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol.* **165**, 735-746.
- Klar T.A., Jakobs S., Dyba M., Egner A. and Hell S.W. (2000) Fluorescence microscopy with diffraction resolution limit broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8206-8210.
- Kracun I., Kalanj S., Cosovic C. and Talan-Hranilovic J. (1990) Brain gangliosides in Alzheimer's disease. *J. Hirnforsch* **31**, 789-793.
- Kreienkamp H. J., Maeda R. K., Sine S. M. and Taylor P. (1995) Intersubunit contacts governing assembly of the mammalian nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **14**, 635-644.
- Kucik D.F., Elson E.L. and Sheetz M.P. (1999) Weak dependence of mobility of membrane protein aggregates on aggregate size supports a viscous model of retardation of diffusion. *Biophys J.* **76**, 314-322.
- Kudo N., Kumagai K., Tomishige N., Yamaji T., Wakatsuki S., Nishijima M., Hanada K. and Kato R. (2008) Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 488-493.
- Kummer T. T., Misgeld T., Lichtman J. W. and Sanes J. R. (2004) Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus. *J. Cell Biol.* **164**, 1077-1087.

- Kummer T.T., Misgeld T. and Sanes J.R. (2006) Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Current Opinion in Neurobiology* **16**, 74-82.
- Kwik J., Boyle S., Fooksman D., Margolis L., Sheetz M.P. and Edidin M. (2003) Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 13964-13969.
- Ladha S., Mackie A.R. and Clark D.C. (1994) Cheek cell membrane fluidity measured by fluorescence recovery after photobleaching and steady-state fluorescence anisotropy. *J Membr Biol.* **142**, 223-228.
- Lambert S., Vind-Kezunovic D., Karvinen S. and Gniadecki R. (2006) Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol.* **126**, 954-962.
- Lang T. (2003) Imaging SNAREs at work in 'unroofed' cells –approaches that may be of general interest for functional studies on membrane proteins. *Biochemical Society Transactions* **31**, 861-864.
- Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C. and Jahn R. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* **20**, 2202-2213.
- Ledesma M. D., Simons K. and Dotti C. G. (1998) Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 3966-3971.
- Lee M. C., Hamamoto S. and Schekman R. (2002) Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H⁺-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **277**, 22395-22401.

- Leibel W.S., Firestone L.L., Legler D.C., Braswell L.M. and Miller K. W. (1987) Two pools of cholesterol in acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo. *Biochim Biophys Acta* **897**, 249-260.
- Lenne P.F., Wawrezynieck L., Conchonaud F., Wurtz O., Boned A., Guo X.J., Rigneault H., He H.T. and Marguet D. (2006) Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *The EMBO Journal* **25**, 3245–3256.
- Levine T.P. (2007) A lipid transfer protein that transfers lipid. *J Cell Biol.* **179**, 11-13.
- Li C., Duan W., Yang F. and Zhang X. (2006) Caveolin-3-anchored microdomains at the rabbit sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* **344**, 1135-1140.
- Lillemeier B.F., Pfeiffer J.R., Surviladze Z., Wilson B.S. and Davis M.M. (2006) Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18992-18997.
- Lin W., Burgess R.W., Dominguez B., Pfaff S.L., Sanes J.R. and Lee K.F. (2001) Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* **410**, 1057-1064.
- Lin W., Dominguez B., Yang J., Aryal P., Brandon E.P., Gage F.H. and Lee K.F. (2005) Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron* **46**, 569-579.
- Lindstrom J. (1997) Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol.* **15**, 193-222.

