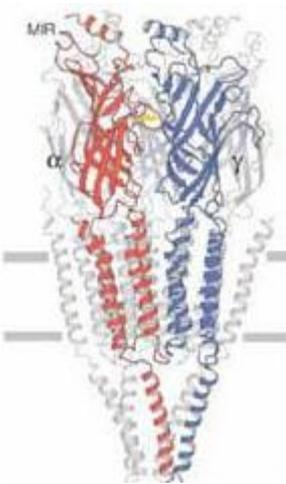




UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS

DOCTOR EN BIOQUIMICA



***"El papel de los lípidos en la estructura
y función del receptor de acetilcolina
nicotínico"***

Ana María Roccamo

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2009

Director de Tesis : Dr. Francisco J. Barrantes

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 y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 30 de Abril de 2002 y el 31 de julio de 2009, bajo la dirección del Doctor Barrantes, Francisco José.

Ana María Roccamo



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mercedo
la calificación de(.....)

Agradecimientos

A mi director, el Dr. Francisco J. Barrantes, por haber depositado en mí su confianza y haber asumido el compromiso de guiarme en este trabajo de Tesis.

A mis compañeros del INIBIBB, los de antes, los de ahora, los de siempre, los que están... y los que se han ido por un tiempo y para siempre...

A todos ellos les debo su ayuda incondicional, académica y personal, siempre y en cualquier circunstancia. Sin ellos, este sueño no habría sido posible.

A mis padres, por haberme permitido volar...

A mi esposo, por haber acompañado mi vuelo...

A mis hijos, por haber comprendido mis ausencias...

A Valentino, porque su existencia ha revalorizado mi vida...

Ana María

ABREVIATURAS

ACh = acetilcolina.

AchBP = proteína unidora de acetilcolina.

AChR = receptor de acetilcolina nicotínico.

ADN = ácido desoxirribonucleico.

ADNc = ácido desoxirribonucleico complementario.

Å = amstrong

ARN= ácido ribonucleico.

ARNm = ARN mensajero.

Carb = carbamilcolina.

CH = colesterol.

CMF = medio libre de cálcio

CO = monóxido de carbono.

C-terminal = carboxilo-terminal.

D.E= desvío estandar.

D.O = densidad óptica.

DMEN = "Dulbecco Modified Eagle Medium".

ESR =resonancia de spin electrónico.

fmoles = femtomoles.

GABA A = γ -amino butírico tipo A.

GABA C = γ -amino butírico tipo C.

h/hs = hora/s

IC₅₀ = concentración que inhibe el 50% de la respuesta.

K_D = constante de disociación.

KD = Kilodaltons

LB = Luria Bertani.

LGIC = canales iónicos activados por ligandos.

M = molar.

M1= segmento transmembranal M1.

M2= segmento transmembranal M2.

M3= segmento transmembranal M3.

M4= segmento transmembranal M4.

MC= medio de cultivo completo.

mCi = mili curie

min = minutos.

mm = milímetros.

mM = milimolar.

ms = milisegundos.

MSS = medio libre de suero.

mV = milivoltio.

nM = nanomolar.

NO= óxido nitroso

N-terminal = amino terminal.

°C = grados centígrados.

PA = ácido fosfatídico.

ps = picosiemens.

PA =ácido fosfatídico.

PC= fosfatidilcolina

PCR = reacción de la polimerasa en cadena.

PE= fosfatidiletanolamina.

pH = - log [H⁺].

PI= fosfatidil inositol.

PS= fosfatidilserina

RE = retículo endoplásmico.

rpm= revoluciones por minuto

RT= transcriptasa reversa.

s = segundo/s.

S =coeficiente de sedimentación

SFB = suero fetal bovino.

SL = esfingolípido.

SLs = esfingolípidos.

SM= esfingomielinea.

SNC = sistema nervioso central.

SNP = sistema nervioso periférico.

SPT = serina palmitoil transferasa.

T.californica = Torpedo *californica*.

TE = Tris-EDTA.

TM = segmento transmembrana

UNM = unión neuromuscular.

μM = micromolar

Resumen

Las propiedades del receptor nicotínico colinérgico muscular (AChR) están reguladas por los lípidos de la membrana. Por tratarse de una proteína integral, desde su síntesis hasta su aparición en la sinapsis y posterior degradación, el AChR está inmerso en una bicapa lipídica, cuya composición está pre-determinada y finamente controlada por la célula. Por lo tanto, el análisis funcional de la relación entre los lípidos y el AChR requiere de un sistema celular que funcione a modo de tubo de ensayo, para evitar los modelos artificiales puros con membranas reconstituídas.

Con este propósito, generamos modelos celulares que expresan heteróloga y constitutivamente el AChR y en los que se puede modificar parcial y selectivamente el contenido de ciertas especies lipídicas.

En una primera etapa a través de la cotransfección del ADNc de las subunidades del AChR adulto de ratón en una línea celular con metabolismo lipídico normal, CHO-K1 (Forsayeth et al., 1990c), establecimos el sistema de referencia.

Posteriormente, generamos dos modelos experimentales con líneas celulares mutantes que eran deficientes en el metabolismo lipídico: una línea mutante de CHO-K1, denominada SPB-1 deficiente en esfingomielina (SM) (Hanada et al., 1990) y otra línea derivada de CHO-K1, auxotrófica, llamada PSA-3, deficiente en fosfatidilserina (PS).

Obtuvimos la estirpe SPB-1/SPH que expresa el AChR y modula, por efecto de la temperatura, la actividad de la enzima serina palmitoil transferasa (SPT), clave en la vía de síntesis de los esfingolípidos. A temperaturas de cultivo entre 33 °C y 37 °C la actividad de la enzima representa sólo del 4 al 8% de la actividad normal, lo cual disminuye los niveles celulares de SM y gangliósidos como el GM3 a valores menores del 1%. Con este modelo, determinamos que no existen diferencias en los parámetros electrofisiológicos y en las propiedades farmacológicas del receptor, y caracterizamos la participación activa de la SM en los mecanismos que regulan el tráfico exocítico de la proteína a la membrana plasmática.

También generamos la línea clonal PSA/AChR, que expresa el AChR y no es capaz de realizar normalmente la síntesis de PS por tener alterada una de las enzimas que catalizan su síntesis. Por este motivo, requiere del agregado exógeno del fosfolípido para su normal crecimiento.

Transfectadas las células y seleccionados los clones positivos, analizamos el ARN por RT-PCR para determinar la expresión de las subunidades. Con los clones elegidos realizamos ensayos de unión a [¹²⁵I]α-bungarotoxina, un radioligando específico para AChR, determinándose los parámetros cinéticos y farmacológicos. Los parámetros electrofisiológicos del canal se caracterizaron por la técnica de patch-clamp y el análisis topológico de la expresión por microscopía de fluorescencia. De esta manera, en cada modelo celular caracterizamos las diferencias estructurales y topológicas del AChR causadas por las variaciones en el contenido lipídico.

En el segundo capítulo de esta tesis analizamos el rol que poseen los aminoácidos que están ubicados, de cara a la membrana, en contacto directo con los lípidos. Con este propósito, modificamos la estructura primaria de la proteína por medio de mutaciones simples y dobles, en residuos cargados y muy conservados, situados en los extremos del segmento αM4 a la altura de las cabezas polares de los fosfolípidos. Por co-transfección de una subunidad α mutada con el resto de las subunidades en la versión salvaje, generamos cinco líneas clonales mutantes. En estos modelos se realizaron ensayos farmacológicos con [¹²⁵I]α-BTX, microscopía de fluorescencia y técnicas bioquímicas que nos permitieron determinar la magnitud de la expresión del receptor mutado y los cambios estructurales y funcionales que se produjeron cuando los diferentes residuos del AChR fueron mutados.

Abstract

The properties of the muscle nicotinic acetylcholine receptor (AChR) are modulated by membrane lipids. As an integral protein, the AChR - from synthesis to appearance in synapses and further degradation- is immersed in a lipid bilayer. The composition of this bilayer is pre-established and finely controlled by the cell. Therefore, the functional analysis of the lipid-AChR relationship requires a cell system that behaves as test tube, to prevent pure artificial models with reconstituted membranes.

For this purpose, the AChR was heterologously and constitutively expressed in cell lines, where the lipid content can be partially and selectively modified.

In a first stage, the reference system was established by means of transfection of adult mouse AChR subunits cDNAs into a cell line with normal lipid metabolism, CHO-K1 (Forsayeth et al., 1990c).

Then, two experimental models were generated with mutant cell lines which were defective in lipid metabolism: a CHO-K1 mutant line, called SPB-1, deficient in sphingomyelin (SM) (Hanada et al., 1990) and another auxotrophic line derived from CHO-K1, called PSA-3 and phosphatidylserine deficient (PS).

The SPB-1/SPH clone was obtained, which expresses the AChR and modulates, by effect of temperature, the activity of the serine palmitoyl transferase (SPT), which is key to the sphingolipids synthesis pathway. At culture temperatures between 33 °C and 37 °C, the enzyme activity represents only from 4% to 8% of normal activity, thus reducing cell levels of SM and gangliosides such as GM3 to values lower than 1%. With this model, we established that the electrophysiological parameters and the pharmacological properties of the receptor show no differences. However, we were able to characterize the active participation of SM in the mechanisms that regulate the exocytic protein traffic to the plasma membrane.

In addition, a PSA/AChR clone line was generated, which expresses the AChR and is not capable to synthesize PS normally, because one of the enzymes that catalyzes this synthesis is altered. Thus, it requires exogenous PS for normal growth.

Once the cells were transfected and the positive clones selected, we analyzed the RNA by RT-PCR to determine the expression of the subunits. With these clones, we performed binding studies with [¹²⁵I]α-bungarotoxin, an AChR specific radioligand, to determine kinetic and pharmacological parameters. The electrophysiological parameters of the channel were characterized by the patch-clamp technique and the topological analysis of the expression by fluorescence microscopy. In this way, on each cell line, we characterized the structural and topological AChR differences caused by lipid content variations.

In a second stage of this Thesis, the role of the aminoacids which are located at the membrane facing extremes in direct contact with the lipids was analyzed. For this purpose, we modified the primary structure of the protein by means of simple and double mutations, in highly conserved and charged residues, located at the αM4 segment extremes at the level of the phospholipid polar heads. By transfection of a mutated α subunit together with the rest of the subunits in their wild-type version, we generated five mutant clone lines. These models were subjected to pharmacological tests with [¹²⁵I]α-BTX, fluorescence microscopy and biochemical techniques that allowed us to establish the expression amount of the mutated receptor and the structural and functional changes that took place when the different residues were mutated.

índice

ABREVIATURAS	i
Resumen	iv
Introducción	1
Los receptores de acetilcolina	4
El receptor de acetilcolina nicotínico muscular	6
Estructura del dominio extracelular	8
Estructura del canal	11
Estados funcionales del AChR	12
Estructura del dominio hidrofóbico	13
Interfase lípido-proteína	14
Objetivos	19
Materiales y Métodos	21
1.0 Marcación de proteínas con [35S] metionina	22
2.0 Obtención y purificación de ADN	22
3.0 Obtención de ARN	23
4.0 Transformación bacteriana	24
5.0 Transfección de células eucariotas	24
6.0 Reacción de la transcriptasa reversa	25
7.0 Reacción de la polimerasa en cadena	26
8.0 Purificación y caracterización de los segmentos obtenidos por PCR	27
9.0 Estrategia para generar mutaciones simples y dobles en el segmento α TM4	27
10.0 Secuenciación de los plásmidos mutantes	30
11.0 Vectores de expresión	30
12.0 Cultivo celular	32
12.1.0 Líneas celulares utilizadas	32
12.1.1 CHO-K1	32
12.1.2 CHO/SPB-1	32
12.1.3 PSA-3	33
12.2.0 Líneas celulares generadas	33
12.2.1 CHO-K1/A5	33
12.2.2 SPB-1/SPH	34
12.2.3 PSA/AChR	34
12.2.4 CHO-K1/ α TM4 His408Ala ($H^{408}A$)	35
12.2.5 CHO-K1/ α TM4 Arg429Ala ($R^{429}A$)	35
12.2.6 CHO-K1/ α TM4 His408Ala/Arg429Ala ($H^{408}A/R^{429}A$)	35
12.2.7 CHO-K1/Arg429Glu ($R^{429}E$)	35
12.2.8 CHO-K1/ α TM4 His408Ala/Arg429Ala ($H^{408}A/R^{429}A$)	35
13.0 Ensayos de unión de α -bungarotoxina radioactiva al AChR	36
Ensayos de binding	36
13.1. Radiomarcación de α -BTX con ^{125}I	36
13.2 Determinación de la unión de [^{125}I] α -BTX a células enteras (binding de superficie)	37
13.3 Determinación de la unión de [^{125}I] α -BTX a células permeabilizadas	38
14.0 Microscopía de fluorescencia	38
14.1 Cuantificación de la fluorescencia	39
14.2 Determinación del porcentaje de AChR desensamblado por unión de α -BTX fluorescente en presencia de carbamilcolina	40
15.0 Gradientes de sacarosa	40
16.0 Tratamiento de CHO-K1/A5 con FB1	42
Capítulo I	43

Obtención de líneas celulares normales y deficientes en el metabolismo de esfingomielina con expresión constitutiva del AChR	44
Antecedentes y objetivos	45
Resultados	46
Inserción del AChR en células CHO-K1	46
Detección de la expresión del ARNm de las subunidades del receptor por determinación con RT-PCR	46
Identificación de los productos de RT-PCR	47
Expresión del AChR en células CHO-K1	48
Cuantificación de la expresión del AChR por ensayos de unión con [¹²⁵ I]α-BTX	50
Electrofisiología del canal iónico expresado en la línea celular CHO-K1/A5	51
Expresión del AChR en células deficientes en esfingolípidos (SPB-1)	52
Obtención de la línea SPB-1/SPH	54
Cuantificación de la expresión del AChR en SPB-1 por ensayos de unión a [¹²⁵ I]α-BTX	56
Marcación de proteínas con [³⁵ S] Metionina en los diferentes sistemas modelo	58
Propiedades farmacológicas del AChR expresado en SPB-1/SPH	58
Curvas de saturación	58
Estudios cinéticos de unión a [¹²⁵ I]α-BTX	60
Curvas de desplazamiento del AChR expresado en SPB-1/SPH	60
Inhibición del metabolismo de SLs por fumonisina B1 (FB1) en células CHO-K1/A5	62
Microscopía de fluorescencia	62
Discusión	66
Obtención y análisis del AChR expresado en PSA-3, una línea celular deficiente en el metabolismo de fosfatidilserina	69
Antecedentes y objetivos	70
Resultados	73
Expresión del AChR muscular de ratón en células PSA-3: creación de una nueva línea celular, PSA/AChR, con deficiencias en el metabolismo de fosfatidilserina	73
Cuantificación de la expresión del AChR en células PSA/AChR	74
Grados de expresión del AChR en la superficie de células PSA/AChR	75
Distribución topológica del AChR expresado en las células PSA/AChR	76
Cinética de asociación del AChR expresado en PSA/AChR.	77
Inhibición de la unión de [¹²⁵ I]α-BTX por el agonista carbamilcolina	78
Determinación del perfil de expresión del AChR en PSA/AChR por microscopía de fluorescencia	79
Determinación del estado de ensamblado del AChR en PSA/AChR por sedimentación en gradientes de sacarosa	81
Efecto de la PS sobre la estabilidad metabólica del AChR de superficie en células PSA/AChR	82
Internalización del AChR en PSA/AChR	83
Discusión	86
Capítulo II	89
Expresión estable de mutaciones generadas en los extremos del segmento αTM4 del AChR	90
Antecedentes y objetivos	91
Resultados	94
Mutaciones del segmento TM4 α del AChR adulto de ratón	94
Expresión estable de mutantes de TM4 α AChR en células CHO-K1	97
Ensayos de unión a [¹²⁵ I]α-BTX	98
Curvas de saturación de mutantes	100
Microscopía de fluorescencia	101

<i>Determinación del estado de asociación de la subunidad α en presencia de carbamilcolina</i>	103
<i>Colocalización del AChR intracelular normal y mutado con calnexina</i>	105
<i>Análisis del estado conformacional del AChR normal y mutado por gradientes de sacarosa</i>	107
Discusión	109

Introducción

Los seres vivos mantienen contacto permanente con el medio externo del cual reciben información y se nutren. Los organismos unicelulares más ancestrales y estructuralmente más simples tienen la capacidad para procesar la información externa utilizando vías de traducción de señales de diferente complejidad, para adaptarse y lograr su supervivencia.

En los organismos multicelulares, en los cuales cada una de las células cumple con sus actividades de acuerdo con los requerimientos de la entidad biológica a la que pertenecen, existe un sistema de generación, transmisión, recepción y respuesta de un gran número de señales de naturaleza química o física que las comunican y que permite que se relacionen funcionalmente entre sí.

El sistema nervioso de los vertebrados, en particular, está formado por una extensa red de comunicaciones por medio de las cuales las neuronas desarrollan actividades especiales y logran percibir sensaciones muy complejas.

El fenómeno de transmisión de información entre células nerviosas y sus efectores específicos, fue denominado “sinapsis” por Sherrington en 1897. El término definía la comunicación entre dos entidades celulares mediada por un compuesto químico (señal química), en un espacio físico especializado. A partir de entonces, se han caracterizado estructuras sinápticas en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso periférico, en la unión neuromuscular (UNM).

La formación de ambas estructuras en el período de desarrollo de los vertebrados es similar. Participan mecanismos celulares y moleculares muy complejos, muchos de los cuales aún no han sido descritos. En los mamíferos, la UNM es considerada “madura” después de varias semanas del primer contacto entre las células.

En la sinapsis ya establecida, la comunicación se realiza a través de una secuencia de eventos que se inician con la despolarización del terminal presináptico, por la llegada del potencial de acción. Esto provoca la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la entrada del ión que desencadena una cascada de señales intracelulares. Se fosforilan proteínas específicas, hay cambios estructurales de proteínas fijadoras de calcio, fusión de vesículas presinápticas a la membrana plasmática y liberación del “neurotransmisor” a la hendidura sináptica.

Los neurotransmisores liberados interactúan con proteínas especializadas ubicadas en la membrana plasmática de la célula diana o post-sináptica denominadas “receptores”. Los receptores son componentes celulares que tienen la capacidad de identificar y unir específicamente una sustancia, hormona o neurotransmisor, y generar cambios que establecen la comunicación (Figura 1).

La idea de la existencia de proteínas receptoras fue sugerida a principios del siglo XX por Langley, Dale y colaboradores. Estudiando la acción de la nicotina en la UNM,

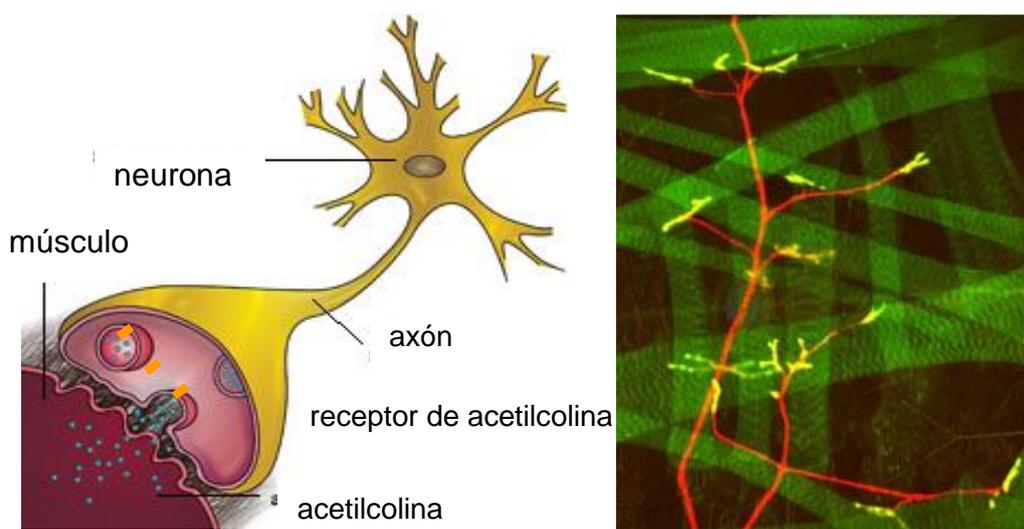
descubrieron la existencia de sustancias receptoras en la superficie de las membranas de las células excitables que formaban compuestos disociables (Langley, 1907).

En 1921, Loewi demostró experimentalmente la naturaleza química del proceso de transmisión sináptica, reconociéndose a partir de allí, numerosas sustancias como neurotransmisoras. Se incluyeron aminas biogénicas, como la acetilcolina, dopamina, noradrenalina y serotonina, aminoácidos y numerosos péptidos. Actualmente se piensa que gases difundibles como el óxido nitroso (NO) y el monóxido de carbono (CO) también actúan como neurotransmisores.

Los mecanismos moleculares que intervienen en la relación entre la neurona y su célula diana han sido ampliamente estudiados en modelos de generación de sinapsis *in vivo* con cultivos puros de neuronas y células musculares. Sin embargo, los resultados más esclarecedores y la mayoría de las técnicas implementadas para tal fin, son producto de estudios realizados en una fuente natural, extremadamente rica en sinapsis colinérgicas: los órganos eléctricos de rayas del género *Torpedo*, a partir de los cuales se pudieron obtener miligramos de un receptor que une la acetilcolina y tiene afinidad por nicotina (Whittaker, 1998).

Esta fuente abundante y homogénea de UNM fue el modelo utilizado para desarrollar ensayos de acoplamiento de la proteína receptora con radioligandos. En el año 1971 se obtuvieron los primeros resultados exitosos de esta metodología, que hizo posible el estudio de la farmacología de los receptores. Es por ello que el receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) fue la primera proteína reconocida como tal, estudiada por técnicas electrofisiológicas y caracterizada por técnicas bioquímicas.

La Unión Neuromuscular



Los receptores de acetilcolina

Dos categorías de receptores están comprometidos en la respuesta al neurotransmisor acetilcolina (ACh), en el sistema nervioso y en la unión neuromuscular de los animales bilaterales: los receptores nicotínicos y los receptores muscarínicos.

Los receptores de tipo muscarínico pertenecen a la superfamilia de receptores metabotrópicos. Están formados por proteínas individuales que presentan siete dominios transmembrana e interactúan con proteínas G heterotriméricas en su cara citoplásmica.

Los receptores nicotínicos pertenecen a la superfamilia de receptores ionotrópicos. Son proteínas multiméricas de membrana que constituyen canales iónicos activados por ligandos. Se los denomina también receptores *cis-loop* debido a que todas las subunidades proteicas de la familia poseen en la porción extracelular, cercano al extremo amino terminal, dos cisteínas separadas por 13 residuos aminoacídicos que forman un puente disulfuro. Comparten esta característica con el receptor de 5-hidroxitriptamina tipo3 (5-HT₃), el receptor γ -amino butírico tipo A (GABA_A), GABA_C, el receptor de glicina y los receptores de glutamato e histidina de invertebrados (Betz, 1990; Schofield et al., 1987).

Todos los miembros de la familia poseen el mismo patrón de funcionamiento. La interacción del neurotransmisor con su receptor desencadena una serie de cambios conformacionales en la proteína, llevando a la apertura de un canal iónico, selectivo para cationes, que modifican el potencial eléctrico de la membrana plasmática y generan la respuesta.

Cada una de las subunidades que forman estos receptores es producto de un gen diferente, pero la alta homología de sus secuencias sugiere un origen filogenético común a partir de un único gen ancestral que codificó un receptor homo-oligomérico. Una explicación posible es que este gen podría haberse multiplicado dando lugar a los distintos tipos de subunidades que forman los receptores de acetilcolina actuales.

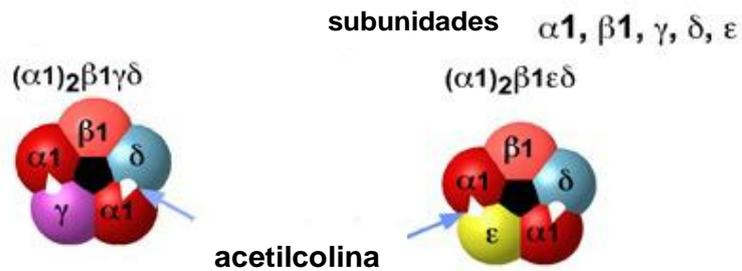
El 18 % de la secuencia de aminoácidos es idéntica para todas las subunidades y la mayoría de estos genes se encuentran muy cerca uno del otro, en el mapa cromosómico de los vertebrados (Ortells and Lunt, 1995).

De acuerdo con su ubicación anatómica, los receptores nicotínicos se clasifican en dos grandes grupos: los receptores de tipo neural, que están presentes en las sinapsis del SNC, y los de tipo muscular en la UNM del sistema periférico.

De los AChRs neuronales se han identificado 17 genes que codifican diferentes subunidades. Se conocen al presente desde $\alpha 2$ a $\alpha 10$ y de $\beta 2$ a $\beta 4$. Las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ son predominantes en el cerebro, el subtipo $\alpha 4\beta 2$ representa el 90% de los receptores cerebrales. Se los agrupa en dos categorías, de alta afinidad (nM) como el $\alpha 7$, homopentamérico y los de baja afinidad (μ M). Las combinaciones de las subunidades

producen múltiples subtipos de AChR, que manifiestan diferentes propiedades funcionales. A pesar de estas diferencias, todos los miembros de la familia mantienen cierta uniformidad estructural consistente en la unión no covalente de subunidades homólogas que respetan un esquema pentamérico, muy primitivo, tal como se esquematiza en la Figura 2.

Receptores musculares



Receptores neuronales

subunidades : $\alpha 7$

$(\alpha 7)_5$



subunidades : $\alpha 2-\alpha 6, \beta 2-\beta 4$

$(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$



$(\alpha 4)_2(\beta 2)_2\alpha 5$



$(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$



$(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$



$(\alpha 3)_2\beta 2\beta 4\alpha 5$



$(\alpha 3)_2(\beta 4)_2\alpha 5$



Figura 2. Receptores de acetilcolina nicotínicos. Tomado y modificado de Lindstrom J.M., 2000).

Cada subtipo de AChR presenta una distribución regional, celular y subcelular diferente, lo cual podría contribuir a explicar su variada participación en distintos procesos fisiológicos y patológicos como: contracción muscular, memoria, atención, aprendizaje, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, ansiedad y depresión, entre otros.

El receptor de acetilcolina nicotínico muscular

El receptor colinérgico nicotínico periférico (AChR) es una fosfoglicoproteína de ~290 KDa y ~2.380 amino ácidos, ubicada en la membrana plasmática de la célula muscular en la sinapsis (Reynolds and Karlin, 1978; Lindstrom et al., 1979). Está compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas diferentes con estequiometría pentamérica. Las cinco subunidades se disponen de forma pseudosimétrica alrededor de un eje central, donde se ubica la depresión que corresponde al poro del canal, esquemáticamente representado en la Figura 3.

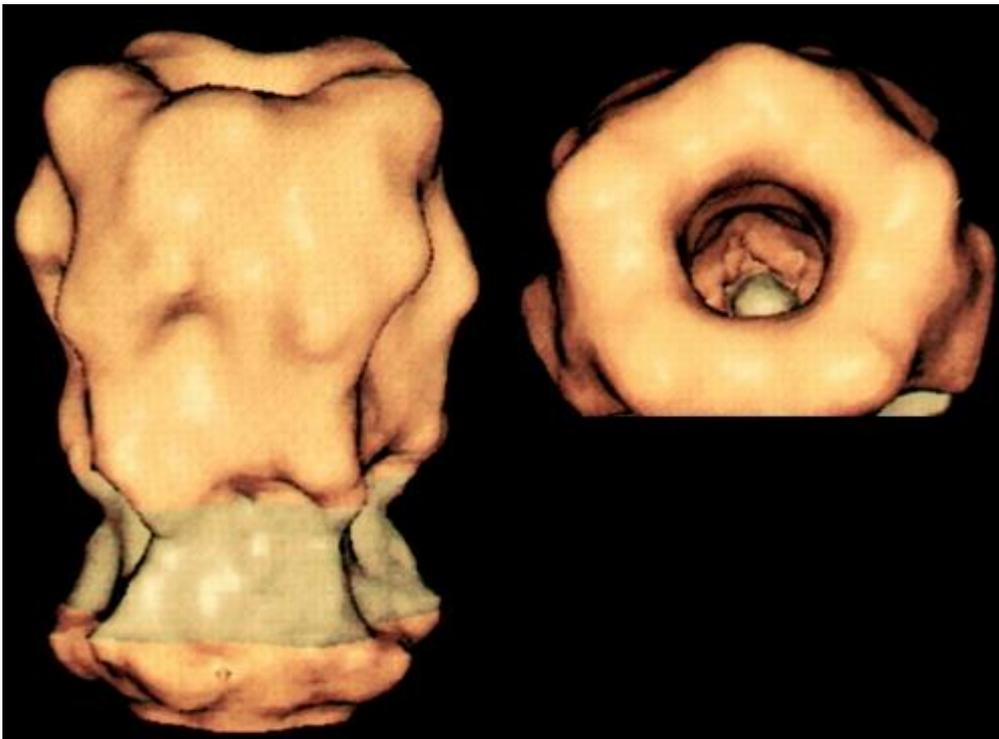
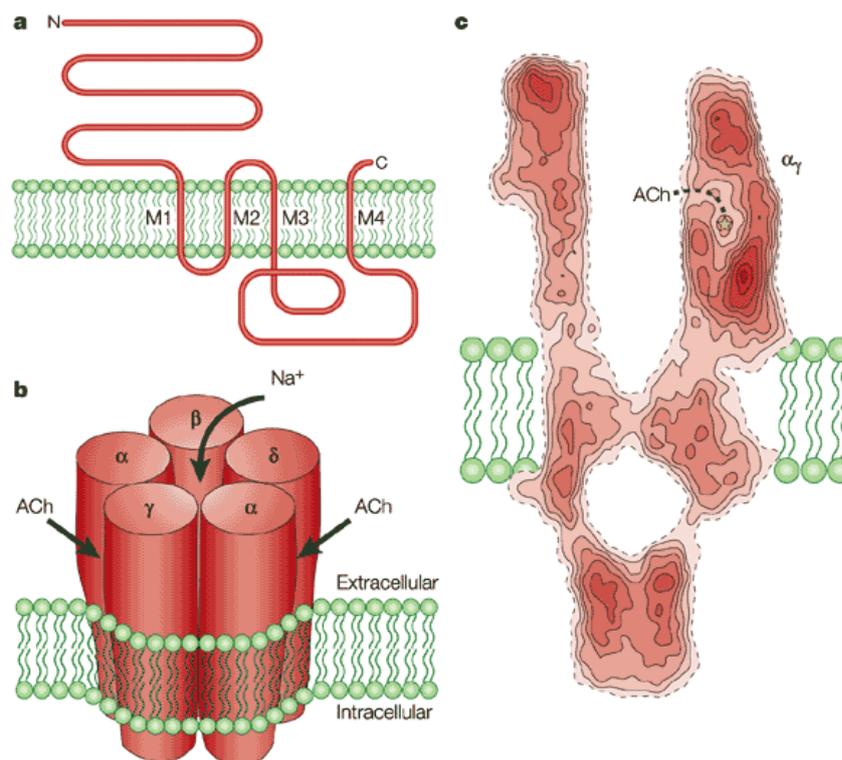


Figura 3. Representación del AChR de torpedo en 3D. Imágen obtenida de T. Green, S.F. Heinemann & J.F. Gusella, 1998. "Molecular Neurobiology and Genetics: Investigation of Neural Function and Dysfunction".

En electrocitos de peces eléctricos y en el estado embrionario el pentámero está formado por cinco subunidades, en estequiometría $\alpha_2\beta\gamma\delta$. En el estado adulto desaparece la subunidad γ y es reemplazada por la subunidad ϵ , manteniendo la misma estequiometría pero con diferencias notorias en los parámetros eléctricos del canal.

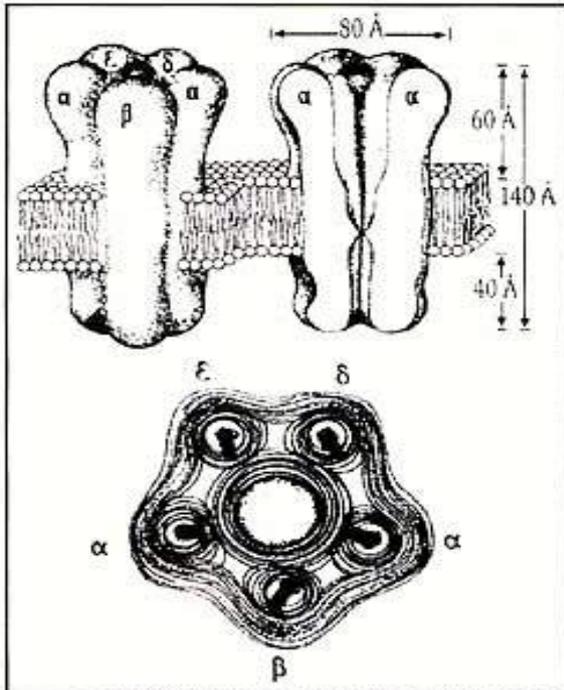
Cada subunidad consta de un dominio N-terminal extracelular seguido de tres segmentos hidrofóbicos transmembranáceos (M1, M2, M3) unidos por segmentos hidrofílicos cortos. Luego del segmento M3, continúa un largo segmento intracelular que contiene todos los sitios de fosforilación y una región con la periodicidad estructural característica de una hélice α (HA) que participa en mecanismos regulatorios y de transducción de señales. Este largo segmento citoplasmático se introduce nuevamente en la membrana a través de la cuarta y última porción transmembranal (M4), finalizando con un segmento C-terminal corto y orientado hacia el espacio sináptico (Huganir, 1987) (ver Figura 3).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 3. Estructura del AChR. a) Esquema descriptivo de los dominios proteicos de las subunidades del AChR. b) Representación gráfica del complejo señalando dominios funcionales. c) Estructura del AChR involucrada en el mecanismo de gatillado del poro. Tomado de Miyazawa y col., (2003).

Las primeras imágenes de la estructura espacial del AChR se obtuvieron por criomicroscopía electrónica usando órganos eléctricos de *Torpedo marmorata* (Cartaud et al., 1973). Utilizando preparaciones de membranas postsinápticas de electrocitos, este grupo de investigación obtuvo cristales de estructuras tubulares planas que contenían al receptor altamente empaquetado con las moléculas lipídicas, tal como se encuentran en el tejido vivo. Con una capacidad resolutive de 22 Å y 18 Å, las imágenes mostraron una proteína de forma cilíndrica que atraviesa perpendicularmente la membrana plasmática (Brisson and Unwin, 1984; Mitra et al., 1989; Kistler and Stroud, 1981)



Gran parte de la molécula, ~65 Å, protruye hacia el espacio sináptico, una pequeña porción de ~15 Å emerge al interior de la célula en forma de cono invertido y el resto de la proteína, aproximadamente el 30%, está inserta en la membrana.

Visto desde el espacio sináptico, el receptor tiene forma de una rosquilla de 80 Å de diámetro con una depresión central de alrededor de 30 Å, que constituye el poro del canal (Miyazawa et al., 2003).

El mayor esfuerzo de los grupos de trabajo dedicados al estudio del AChR en la placa neuromuscular, se concentró

fundamentalmente en la descripción de la estructura atómica de regiones con significación funcional.

Estructura del dominio extracelular

La estructura de la porción extracelular del AChR muscular es motivo de estudio desde hace más de una década. Esta parte de la proteína es responsable de iniciar la respuesta biológica porque posee el dominio hidrofílico especializado en la unión al ligando y a una gran cantidad de agonistas y antagonistas competitivos (Sine, 2002). Es el blanco de drogas usadas en la clínica para patologías relacionadas con la funcionalidad del receptor y presumiblemente, el lugar donde se ubican las estructuras moleculares que traducen la unión de ACh en la apertura del canal y el paso de iones. Está formada, principalmente, por la contribución de la región N-terminal de las cinco subunidades dispuestas en forma de rosca alrededor de un eje central, perpendicular a la membrana

(Montal and Opella, 2002). Es la única porción de la molécula que sufre glicosilación post-transduccional.

Experimentos realizados con ligandos fotoactivables confirmaron que el dominio de unión está ubicado en la subunidad α (Weiland et al., 1979; Reiter et al., 1972) y que son necesarias dos moléculas de ACh unidas al complejo glicoproteico para inducir el cambio estructural que desencadena la respuesta (Grosman et al., 2000).

La microsecuenciación de la porción N-terminal de las distintas subunidades en *T. californica* y el posterior clonado y secuenciación de los genes, que confirmaron la estequiometría $\alpha_2\beta\epsilon\delta$, determinaron la misma secuencia de aminoácidos para las dos subunidades α (Raftery et al., 1980; Claudio et al., 1989; Stroud et al., 1990). Estudios de unión con antagonistas competitivos, como el curare (Sine and Taylor, 1981), y ensayos de expresión heteróloga en *Xenopus laevis* que modifican la estequiometría de las subunidades, confirmaron que los sitios de unión ubicados en la subunidad α , no son equivalentes. Uno está localizado en la interface α/ϵ y el otro en la interface α/δ (Miyazawa et al., 1999).

Las imágenes de crio-microscopía electrónica con una resolución de 9 Å, realizada con preparaciones de electrocitos de *T. marmorata*, revelaron una mayor densidad electrónica en zonas cercanas a los sitios que unen ACh (Unwin, 1993). Estas imágenes se ubican en la parte media de la porción extracelular, que posee un tamaño aproximado de 20 Å de ancho y 65 Å de longitud. En gran parte de este dominio se observaron pequeñas estructuras cilíndricas que fueron propuestas como estructuras de α -hélice. Cuando la microscopía permitió una resolución de 4 Å, resultaron ser hebras de lámina plegada β (Miyazawa et al., 1999). De esta manera, la estructura secundaria de cada monómero en la porción extracelular estaría compuesta básicamente por tres giros de una α -hélice en el extremo N-terminal seguido por 10 estructuras cilíndricas conectadas por pequeños “loops”, a manera de “sándwich”, de lámina plegada β .

Todos los ensayos experimentales ubicaron en esta porción de la proteína cercana al extremo N-terminal, a los dos residuos cisteína adyacentes que forman el puente disulfuro (*cis-loop*) característico de todos los miembros de la superfamilia de receptores que constituyen canales iónicos activados por ligandos (LGIC). Esta estructura particular está involucrada en la unión a agonistas y antagonistas competitivos y caracteriza a las subunidades de tipo “ α ”. Las subunidades que no tienen esta particularidad se denominan “no- α ”.

El verdadero salto cuántico en el conocimiento de la estructura de la porción extracelular del receptor se logró mediante la cristalización de una proteína soluble, extraída de serpientes, capaz de unir acetilcolina (AChBP). Esta proteína posee alta

homología con la porción extracelular del AChR, un arreglo pentamérico similar, con una identidad de secuencias del 24%, pero no posee un canal central. El análisis estructural de AChBP cristalizada alcanzó una resolución atómica de 2,7 Å. El modelo permitió una descripción detallada del sitio de unión al agonista, que pudo ser trasladada a otros receptores *Cys-loop* (Brejc et al., 2001) (Figura 5).

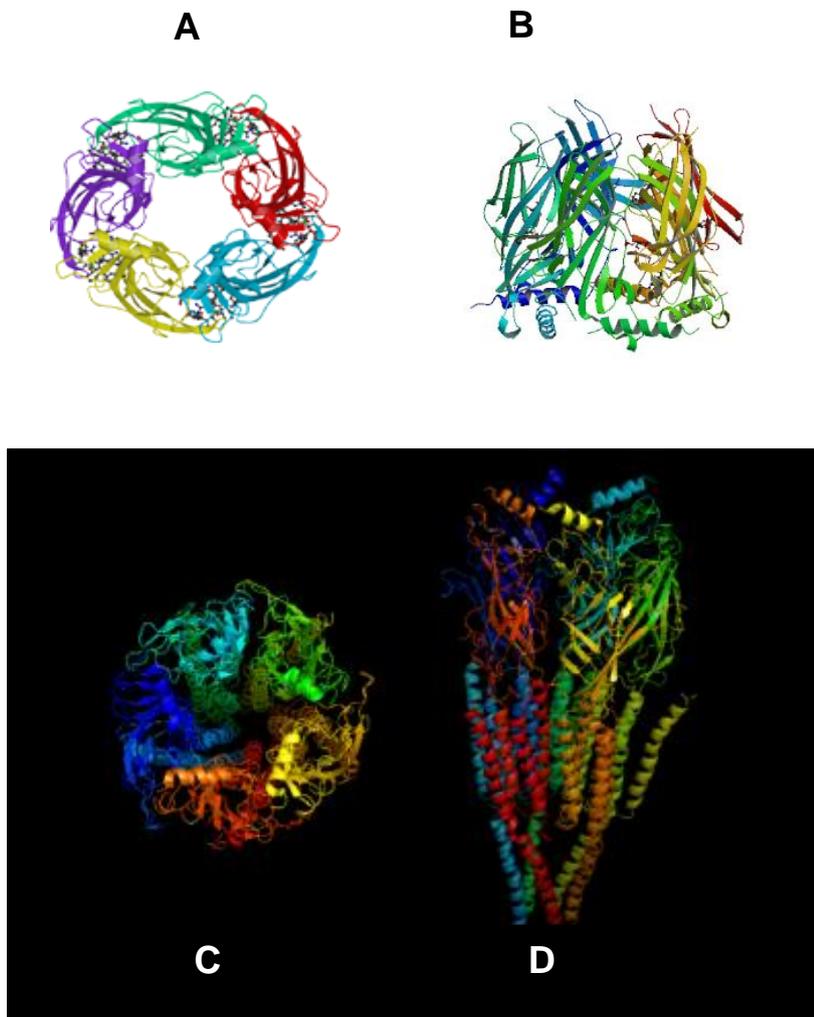


Figura 5. Estructura de Rayos X de la AChBP y del AChR. A) Vista superior de la AChBP con carbamilcolina a 2.5 Å de resolución (Celie, P.H.N.; 2004). B) Vista lateral de la AChBP unida a α -conotoxina, a 2.07 Å de resolución (Hansen, S.B.; 2004). C) Vista superior del AChR. D) Vista lateral del AChR a 4 Å de resolución (Unwin, 2005).

Recientemente se cristalizó el dominio extracelular de la subunidad α de ratón unida a α -bungarotoxina, y mediante difracción de rayos X se resolvió la estructura con una resolución de 1.94 Å. El análisis reveló detalles estructurales de elementos de importancia funcional, tales como el segmento inmunogénico (MIR), ubicado en el segmento N-terminal,

el sitio de unión del ligando y el enlace disulfuro de cisteínas adyacentes. Con estos resultados fue posible discernir las coincidencias y las diferencias de la subunidad de ratón con la AChBP. En este modelo, se observó por primera vez el carbohidrato unido y su participación directa en la unión a la toxina y en la apertura del canal (Dellisanti et al., 2007).

Más reciente aun ha sido la obtención de la imagen estructural por rayos X de una proteína homóloga del AChR aislada de un procarionota, la bacteria *Erwinia chrysanthem*, con una resolución atómica de 3.3 Å. Esta proteína evidencia un 16% de identidad con la secuencia de la subunidad α de eucariotas y una gran similitud con los demás miembros de la familia. Los resultados presentados constituyen la primera descripción detallada de un LGIC y los primeros datos obtenidos con un modelo de proteína de membrana. El análisis del modelo brindó más detalles de la estructura y de los mecanismos moleculares que maniobran la apertura del canal y la permeabilidad de los iones (Hilf and Dutzler, 2008).

Estructura del canal

La estructura del canal iónico ha sido determinada por estudios combinados de mutaciones puntuales y técnicas electrofisiológicas. La marcación por fotoafinidad de moléculas bloqueadoras, no competitivas, demostró que la pared del canal está formada por estructuras con periodicidad de hélice α , de los cinco segmentos M2 (Edelstein and Changeux, 1998a). La presencia de una secuencia altamente conservada y su carácter anfipático corroboran esta afirmación (Montal and Opella, 2002).

En principio, fueron descritos tres anillos con carga negativa, dos cercanos a la región citoplasmática y un tercero en la región extracelular (Figura 6). Posteriormente se señaló que la compuerta del canal estaría formada por uno ó dos anillos de cadenas laterales ubicados a lo ancho del poro y a la altura de la mitad de la bicapa lipídica (Miyazawa et al., 1999). Allí dos residuos (α L251 y α V255) producen una gran estrechez del poro que no permite el pasaje de iones (Miyazawa et al., 2003).

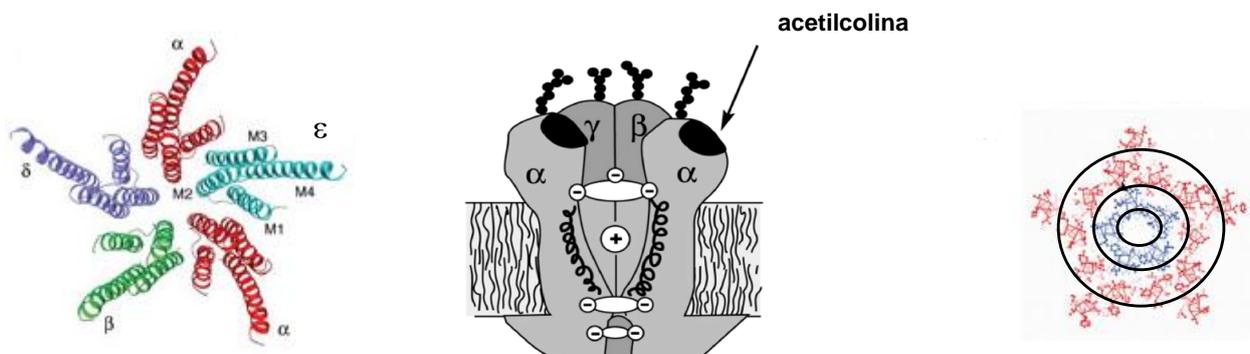


Figura 6. Estructura del poro del canal iónico del AChR. Tomado y modificado de Miyazawa, et al., 2003.