- Lindstrom J.M. (2003) Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N Y Acad Sci.* **998**, 41-52.
- Lippincott-Schwartz J., Altan-Bonnet N. and Patterson G.H. (2003) Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biol.* **5**, S7–S14.
- Lipsky N. G. and Pagano R. E. (1983) Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2608-2612.
- Liu A.P. and Fletcher D.A. (2006) Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophys J.* **91**, 4064-4070.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J.E. Molecular Cell Biology (1999) New York: W. H. Freeman & Co.
- London E. and Brown D.A. (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* **1508**, 182-195.
- Lonka L., Kyttälä A., Ranta S., Jalanko A. and Lehesjoki A.E. (2000) The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet.* **9**, 1691-1697.
- Lonka L., Salonen T., Siintola E., Kopra O., Lehesjoki A.E. and Jalanko A. (2004) Localization of wild-type and mutant neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 proteins in non-neuronal and neuronal cells. *J Neurosci Res.* **76**, 862-71.
- Loura L.M., Fedorov A. and Prieto M. (2001) Exclusion of a cholesterol analog from the cholesterol-rich phase in model membranes. *Biochim Biophys Acta* **1511**, 236-243.

- Lundbaek J.A., Andersen O.S., Werge T. and Nielsen C. (2003) Cholesterol-induced protein sorting: an analysis of energetic feasibility. *Biophys J.* **84**, 2080-2089.
- Maceyka M. and Machamer C. E. (1997) Ceramide accumulation uncovers a cycling pathway for the cis-Golgi network marker, infectious bronchitis virus M protein. *J Cell Biol.* **139**, 1411-1418.
- Mahfoud R., Garmy N., Maresca M., Yahi N., Puigserver A. and Fantini J. (2002) Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 11292-11296.
- Mandon E.C., Ehses I., Rother J., van Echten G. and Sandhoff K. (1992) Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem.* **267**, 11144-11148.
- Mantipragada S. B. L., Horváth I., Arias H. R., Schwarzmann G., Sandhoff K., Barrantes F. J. and Marsh D. (2003) Lipid-protein interactions and the effect of local anaesthetics in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry* **42**, 9167-9175.
- Marchand S., Devillers-Thiery A., Pons S., Changeux J. P. and Cartaud J. (2002) Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J. Neurosci.* **22**, 8891-8901.
- Marcheselli V., Daniotti J. L., Vidal A. C., Maccioni H., Marsh D. and Barrantes F. J. (1993) Gangliosides in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* and *Discopyge tschudii*. *Neurochem. Res.* **18**, 599-603.
- Marsh D. and Barrantes F.J. (1978) Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **75**, 4329-4933.

- Marsh D., Watts A. and Barrantes F.J. (1981) Phospholipid chain immobilization and steroid rotational immobilization in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochim Biophys Acta* **645**, 697-101.
- Masters C. L., Cappai R., Barnham K. J. and Villemagne V. L. (2006) Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *J. Neurochem.* **97**, 1700–1725.
- Mattei V., Garofalo T., Misasi R., Gizzi C., Mascellino M.T., Dolo V., Pontieri G.M., Sorice M. and Pavan A. (2002) Association of cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells. *Neurochem Res.* **27**, 743-749.
- Matthews-Bellinger J.A. and Salpeter M.M. (1983) Fine structural distribution of acetylcholine receptors at developing mouse neuromuscular junctions. *J Neurosci.* **3**, 644-657.
- Maxfield F.R. (2002) Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol.* **14**, 483-487.
- McCampbell A., Truong D., Broom D.C., Allchorne A., Gable K., Cutler R.G., Mattson M.P., Woolf C.J., Frosch M.P., Harmon J.M., Dunn T.M. and Brown R.H. Jr. (2005) Mutant SPTLC1 dominantly inhibits serine palmitoyltransferase activity in vivo and confers an age-dependent neuropathy. *Hum Mol Genet.* **14**, 3507-3521.
- Meiri K.F. (2005) Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **360**, 1663-1672.
- Merlie J.P. and Lindstrom J. (1983) Assembly in vivo of mouse muscle acetylcholine receptor: identification of an alpha subunit species that may be an assembly intermediate. *Cell* **34**, 747-757.
- Merlie J.P. and Sanes J.R. (1985) Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. *Nature* **317**, 66-68.