Estados funcionales del AChR

El AChR es una proteína alostérica. La unión reversible del ligando determina la existencia de al menos tres estados funcionales interconvertibles (Edelstein and Changeux, 1998b; Corringer et al., 2000). En ausencia del neurotransmisor el canal iónico permanece cerrado y presenta muy baja afinidad para agonistas. En esta situación se dice que el receptor está en estado de **reposo**. Después de la unión del ligando, en el término de microsegundos, el receptor adquiere el estado **activado**. En este estado conformacional la proteína tiene alta afinidad por agonistas y el canal está abierto, permitiendo el pasaje de cationes y la depolarización de la membrana.

A altas concentraciones de agonista y cuando esta condición perdura en el tiempo, el receptor adopta el estado **desensibilizado**. Este estado se logra a través de dos fases de transición, una fase rápida y una fase lenta. Algunos autores consideran estas dos fases de transición como estados funcionales diferentes y por esa razón, definen cuatro estados funcionales del AChR (Karlin, 2002).

El estado desensibilizado corresponde a una configuración de canal cerrado en presencia del agonista. Su rol funcional es incierto y al igual que el estado abierto presenta muy poca estabilidad (Akabas et al., 1994; Sakmann et al., 1980; Grosman and Auerbach, 2001). El estado de reposo, en cambio, tiene baja afinidad por ACh y el mayor grado de estabilidad (Figura 7).

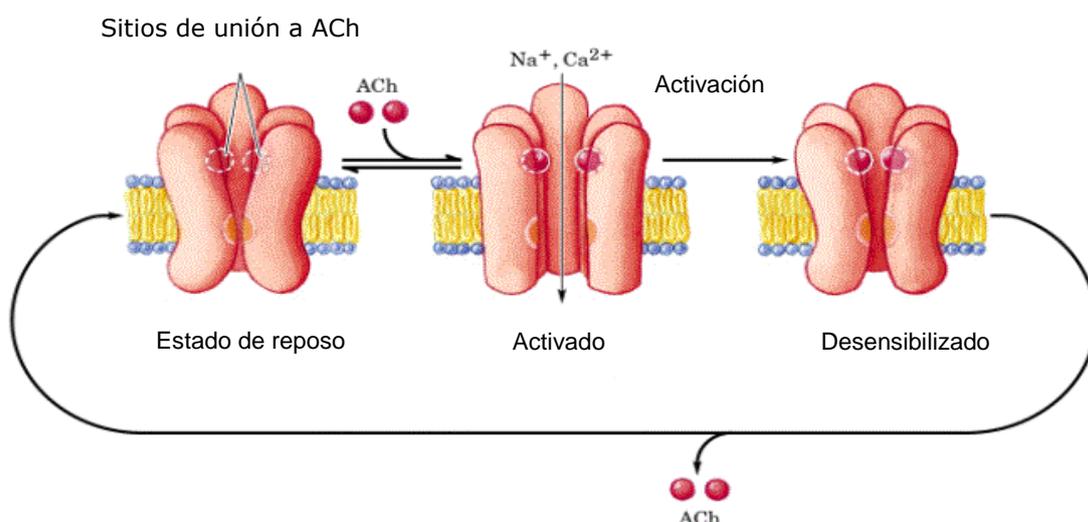


Figura 7. Estados funcionales del AChR. Tomado y modificado de "www.responsabilidadpsiquiatrica.info/images/g..."

El mecanismo de activación del canal no ha sido totalmente dilucidado hasta el momento. Sin embargo, hay evidencia de que la unión del ligando inicia una serie de cambios conformacionales que culminan con la apertura del canal y el pasaje de iones. La microscopía electrónica permitió captar imágenes del AChR en sus estados abierto y cerrado. El procedimiento consistió en un congelamiento rápido del tejido en presencia y en ausencia de ACh durante alrededor de 5 ms. Se comprobó de esta manera, que en el estado cerrado, las subunidades denominadas α tienen una conformación diferente de las denominadas no- α .

Para comprender las bases físicas del cambio estructural que sufre el receptor a partir de la unión al ligando, es necesario lograr la estructura cristalina de la proteína para ubicar correctamente cada uno de los residuos aminoacídicos que participan. En 2003, cuando Unwin y su grupo lograron capturar imágenes del receptor con una resolución de 4 Å, proporcionaron la descripción detallada de la molécula en el estado de canal cerrado. A pesar de ello, aún no se ha logrado determinar con exactitud, los residuos proteicos y/o unidades estructurales que participan en los mecanismos moleculares asociados a la apertura del canal en presencia del agonista.

Al presente, los resultados experimentales apoyan la presunción de que las transiciones de un estado funcional a otro son causa de cambios conformacionales de la proteína. De hecho, según se deduce del análisis de imágenes, la compuerta del canal difiere estructuralmente entre los estados cerrado y desensibilizado (Hilf and Dutzler, 2008).

La cristalización de la AChBP permitió comparar detalles estructurales del protómero en presencia de agonistas, con la subunidad α del AChR en el estado cerrado. Los resultados demostraron un movimiento rotacional de la subunidad α , el cual permite el acercamiento de los aminoácidos ubicados en el sitio de unión al agonista en el estado abierto y que se encontrarían alejados en el estado cerrado (Brejc et al., 2001; Miyazawa et al., 2003).

Estructura del dominio hidrofóbico

Las subunidades del receptor muestran un alto porcentaje de homología en su secuencia. En todas ellas se encuentran cuatro regiones bien definidas con residuos altamente hidrofóbicos que constituyen los elementos integrales de membrana denominados M1, M2, M3 y M4, ya mencionados. La topología de cada segmento es, en cambio, muy disímil y fue determinada por técnicas de marcación con sondas fluorescentes, mutagénesis, derivatización química y microscopía electrónica.

Los residuos ubicados de cara al canal y lejos del interior de la proteína en contacto con la membrana, se determinaron por estudios de accesibilidad a cisteínas sustituidas y marcación con compuestos solubles en agua. Según estos resultados, el segmento M2 de cada subunidad forma las paredes del canal y tiene un mínimo contacto con el resto de las subunidades. Los experimentos de marcación de α Leu288 mostraron la vecindad de M2 con M1 y la participación de este último en la estructura de la porción extracelular del poro (Zhang and Karlin, 1997; Wilson and Karlin, 1998 ; Miyazawa et al., 2003).

Reactivos lipofílicos fotoactivables marcaron las subunidades del receptor en los segmentos M1, M3 y M4, demostrando una ubicación cercana a los lípidos (Blanton and Cohen, 1992; Blanton et al., 1994; Blanton et al., 1998; Blanton et al., 1999). Por otro lado, datos experimentales de marcación por afinidad, en concordancia con todos los demás resultados experimentales obtenidos, demostraron que el segmento M4 es el más hidrofóbico, el menos conservado evolutivamente y por estar ubicado en la parte más externa, es el que posee mayor interacción con los lípidos de la membrana. La estructura secundaria de la porción hidrofóbica del receptor fue un tema controversial por mucho tiempo. Actualmente existe un acuerdo generalizado de que los cuatro segmentos transmembrana poseen estructura de α hélice (Noda et al., 1983 ; Finer-Moore and Stroud, 1984).

Interfase lípido-proteína

Por tratarse de una proteína alostérica que posee el 30% de su masa inmersa en la membrana plasmática, el AChR tiene un entorno lipídico que sería el responsable de proporcionarle la fluidez necesaria para que se produzcan los cambios conformacionales asociados a sus diferentes estados: abierto, cerrado y desensibilizado (Changeux et al., 1996).

Sabemos que la funcionalidad del canal está influenciada por múltiples factores de carácter físico, químico y biológico tales como: la composición y calidad iónica de las soluciones a ambos lados de la membrana, el voltaje al cual ésta es sometida, la temperatura de la reacción y el microambiente lipídico en el que se encuentra inserta la proteína. Por lo tanto, la contribución de las especies lipídicas en contacto con el receptor parece ser esencial para su correcto funcionamiento. De acuerdo con esta hipótesis, surge el interés de varios grupos de investigación por el análisis de la interfase lípido-proteína para determinar las relaciones funcionales entre el segmento proteico y los lípidos que lo circundan (Barrantes, 2003; Barrantes, 2004; Barrantes, 2007). Las primeras evidencias experimentales de la relación entre el AChR y los lípidos de la membrana fueron proporcionadas por Marsh y Barrantes (Marsh and Barrantes, 1978; Marsh et al., 1981).

Mediante estudios de resonancia de *spin* electrónico (ESR) en fracciones de membranas de órgano eléctrico de *T. marmorata* enriquecidas en AChR, se determinó una limitación en el desplazamiento de una capa de lípidos (ácidos grasos, androstanol y fosfolípidos) ubicados en su entorno inmediato (Marsh and Barrantes, 1978; Marsh et al., 1981; Criado et al., 1982b). Por medio de la misma técnica, fue posible determinar un mínimo de ~45 moléculas lipídicas en contacto directo con el pentámero y una asociación preferencial con esteroides, ácido fosfatídico (PA) y ácidos grasos (Marsh et al., 1981).

Con el aislamiento de la proteína oligomérica purificada a partir de estas preparaciones de membrana, se constató el número aproximado de fosfolípidos que co-purifican con ella, la rodean y están en íntimo contacto (“*ánulo*”). Estos resultados permitieron confirmar la relación funcional entre ambas entidades moleculares y su vinculación física (Figura 8).

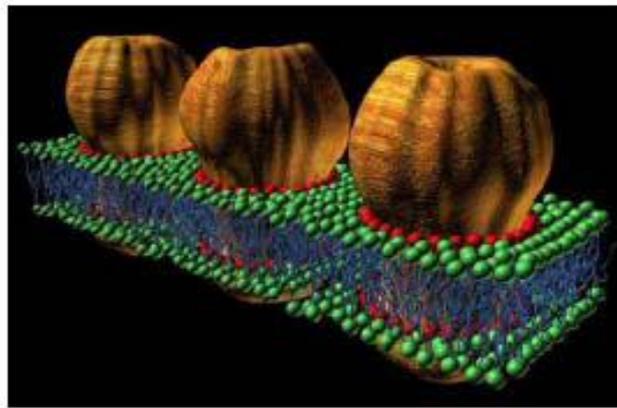


Figura 8. Diagrama que representa al AChR en la membrana postsináptica rodeado del cinturón de lípidos anulares (esferas rojas) y el resto de los lípidos de la bicapa (esferas verdes). Obtenido de “Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function”.Barrantes F.J., 2004

Siguiendo la cinética del receptor a través de los diferentes estados de transición inducidos por el agonista, se determinó que los cambios en la composición lipídica de la membrana disminuyen su funcionalidad y que en presencia de colesterol o análogos de colesterol se logra un correcto funcionamiento (Sunshine and McNamee, 1992). Estudios posteriores revelaron, además, la existencia de una distribución asimétrica de los componentes lipídicos entre ambas hemicapas y en el plano horizontal de la membrana (Barrantes, 1993b).

En nuestro grupo de trabajo se determinó que en la hemicapa externa, de cara al espacio sináptico, hay un porcentaje mayor de fosfatidilcolina (PC) y de esfingomiélin (SM). Fosfatidiletanolamina (PE) y más de la mitad de la fosfatidilserina (PS) se encuentran en la hemicapa interna (Bonini, I et al., 1990; Marsh, 2001; Marsh, 1978; Marsh et al., 1981).

De acuerdo con estos resultados, la funcionalidad del AChR parece depender más de la composición lipídica que del estado de fluidez de la membrana (Ellena et al., 1983).

Para su correcto funcionamiento el AChR requiere de la presencia, en su microentorno, de colesterol y de fosfolípidos de carga negativa (por ejemplo, PA o PS) (Fong and McNamee, 1986). Diferentes grupos de investigación coinciden en que es necesaria la presencia de colesterol y de fosfolípidos del tipo del ácido fosfatídico (PA) en el proceso de purificación de la proteína receptora, para conservar la función de translocación de iones y las propiedades de unión del ligando. Sin embargo, algunos autores discrepan en la existencia de sitios de unión no anulares, de colesterol y de ácidos grasos, en los que estarían excluidos los fosfolípidos (Jones et al., 1988a).

Por otra parte, según Criado y colaboradores, el paso de cationes a través del poro del canal y el cambio conformacional del estado de reposo al desensibilizado, guarda estrecha relación estructural con el colesterol y los fosfolípidos cargados negativamente (Criado et al., 1982b; Criado et al., 1984; Ochoa et al., 1983b; Fong and McNamee, 1986; Jones et al., 1988b; Ochoa et al., 1983a; Baenziger et al., 1992). El colesterol ejerce su efecto modificando la fluidez de la membrana, sin embargo, la presencia de lípidos aniónicos parece ser necesaria para hacer posible el pasaje del estado de reposo al desensibilizado (Baenziger et al., 1992). Otros resultados indican que además de la función estabilizadora de PC en la membrana, el colesterol y el PA facilitan el pasaje al estado de reposo (Baenziger et al., 1992). Por otro lado, sin colesterol el receptor se estabiliza en el estado cerrado y sólo adquiere la capacidad para pasar al estado activado por agregado del lípido al sistema (Baenziger et al., 1992; Rankin et al., 1998). El estado físico de la membrana incide, sin dudas, en forma directa en los estados funcionales del receptor.

Los sitios de acción moduladora de los lípidos han sido ubicados en los segmentos hidrofóbicos, α M1, α M4 y γ M4. Según mencionáramos anteriormente, de acuerdo con los patrones de hidrofobicidad y el grado de marcación con sondas hidrofóbicas, el segmento M4 es el que tiene la mayor probabilidad de estar en contacto directo con los lípidos de la bicapa (Blanton and Cohen, 1992; Baenziger et al., 1992; Blanton et al., 1994; Rankin et al., 1998; Barrantes, 1993b; Barrantes, 1993a). De hecho, mutaciones puntuales en α M4 modifican el efecto modulador del colesterol (Santiago et al., 2001).

Hay una gran variedad de sustancias que actúan a nivel de la interfase lípido-proteica, con capacidad para modificar y regular la funcionalidad del canal tales como alcoholes, anestésicos generales, ácidos grasos libres y glucocorticoides.

En ensayos realizados con sistemas reconstituídos se observó que los ácidos grasos tienen un sitio de acción que se superpone con el colesterol y los fosfolípidos (Antollini and Barrantes, 1998). Utilizando la técnica de *patch-clamp* en la línea celular de expresión

endógena BC3H-1, se demostró la importancia del efecto modulador de los ácidos grasos en los parámetros electrofisiológicos del canal (Bouzat and Barrantes, 1993b). Estudios basados en el desplazamiento de una sonda hidrofóbica marcada sugirieron la acción de los ácidos grasos en la interface lípido-proteica por desplazamiento de los lípidos anulares (Antollini and Barrantes, 2002). Ciertos ácidos grasos tienen la capacidad de unirse covalentemente a las subunidades aisladas del AChR. Esto sugiere también una activa participación en el proceso de ensamblado y expresión del receptor en superficie (Olson et al., 1984).

Además de los ácidos grasos, otras sustancias hidrofóbicas modifican la actividad del receptor. Es importante destacar los resultados de nuestro grupo en el análisis de la acción moduladora de los esteroides en sistemas celulares de expresión transiente (Bouzat and Barrantes, 1993a; Bouzat and Barrantes, 1996). Estos estudios indican que estas moléculas hidrofóbicas parecen actuar en zonas en las que el AChR está en contacto directo con los lípidos. Por otro lado, todos los datos experimentales indican que las propiedades de los lípidos modifican las propiedades estructurales y funcionales del receptor (Ortells et al., 1992), lo cual pone de manifiesto, la importancia de su caracterización y la determinación del rol que desempeñan.

En nuestro laboratorio, la línea de trabajo se centró particularmente en el desarrollo de modelos y condiciones experimentales adecuados para desentrañar el efecto que determinadas especies lipídicas estarían ejerciendo sobre la presencia, la estructura y la funcionalidad del AChR en la membrana. Es por ello que se ha propuesto un tercer dominio funcional, con igual jerarquía a los anteriores, formado por la extensa superficie de contacto que existe entre la proteína y los lípidos (Barrantes, 2001; Barrantes, 2002; Barrantes, 2003a; Barrantes, 2003b). A pesar de la gran cantidad de resultados obtenidos, los mecanismos moleculares por los cuales los lípidos ejercen su efecto sobre el receptor no están aún totalmente esclarecidos.

Los primeros estudios bioquímicos y los principales avances en la resolución de la estructura y función del AChR se realizaron en una de las fuentes naturales más ricas, como es el órgano eléctrico de peces de la familia Torpedinidae, como el *T. marmorata*. Con este modelo experimental se determinaron aspectos de carácter estructural, propiedades de unión al ligando y transiciones conformacionales (Damle and Karlin, 1980; Conti-Tronconi and Raftery, 1982; Bon et al., 1984). Otros aspectos de la bioquímica del receptor deben ser abordados en sistemas funcionalmente completos.

Los estudios preliminares sobre los procesos de síntesis, ensamblado, regulación y flujo de cationes se realizaron en líneas celulares que expresaban la proteína receptora de manera endógena (Blount and Merlie, 1989; Sine and Claudio, 1991b). Cuando se logró aislar y purificar el ARN mensajero, los receptores embrionario y adulto se expresaron por

microinyección en ovocitos de *Xenopus laevis*, y a partir de allí, se obtuvieron los ADNc de las cinco subunidades con las cuales se logró la expresión heteróloga del receptor en células eucariotas.

Si consideramos la importancia de la selectividad y la estequiometría lipídica, en la interacción y en la dinámica de la proteína desde su síntesis en el retículo endoplásmico (RE) hasta su destino final en la sinapsis, tenemos que destacar la participación de mecanismos fundamentales como la inserción vectorial, el ensamblado y montaje del pentámero, el tráfico y la estabilización de la proteína, la regulación de su vida media en la membrana por procesos de internalización y el catabolismo. Todos son procesos en los cuales los lípidos participan activamente. Estos aspectos no pueden ser estudiados en sistemas artificiales reconstituídos y requieren ser abordados en sistemas funcionalmente completos.

Objetivos

El objetivo de esta tesis fue establecer un modelo celular para estudiar y definir el efecto de las interacciones lípido-proteicas del receptor nicotínico colinérgico muscular de ratón. Para tal fin, se requería contar con una célula funcionando a modo de tubo de ensayo para evitar los modelos artificiales puros con membranas reconstituídas. Con este propósito, utilizamos líneas celulares eucariotas para inducir la expresión heteróloga permanente del receptor y modificar en ellas, el contenido lipídico.

En el primer capítulo describimos tres líneas celulares con capacidad para la expresión heteróloga y estable del AChR. Estas son: un sistema celular de referencia en una línea salvaje y dos modelos creados con líneas celulares mutantes, deficientes en el metabolismo lipídico. Se eligió como línea celular salvaje a la línea celular CHO-K1 derivada de ovario de *hamster* chino por la factibilidad de expresar en ella el receptor de manera estable (Forsayeth et al., 1990b), y porque se disponía de información experimental acerca de su metabolismo y contenido de lípidos.

Transfectamos cultivos de CHO-K1 con las cuatro subunidades del receptor, seleccionamos los clones positivos con el antibiótico de selección y de cada uno de ellos aislamos el ARN total para la determinación cualitativa de la expresión por RT-PCR. En cada uno de los clones positivos para el ensayo de RT-PCR, se realizaron ensayos de unión con [¹²⁵I]α-bungarotoxina ([¹²⁵I]α-BTX), un radioligando específico. De esta manera, se cuantificó en cada uno el total de la proteína expresada, la fracción de receptores que alcanzan la membrana plasmática y la vida media del receptor en superficie. Además, se determinaron el perfil farmacológico del receptor por cinéticas de asociación y disociación con diferentes ligandos y los parámetros electrofisiológicos del canal por la técnica de *patch-clamp*. De esta forma, se logró obtener y caracterizar una línea celular que expresaba en forma heteróloga al AChR y que posteriormente fue utilizada como sistema control.

Para los modelos experimentales deficientes en el metabolismo lipídico, utilizamos dos líneas celulares mutantes, derivadas de CHO-K1. En ambas, la mutación que poseen afecta a proteínas reguladoras de vías metabólicas que modifican el contenido endógeno de esfingomielina (SM) y fosfatidilserina (PS), respectivamente.

En primer término, utilizamos una línea celular mutante denominada SPB-1 que expresa una inhibición dependiente de la temperatura de la enzima serina palmitoil transferasa (SPT), clave en la vía de síntesis de esfingolípidos (Hanada et al., 1990). A temperaturas de cultivo entre 33 °C y 37 °C la actividad de la enzima disminuye a niveles que representan tan sólo del 4 al 8% de la actividad normal, lo cual permite llevar los niveles celulares de esfingomielina y gangliósidos como el GM3 a valores menores del 1% de los valores controles. Este modelo nos permitió caracterizar la participación activa de la

esfingomielina en los mecanismos que regulan el tráfico del receptor desde su síntesis hasta la llegada a la membrana plasmática. Sin embargo, no encontramos diferencias en los parámetros electrofisiológicos y en las propiedades farmacológicas del AChR en este sistema celular con respecto al modelo de referencia.

En segundo término, utilizamos otra línea derivada de CHO-K1, auxotrófica, llamada PSA-3, que requiere de PS exógena para su normal crecimiento ya que posee una alteración en una de las enzimas que catalizan la síntesis por intercambio de bases de los fosfolípidos con serina, lo que la hace incapaz de realizar normalmente la síntesis de PS. La línea fue aislada y caracterizada por Kuge y col. (Kuge et al., 1986b; Kuge et al., 1986a)

Ambas líneas celulares se utilizaron (a manera de tubo de ensayo) para explorar experimentalmente el efecto producido por la carencia específica de un determinado tipo de lípido en el comportamiento del receptor. Del mismo modo que la línea control, las mutantes fueron modificadas genéticamente por co-transfección del ADNc de las cuatro subunidades y expresan heterológamente y en forma estable el AChR de ratón.

En el segundo capítulo de esta tesis se presentan estudios realizados con el propósito de dilucidar el rol que poseen los aminoácidos que están ubicados de cara a la membrana en íntimo contacto con los lípidos. Elegimos para ello residuos cargados situados en los extremos del segmento M4, el más hidrofóbico, de la subunidad α . Creamos sistemas celulares con una estrategia diferente. Modificamos la estructura primaria de la proteína receptora generando mutaciones simples y múltiples en residuos ubicados en los extremos del segmento α M4, a la altura de las cabezas polares de los fosfolípidos. Introdujimos la proteína receptora por co-transfección de la subunidad α mutada con el resto de las subunidades, en la versión salvaje, en la línea celular normal CHO-K1.

Siguiendo la misma estrategia descrita en el capítulo anterior logramos seleccionar cinco líneas clonales mutantes. Cada clon, con metabolismo lipídico normal, nos permitió no sólo realizar estudios sobre la magnitud de la expresión del receptor mutado sino también determinar los cambios estructurales y funcionales que se producen cuando estos residuos no participan en la estructura.

Materiales y Métodos

1.0 Marcación de proteínas con [³⁵S] metionina

Para determinar el perfil proteico diferencial de las nuevas líneas celulares se realizó una marcación metabólica de proteínas por incorporación de aminoácidos radiactivos en el proceso de síntesis. Las líneas celulares establecidas y los controles se cultivaron en placas de 100 mm hasta un 70% de confluencia. Antes del inicio de la marcación se lavaron con CMF y se incubaron en medio DME sin metionina durante 30 minutos. Luego se agregó [³⁵S] metionina (100 μ Ci /ml) y se incubaron cuatro horas más. Se lavaron nuevamente con PBS para eliminar la radioactividad no incorporada, se rasparon y colectaron en un tubo y se congelaron a -70°C.

Para someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970), se descongelaron en una solución (*buffer*) de lisis: (Tris-HCl 50 mM pH 5.2, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM EGTA 5 mM, PMSF 200 μ M) 1ml/10⁷), se mantuvieron en hielo durante 30 minutos con agitación ocasional y se incubaron por 30 minutos más a 37° C. en SDS al 5% (p/v), Tris-HCl 0.5 M. pH 6.8, glicerol al 30%(v/v), 2-mercaptoetanol al 15% y azul de bromo fenol al 0.05% (v/v).

El peso molecular de las proteínas se evaluó por comparación con un estándar de peso molecular. Las subunidades del AChR se determinaron por el análisis de patrones proteicos diferenciales entre células CHO-K1 no transfectadas y los clones que resultaron de la selección, luego del revelado de la placa autorradiográfica.

2.0 Obtención y purificación de ADN

Para la obtención de ADN plasmídico a pequeña y mediana escala siguiendo el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989) se partió de una colonia aislada crecida durante 14-16 horas a 37°C y agitación en 2 ml ó en 50 ml de medio de Luria Bertani (LB) en presencia de ampicilina (50-100 μ g /ml). El sedimento bacteriano obtenido se resuspendió cuidadosamente en una solución tampón: GET (50mM glucosa, 10mM EDTA y 2,5 mM Tris-HCl; pH 7,5) adicionado con lisozima y ARNasa. Se incubó con la solución de lisis (NaOH 0,2 N; SDS 1%) y se precipitó con acetato de potasio 5M. En el sobrenadante recuperado se realizaron dos extracciones, con fenol : cloroformo (1:1) y con cloroformo.

El ADN plasmídico de la fase acuosa se precipitó por el agregado de acetato de sodio 5M y etanol 95% a -20°C. El precipitado de ADN obtenido se lavó con etanol 70%, y previo secado se resuspendió en una solución acuosa de Tris-EDTA (TE) a pH 8,0 del cual se tomaron alícuotas para cuantificar, determinar el grado de pureza y realizar análisis estructurales adicionales con endonucleasas de restricción.

La obtención de ADN plasmídico en gran escala se realizó con el mismo método.

Partiendo de volúmenes de cultivo bacteriano de 150 a 500 ml se obtuvieron rendimientos del orden de los miligramos. El protocolo incluyó, luego de la obtención del primer precipitado de ADN plasmídico, un proceso de purificación por gradientes de cloruro de cesio, obteniéndose plásmidos con un alto grado de pureza.

Además, se obtuvo ADN plasmídico en gran escala mediante el uso del *kit* comercial Wizards™ Maxiprep Plus de Promega en cuyo caso la purificación se realizó por cromatografía de adsorción en columna.

Para cuantificar y evaluar el grado de pureza de los ácidos nucleicos, se usó un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch & Lomb) con lecturas en el ultravioleta. Para la cuantificación se realizaron lecturas a 260 nm de ADN diluído en agua ultra pura y la DO. obtenida se multiplicó por el factor de conversión correspondiente: 50 ng/ μ l. Para determinar la pureza se calculó la relación DO 260 / DO 280 y se usaron sólo aquellas muestras cuyos valores resultaron entre 1.8 y 2.0.

3.0 Obtención de ARN

Para determinar la efectividad de la inserción en el genoma celular y la expresión de las subunidades del receptor a nivel de ARN, los clones seleccionados y establecidos como nuevas líneas, se cultivaron en medio completo en presencia del antibiótico correspondiente para el aislamiento de ARN total.

Los cultivos en placas de 100 mm confluentes tripsinizados se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml y lavaron con PBS por centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos. Se resuspendieron en 500 μ l de isotiocianato de guanidinio, se incubaron durante 15 minutos a 60°C y se agregó igual volumen de fenol saturado en agua y de acetato de sodio/EDTA agitando vigorosamente con vortex. Se continuó la incubación por 10 minutos más y se agitó nuevamente la mezcla por 30 segundos adicionales. Se agregaron 500 μ l de cloroformo, se agitó enérgicamente y luego de una centrifugación breve, la fase acuosa se recuperó en un tubo limpio. Se hicieron dos lavados con 500 μ l de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) y 500 μ l de cloroformo. A la fase acuosa recuperada se le agregaron 50 μ l de acetato de sodio 3M, 2 volúmenes de etanol y se la mantuvo a -20° C varias horas para precipitar el ARN. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se lavó el precipitado con etanol 75%, se secó al aire y se resuspendió con agua ultrapura estéril.

Para la cuantificación se realizaron lecturas a 260 nm. La DO. obtenida se multiplicó por el valor de la dilución realizada y por el factor de conversión correspondiente para ARN: 40 ng/ μ l. El grado de pureza fue calculado por la relación DO 260 / DO 280 nm. La

integridad molecular se controló por electroforesis en geles de agarosa 1%, y los ARN así obtenidos se conservaron a -70°C .

4.0 Transformación bacteriana

Para la introducción de ADN en bacterias, proceso denominado transformación, se utilizó el método de *choque* (shock) térmico en presencia de calcio (Sambrook et al., 1989). Se usaron las cepas de E.coli, NS α F', DH5- α y HB 101 competentes, preparadas en nuestro laboratorio a partir de una suspensión en fase logarítmica de crecimiento, tratada con soluciones de cloruro de calcio. Las bacterias competentes se incubaron con el ADN por 15 minutos, se realizó el *choque* térmico a una temperatura de 42°C por 45 segundos seguido por 5 minutos en hielo y una incubación adicional en medio LB, sin el antibiótico de selección, durante 1 hora.

El aislamiento de colonias se realizó luego de incubar el producto de la transformación en medio sólido (LB/agar, 15 gr/l) en presencia del antibiótico de selección correspondiente en estufa a 37°C durante toda la noche.

En los casos en que la transformación se realizó con plásmidos se usaron $\cong 50\text{ng}$ de ADN en un volumen de bacterias competentes variable entre $50\mu\text{l}$ y $100\mu\text{l}$. Cuando se transformaron bacterias con productos de la reacción de la enzima T4 ADN ligasa generalmente se utilizó la mitad del volumen total de la reacción.

5.0 Transfección de células eucariotas

El ADNc de las subunidades α , β , δ de ratón y la subunidad ϵ proveniente de músculo de diafragma de ratón adulto, fueron cedidas por el Dr. J. Patrick (Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Texas, USA). Las secuencias se insertaron detrás de un promotor SV40 en unidades vectoriales de expresión. Los cuatro plásmidos, fueron ampliados en cepas bacterianas del tipo DH5 α , purificados en gradientes de cloruro de cesio y transfectados en células normales y deficientes.

La introducción de ADN plasmídico en células eucariotas, proceso de transfección, se llevó a cabo mediante diferentes técnicas realizadas sobre líneas celulares establecidas.

El método de fosfato de calcio se desarrolló según el protocolo original de Gaham y van der. Se preparó un fino precipitado de fosfato de calcio con $5\mu\text{g}$ totales de ADN en una mezcla conteniendo los plásmidos pSM α , pSM β , pSM ϵ , pSM δ , y pSV $_2$ Neo (Esquema III y IV), en relación molar 2:1:1:1:0.1, y se esparció sobre un cultivo en placa de 35mm con una confluencia del 70%.

Después de 4-6 horas de contacto con el precipitado las células se sometieron a un *choque* de glicerol por 3 minutos, que permitió aumentar sustancialmente la eficiencia de la transfección.

A las 24 horas el cultivo se levantó con tripsina para diluir las células (1:5) y 24 horas después se inició la selección con el agregado del antibiótico a una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ de G418 en medio de cultivo completo. El medio se cambió cada cuatro días para eliminar las células muertas. En todos los casos entre 10 y 14 días de comenzado el proceso de selección, se registró la aparición de grupos aislados de células resistentes que formaron colonias. Unas pocas células de cada uno de estos grupos o clones se levantaron por acción de la tripsina, con ayuda de cilindros de clonado, se transfirieron a una nueva placa de cultivo y se cultivaron como una línea independiente.

En otros casos, la transfección se realizó por complejos ADN-liposomas con reactivos comerciales como el TfxTM-10 de Promega y Polyfect, Transfection Reagent de Qiagen para células CHO-K1. La cantidad de ADN y el tiempo de incubación usados con estos reactivos se ajustaron a los protocolos sugeridos por la firma comercial. El modo según el cual se realizó el proceso de selección fue igual en todos los casos.

De cada transfección se aislaron entre 10 y 20 clones cada uno de los cuales generó una línea celular estable que fue cultivada en presencia del antibiótico en forma permanente.

Dada nuestra estrategia de clonado, consistente en una cotransfección de cinco plásmidos, (cuatro subunidades receptoras y un marcador de selección) obtuvimos clones incompletos. Aquellos clones que carecían de una subunidad fueron sometidos a una retransfección con la subunidad faltante y otro plásmido de selección distinto, en relación molar 1:0.1 y a un nuevo proceso de selección. Los clones obtenidos de esta manera se mantienen en cultivo con los dos antibióticos de selección en el medio.

6.0 Reacción de la transcriptasa reversa

Para la reacción de la transcriptasa reversa (RT) se usaron 2 μg del ARN total obtenido según se detalla en 2.1, la enzima M-MLV (Promega) y como oligonucleótidos cebadores o *primers*, hexámeros con secuencias al azar en un volumen final de 20 μl . La incubación se realizó a 42°C durante 1 h.

7.0 Reacción de la polimerasa en cadena

Para amplificar los cDNAs de cada una de las subunidades del receptor por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), se utilizaron 5 μ l del producto de la RT.

Se realizaron cuatro reacciones en paralelo utilizando diferentes pares de oligonucleótidos cebadores, con un tamaño de 20 mers, diseñados para que se unan a sitios altamente específicos en cada una de las subunidades del receptor. La secuencia de cada uno está basada en las secuencias de los cDNAs publicados para el AChR adulto ($\alpha\beta\epsilon\delta$), (LaPolla et al., 1984; Boulter et al., 1986; Buonanno et al., 1986; Isenberg et al., 1986; Gardner, 1990).

Composición de bases de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la detección de las subunidades del receptor

α 1 5' TGAAGCACTGGGTGTTCTA 3'

α 2 5' AGCGGAGAGTGTTTGCCCAT 3'

β 1 5' ATCCCTTCCAGGGGAT 3'

β 2 5' GATTCAGGCTGAAACCTGTT 3'

ϵ 1 5' GACTACTGCCAGGCATGA 3'

ϵ 2 5' GTTCTGGCAGAGGGCTGCGGTCC 3'

δ 1 5' ACCCCAGTGTCCCGATGGA 3'

δ 2 5' AGAGCTCCTGTTGGACCTGCTC 3'

Los cebadores fueron diseñados para unirse a una secuencia de bases, sin intrones, en sitios específicos de cada subunidad. Esto permite asegurar que no amplificarán las secuencias del ADN genómico del receptor. Cada par, α 1 α 2, ϵ 1 ϵ 2, β 1 β 2, δ 1 δ 2, al unirse por complementariedad de bases acota un segmento de longitud diferente para cada subunidad: α =618 bp, β =582 bp, ϵ =615 bp, δ =629 bp, que es multiplicado por la reacción de PCR. Las cuatro reacciones poseen la misma mezcla de reactivos, 2 unidades de Taq polimerasa (Pormega) y 1 mM de MgCl₂ como cofactor, en un volumen final de 20 μ l. El ciclador térmico (marca BIOMETRA) se programó para: 5 minutos iniciales de temperatura de desnaturalización a 95°C, 30 ciclos de: 95°C 60", 55 °C 60", 72°C 90", y un período adicional de síntesis de 5 minutos a 72°C.

Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1,2 % en presencia de bromuro de etidio (1 mg/ml) con un marcador de peso molecular.

8.0 Purificación y caracterización de los segmentos obtenidos por PCR

Los cuatro segmentos obtenidos por la reacción de RT-PCR a partir del ARN total de los clones seleccionados se visualizaron con luz U.V. en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio en presencia de un marcador de peso molecular que permitió verificar el tamaño predeterminado de cada uno.

Los segmentos se recuperaron del gel, se purificaron por unión a vidrio, y se lavaron con etanol utilizando el *Kit* GENE CLEAN II, Bio 101. Cat. # 1001-400.

Para determinar la autenticidad de las bandas obtenidas se realizaron digestiones con endonucleasas de restricción cuyo resultado fue también evaluado por electroforesis en geles de agarosa.

9.0 Estrategia para generar mutaciones simples y dobles en el segmento α TM4

Para generar las mutaciones se diseñaron y se mandaron a sintetizar, un par de oligonucleótidos (sentido y antisentido) que contiene el cambio de bases que genera la mutación que se desea introducir. De acuerdo con el plásmido utilizado en cada caso se eligieron endonucleasas de restricción apropiadas; se cortó el plásmido; se aislaron los segmentos en geles de agarosa y se los purificó por unión a vidrio, según 8.0 (de esta sección). El plásmido mutado se obtuvo por la unión del par de oligonucleótidos ya unidos en doble hebra por hibridación y el resto de los segmentos purificados en una reacción con la enzima T4 ADN ligasa.

La mutación del residuo Histidina 408 se realizó con el plásmido recombinante pBRG4 que contiene subclonada la subunidad α (Sine, 1993), según el protocolo del esquema I. La subunidad α mutada fue transferida del plásmido pBRG4, al plásmido pSM. Para la mutación en la posición 429 utilizamos el plásmido pSM α , con sitios de corte diferentes y un nuevo par de oligonucleótidos que introducen la mutación. Para lograr la mutación doble se utilizó en la reacción de la ligasa un segmento aislado de un plásmido ya mutado en la posición 408. La estrategia se detalla en el esquema II.

**Esquema I - Estrategia utilizada para generar mutaciones en el residuo Hist408
 $\alpha 1$ TM4 del AChR**

BspM I  Spe I

Bstx I  Spe I

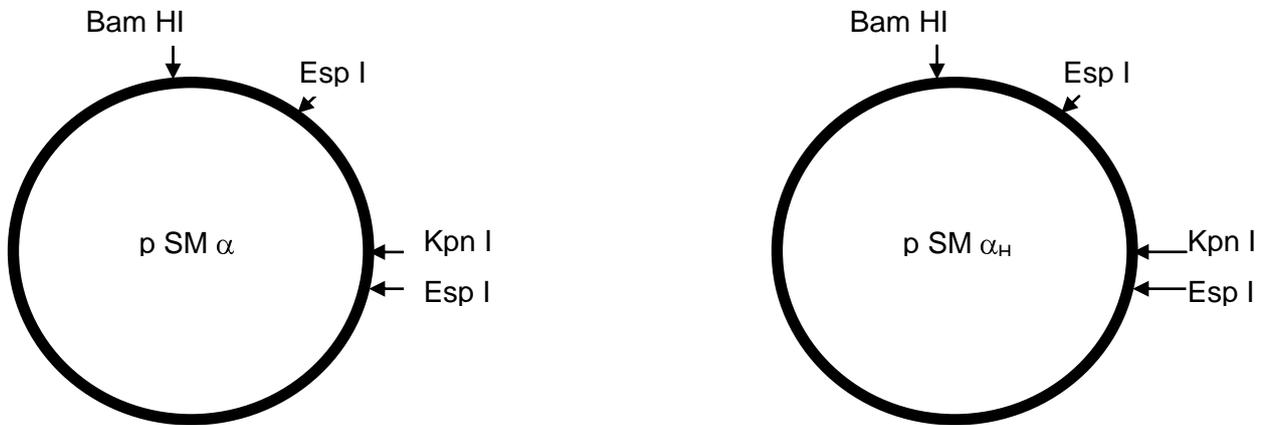
Oligonucleótido H408A

BspM I  Bstx I

Reacción con la T4 ADN Ligasa.

BspM I  Spe I  Bstx I  BspM I

Esquema II - Estrategia utilizada para generar mutaciones en el residuo Arg429 de $\alpha 1$ TM4 del AChR



Bam HI  Esp I

Bam HI  Esp I

Bam HI  Kpn I

Bam HI  Kpn I

Kpn I  Esp I

Kpn I  Esp I

 3374 bp

 1350 bp

 1350 bp

 62-69 bp

 H⁴⁰⁸A

10.0 Secuenciación de los plásmidos mutantes

Los vectores de expresión recombinantes obtenidos por la reacción con T4 ADN ligasa se transformaron en *Escherichia coli*, y se sometieron a una minipreparación para aislar el ADN plásmidico. Los plásmidos se verificaron estructuralmente a través de cortes con endonucleasas de restricción y análisis en geles de agarosa. Los que respondieron a patrones estructurales predeterminados se consideraron positivos y fueron secuenciados por el método de Sanger en presencia de ATP marcado y utilizando como cebador, α M4 cuya secuencia es:

α M4 5' GCAGAGACCATGAAGTCAGACC 3'

11.0 Vectores de expresión

Los ADNc codificantes de las cuatro subunidades proteicas del receptor nicotínico colinérgico muscular de ratón fueron cedidas por el Dr. Jim Patrick (Baylor college of Medicine, TX, USA). Para transfectar las subunidades correspondientes al AChR muscular adulto de ratón se utilizó el vector de expresión eucariota pSM subclonado con las subunidades en los sitios que se detallan en el Esquema III.

Esquema III- Construcciones plasmídicas eucariotas subclonadas con las subunidades del AChR

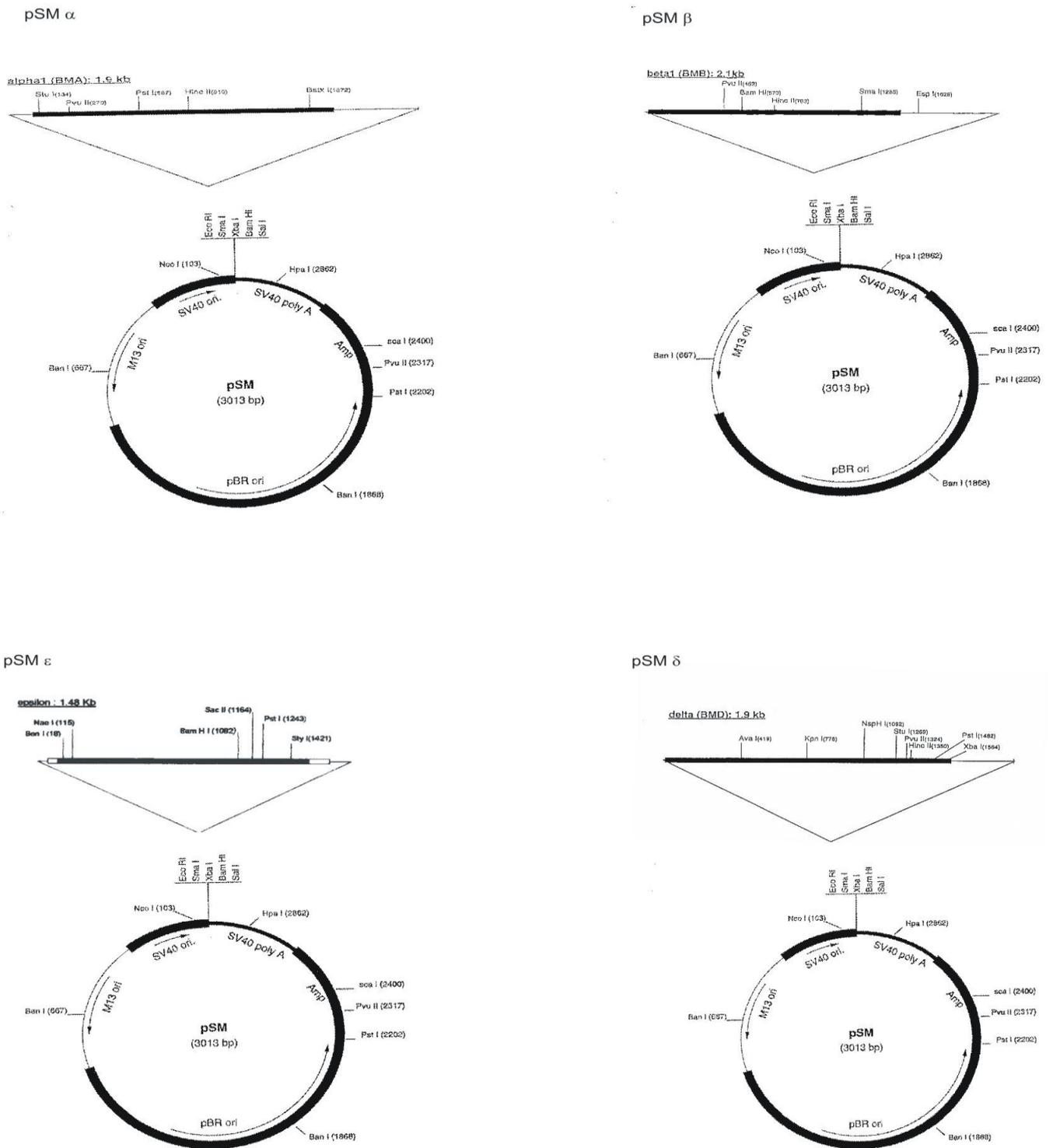


Diagrama de las construcciones plasmídicas utilizadas en la mezcla de transfección para lograr la expresión del AChR muscular murino adulto en las diferentes líneas celulares.

Esquema IV. Construcciones plasmídicas eucariotas subclonadas con los genes de selección

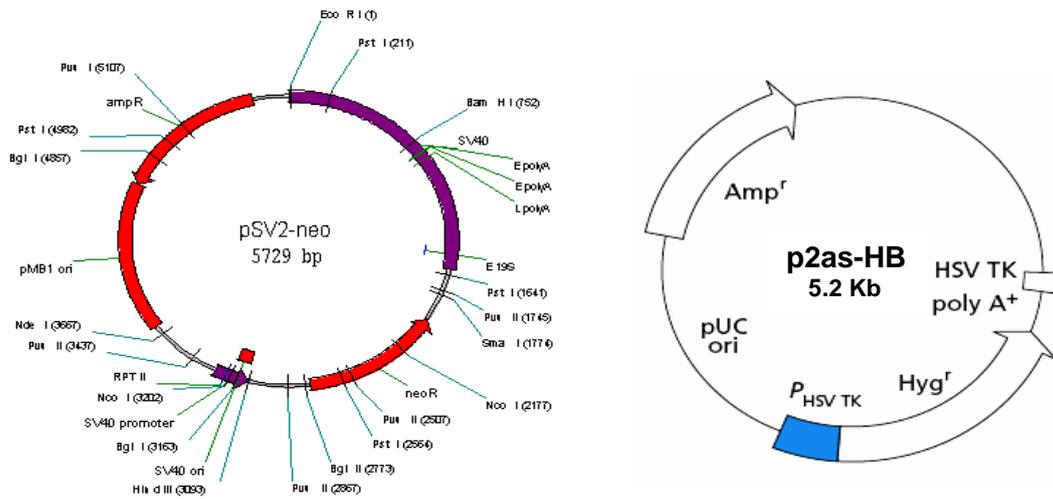


Diagrama de los plásmidos de selección utilizados en la mezcla de transfección. Los plásmidos de selección se agregaron en una relación diez veces menor en peso (5:0,1) con respecto a las subunidades del AChR, para lograr una mayor eficiencia.