- Merrill A.H. Jr. (1983) Characterization of serine palmitoyltransferase activity in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* **754**, 284-291.
- Merrill A.H. Jr. (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem.* **277**, 25843-25846.
- Merrill A. H. Jr., Schmelz E. M., Dillehay D. L., Spiegel S., Shayman J. A., Schroeder J. J., Riley R. T., Voss K. A. and Wang E. (1997) Sphingolipids-the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 208-225.
- Merrill A. H. Jr., Sullards M. C., Wang E., Voss K. A. and Riley R. T. (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* **109**, 283-289.
- Misgeld T., Kummer T.T., Lichtman J.W. and Sanes J.R. (2005) Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 11088-11093.
- Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C. and Sakmann B. (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* **321**, 406-411.
- Mishra S. and Joshi P.G. (2007) Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem.* **103** Suppl 1, 135-142.
- Mitra A.K., McCarthy M.P. and Stroud RM. (1989) Three-dimensional structure of the nicotinic acetylcholine receptor and location of the major associated 43-kD cytoskeletal protein, determined at 22 Å by low dose electron microscopy and x-ray diffraction to 12.5 Å. *J Cell Biol.* **109**, 755-774.

- Mitra K., Ubarretxena-Belandia I., Taguchi T., Warren G. and Engelman D.M. (2004) Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4083-4088.
- Miyake Y., Kozutsumi Y., Nakamura S., Fujita T. and Kawasaki T. (1995) Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 396-403.
- Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Stowell M. and Unwin N. (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol.* **288**, 765-786.
- Miyazawa A., Fujiyoshi Y. and Unwin N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955.
- Moyer B.D., Matteson J., and Balch W.E. (2001). Expression of wild-type and mutant green fluorescent protein-Rab1 for fluorescence microscopy analysis. *Methods Enzymol.* **329**, 6–14.
- Narayanaswami V. and McNamee M.G. (1993) Protein-lipid interactions and *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor function. 2. Membrane fluidity and ligand-mediated alteration in the accessibility of gamma subunit cysteine residues to cholesterol. *Biochemistry* **32**, 12420-12427.
- Nickel W., Brügger B. and Wieland F.T. (1998) Protein and lipid sorting between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Semin Cell Dev Biol.* **9**, 493-501.
- Nievas G.A., Barrantes F.J. and Antollini S.S. (2007) Conformation-sensitive steroid and fatty acid sites in the transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry.* **46**, 3503-3512.
- Niggli V. (2001) Structural properties of lipid-binding sites in cytoskeletal proteins. *TRENDS in Biochemical Sciences* **26**, 604-611.

- Nishimura S.Y., Vrljic M., Klein L.O., McConnell H.M. and Moerner W.E. (2006) Cholesterol depletion induces solid-like regions in the plasma membrane. *Biophys J.* **90**, 927-938.
- Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikuyotani S., Furutani Y., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Miyata T. and Numa S. (1983) Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature* **302**, 528-532.
- Nyholm T.K., Ozdirekcan S. and Killian J.A. (2007) How protein transmembrane segments sense the lipid environment. *Biochemistry* **46**, 1457-1465.
- Ochoa E.L., Dalziel A.W. and McNamee M.G. (1983) Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochim Biophys Acta* **727**, 151-162.
- O'Connell K.M. and Tamkun M.M. (2005) Targeting of voltage-gated potassium channel isoforms to distinct cell surface microdomains. *J Cell Sci.* **118**, 2155-66.
- Omel'kov A.V., Pavlova IuB, Boldyrev I.A. and Molotkovskii IuG. (2006) Depth-dependent investigation of the apolar zone of lipid membranes using a series of fluorescent probes, Me4-BODIPY-8-labeled phosphatidylcholines. *Bioorg Khim.* **33**, 544-549.
- Orr G., Hu D., Özçelik S., Opresko L.K., Wiley H.S. and Colson S.D. (2005) Cholesterol Dictates the Freedom of EGF Receptors and HER2 in the Plane of the Membrane. *Biophys J.* **89**, 1362–1373.
- Paladino S., Sarnataro D., Pillich R., Tivodar S., Nitsch L. and Zurzolo C. (2004) Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol.* **167**, 699-709.
- Paulson H.L., Claudio T. (1990) Temperature-sensitive expression of all-Torpedo and Torpedo-rat hybrid AChR in mammalian muscle cells. *J Cell Biol.* **110**, 1705-1717.