12.0 Cultivo celular

Todas las líneas celulares se cultivaron rutinariamente en incubador a 36.5 °C, 95% de humedad relativa, 5% de CO₂ y el medio de cultivo sugerido por la ATCC para cada una de las líneas celular utilizada.

12.1.0 Líneas celulares utilizadas

12.1.1 CHO-K1

La línea celular CHO-K1 (ATCC CRL 9618) se propagó rutinariamente en medio Ham's F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y la presencia de penicilina/estreptomicina.

12.1.2 CHO/SPB-1

Fueron cedidas por el Dr. Kentaro Hanada (National Institute of Health, Tokio, Japón). Se obtuvieron por tratamiento de CHO-K1 salvajes con etil-metánsulfonato según (Hanada et al., 1990). Las células presentan una mutación termosensible en la serina

palmitoil transferasa (SPT) que es la enzima que cataliza el primer paso en la ruta biosintética de los esfingolípidos. (Esquema I – Capítulo I)

Cuando las células se cultivan a temperatura fisiológica, 37°C, los valores de la actividad de la enzima representan alrededor del 4% de los valores determinados en la línea normal. Por encima de 39°C no se registra actividad enzimática lo que resulta en una línea celular deficiente en el metabolismo de los esfingolípidos (Hanada et al., 1990; Hanada et al., 1992).

12.1.3 PSA-3

Esta línea celular mutante tiene un defecto en la actividad de la fosfatidil serina sintetasa I (Kuge et al., 1986a). En medio de cultivo, sin el agregado de fosfatidil serina (PS) exógena, esta línea celular posee menos del 50% del contenido normal de PS. Se cultiva en el laboratorio en las mismas condiciones que la línea CHO-K1.

Para estudiar el efecto producido por la disminución de PS sobre las propiedades del AChR se mantiene el cultivo en medio completo sin ningún agregado por un mínimo de tres días, se las incuba con un medio depletado de lípidos (Nutridoma-BO), o se las incuba en medio M1 por el tiempo indicado en cada caso, hasta la realización del ensayo.

12.2.0 Líneas celulares generadas

12.2.1 CHO-K1/A5

Constituye una línea normal de células CHO-K1 que expresa en forma heteróloga y estable el AChR muscular murino adulto. Para obtenerla, se transfectaron células CHO-K1 con una mezcla de pSM α , pSM β , pSM ϵ , pSM δ , pSV₂Neo en relación molar 2:1:1:1:0,1 mediante la técnica de precipitación con fosfato de calcio según se detalla en 2.5. Luego de 4 a 6 hrs de incubación con los cDNAs, las células se trataron con glicerol 15 % en medio de cultivo completo durante 3 minutos, lo que aumentó la eficiencia de la transfección. Se lavaron con CMF y se incubaron en medio completo hasta el día siguiente que se levantaron con tripsina y se transfirieron a 5 cápsulas de 35 mm.

A las 24 hs del proceso de transfección se inició la selección de clones a través del agregado al medio de cultivo de 400 μ g/ml de G418 o neomicina. Con este medio (medio de selección) se lavan los cultivos cada 4 ó 5 días para eliminar células muertas hasta la aparición de clones estables. Cada grupo celular aislado o clon establecido se transfirió por acción de tripsina a una caja de cultivo donde se cultivó como una línea diferente. En cada clon se analizó la inserción genómica y la expresión del receptor completo por técnicas de

biología molecular según se detalla en 2.3, 2.6, 2.8. Establecida la línea se cultivó rutinariamente con 40 $\mu\text{g/ml}$ de G418.

12.2.2 SPB-1/SPH

Es una línea mutante, deficiente en el metabolismo de los esfingolípidos, que expresa de manera heteróloga el AChR murino adulto en forma estable.

Se obtuvo en nuestro laboratorio utilizando, como en el caso anterior, el método de fosfato de calcio como técnica de transfección. A un cultivo de SPB-1 se le agregó una mezcla de pSM α , pSM β , pSM ϵ , pSM δ , pSV₂Neo, según se detalla en 2.5. Los clones fueron seleccionados, al igual que en los casos anteriores, con 400 $\mu\text{g/ml}$ de G418 o neomicina en el medio de cultivo. Al analizar la expresión de los clones, con RT-PCR y ensayos de unión a [¹²⁵I] α -bungarotoxina ([¹²⁵I] α -BTX), se detectó un clon que presentaba un alto nivel de marca radioactiva en superficie pero no mostraba expresión de ARN correspondiente a la subunidad ϵ . Técnicas que permiten determinar los parámetros electrofisiológicos del receptor como canal iónico, confirmaron estos resultados. Este clon fue elegido para ser retransfectado con pSM ϵ y p2as-HB, un plásmido que confiere resistencia al antibiótico Higromicina, en relación molar 1: 0.1.

La selección del clon se realizó, en este caso, con 400 $\mu\text{g/ml}$ de G418 y 800 $\mu\text{g/ml}$ de Higromicina B1. El clon que expresó el mayor nivel del receptor en superficie fue elegido para posteriores estudios y lo denominamos SPB-1/SPH. Rutinariamente SPB-1/SPH se cultiva en las mismas condiciones de una célula CHO-K1 pero en presencia de 40 $\mu\text{g/ml}$ de G418 o neomicina y 80 $\mu\text{g/ml}$ de Higromicina B.

12.2.3 PSA/AChR

Es un clon estable generado en nuestro laboratorio a partir de la línea celular PSA-3, mutante de CHO-K1 deficiente en el metabolismo de PS (Kuge et al., 1986b). Por transfección con lípidos catiónicos se introdujo la mezcla de plásmidos que codifican las subunidades de un AChR muscular murino adulto pSM β , pSM ϵ , pSM δ y pcDNA 3.1/ α 1myc-His. Esta última se obtuvo por el subclonado de la subunidad α 1 en un plásmido pcDNA 3.1/myc-His (invitrogen). Este plásmido contiene, además del código genético de α 1, la información genética para conferir resistencia a neomicina ó G418 como antibiótico de selección eucariota.

12.2.4 CHO-K1/ α TM4 His408Ala ($H^{408}A$)

Se generó en nuestro laboratorio. Constituye una línea CHO-K1 normal transfectada con las cuatro construcciones de expresión eucariota ya mencionadas pSM β , pSM ϵ , pSM δ , pSM Neo y el plásmido pSM α modificado por introducción de una mutación en el segmento TM4 de la subunidad α . Se cambió el aminoácido Histidina 408 por Alanina ($H^{408}A$). La mutación fue generada por la introducción a modo de *cassette* de un oligonucleótido sintetizado para tal fin. La estrategia empleada se muestra en el Esquema II.

12.2.5 CHO-K1/ α TM4 Arg429Ala ($R^{429}A$)

Obtenida con una estrategia similar a His408Ala. La mutación se generó en el aminoácido Arginina429, cambiando por Alanina según la estrategia del Esquema III.

12.2.6 CHO-K1/ α TM4 His408Ala/Arg429Ala ($H^{408}A/R^{429}A$)

Esta línea posee una mutación en cada uno de los extremos del segmento α TM4. La doble mutación se logró con la misma estrategia utilizada para la mutante simple pero empleando para la unión, un segmento obtenido de una subunidad α que ya poseía la mutación $\alpha H^{408}A$. Esquema III.

12.2.7 CHO-K1/Arg429Glu ($R^{429}E$)

Esta línea celular se generó con la misma estrategia utilizada para el resto de las mutantes pero empleando un oligonucleótido diferente diseñado y sintetizado para ese propósito.

12.2.8 CHO-K1/ α TM4 His408Ala/Arg429Ala ($H^{408}A/R^{429}A$)

Al igual que His408Ala/Arg429Ala, este clon posee una subunidad α con su TM4 mutado en ambos extremos.

13.0 Ensayos de unión de α -bungarotoxina radioactiva al AChR

(ensayos de binding)

Para determinar el número de receptores y realizar análisis de tipo farmacológico se utilizaron ensayos de unión a α -BTX marcada con ^{125}I . La alta afinidad del receptor por la toxina permite una determinación cuantitativa, altamente específica y relativamente sencilla. En algunos experimentos se utilizó [^{125}I] α -BTX adquirida a la firma Amersham y en la mayor parte de los ensayos se usó toxina iodada en el laboratorio.

13.1. Radiomarcación de α -BTX con ^{125}I

Se disolvieron 10 nmoles de α -BTX (de *Bungarus multicinctus*) en *buffer* fosfato sódico 100 mM, pH 7.4. Se le añadieron, a temperatura ambiente y bajo campana, 0.5 mCi de ^{125}I Na (A.E. 17.00 Ci/g) y 5 nmoles de Cloramina T. La reacción se frenó luego de 2 minutos por el agregado de 6 nanomoles de metabisulfito de sodio. Diluída al doble, toda la reacción se sembró inmediatamente en una columna de exclusión de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo *buffer* y mantenida a 4°C. Se colectaron alícuotas de 1 ml y se destinaron 10 μl de cada alícuota para determinar la radioactividad con un contador de centelleo gama en el Centro de Medicina Nuclear de Bahía Blanca. La Figura 1 muestra una curva de elución característica, con una buena separación entre la α -bungarotoxina marcada y el yoduro libre remanente. Se determinó en cada alícuota la absorción a DO.280 nm. Se calculó la actividad específica según (Hanley, 1987), fue fraccionada en volúmenes pequeños y conservada a -20°C durante 30 días, período en el que se realizaron los experimentos.

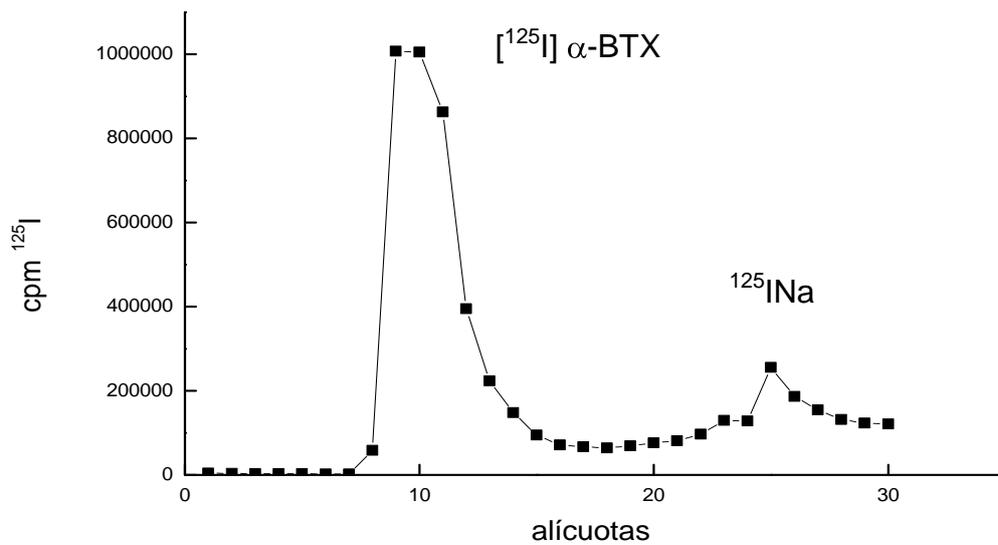


Figura 1. Curva de elución de α-Bungarotoxina iodada. En una columna de exclusión preparada con Sephadex G-25, se sembraron 10 nmoles de α-Bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*) marcada con 0.5 μCi de ¹²⁵I. Se colectaron muestras de 1ml y se midió la radioactividad. Las fracciones correspondientes al primer pico de inclusión, contienen la toxina iodada [¹²⁵I]α-BTX.

13.2 Determinación de la unión de [¹²⁵I]α-BTX a células enteras

(binding de superficie)

El número de receptores expresados en la superficie celular se determinó por unión de [¹²⁵I]α-BTX a células enteras, en cultivos celulares en placa de 35 mm y en células en suspensión. Las células crecidas hasta 70-80 % de confluencia se incubaron con concentraciones crecientes de [¹²⁵I]α-BTX, con una actividad específica de 120 μCi/nmol (New England Nuclear, Dupont, Boston M.A. USA) hasta 60 - 80 nM en medio de cultivo completo durante 1 hora a 25 °C. Luego se lavaron 3 veces con PBS, se removieron con 2 ml de NaOH 0.1N y la radioactividad remanente se midió en un contador gama con un 80 % de eficiencia. El contenido en proteínas de cada muestra se determinó por el método de Lowry en una alícuota de 200 μl de la muestra. La unión inespecífica de la toxina radioactiva se determinó por incubación de muestras controles con carbamilcolina 1mM ó α-BTX fría por 30 minutos, previo al ensayo.

Para el ensayo de unión a superficie con células en suspensión se resuspendió el cultivo con PBS-EDTA. Las células en suspensión fueron lavadas con PBS por centrifugación a 4000 rpm y se resuspendieron en con 1ml de PBS-BSA (27mg /900 ml). De esta suspensión celular se usaron 150 μl para cada muestra, que fueron incubados primero

con 1 mM de carbamilcolina en la condición control y 1 hora a 25 °C con 20 nM de toxina marcada. Se centrifugó a baja velocidad y se lavó 3 veces con PBS.

Luego del lavado, cada muestra se resuspendió con 2 ml de NaOH 0.1N y se contó en un contador gama con un 80% de eficiencia. Una alícuota de 200 µl de esta suspensión fue usada para la determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951b).

13.3 Determinación de la unión de [¹²⁵I]α-BTX a células permeabilizadas

Para determinar el total de receptores expresados en cada línea clonal y poder cuantificar los receptores intracelulares, el ensayo de unión con toxina radioactiva se realizó en células permeabilizadas y/o lisadas. Las células se lisaron con un *buffer* Tris-HCl pH 7.4, conteniendo: NaCl, 150 mM, EDTA 5mM, Tritón X-100 1%, NaN₃ 0.02%, BSA 10 µg/mL, PMSF 2mM, y 10 µg/mL de cada uno de los inhibidores de proteasas: quimiostatina, leupeptina, pepstatina, TLCK y TPCK agregadas al *buffer* inmediatamente antes de ser usado (Green and Claudio, 1993), durante toda la noche a 4°C.

Según lo describen Schmidt y Raftery (1973), el equivalente al contenido proteico de un frasco de cultivo confluyente se resuspendió con 600 µl de *buffer* de lisis y de allí se tomaron 20 µl para cada muestra. Cada condición se llevó a un volumen final de 125 µl en presencia de [¹²⁵I]α-BTX, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. La radioactividad inespecífica unida se sustrajo de los valores obtenidos de muestras incubadas con 1mM de carbamilcolina por 30 minutos a temperatura ambiente antes del agregado de la toxina radioactiva. Un volumen de 80 µl de la mezcla se sembró en papeles del tipo DE81 (Whatman) y se lavaron 4 veces con un volumen aproximado de 10 ml de *buffer* de lisis con 0,1% de Tritón X100 por cada unidad de papel. Se secaron y se contaron en un contador gama con un 80% de eficiencia. Alternativamente, el total de receptores expresados fue determinado en células permeabilizadas con 0.5% de saponina.

De esta manera, el número de receptores intracelulares es obtenido como la diferencia entre el total y el valor determinado de los receptores de superficie.

14.0 Microscopía de fluorescencia

Para el análisis de todos los sistemas celulares establecidos a través de la microscopía de fluorescencia, las células se cultivaron, según las condiciones detalladas en cada caso, en cubreobjetos de vidrio circular de 25 mm de diámetro.

Para los experimentos con mutantes en los que se evaluó el efecto de la privación de lípidos en el sistema, se modificó la temperatura del medio de cultivo o se cambió el medio

Ham's F-12 completo por Nutridoma–BO y luego el cultivo se mantuvo en esas condiciones por el tiempo indicado.

La marcación de los receptores de superficie se logró incubando las células con α -BTX conjugada con Alexa⁴⁸⁸ ó Alexa⁵⁹⁴ a una concentración final de 1 μ g/ml en el medio de cultivo por 50-60 minutos en hielo. El exceso de marca se eliminó lavando con medio de cultivo sin suero, medio M1 ó PBS antes de montar la muestra sobre portaobjeto de vidrio y visualizarlas en el microscopio de fluorescencia.

Para marcar el AChR intracelular, se saturó primero el receptor de superficie por incubación con 1 μ g/m de α -BTX en PBS durante 1 hora. Luego las células se fijaron con paraformaldehído 4% por 40 minutos y se permeabilizaron con 0.1% Triton X-100 durante 20 min. Finalmente se incubaron con α -BTX Alexa⁵⁹⁴ a una concentración final de 1 μ g/ml en PBS por 1 hora.

Las imágenes de fluorescencia se captaron utilizando un microscopio Nikon normal modelo Eclipse E-600 T120 equipado con una cámara Apogee K2E de 14 *bits* refrigerada, controlada a -10°C , SBIG modelo ST-7 (765 x 510 *pixels*, 9.0 x 9.0 μ m *pixels*, Santa Barbara, CA.), adosado con un software CCDOPS (SBIG Astronomical Instruments, version 5.25, Santa Barbara, CA). Objetivo de inmersión 40x (1.0 N.A.), 60x (1.4 N.A.) ó 100x (1.4 NA) se usaron en todos los experimentos. Se emplearon sistemas de filtros apropiados para cada fluoróforo en particular. La señal de fluorescencia de fondo se obtuvo del mismo preparado en un área cercana a la célula. Las imágenes adquiridas a 16-bit TIFF se analizaron en Scion Image y la confección de los gráficos se realizó utilizando el Adobe Photoshop 7.0 y Corell Draw 11.

14.1 Cuantificación de la fluorescencia

Para cuantificar la fluorescencia, las imágenes se analizaron con el software Image J. La región de interés (ROI), se definió en forma manual y se cuantificó la fluorescencia promedio. Las medidas se realizaron sobre la selección de 10 células al azar, en la imagen de contraste de fase. El valor de la fluorescencia de fondo se obtuvo en el mismo preparado, en un área cercana, libre de células y se sustrajo al valor promedio del preparado. La confección de los gráficos se realizó utilizando el Adobe Photoshop 7.0 y Corell Draw 11.

14.2 Determinación del porcentaje de AChR desensamblado por unión de α -BTX fluorescente en presencia de carbamilcolina

La α -BTX tiene la propiedad de unirse con alta afinidad a la subunidad α antes de formar parte del pentámero en el proceso postraduccional de plegado y ensamblado. La carbamilcolina en cambio sólo se une al receptor completo lo que permite diferenciar ambos tipos de conformación y determinar la magnitud de receptores ensamblados/desensamblados en cada sistema celular de expresión heteróloga.

Para determinar y cuantificar ambos estados conformacionales del receptor se incubaron los cultivos celulares sobre cubreobjetos de vidrio, en placas de 35 mm con α -BTX a una concentración final de 1 μ g/ml durante 50-60 minutos a 4°C con el fin de saturar los receptores de superficie. Luego, las células se lavaron 3 veces con 1ml de PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% por 40 minutos y se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 por 20 minutos. Una vez fijadas y antes de ser incubadas con α -BTX Alexa⁵⁹⁴ 1 μ g/ml en PBS por 50 minutos, las células para la condición experimental, se incubaron con 10 mM de carbamilcolina, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células cultivadas en las mismas condiciones pero sin el agregado de carbamilcolina, se utilizaron para la condición control. Finalizado el tiempo de marcación con α -BTX Alexa⁵⁹⁴, los cubreobjetos se lavaron con PBS, se montaron en portaobjeto de vidrio y se llevaron al microscopio de fluorescencia. Para cuantificar la marca, se tomaron fotos de 10 campos por condición experimental y se analizaron 10 células por campo. El total corresponde a la marcación del preparado sin carbamilcolina (receptores ensamblados + desensamblados) y el control, a los valores obtenidos en la línea CHO-K1/A5.

15.0 Gradientes de sacarosa

Las cuatro subunidades del AChR se pliegan y ensamblan a través de sitios específicos en cada una de ellas que interactúan para formar el pentámero y llegar a la superficie celular. El análisis de la formación de monómeros, dímeros y pentámeros en cultivos celulares fue realizado a través de gradientes de sacarosa según se describe en (Sine and Claudio, 1991b; Kreienkamp et al., 1995). Los cultivos confluentes de las diferentes líneas celulares, en placas de 35mm, fueron sometidos a un ensayo de *binding* total en presencia de [¹²⁵I] α -BTX 10 nM durante 1 hora a 4°C. Finalizado el período de incubación, la toxina libre fue eliminada por lavados con PBS (1X). En el siguiente paso, las células fueron solubilizadas con 200 μ l de *buffer*. Tris (pH 7.5), 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM y Tritón X-100 1% durante 3 ó 4 horas en hielo. El material sulubilizado se colectó en tubos de centrifuga de 1.5 ml, por el raspado de las placas de cultivo, se separó el material

insolubilizado centrifugando a 14.000 rpm y se sembraron 200 μ l del sobrenadante en gradientes de sacarosa de 5 % a 20 % en el mismo *buffer* y en presencia del detergente. Los gradientes se corrieron en una ultracentrífuga marca Beckman, Optima™ TLX en un rotor TLA 100.4 durante 19 horas a 39000 rpm. Se colectaron muestras de 150 μ l ó 200 μ l que se contaron en un contador de centelleo gama con un 80 % de eficiencia. El valor del coeficiente de sedimentación (S), de las fracciones del gradiente, se determinó con proteínas de valor conocido, sedimentadas en gradientes paralelos como se muestra en la Figura 2. Se usaron, Anhidrasa carbónica (3.3 S), fosfatasa alcalina (6.1 S) y catalasa (11 S). Las fracciones del gradiente se colectaron desde la parte superior del tubo, hacia la inferior. La presencia de las proteínas marcadoras se determinó por el valor de absorvancia de lecturas realizadas en el espectrofotómetro a 280 nm. Además, realizamos un control de la toxina libre, agregando a la corrida un gradiente sembrado con [¹²⁵I] α -BTX (~ 1.8S). Las alícuotas se contaron con un contador gama.

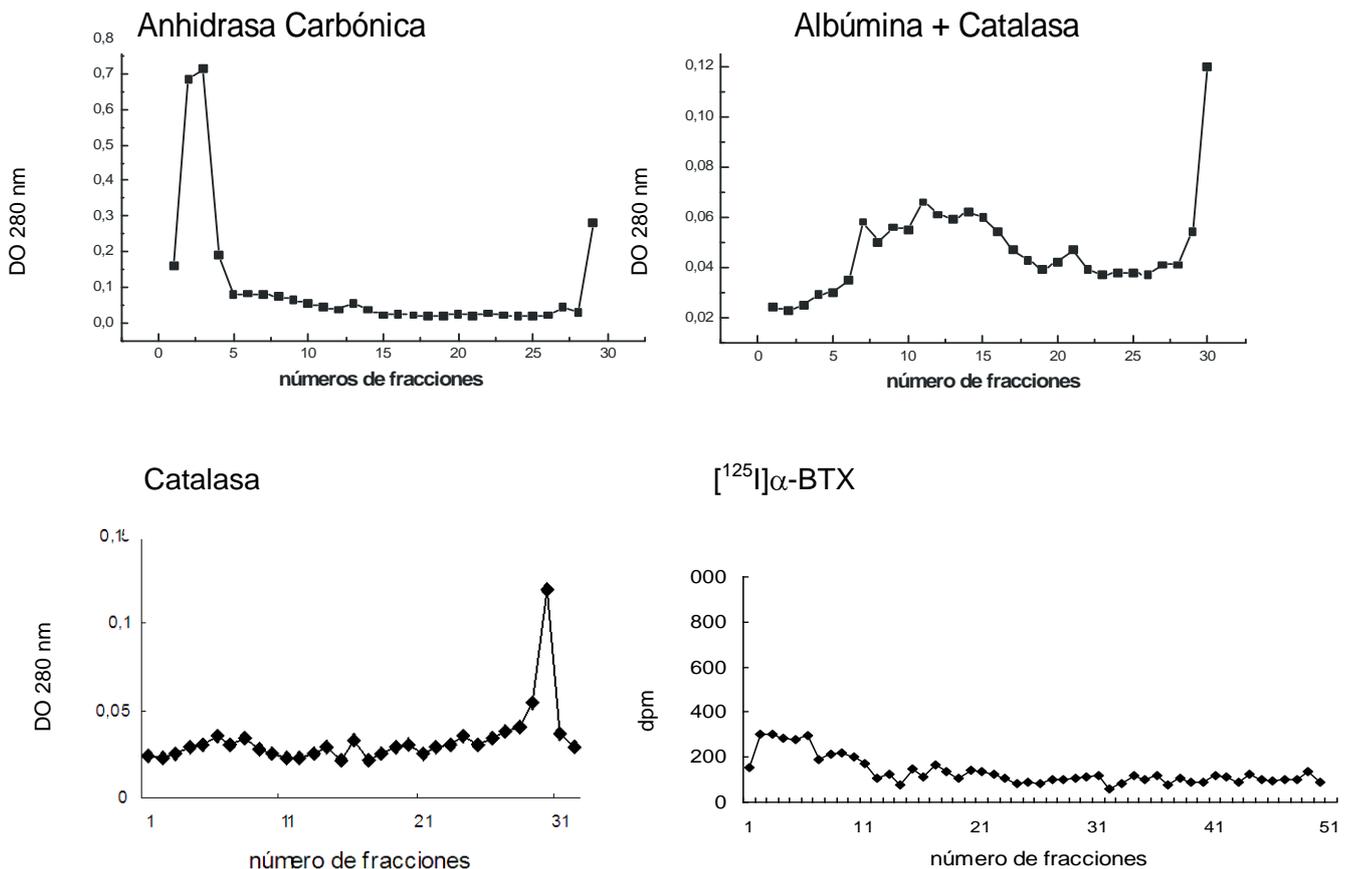


Figura 2. Gradientes de sacarosa. Proteínas de peso molecular conocido se sembraron en un gradiente de sacarosa del 5% al 20%. Alícuotas tomadas del gradiente se midieron a 280 nm y los valores de absorvancia se graficaron en función del número de fracciones. Una alícuota de la toxina marcada (¹²⁵I) α -BTX se sembró en un gradiente que se corrió en paralelo con las muestras. El gráfico representa la radioactividad medida en cada fracción del gradiente.

16.0 Tratamiento de CHO-K1/A5 con FB1

La inhibición total del metabolismo de los esfingolípidos en las células SPB1 se pone de manifiesto a elevadas temperaturas de cultivo. Además de los controles realizados para determinar la viabilidad celular, el efecto observado en las mutantes debía ser corroborado en células con metabolismo y condiciones de cultivo normales. Para ello se trataron células CHO-K1 salvajes con Fumonisina B1, toxina fúngica capaz de inhibir selectivamente la esfingosina N-acetil transferasa (ceramida sintetasa) (Norred et al., 1992). Las células CHO-K1/A5 se cultivaron en placas de 35 mm con Ham's F12 + 10% de suero fetal bovino a 37°C por un período de no menos de 24 horas. Para realizar los experimentos, el medio de cultivo se reemplazó por Nutridoma-BO conteniendo 50 μ M de FB1 y las células se incubaron por un período adicional de 48 horas. Los controles corresponden a cultivos mantenidos en medio completo y medio definido a 37°C.

Capítulo I

Obtención de líneas celulares normales y deficientes en el metabolismo de esfingomielina con expresión constitutiva del AChR

Antecedentes y objetivos

Para determinar la participación de los lípidos en la función de proteínas de membrana, es necesario contar con un modelo experimental que permita introducir cambios en el metabolismo y consecuentemente, en el contenido de ciertas especies lipídicas en el sistema. La realización de experimentos que permitan evaluar la importancia de la influencia del microambiente lipídico sobre la conformación, regulación y función del AChR, requiere de un modelo experimental capaz de bloquear los mecanismos endógenos compensatorios que las células poseen para evitar variaciones en la composición y el contenido de los lípidos.

Estudios realizados en nuestro laboratorio con una línea muscular de ratón (BC3H-1) que expresa de forma endógena la versión embrionaria del AChR, demostraron una rápida reversión de las condiciones experimentales impuestas, principalmente cuando se pretendía determinar cambios que se manifestaban en tiempos largos de incubación (Pediconi et al., 1992). Los lípidos exógenos aportados por el medio de cultivo eran suficientes para que los mecanismos regulatorios eviten cambios de composición inducidos. Fue necesario entonces, contar con un sistema celular que exprese la proteína receptora de manera constitutiva y paralelamente se pueda modificar el contenido endógeno de ciertos lípidos.

El AChR de ratón ha sido heterológamente expresado de forma transitoria y permanente en varios sistemas celulares eucariotas: el ovocito de *Xenopus* (Mishina et al., 1984; Mishina et al., 1986) , una línea celular de riñón de mono, COS (Gu et al., 1990) fibroblastos de ratón (Claudio, 1987; Sine and Claudio, 1991a; Kopta and Steinbach, 1994) y células CHO-K1 (Forsayeth et al., 1990a).

La expresión heteróloga transitoria de una proteína ofrece la ventaja de un alto nivel de expresión en un cierto número de células del cultivo, pero con poca disponibilidad temporal para el análisis. La expresión estable, en cambio, aunque brinda menor nivel de expresión proteica, permite la obtención de una línea celular homogénea seleccionada para la expresión de la proteína e independiente de la ventana temporal de exploración.

Para lograrlo, la secuencia completa de las subunidades del AChR subclonadas en vectores de expresión eucariota, sumadas a un vector de selección, fueron transfectadas en células CHO-K1 para establecer una línea de referencia o control y en mutantes de CHO-K1, con alteraciones en el metabolismo lipídico, para obtener el modelo experimental.

Resultados

Inserción del AChR en células CHO-K1

El ADNc de las subunidades α , β , δ y ϵ de ratón fue insertado detrás de un promotor SV40 en unidades vectoriales de expresión eucariota. Estos plásmidos fueron ampliados en cepas bacterianas del tipo DH5 α , purificados en gradientes de cloruro de cesio y transfectados por el método de fosfato de calcio en células CHO-K1.

Para la transfección se usaron 5 μ g totales de las construcciones pSM α , pSM β , pSM ϵ , pSM δ y pSV₂Neo, un plásmido que posee el mismo promotor que el de las subunidades del receptor y que confiere resistencia al antibiótico neomicina o G418 (ver sección Materiales y Métodos). Tras el proceso de selección, se aislaron un total de 25 clones que fueron ampliados y cultivados como líneas clonales independientes.

Detección de la expresión del ARNm de las subunidades del receptor por determinación con RT-PCR

La capacidad de resistencia adquirida por la inserción del plásmido pSV₂Neo no asegura la presencia del ARNm ni la síntesis proteica de las cuatro subunidades del receptor. Para determinar la inserción de los vectores y verificar la expresión del ARNm del AChR, se aisló el ARN total de cada uno de los clones seleccionados, se realizó la reacción de la transcriptasa reversa (RT), y cuatro reacciones de multiplicación selectiva de la polimerasa en cadena (PCR).

El programa de amplificación y las condiciones para la reacción de PCR se ajustaron utilizando los plásmidos de transfección como molde de ADN. Esta misma reacción se constituyó en el control positivo y se corrió en paralelo con cada reacción de RT-PCR realizada. Para descartar falsos positivos por la presencia de los genes del AChR en la línea celular, el par de oligonucleótidos cebadores, se diseñó en sitios de la secuencia específicos de la especie y separados por al menos un intrón del ADN genómico (las secuencias se muestran en la sección Materiales y Métodos).

El primer 1 (sentido) se diseñó para que se una al dominio extracelular del extremo N-terminal antes del segmento transmembrana M1, y el primer 2 (antisentido) se diseñó para que se una a secuencias ubicadas en la porción citoplasmática entre M3 y M4. Estas regiones difieren entre las subunidades del receptor y son específicas de cada especie (Ortells and Lunt, 1995).

Los productos de amplificación, con los cuatro pares de cebadores específicos para cada subunidad (α 1, α 2, β 1, β 2..... δ 1, δ 2), tienen un tamaño diferente y predeterminado que

varía entre 550 y 600 bp. Esto permitió caracterizarlos fácilmente por electroforesis en geles de agarosa.

La Figura 1 muestra el resultado de la electroforesis de productos de RT-PCR analizados en un gel de agarosa (1,2%) en presencia de bromuro de etidio. En el panel de la izquierda (a) se muestran los segmentos de ADN obtenidos luego de optimizar la reacción de PCR con los plásmidos de cada subunidad y sus correspondientes cebadores. En el panel de la derecha (b) se muestra el resultado de la RT-PCR del ARN correspondiente a la línea CHO-K1/A5.

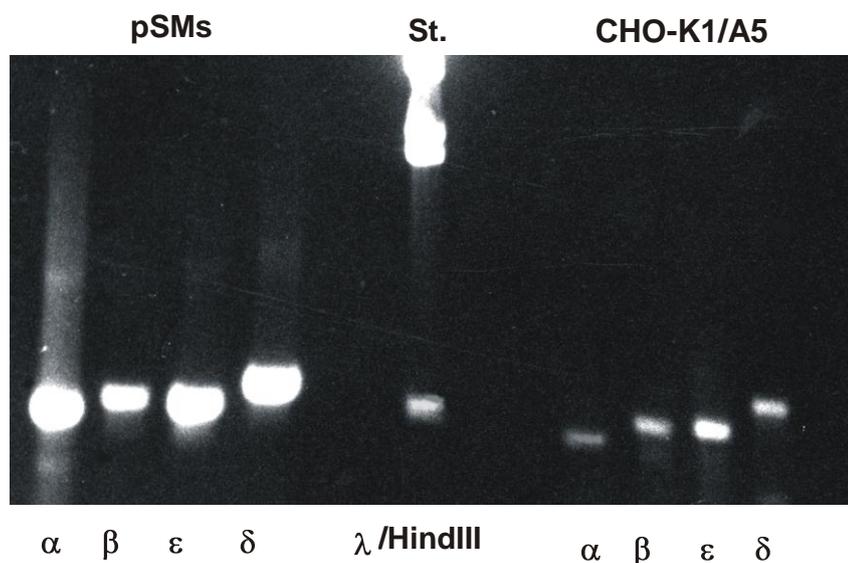


Figura 1. Expresión heteróloga del AChR adulto de ratón en células CHO-K1. La foto muestra el resultado de la reacción de RT-PCR optimizada y el análisis de la expresión de la línea CHO-K1/A5 luego de una electroforesis en geles de agarosa al 1,2 %. **(a)** Resultado de la optimización de la reacción de PCR empleando cebadores específicos para cada subunidad y los plásmidos utilizados para la transfección, como ADN molde. **(b)** Resultado del clon CHO-K1/A5. Las muestras fueron obtenidas por reacciones de RT-PCR a partir del ARN total aislado y purificado de cultivos celulares en placa. El estándar utilizado en la corrida corresponde al fago λ digerido con Hind III.

Identificación de los productos de RT-PCR

En la reacción de PCR cada par de cebadores multiplica un segmento de tamaño y secuencia conocidos para cada una de las subunidades del receptor. Para descartar reacciones inespecíficas y falsos positivos, se realizó un ensayo que permite confirmar la secuencia de los segmentos obtenidos y purificados del gel de agarosa. Se identificaron en cada uno secuencias específicas, blanco de endonucleasas y se determinó el tamaño de los fragmentos que se deberían obtener luego de la digestión con dichas enzimas.

La Figura 2 muestra el tamaño de los fragmentos obtenidos luego de la digestión de los segmentos de RT-PCR, de cada una de las subunidades, con la enzima de restricción correspondiente. El producto de las reacciones se corrió en un gel de agarosa 1,2%. Los pocillos del gel sembrados de a pares permiten comparar el segmento amplificado y el producto de digestión. Los resultados fueron idénticos para todos los clones analizados.

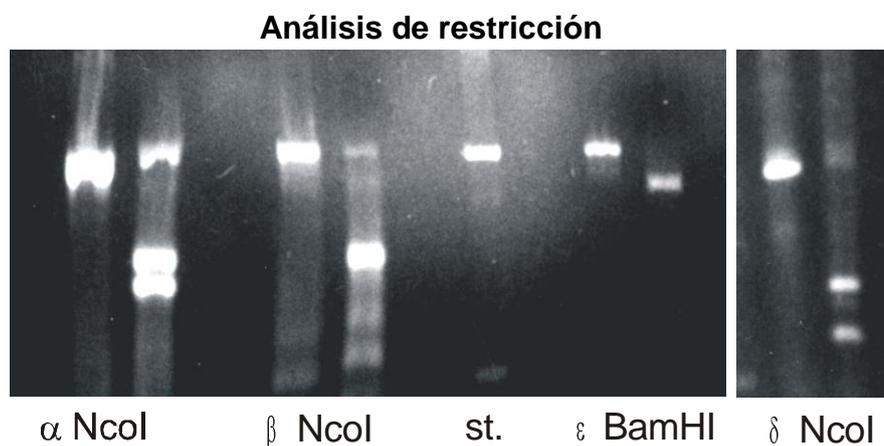


Figura 2. Análisis estructural de los fragmentos de PCR con endonucleasas de restricción. Los segmentos de PCR aislados y purificados fueron digeridos con enzimas de restricción. De acuerdo con la secuencia de cada uno, se obtuvieron fragmentos de tamaño predeterminado que permiten su identificación (Materiales y Métodos). Las calles: 1-2 muestran la subunidad α y el resultado de su digestión con Nco I; 3-4, β y su digestión con Nco I; 5, estándar de peso molecular (λ / Hind III); 6-7 ϵ , ϵ /Bam HI; 8-9, δ , δ / Nco I. Los clones CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH muestran idénticos resultados.

Expresión del AChR en células CHO-K1

Para el desarrollo de nuestro objetivo se generó, en principio, una línea celular que expresa el receptor en forma heteróloga y posee metabolismo lipídico normal. Se cotransfectó la línea CHO-K1 con las unidades vectoriales, que codifican las subunidades del receptor en la versión adulta, para lograr el sistema de referencia o control. Los resultados obtenidos se compararon con la línea BC3H-1. Esta línea celular es empleada como sistema modelo para el estudio de proteínas de músculo esquelético. Es de origen ectodérmico y posee expresión endógena del AChR de tipo embrionario cuando se la somete a un proceso de diferenciación por incubación en medio de cultivo, con bajo contenido de suero fetal bovino (Taubman et al., 1989). Finalizado el proceso de selección, se midió el número de receptores expresados en todas las líneas clonales que resultaron positivas por RT-PCR. La línea elegida para el análisis fue denominada CHO-K1/A5.

De acuerdo con los primeros resultados mostrados por microscopía de fluorescencia, con α -BTX Alexa, este clon presentaba heterogeneidad en la expresión. Por tal motivo, se sometió a un nuevo proceso de selección o subclonado. Del proceso de

subclonado, resultó una línea totalmente homogénea y con un nivel de expresión estable del mismo orden de magnitud que la línea de expresión endógena, BC3H-1. Los resultados se muestran en la Figura 3. El panel superior corresponde a las imágenes logradas en contraste de fase. En el panel inferior (izquierda) se muestra la imagen obtenida luego de marcar células vivas en cultivo con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ a 4°C durante una hora. Luego de lavados sucesivos para eliminar la toxina libre fue posible visualizar en el microscopio de fluorescencia, el receptor en la superficie celular. En el panel inferior (derecha) se muestra el perfil de marcación del receptor intracelular. Para visualizarlo se preincubaron cultivos celulares con α -BTX sin marcar, se fijaron con paraformaldehído, se permeabilizaron con Tritón X100, y se marcaron con α -BTX Alexa⁵⁹⁴. La línea CHO-K1/A5 generada en nuestro laboratorio muestra una distribución y un nivel adecuado de marca fluorescente tanto en la superficie como en el interior celular.

CHO-K1/A5

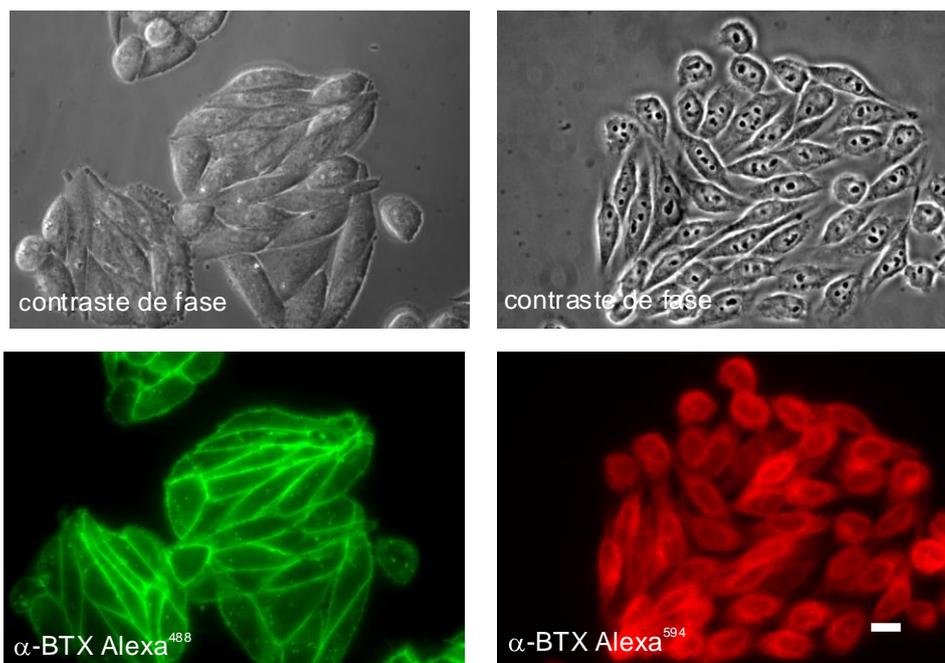


Figura 3. Microscopía de Fluorescencia de células CHO-K1/A5 marcadas con α -BTX. Células en cultivo se marcaron con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ por 1 hora a 4°C. Luego de lavarlas con PBS, se montaron vivas en portaobjetos para determinar la magnitud de la fluorescencia en la membrana plasmática (panel inferior izquierdo) Los receptores intracelulares (panel inferior derecho) se determinaron en células de la misma línea, fijadas, permeabilizadas y marcadas con α -BTX Alexa⁵⁹⁴, bloqueando previamente el receptor de superficie con α -BTX. Ver sección Materiales y Métodos. Escala 10 μ m

Cuantificación de la expresión del AChR por ensayos de unión con [¹²⁵I]α-BTX

Los clones que resultaron positivos para las cuatro subunidades del receptor por RT-PCR, se analizaron en base a su capacidad de unión a un ligando específico marcado para cuantificar la expresión del receptor en superficie. En cada uno de ellos, se realizaron ensayos con el antagonista radioactivo [¹²⁵I]α-BTX cuya unión al receptor es cuantitativa, específica y de alta afinidad.

Según se detalla en la sección Materiales y Métodos, los ensayos de unión a [¹²⁵I]α-BTX se realizaron en células enteras para cuantificar receptores en superficie y en células permeabilizadas para determinar el total de los receptores expresados. Los resultados de la expresión en la superficie celular, obtenidos con la línea CHO-K1/A5, se compararon con la línea BC3H-1. Aunque esta línea celular expresa un receptor de tipo embrionario (contiene la subunidad γ en reemplazo de la subunidad ε), posee expresión endógena y en ella, el receptor está ampliamente caracterizado. Además, es la fuente a partir de la cual fueron aislados los genes de las subunidades α, β, y δ que, tras ser subclonados en los vectores de expresión adecuados, se utilizaron en el desarrollo de este trabajo.

Para determinar el número de receptores expresados en la superficie celular los clones se cultivaron en placas de 35 mm hasta un 70% ó 80% de confluencia. La incubación en presencia de la toxina radioactiva o ensayo de unión se realizó a 24°C durante 1 hora en medio de cultivo completo con células vivas. Luego la marca libre, remanente, se eliminó por lavados con medio de cultivo sin suero o PBS. Las células se removieron y se colectaron en tubos con NaOH 0.1N. La radioactividad se midió en un contador gama, con una eficiencia del 80%.

La unión inespecífica de la toxina marcada fue determinada en muestras incubadas con 10 μM de α-BTX fría o carbamilcolina (1 mM), 30 minutos antes de comenzar la incubación con el radioligando, y fue descontada de los valores obtenidos en las muestras experimentales. Para la línea control se aceptaron valores de inespecificidad de hasta un 10%.

De los ensayos de unión realizados a concentraciones saturantes de toxina, el clon con mayor nivel de expresión en la membrana celular fue el denominado CHO-K1/A5. Las curvas de saturación realizadas en función de la concentración de toxina en el rango de 1 nM a 60 nM determinaron que la saturación de sitios que ligan [¹²⁵I]α-BTX corresponden a valores de entre 20 nM y 60 nM (Figura 7). El valor de B_{máx} determinada por análisis de Scatchard dio como resultado 0.65 ± 0.04 pmoles de toxina por miligramo de proteína, una magnitud de expresión del orden de BC3H-1. La K_D encontrada para CHO-K1/A5 es también similar a la determinada para BC3H-1 (TABLA I).

El total de receptores expresados en cada línea clonal se evaluó en lisados celulares o en muestras permeabilizadas con saponina 0.5% durante 5 minutos. Los lisados celulares se obtuvieron por incubación de las células en presencia de Tritón X100 a 4°C durante toda la noche. Después de realizar una centrifugación a alta velocidad para eliminar restos celulares, se incubó el sobrenadante con la toxina marcada, según el protocolo de Schmidt y Raftery (1973) (Schmidt and Raftery, 1973). En ambos casos se obtuvieron resultados equivalentes. El número de sitios determinados en células enteras, a concentraciones saturantes de toxina, restados a la cantidad de sitios totales capaces de unir [¹²⁵I]α-BTX de lisados celulares o células permeabilizadas, permitió determinar los sitios intracelulares y evaluar el porcentaje de receptores sintetizados capaces de llegar a la superficie celular. En la línea CHO-K1/A5, se observó que un 40% de los receptores sintetizados llega a la membrana plasmática (Figura 5).

En la línea de expresión endógena, el mayor porcentaje de sitios de unión se encuentra en el interior celular, superando en más de un 80% a los receptores de superficie. Si bien no fue aislado y cuantificado el ARN total de BC3H-1, este resultado podría sugerir un mayor nivel de expresión genética de la proteína así como diferencias en el proceso de ensamblado o cambios en la velocidad de degradación. Es importante recordar que los genes en ambas líneas no están regulados de la misma forma.

Estudios cinéticos de unión del ligando radioactivo determinaron un valor de $K_{obs} = 1.43 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ para CHO-K1/A5. El recambio metabólico del receptor en superficie fue medido con experimentos en los que se realizó la marcación con [¹²⁵I]α-BTX 1h a 37°C y se determinó la disminución de la radioactividad en superficie en función del tiempo, luego de eliminar por sucesivos lavados la toxina libre remanente. El resultado del $t_{1/2}$ es de 5.0 ± 0.1 hs (TABLA I).