- Pediconi M.F., Gallegos C.E., De Los Santos E.B. and Barrantes F.J. (2004) Metabolic cholesterol depletion hinders cell-surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience* **128**, 239-49.
- Perry D.K. (2002) Serine palmitoyltransferase: role in apoptotic de novo ceramide synthesis and other stress responses. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 146-152.
- Phillips W.D., Kopta C., Blount P., Gardner P.D., Steinbach J.H. and Merlie J.P. (1991) ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kildalton protein. *Science* **251**, 568-570.
- Pichler H. and Riezman H. (2004) Where sterols are required for endocytosis. *Biochem Biophys Acta* **1666**, 51-61.
- Pielsticker L.K., Mann K.J., Lin W.L. and Sevlever D. (2005) Raft-like membrane domains contain enzymatic activities involved in the synthesis of mammalian glycosylphosphatidylinositol anchor intermediates. *Biochem Biophys Res Commun.* **330**,163-171.
- Pike L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J.* **378**, 281-292.
- Pike L.J. and Miller J.M. (1998) Cholesterol Depletion Delocalizes Phosphatidylinositol Bisphosphate and Inhibits Hormone-stimulated Phosphatidylinositol Turnover. *J. Biol. Chem.* **273**, 22298–22304.
- Plowman S.J., Muncke C., Parton R.G. and Hancock J.F. (2005) H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 15500-15505.
- Pouwels J., van der Velden T., Willemse J., Borst J.W., van Lent J., Bisseling T. and Wellink J. (2004) Studies on the origin and structure of tubules made by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *J Gen Virol.* **85**, 3787-3796.

- Poveda J.A., Encinar J.A., Fernández A.M., Mateo C.R., Ferragut J.A. and González-Ros J.M. (2002) Segregation of phosphatidic acid-rich domains in reconstituted acetylcholine receptor membranes. *Biochemistry* **41**, 12253-12262.
- Pralle A., Keller P., Florin E.L., Simons K. and Hörber J.K. (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol.* **148**, 997-1008.
- Prior I.A., Muncke C., Parton R.G. and Hancock J. F. (2003) Direct visualization of Ras in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.* **160**, 165-170.
- Pucadyil T.J. and Chattopadhyay A. (2006) Effect of cholesterol on lateral diffusion of fluorescent lipid probes in native hippocampal membranes. *Chem Phys Lipids.* **143**, 11-21.
- Pucadyil T.J., Mukherjee S., Chattopadhyay A. (2007) Organization and dynamics of NBD-labeled lipids in membranes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. *J Phys Chem B.* **111**, 1975-1983.
- Pumplin D.W. (1989) Acetylcholine Receptor Clusters of Rat Myotubes Have at least Three Domains with Distinctive Cytoskeletal and Membranous Components. *J. Cell Biol.* **109**, 739-753.
- Pumplin D.W., Bloch R.J. (1983) Lipid domains of acetylcholine receptor clusters detected with saponin and filipin. *J Cell Biol.* **97**, 1043-1054.
- Quiram P. A, Ohno K., Milone M., Patterson M. C., Pruitt N. J., Brengman J. M., Sine S. M. and Engel A. G. (1999) Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor beta/delta subunit interaction essential for assembly. *J Clin Invest.* **104**, 1403-1410.

- Radin N. S., Shayman J. A. and Inokuchi J. (1993) Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances. *Adv. Lipid. Res.* **26**, 183-213.
- Raggers R.J., Pomorski T., Holthuis J.C., Kälin N. and van Meer G. (2000) Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. *Traffic* **1**, 226-234.
- Ramarao M.K. and Cohen J.B. (1998) Mechanism of nicotinic acetylcholine receptor cluster formation by rapsyn. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4007-4012.
- Ranta S., Zhang Y., Ross B., Lonka L., Takkunen E., Messer A., Sharp J., Wheeler R., Kusumi K., Mole S., Liu W., Soares M.B., Bonaldo M.F., Hirvasniemi A., de la Chapelle A., Gilliam T.C. and Lehesjoki A.E. (1999) The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMP and mnd mutant mice are associated with mutations in CLN8. *Nat Genet.* **23**, 233-236.
- Riebeling C., Allegood J.C., Wang E., Merrill A.H. Jr. and Futerman A.H. (2003) Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, trh1 and trh4, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors. *J Biol Chem.* **278**, 43452-43459.
- Riezman H. and van Meer G. (2004) Lipid pickup and delivery. *Nat Cell Biol.* **6**, 15-16.
- Roccamo A. M., Pediconi M. F., Aztiria E., Zanello L., Wolstenholme A. and Barrantes F. J. (1999) Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1615-1623.
- Rodriguez-Boulan E., Kreitzer G. and Müsch A. (2005) Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 233-247.