Electrofisiología del canal iónico expresado en la línea celular CHO-K1/A5

En nuestro grupo de trabajo también se caracterizaron parámetros electrofisiológicos del canal iónico, expresado en CHO-K1/A5. Mediante la técnica de *patch-clamp*, se realizaron registros de canal único en la configuración adentro-afuera (“*inside-out*”) en CHO-K1/A5. Los resultados mostraron valores de conductancia de ≈ 60 pS y dos tiempos de estado abierto, 1.9 ± 0.3 y 0.3 ± 0.08 ms, en total correspondencia con los parámetros reportados para un receptor adulto normal expresado endógenamente (Gu et al., 1990; Charnet et al., 1992; Camacho et al., 1993).

Los resultados obtenidos demuestran que la línea celular CHO-K1/A5 generada en nuestro laboratorio, expresa constitutivamente el AChR muscular adulto de ratón con las

características funcionales de un receptor expresado en forma endógena. Ésto nos permitirá utilizarla como sistema celular de referencia o control.

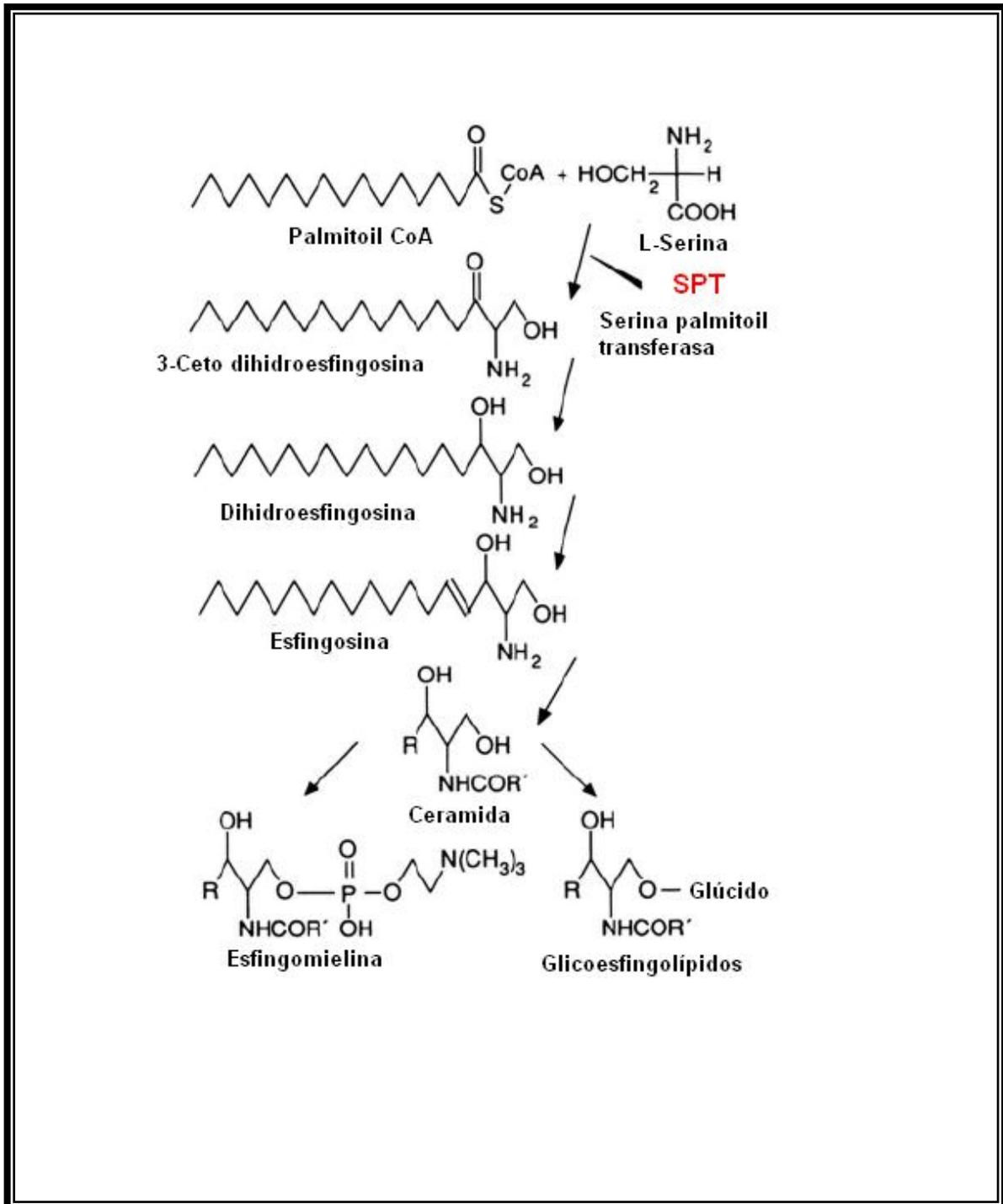
Expresión del AChR en células deficientes en esfingolípidos (SPB-1)

Para determinar la influencia de los esfingolípidos (SLs) en la expresión del AChR, fue necesario obtener variaciones puntuales en la relación de estos lípidos con la proteína. Por este motivo, generamos un sistema celular con alteraciones endógenas en el metabolismo lipídico que, además, pudiese expresar la proteína receptora. Con este propósito utilizamos una línea celular mutante que tiene alterada la vía de síntesis de los SLs.

Los SLs constituyen la familia de lípidos más numerosa presente en las membranas biológicas de animales, plantas y otros microorganismos. Si bien estos lípidos son componentes minoritarios de la membrana plasmática de células de mamífero (10-20%), se ha propuesto que las bases esfingoideas del tipo de la esfingosina, los liso esfingolípidos y la ceramida actuarían como reguladores de una gran variedad de procesos celulares, tales como la regulación del control del ciclo celular, el proceso de apoptosis y la respuesta a *stress* (Dickson and Lester, 1999; Hannun and Obeid, 1997; Spiegel, 1999). También se ha determinado que participan en la transducción de señales (Okazaki et al., 1989), en la regulación de quinasas (Hannun and Bell, 1989) y en la segregación lateral de lípidos en una de las hemicapas de las membranas celulares. Al respecto, se ha postulado que estos lípidos participan en la formación de arreglos lipídicos denominados microdominios o “*rafts*” que excluyen o reclutan determinadas proteínas (Simons and van, 1988). También la fluidez y/o la permeabilidad de las membranas parecerían estar en estrecha relación con el contenido de esfingomielina (SM) (Barenholz and Thompson, 1980). Esta última está ligada al transporte y metabolismo del colesterol. La depleción celular de SM altera la distribución intracelular de colesterol (Slotte and Bierman, 1988).

El grupo de trabajo que dirige el Dr. Kentaro Hanada (National Institute of Health, Tokio, Japón) generó, a partir de la línea celular CHO-K1, una línea mutada con etilmetanosulfonato en la cual se inhibe, por efecto de la temperatura, la enzima serina palmitoil transferasa (SPT) que cataliza el primer paso en la biosíntesis de los SLs (Esquema I). Por debajo de 33°C la actividad de la SPT es normal, a 37°C sólo es del 4% y por encima de 39°C no se registra actividad. De esta forma, el cultivo a distintas temperaturas modula la actividad de la enzima y permite modificar la biosíntesis y el contenido de los SLs de la línea mutada. En estas condiciones y en un medio de cultivo carente de lípidos, las células frenan su crecimiento y disminuyen el contenido de SM y del gangliósido sialil-galactosilceramida (GM3) (Hanada et al., 1992). Esta línea, que fue

proporcionada por el Dr. Hanada, constituye una herramienta ideal para estudiar el efecto de la deficiencia de los SLs sobre el direccionamiento a la membrana y la funcionalidad del AChR en un sistema celular.



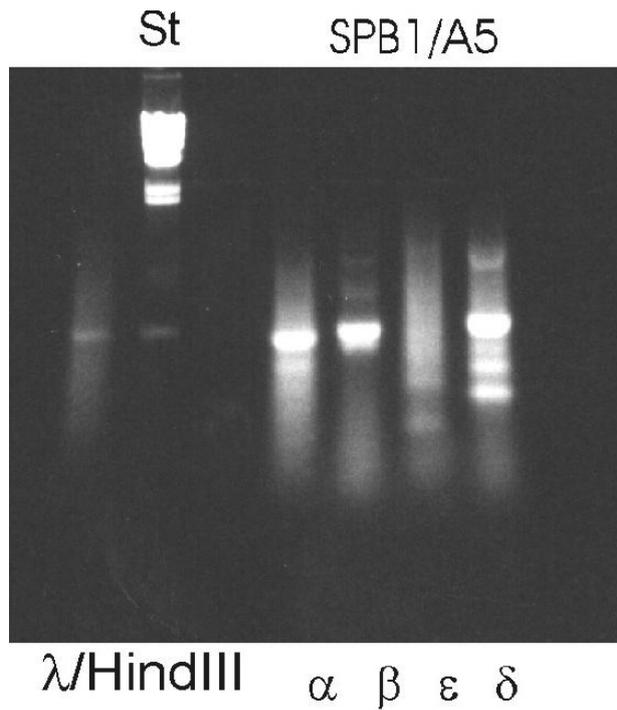
Esquema I. Biosíntesis de SM. Se señala en rojo la enzima alterada por mutación en la línea SPB-1, sensible a la temperatura de cultivo (Hanada and Fukasawa, 1999)

Obtención de la línea SPB-1/SPH

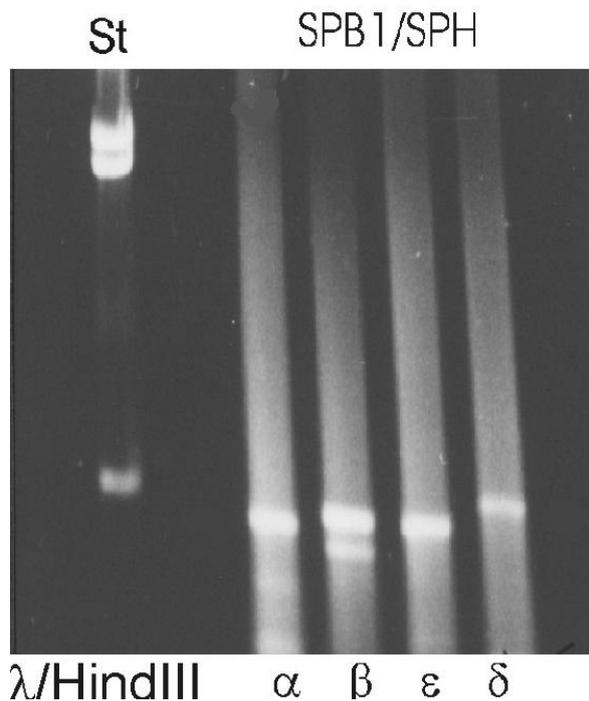
Para determinar los parámetros funcionales del receptor expresado en la línea SPB-1, transfectamos los mismos vectores de expresión y seleccionamos clones tal como se ha descrito anteriormente para la línea control.

En la Figura 4 se muestra el resultado de RT-PCR de dos de los clones seleccionados por resistencia a antibióticos. El clon SPB1/A5 carecía de la subunidad ϵ . A diferencia de otros clones seleccionados, este clon tenía la particularidad de presentar muy buena actividad eléctrica cuando fue analizado por la técnica de patch-clamp en presencia del agonista. Por tal motivo, esta línea celular fue co-transfectada nuevamente con la subunidad ϵ y el agregado de otro plásmido de selección, p2as-HB, que confiere resistencia al antibiótico Higromicina B.

De los clones que resultaron positivos para las cuatro subunidades (Figura 4) surgió la línea de elección denominada SPB-1/SPH para todos los ensayos realizados. De la selección de la línea SPB-1 deficiente se aislaron aproximadamente 25 a 30 clones, al igual que en la línea normal. Los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR de clones mutantes coincidieron en tamaño con los segmentos obtenidos con la línea control. La identificación de los segmentos de PCR por análisis de restricción, dio idénticos resultados.



SPB-1/A5 – La electroforesis en geles de agarosa (1.2%) con el producto de RT-PCR del ARN total del clon SPB1/A5, muestra la ausencia del segmento amplificado en la línea correspondiente a la subunidad ϵ .



SPB-1/SPH – La electroforesis en geles de agarosa (1.2%) con el producto de la reacción de RT-PCR de la línea clonal SPB-1/A5 retransfectada con la subunidad ϵ , muestra la presencia de los cuatro segmentos amplificados.

Figura 4. Análisis de la expresión del AChR por RT-PCR. Resultados obtenidos con el ARN total aislado y purificado de los diferentes clones de la línea SPB-1.

Cuantificación de la expresión del AChR en SPB-1 por ensayos de unión a [125 I] α -BTX

Los ensayos de unión a [125 I] α -BTX en células permeabilizadas, según se describe en la sección Materiales y Métodos, nos permitieron evaluar el total de sitios de unión a la toxina. La diferencia entre el valor total de los sitios, menos el valor de expresión en superficie nos permitió cuantificar el valor del receptor intracelular (Figura 5) para todas las líneas celulares en estudio.

En la línea de expresión heteróloga normal llegan a la superficie ~40% de los sitios totales de unión a toxina. En las líneas mutantes, deficientes en SM, sólo lo hace el 10% del total de sitios. Diferencias en la llegada a la membrana del AChR sintetizado ya han sido reportadas por Black y Hall, (1985) y Gu y Hall, (1989) en células musculares C2 defectuosas en el transporte desde el retículo endoplásmico (RE) a la membrana plasmática, por errores de glicosilación proteica.

Expresión heteróloga del AChR en sistemas eucariotas

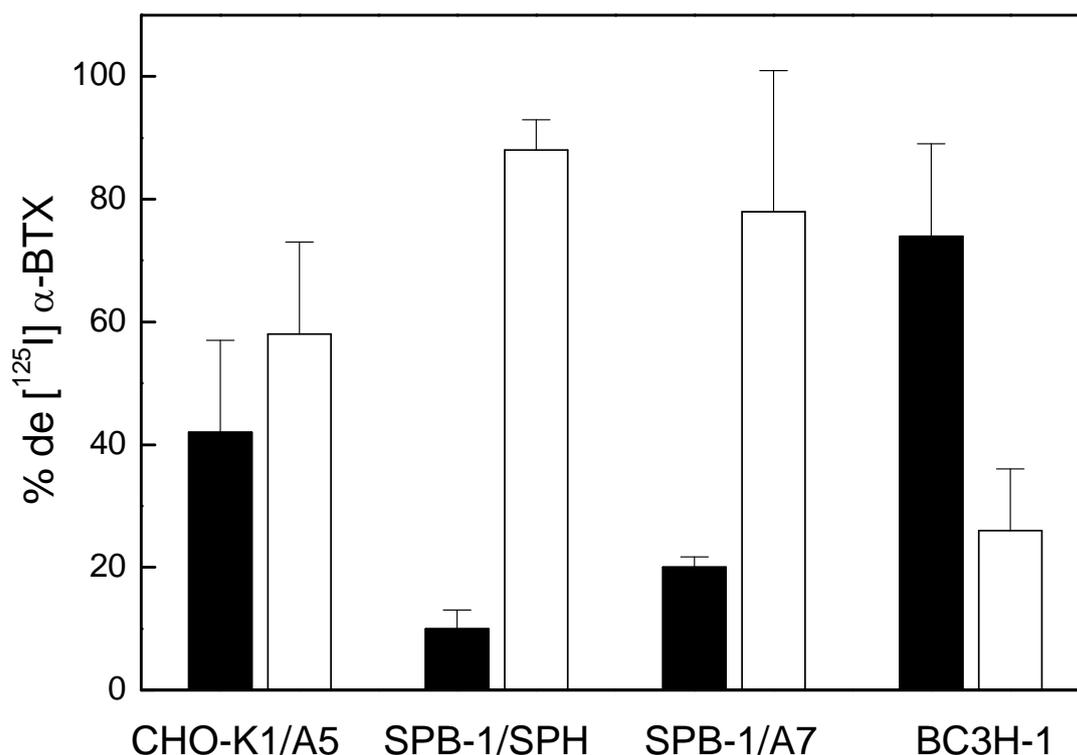


Figura 5. Expresión del AChR murino adulto en sistemas celulares estables. El histograma muestra el porcentaje de unión de [125 I] α -BTX en células enteras (■ superficie) y en células permeabilizadas (□ pool intracelular). Permite comparar los receptores de superficie con los totales en los sistemas de expresión heteróloga estable y en la línea BC3H-1 de expresión endógena.

TABLA 1. Propiedades de unión de α -BTX de AChR expresado en la superficie de celular de líneas celulares salvajes normales y mutantes deficientes en el metabolismo de esfingolípidos a temperaturas permisivas (30°C) y semipermisivas (37°C).

Línea Celular	Temperatura crecim. (°C)	B _{max} * (fmol/mg prot)	K _{obs} (h ⁻¹)	K _D (nM)	t _{1/2} (h)	Coeficiente de Hill	de CCh I _{C50} (μM)	D-tubocurarina I _{C50} (μM)
BC3H-1	37	1200 ± 112	0.82 ± 0.15	10 ± 1.0	7.7 ± 2.1	1.3 ± 0.1	8.5 ± 0.1	3.6 ± 0.4
CHO-K1/A5	37	649 ± 39	1.43 ± 0.07	17.1 ± 4.1	5.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	3.6 ± 0.2	5.0 ± 0.4
CHO-K1/A5 + FB1†	37	354 ± 15	ND	9 ± 3.1	ND	ND	ND	ND
SPB-1/A7	30	279 ± 20	0.99 ± 0.05	2.7 ± 0.3	1.8 ± 0.4	ND	ND	ND
SPB-1/A7	37	170 ± 15	1.20 ± 0.15	5.0 ± 0.1	1.5 ± 0.2	ND	ND	ND
SPB-1/SPH	37	154 ± 26	1.42 ± 0.18	6.1 ± 1.1	3.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	3.4 ± 0.5

* Células de cuatro o cinco días fueron crecidas a la temperatura indicada e incubadas con [¹²⁵I]α-BTX según se detalla en Materiales y Métodos. Las constantes de disociación fueron calculadas de las isotermas de saturación por análisis de Scatchard, con los resultados de experimentos realizados a 25°C. La constante de disociación aparente (K_{obs}), y la vida media del receptor en superficie (t_{1/2}) se determinaron con experimentos realizados a 37°C usando 10nM de [¹²⁵I]α-BTX.

† Las células CHO-K1/A5 se cultivaron en medio definido, Nutridoma- BO y 50μM de FB1. El resto de las líneas celulares utilizadas fueron cultivadas en medio completo según se indica en Materiales y Métodos. ND, valor no determinado.

Marcación de proteínas con [³⁵S] Metionina en los diferentes sistemas modelo

La marcación con [³⁵S] Metionina y la electroforesis en SDS-PAGE de las líneas clonales con mayor nivel de expresión en superficie nos permitieron diferenciar, por autorradiografía del gel de acrilamida, la presencia de una banda coincidente con el peso molecular de la subunidad α del AChR, que no aparece en la línea salvaje. La Figura 6 muestra la magnitud de la proteína heteróloga sintetizada y el perfil proteico de las diferentes líneas celulares.

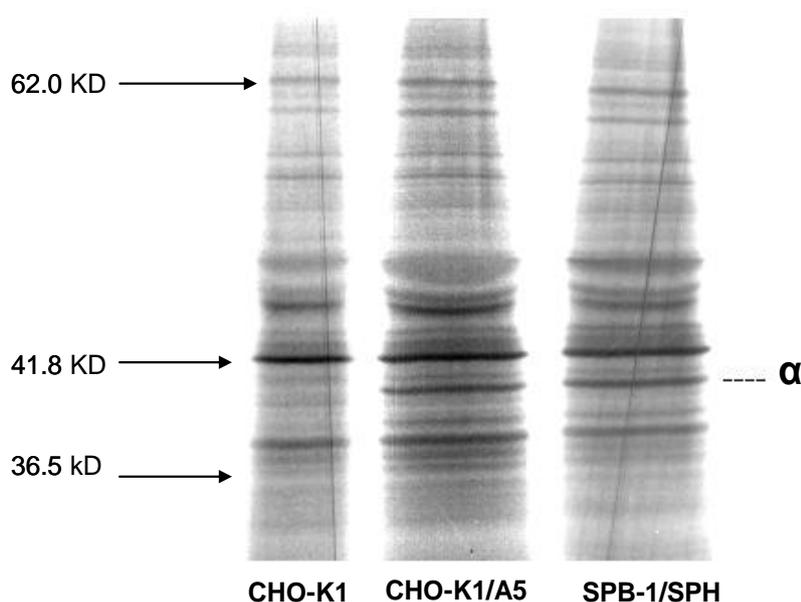


Figura 6. Electroforesis en SDS-PAGE de clones marcados con [³⁵S] Metionina. Se marcaron con [³⁵S] Metionina cultivos celulares en placas de 35mm. Cada una de las muestras lisadas se sembró en gel de poliacrilamida 10% en presencia de SDS. La autorradiografía del gel muestra el perfil proteico radiomarcado de las células CHO-K1 y de los clones seleccionados de líneas normales (CHO-K1/A5) y deficientes en el metabolismo de esfingolípidos (SPB-1/SPH).

Propiedades farmacológicas del AChR expresado en SPB-1/SPH

Curvas de saturación

Los sitios de unión a [¹²⁵I]α-BTX medidos en las mutantes SPB-1/A7 y SPB-1/SPH se saturan entre 20 y 60 nM de ligando radioactivo, como en la línea control CHO-K1/A5. Las curvas de saturación realizadas a 25°C y las correspondientes transformadas de Scatchard se muestran en la Figura 7.

A temperaturas permisivas (30°C) en medio de cultivo completo (10% de suero fetal bovino), la expresión del receptor en superficie aumenta aproximadamente 2 veces la

expresión medida a 37°C (TABLA 1). A esa temperatura (33°C), el contenido de SM en las células mutantes es el 90% comparado con la línea normal (Hanada et al., 1990). A temperaturas superiores (semipermisivas), el valor de Bmax para las mutantes (medida a 37°C) es de 0.15 ± 0.03 y de 0.17 ± 0.02 pmol de toxina unida / mg de proteína para SPB-1/SPH y SPB-1/A7, respectivamente (TABLA 1). A esa temperatura el contenido de SM en células cultivadas en medio completo es de 62%.