- Rosenwald A. G., Machamer C. E. and Pagano R. E. (1992) Effects of a sphingolipid synthesis inhibitor on membrane transport through the secretory pathway. *Biochemistry* **31**, 3581-3590.
- Ross A. F., Green W. N., Hartman D. S. and Claudio T. (1991) Efficiency of acetylcholine receptor subunit assembly and its regulation by cAMP. *J Cell Biol.* **113**, 623-636.
- Rozelle A.L., Machesky L.M., Yamamoto M. and Driessens M.H.E. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP–Arp2/3. *Current Biology* **10**, 311–320.
- Saffman P.G. and Delbrück M. (1975) Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3111-3113.
- Samsonov A.V., Mihalyov I. and Cohen F.S. (2001) Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys J.* **81**, 1486-1500.
- Sanes J. R. and Lichtman J. W. (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci.* **2**, 791–805.
- Saraste J., Lahtinen U. and Goud B. (1995) Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway. *J Cell Sci.* **108**, 1541–1552.
- Sarnataro D., Campana V., Paladino S., Stornaiuolo M., Nitsch L. and Zurzolo C. (2004) PrPC association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 4031-4042.
- Sato S. B., Ishii K., Makino A., Iwabuchi K., Yamaji-Hasegawa A., Senoh Y., Nagaoka I., Sakuraba H. and Kobayashi T. (2004) Distribution and Transport of Cholesterol-rich Membrane Domains Monitored by a Membrane-impermeant Fluorescent Polyethylene Glycol-derivatized Cholesterol. *J. Biol. Chem.* **279**, 23790–23796.

- Sawamura N., Ko M., Yu W., Zou K., Hanada K., Suzuki T., Gong J. S., Yanagisawa K. and Michikawa M. (2004) Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. *J. Biol. Chem.* **279**, 11984-11991.
- Saxton M.J. (1993) Lateral diffusion in an archipelago. Dependence on tracer size. *Biophys J.* **64**, 1053-1062.
- Scheiffele P., Rietveld A., Wilk T. and Simons K. (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem.* **274**, 2038-2044.
- Scher M.G. and Bloch R.J. (1991) The lipid bilayer of acetylcholine receptor clusters of cultured rat myotubes is organized into morphologically distinct domains. *Exp Cell Res.* **195**, 79-91.
- Schneiter R., Brügger B., Sandhoff R., Zellnig G., Leber A., Lampl M., Athenstaedt K., Hrastrnik C., Eder S., Daum G., Paltauf F., Wieland F.T. and Kohlwein S.D. (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol.* **1146**,741-754.
- Schootemeijer A., van Beekhuizen A.E., Gorter G., Tertoolen L.G., de Laat S.W. and Akkerman J.W. (1994) Rapid alterations in lateral mobility of lipids in the plasma membrane of activated human megakaryocytes. *Eur J Biochem.* **221**, 353-362.
- Schorling S., Vallée B., Barz W.P., Riezman H. and Oesterhelt D. (2001) Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **12**, 3417-3427.
- Schroeder R. J., Ahmed S. N., Zhu Y., London E. and Brown D.A. (1998) Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-

- anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem.* **273**, 1150-1157.
- Schuck S. and Simons K. (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci.* **117**, 5955-5964.
- Schwarzmann G. and Sandhoff K. (1990) Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids. *Biochemistry* **29**, 10865-10871.
- Selkoe D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**, 741-766.
- Sevlever D., Pickett S., Mann K. J., Sambamurti K., Medof M. E. and Rosenberry T. L. (1999) Glycosylphosphatidylinositol-anchor intermediates associate with triton-insoluble membranes in subcellular compartments that include the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **343**, 627-635.
- Sharma G. and Vijayaraghavan S. (2002) Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J Neurobiol.* **53**, 524-534.
- Sharma P., Sabharanjak S. and Mayor S. (2002) Endocytosis of lipid rafts: an identity crisis. *Semin Cell Dev Biol.* **13**, 205-214.
- Shtrom S.S. and Hall Z.W. (1996) Formation of a ligand-binding site for the acetylcholine receptor in vitro. *J Biol Chem.* **271**, 25506-25514.
- Shvartsman D.E., Kotler M., Tall R.D., Roth M.G. and Henis Y.I. (2003) Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts. *J Cell Biol.* **163**, 879-888.

- Sieber J.J., Willig K.I., Kutzner C., Gerding-Reimers C., Harke B., Donnert G., Rammner B., Eggeling C., Hell S.W., Grubmüller H. and Lang T. (2007) Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* **317**, 1072-1076.
- Simons K. and Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons K. and van Meer G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197–6202.
- Simons K. and Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev. Molec. Cell. Biol.* **1**, 31–39.
- Singer S.J. and Nicolson G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–731.
- Sisodia S. S. and St George-Hyslop P. H. (2002) Gamma-secretase, notch, abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 281–290.
- Skrzypek M., Lester R. L. and Dickson R. C. (1997) Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**, 1513-1520.
- Smit A.B., Syed N.I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K.S., Lodder H., van der Schors R.C., van Elk R., Sorgedrager B., Brejc K., Sixma T.K. and Geraerts W.P. (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* **411**, 261-268.
- Smith D.C., Sillence D.J., Falguières T., Jarvis R.M., Johannes L., Lord J.M., Platt F.M. and Roberts L.M. (2006) The association of Shiga-like toxin with detergent-resistant membranes is modulated by glucosylceramide and is an essential requirement in the endoplasmic reticulum for a cytotoxic effect. *Mol Biol Cell* **17**, 1375-1387.

- Smith M. M., Lindstrom J. and Merlie J. P. (1987) Formation of the alpha-bungarotoxin binding site and assembly of the nicotinic acetylcholine receptor subunits occur in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **262**, 4367-4376.
- Spector I., Shochet N.R., Blasberger D. and Kashman Y. (1989) Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* **13**, 127-144.
- Sprong H., Degroote S., Claessens T., van Drunen J., Oorschot V., Westerink B. H., Hirabayashi Y., Klumperman J., van der Sluijs P. and van Meer G. (2001) Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **155**, 369-380.
- Stetzkowski-Marden F., Gaus K., Recouvreur M., Cartaud A. and Cartaud J. (2006) Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J Lipid Res.* **47**, 2121-33.
- Stya M. and Axelrod D. (1983) Mobility and Detergent Extractability of Acetylcholine Receptors on Cultured Rat Myotubes: A Correlation. *J. Cell Biol.* **97**, 48-51.
- Sumikawa K. (1992) Sequences on the N-terminus of ACh receptor subunits regulate their assembly. *Brain Res Mol Brain Res.* **13**, 349-353.
- Sumikawa K. and Nishizaki T. (1994) The amino acid residues 1-128 in the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor contain assembly signals. *Brain Res Mol Brain Res.* **25**, 257-264.
- Sun M., Northup N., Marga F., Huber T., Byfield F.J., Levitan I. and Forgacs G. (2007) The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J Cell Sci.* **120**, 2223-2231.

- Swope S.L., Moss S.J., Raymond L.A. and Huganir R.L. (1999) Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* **33**, 49-78.
- Tamamizu S., Guzmán G.R., Santiago J., Rojas L.V. , McNamee M.G., and Lasalde-Dominicci J.A. (2000) Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the alpha M4 transmembrane domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **39**, 4666-4673.
- Tamboli I. Y., Prager K., Barth E., Heneka M., Sandhoff K. and Walter J. (2005) Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid betapeptide. *J. Biol. Chem.* **280**, 28110–28117.
- Taniguchi Y., Ohba T., Miyata H. and Ohki K. (2006) Rapid phase change of lipid microdomains in giant vesicles induced by conversion of sphingomyelin to ceramide. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 145-153.
- Tettamanti G., Bassi R., Viani P. and Riboni L. (2003) Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie.* **85**, 423-437.
- Thoumine O., Saint-Michel E., Dequidt C., Falk J., Rudge R., Galli T., Faivre-Sarrailh C. and Choquet D. (2005) Weak effect of membrane diffusion on the rate of receptor accumulation at adhesive contacts. *Biophys J.* **89**, L40-L42.
- Tisdale E.J., Bourne J.R., Khosravi-Far R., Der C.J. and Balch W.E. (1992) GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol.* **119**, 749–761.
- Toyoshima C. and Unwin N. (1990) Three-dimensional structure of the acetylcholine receptor by cryoelectron microscopy and helical image reconstruction. *J Cell Biol.* **111**, 2623-2635.

- Tuuf J. and Mattjus P (2007) Human glycolipid transfer protein-Intracellular localization and effects on the sphingolipid synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 1353-1363.
- Tzartos S.J., Hochschwender S., Vasquez P. and Lindstrom J. (1987) Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol.* **15**, 185–194.
- Tzartos S.J., Kokla A., Walgrave S.L. and Conti-Tronconi B.M. (1988) Localization of the main immunogenic region of human muscle acetylcholine receptor to residues 67-76 of the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2899-2903.
- Tzartos S.J., Barkas T., Cung M.T., Mamalaki A., Marraud M., Orlewski P., Papanastasiou D., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Tsantili P. and Tsikaris V. (1998) Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. *Immunol Rev.* **163**, 89-120.
- Unwin N. (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **229**, 1101–1124.
- Unwin N. (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* **373**, 37-43.
- Unwin N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* **346**, 967-989.
- van Meer G, Holthuis JC. (2000) Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **1486**,145-70.
- van Meer G. and Lisman Q. (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* **277**, 25855-25858.

- van Meer G. and Sprong H. (2004) Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol.* **16**, 373-378.
- Vaz W.L., Criado M., Madeira V.M., Schoellmann G. and Jovin T.M. (1982) Size dependence of the translational diffusion of large integral membrane proteins in liquid-crystalline phase lipid bilayers. A study using fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **21**, 5608-5612.
- Venkataraman K., Riebeling C., Bodennec J., Riezman H., Allegood J.C., Sullards M.C., Merrill A.H. Jr. and Futerman A.H. (2002) Upstream of growth and differentiation factor 1 (uog1), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (LAG1), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells. *J Biol Chem.* **277**, 35642-35649.
- Vereb G., Szöllosi J., Matkó J., Nagy P., Farkas T., Vigh L., Mátyus L., Waldmann T.A. and Damjanovich S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8053-8058.
- Verrall S. and Hall Z.W. (1992) The N-terminal domains of acetylcholine receptor subunits contain recognition signals for the initial steps of receptor assembly. *Cell* **68**, 23-31.
- Vidal A. and McIntosh T.J. (2005) Transbilayer peptide sorting between raft and nonraft bilayers: comparisons of detergent extraction and confocal microscopy. *Biophys J.* **89**, 1102-1108.
- Vidugiriene J., Sharma D. K., Smith T. K., Baumann N. A. and Menon AK. (1999) Segregation of glycosylphosphatidylinositol biosynthetic reactions in a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **274**, 15203-15212.

- Vrljic M., Nishimura S.Y., Moerner W.E. and McConnell H.M. (2005) Cholesterol Depletion Suppresses the Translational Diffusion of Class II Major Histocompatibility Complex Proteins in the Plasma Membrane. *Biophys J.* **88**, 334–347.
- Wanamaker C. P., Christianson J. C. and Green W. N. (2003) Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **998**, 66-80.
- Wanamaker C.P and Green W.N. (2005) N-linked glycosylation is required for nicotinic receptor assembly but not for subunit associations with calnexin. *J Biol Chem.* **280**, 33800-33810.
- Wanamaker C.P. and Green W.N. (2007) Endoplasmic reticulum chaperones stabilize nicotinic receptor subunits and regulate receptor assembly. *J Biol Chem.* **282**, 31113-31123.
- Wang E., Norred W. P., Bacon C. W., Riley R. T. and Merrill A. H. Jr. (1991) Links Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem.* **266**, 14486-14490.
- Wang J. M., Zhang L., Yao Y., Viroonchatapan N., Rothe E. and Wang Z. Z. (2002) A transmembrane motif governs the surface trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Neurosci.* **5**, 963-970.
- Wang Q. and Chang A. (2002) Sphingoid base synthesis is required for oligomerization and cell surface stability of the yeast plasma membrane ATPase, Pma1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12853-12858.
- Wang T.Y. and Silvius J.R. (2000) Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers. *Biophys J.* **79**, 1478-1489.

- Wenz J.J. and Barrantes F.J. (2005) Nicotinic Acetylcholine Receptor Induces Lateral Segregation of Phosphatidic Acid and Phosphatidylcholine in Reconstituted Membranes. *Biochemistry* **44**, 398-410.
- Wess J. (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol.* **10**, 69-99.
- Whitaker J.N., Falchuck Z.M., Engel W.K., Blaese R.M. and Strober W. (1974) Hereditary sensory neuropathy. Association with increased synthesis of immunoglobulin A. *Arch Neurol.* **30**,359-371.
- Willmann R. and Fuhrer C. (2002) Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited. *Cell Mol Life Sci.* **59**, 1296–1316.
- Willmann R., Pun S., Stallmach L., Sadasivam G., Santos A. F., Caroni P. and Fuhrer C. (2006) Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *EMBO J.* **25**, 4050-4060.
- Wilson B.S., Steinberg S.L., Liederman K., Pfeiffer J.R., Surviladze Z., Zhang J., Samelson L.E., Yang L.H., Kotula P.G. and Oliver J.M. (2004) Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell* **15**, 2580-2592.
- Winter E. and Ponting C.P. (2002) TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains?. *Trends Biochem Sci.* **27**, 381-383.
- Witzemann V. (2006) Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res.* **326**, 263-271.
- Yang X., Arber S., William C., Li L., Tanabe Y., Jessell T.M., Birchmeier C. and Burden S.J. (2001) Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* **30**, 399-410.

- Yildiz Y., Matern H., Thompson B., Allegood J.C., Warren R.L., Ramirez D.M., Hammer R.E., Hamra F.K., Matern S. and Russell D.W. (2006) Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J Clin Invest.* **116**, 2985-2994.
- Yin H.L. and Janmey P.A. (2003) Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol.* **65**, 761-89.
- Yu X.M. and Hall Z.W. (1994a) A sequence in the main cytoplasmic loop of the alpha subunit is required for assembly of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **13**, 247-255.
- Yu X.M. and Hall Z.W. (1994b) The role of the cytoplasmic domains of individual subunits of the acetylcholine receptor in 43 kDa protein-induced clustering in COS cells. *J Neurosci.* **14**, 785-795.
- Yumoto N., Wakatsuki S. and Sehara-Fujisawa A. (2005) The acetylcholine receptor gamma-to-epsilon switch occurs in individual endplates. *Biochem Biophys Res Commun.* **331**, 1522-1527.
- Zha Q., Ruan Y., Hartmann T., Beyreuther K. and Zhang D. (2004) GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Mol. Psychiatry* **9**, 946-952.
- Zhang J., Kang D.E., Xia W., Okochi M., Mori H., Selkoe D.J. and Koo E.H. (1998). Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 12436-12442.
- Zhu D., Xiong W. C. and Mei L. (2006) Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Neurosci.* **26**, 4841-4851.

Zingsheim H.P., Neugebauer D.C., Frank J., Hänicke W. and Barrantes F.J. (1982) Dimeric arrangement and structure of the membrane-bound acetylcholine receptor studied by electron microscopy. *EMBO J.* 1, 541-547.