Isotermas de saturación de las líneas clonales CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH

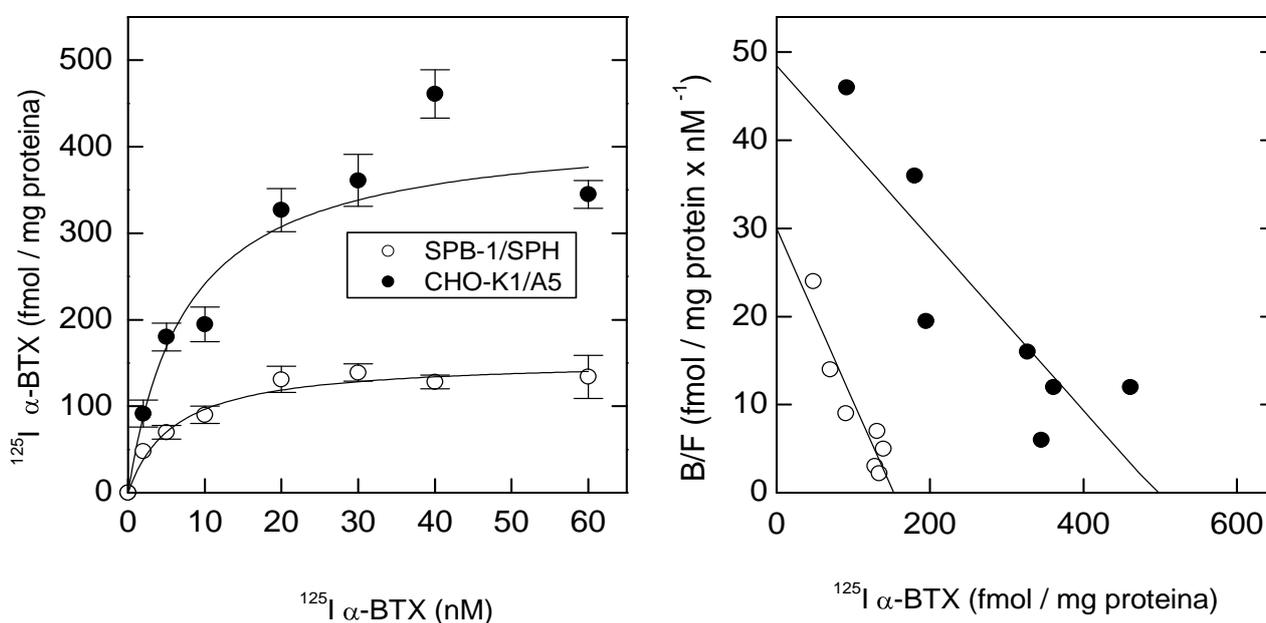


Figura 7. Curvas de saturación de ^{125}I α -BTX en células CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH. El gráfico de la izquierda muestra las curvas de unión de la toxina y el de la derecha muestra las correspondientes transformadas de Scatchard. Los ensayos de unión se realizaron en cultivos vivos, subconfluentes utilizando concentraciones crecientes de ^{125}I α -BTX, de 1-60 nM durante 1h a 25 °C. Para determinar la unión inespecífica se realizaron ensayos con muestras tratadas previamente con carbamilcolina 10 mM o toxina fría 10 μM . Las constantes de equilibrio de asociación se calcularon por las isotermas de saturación y el análisis de Scatchard.

Estudios cinéticos de unión a [125 I] α -BTX

Estudios cinéticos de unión a [125 I] α -BTX dieron como resultado una $K_{obs} = 1.43 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ para la línea control y $1.42 \pm 0.18 \text{ h}^{-1}$ para las mutantes, lo que demostró que no existen en esta línea alteraciones en la asociación del ligando al AChR (Figura 8, TABLA1).

Cuando determinamos el recambio metabólico del receptor, medido como desaparición de la marca en superficie de células marcadas por 1 hora a 37°C , dio como resultado un $t_{1/2} = 5.0 \pm 0.1 \text{ hs}$, y $t_{1/2} = 3.0 \pm 0.1 \text{ hs}$ en células salvajes y mutantes, respectivamente (TABLA1), demostrando una menor permanencia del AChR en la membrana de la línea mutante.

Cinética de asociación de [125 I] α -BTX de células CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH

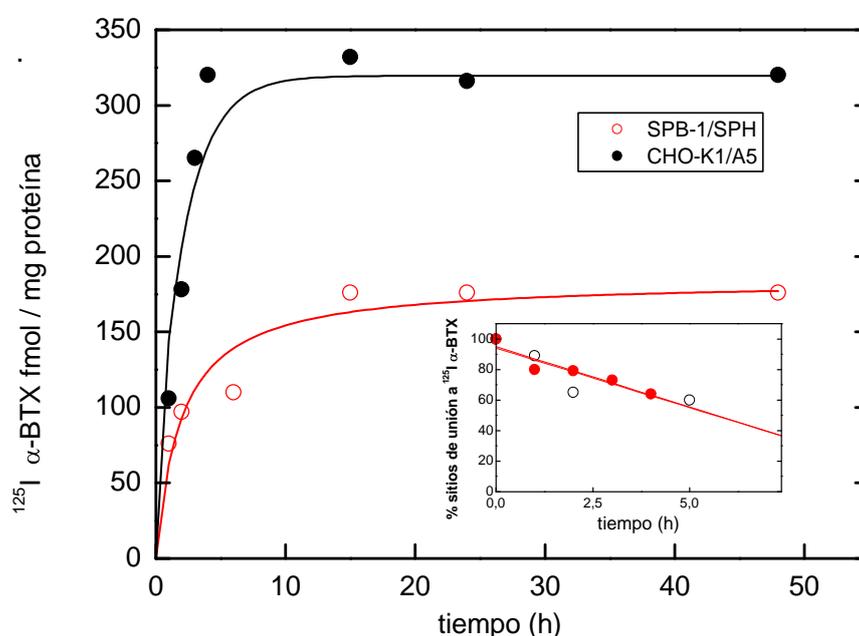


Figura 8. Cinética de asociación de [125 I] α -BTX. Las curvas se realizaron con cultivos vivos, a concentraciones saturantes para cada una de las líneas clonales utilizadas, según se indica en Materiales y Métodos. El inserto muestra un diagrama de la disociación de [125 I] α -BTX, luego del agregado de α -BTX fría, en los tiempos de incubación indicados.

Curvas de desplazamiento del AChR expresado en SPB-1/SPH

Para el análisis de las propiedades farmacológicas del AChR expresado en las diferentes líneas celulares, se realizaron ensayos de desplazamiento de [125 I] α -BTX frente a concentraciones crecientes de carbamilcolina, un agonista total, y de d-tubocurarina, un agonista parcial.

De acuerdo con la Figura 9, las curvas obtenidas para las diferentes líneas celulares son comparables con la línea celular de expresión endógena BC3H-1. La reducción de la marca radioactiva por aumento de la concentración de carbamilcolina se ajustó a una curva teórica cuyo coeficiente de Hill ≥ 1 . El nH es muy similar para la línea control y para las mutantes. Los valores obtenidos concuerdan con valores reportados para la línea de expresión endógena BC3H-1 y para fibroblastos con expresión heteróloga (Blount and Merlie, 1989; Blount and Merlie, 1991; Kopta and Steinbach, 1994). El valor hallado de IC_{50} con carbamilcolina para la línea CHO-K1/A5 fue de 3.6 μ M. Para la mutante SPB-1/SPH obtuvimos un valor de 2.7 μ M (TABLA1). La disminución de la marca con d-tubocurarina en la línea AChR control dio un coeficiente de Hill mucho menor. Estos resultados también coinciden con valores reportados por Kopta y Steinbach (1994), para el receptor expresado en forma heteróloga.

Curvas de desplazamiento de [125 I] α -BTX por carbamilcolina y d- tubocurarina

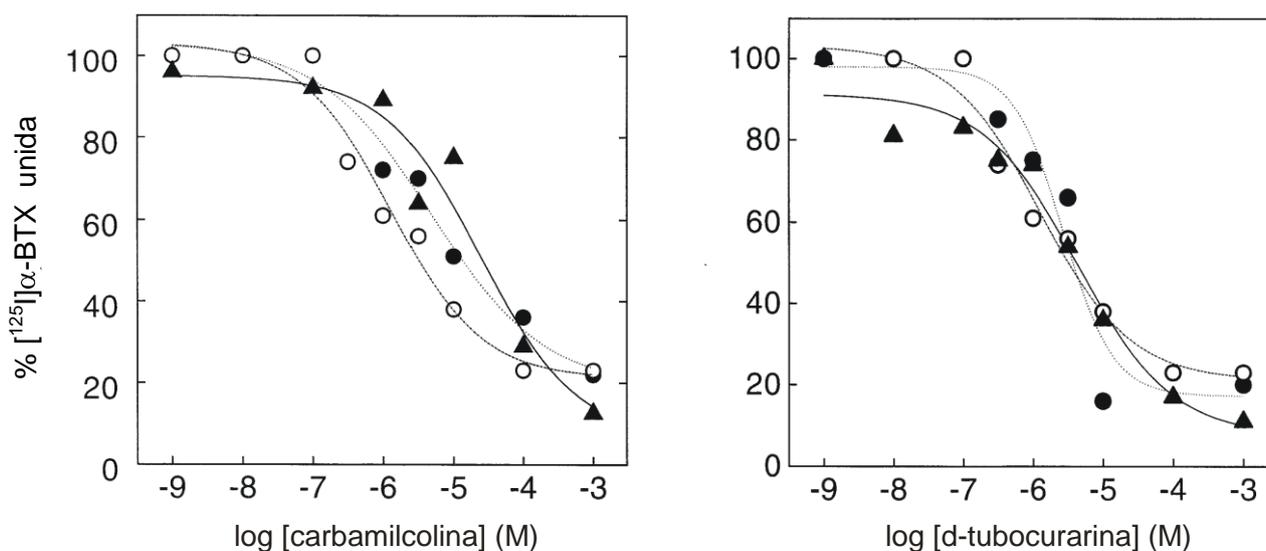


Figura 9. Curvas de desplazamiento. Isotermas de inhibición de la unión de α -BTX por carbamilcolina y d-tubocurarina en células CHO-K1/A5 (●) SPB-1/SPH (○) y BC3H-1(▲). Las diferentes líneas celulares fueron preincubadas con Carbamilcolina o d- tubocurarina durante 30 minutos en 0.9 ml de medio de cultivo. Luego, se les agregó [125 I] α -BTX hasta una concentración final de 8 nM y se incubó por 20 minutos más a temperatura ambiente. Los datos que se muestran son el resultado de 3 experimentos independientes con un DS < 0.15.

Inhibición del metabolismo de SLs por fumonisina B1 (FB1) en células CHO-K1/A5

Para determinar si las diferencias encontradas entre la línea celular normal y la mutante, se debían específicamente a la deficiencia de esfingolípidos, se reprodujo la condición de deficiencia lipídica en una célula normal. Se incubaron células CHO-K1/A5 con la toxina fúngica, FB1. Esta toxina es un inhibidor de la enzima ceramida sintetasa (Schroeder et al., 1994). El tratamiento se realizó con 50 μM de FB1 en medio Nutridoma – BO carente de lípidos. Los resultados determinaron una disminución del 45.5% de la expresión del receptor en superficie (TABLA1).

Microscopía de fluorescencia

Como complemento de los experimentos de unión con [^{125}I] α -BTX, las células en cultivo fueron marcadas con α -BTX Alexa⁴⁸⁸. Los resultados de la marcación del receptor en la superficie de células vivas, realizada según se detalla en la sección Materiales y Métodos, se muestran en la Figura 10. En dicha figura se observa claramente una línea clonal homogénea en la expresión y marcada selectivamente en la superficie celular.

SPB-1/SPH

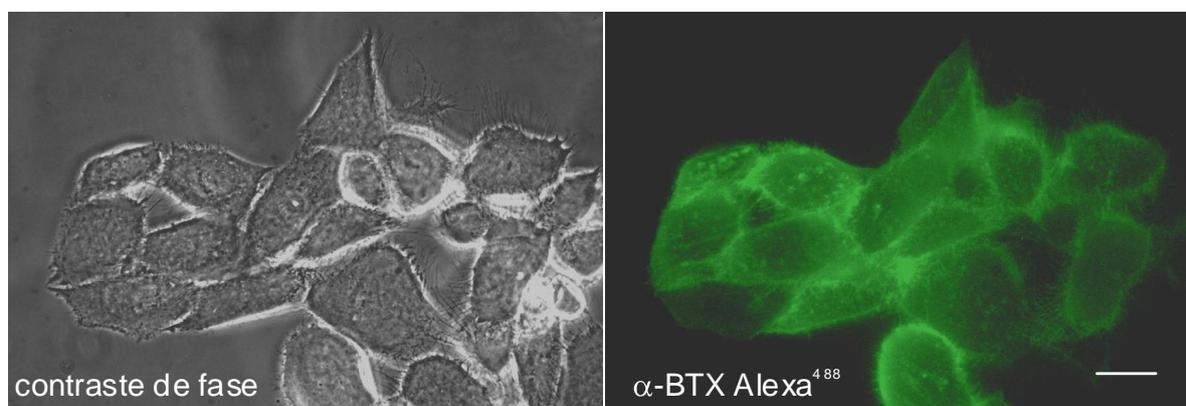


Figura 10. Microscopía de Fluorescencia de SPB-1/SPH. Cultivos celulares se marcaron con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ por 1 hora a 4°C, se lavaron con PBS y se montaron vivas en portaobjetos para ser visualizadas en el microscopio de fluorescencia. Ver sección Materiales y Métodos. Escala 25 μM

En la Figura 11 mostramos el perfil de maracación de la línea clonal deficiente en SM en dos condiciones de cultivo. En el panel izquierdo se puede ver la distribución y la magnitud de los receptores de superficie e intracelulares cultivados con el medio completo

(ver Materiales y Métodos). En el panel de la derecha se aprecia la diferencia en la magnitud de expresión cuando el clon está cultivado en medio deprivado de lípidos.

SPB-1/SPH

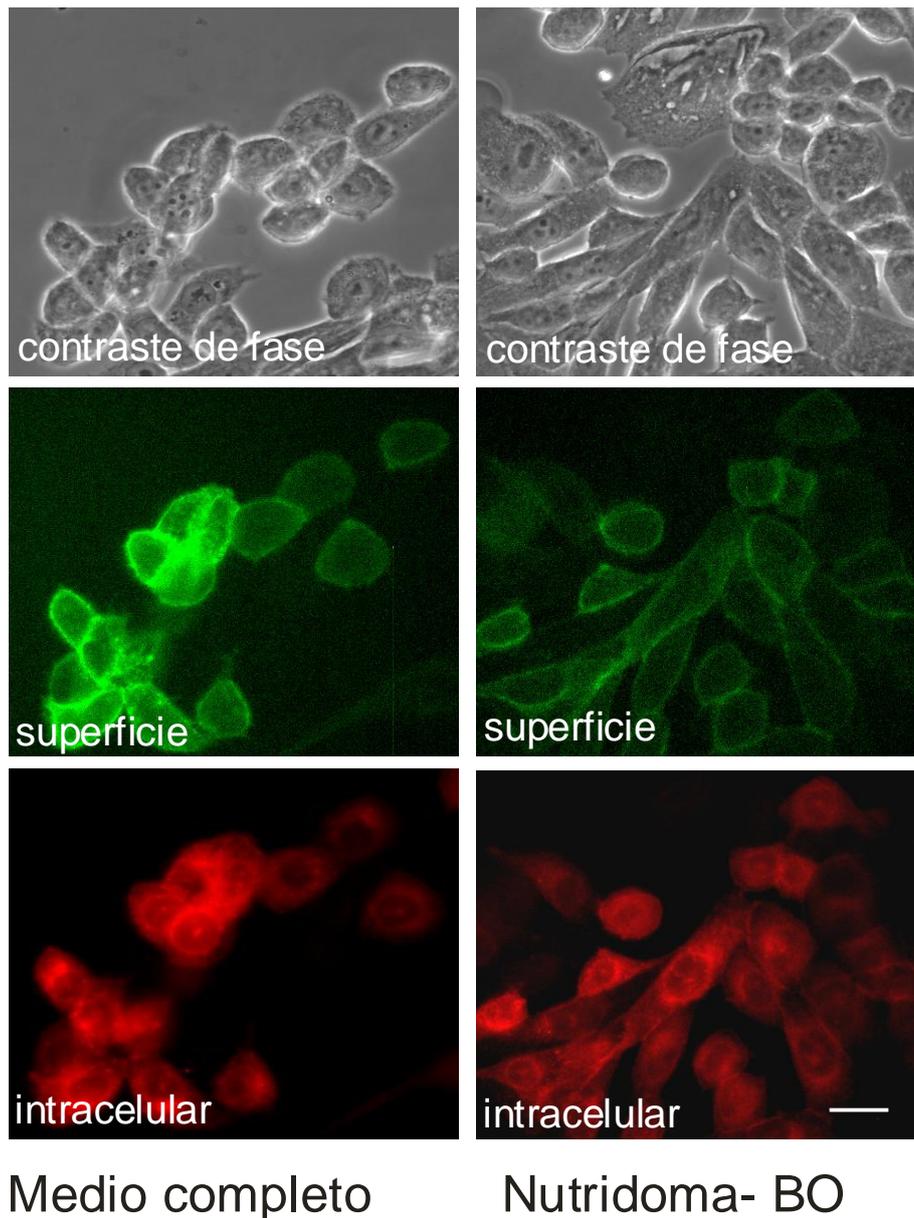


Figura 11. Perfil de marcación de células SPB1/SPH por microscopía de fluorescencia en diferentes condiciones de cultivo. Se marcaron las células con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ durante 1 h. a 4°C, se lavaron con PBS, se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron nuevamente con α -BTX Alexa⁵⁹⁴ (ver sección Materiales y Métodos). El panel de la izquierda muestra imágenes de contraste de fase, el perfil de marcación del receptor de superficie e intracelular en la condición de cultivo con medio completo. El panel de la derecha muestra el resultado obtenido con un cultivo sin aporte de lípidos exógenos. Escala 25 μ M

Electrofisiología del canal iónico expresado en las líneas celulares de expresión heteróloga CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH

Paralelamente, en nuestro grupo de trabajo se caracterizaron los parámetros electrofisiológicos del canal iónico, expresado en CHO-K1/A5 y SPB1/SPH.

Mediante la técnica de patch-clamp, se realizaron registros de canal único en la configuración "inside-out", en ambas líneas celulares. Los resultados mostraron para la línea de referencia valores de conductancia de ≈ 60 pS y dos tiempos de estado abierto, 1.9 ± 0.3 y 0.3 ± 0.08 ms, en total correspondencia con los parámetros reportados para un receptor adulto normal expresado endógenamente (Gu et al., 1990; Charnet et al., 1992; Camacho et al., 1993).

En la línea clonal mutante los valores encontrados no difieren de los de la línea de referencia, aun en las condiciones de máxima deficiencia de contenido de SM, a temperaturas permisivas, semipermisivas y en diferentes condiciones de cultivo (TABLA 2).

Cabe destacar, que cuando la línea con metabolismo lipídico normal se incubaba en presencia de $50 \mu\text{M}$ de FB1 y se inhibe el metabolismo de SM no se detectan cambios en los parámetros electrofisiológicos del canal (TABLA 2) (Roccamo et al., 1999).

TABLA 2. Propiedades de canal único del AChR expresado en la línea celular normal (CHO-K1/A5) y la mutante (SPB-1/SPH) bajo condiciones de crecimiento semipermisivas o nopermisivas.

Línea Celular	Temperatura crecim. (°C)	Tiempo medio de estado abierto (ms)	
		Componente breve	Componente largo
CHO-K1/A5 (1)	37	0.31 ± 0.05	1.94 ± 0.30
CHO-K1/A5 (2)	37	0.44 ± 0.11	1.66 ± 0.04
SPB-1/SPH (1)	37	0.32 ± 0.08	1.60 ± 0.30
SPB-1/SPH (3)	37	0.35 ± 0.10	1.71 ± 0.31
SPS-1/SPH (3)	39	0.33 ± 0.12	1.97 ± 0.32

Las líneas celulares fueron cultivadas en (1) medio completo Ham's F-12 + 10 % FCS; (2) medio de composición lipídica definida Nutridoma-BO + $50 \mu\text{M}$ FB-1; (3) medio Nutridoma-BO

Discusión

Los SLs presentes en células eucariotas constituyen una fracción pequeña (10-20%) pero de vital importancia de los lípidos de membrana. Desde su descubrimiento hace más de 100 años, su gran diversidad de compuestos ha fascinado a los biólogos y los ha motivado para esclarecer su función específica y su importancia funcional. En un principio se les asignó una función puramente estructural pero fue creciendo el reconocimiento de que las bases esfingoideas, ceramidas y otros intermediarios metabólicos actúan como señales moleculares en el control del ciclo celular, en la respuesta a estrés y en el proceso de apoptosis (Hannun and Obeid, 1997). Además, existen evidencias experimentales que prueban que estos compuestos dirigen la diferenciación lateral de las membranas biológicas que permiten la existencia de islotes de composición molecular determinada. Se ha postulado que las características de miscibilidad diferencial de estos lípidos disparan la formación de microdominios que adquieren funciones específicas concentrando o excluyendo determinadas proteínas de membrana (Simons and van, 1988). Actualmente se sabe que estos microdominios lipídicos sirven como plataformas para varios eventos celulares incluyendo la transducción de señales, la adhesión celular y la polaridad en la inserción de proteínas en las membranas.

Los SLs se clasifican en dos grupos: los fosfoesfingolípidos y los glicoesfingolípidos. Predominan en la membrana plasmática con respecto a las membranas intracelulares y son más abundantes en la hemicapa externa que en la interna (Hakomori, 1981). La síntesis de los SLs se produce en el complejo de Golgi. Éste es una estructura subcelular que constituye una estación donde convergen los dos mayores circuitos del tráfico intracelular, uno que conecta el complejo de Golgi con el RE y el otro con la membrana plasmática.

La expresión heteróloga de proteínas en líneas celulares es una metodología que nos ha permitido estudiar la influencia de la composición de la membrana en la estructura y función del AChR. Independientemente de la proteína que se estudie, esta estrategia permite sortear la imposibilidad que supone tener una célula viva carente de cualquiera de las especies lipídicas, naturalmente presentes en las células eucariotas. La transfección de las subunidades del AChR muscular de ratón en células no musculares nos permitió comparar las propiedades de la proteína en un sistema heterólogo que carece de otras proteínas musculares (Forsayeth et al., 1990c). Utilizamos una línea celular a modo de tubo de ensayo y avanzamos en este sentido logrando la expresión estable del AChR muscular de ratón en una mutante sensible a la temperatura. Cultivado a temperaturas semipermisivas y no permisivas, el sistema es deficiente en el contenido de SM. Los resultados obtenidos con la línea control demuestran que en esas condiciones no se generan otros efectos metabólicos nocivos, ni cambia el nivel de síntesis de membranas ni la viabilidad celular. De esta manera, pudimos comparar las propiedades funcionales del

receptor en una línea normal, CHO-K1/A5, con respecto a la línea patológica SPB-1/SPH y establecer la participación de estas especies lipídicas en el tráfico de la proteína a la membrana.

Las proteínas multiméricas integrales de membrana se sintetizan en el RE y mientras lo hacen, deben plegarse y someterse a un proceso de armado o ensamblado, finamente regulado y asistido por chaperonas. Sólo el receptor ensamblado, pentamérico, insertado en la membrana logra salir del RE, llegar al complejo de Golgi (Smith et al., 1987) y de allí, a la membrana plasmática. Las subunidades no plegadas ni ensambladas son retenidas en el RE y rápidamente degradadas (Harikumar et al., 2005).

Estudios realizados con el receptor de colecistoquinina expresado de manera heteróloga en células SPB-1 demostraron que las temperaturas no permisivas, y por ende, deficientes en SM, inhiben marcadamente el tráfico y la internalización de este receptor (Harikumar et al., 2005). En iguales condiciones y por las mismas rutas, el tráfico del receptor de transferrina no sufre cambios, lo que sugiere la gran diversidad de mecanismos regulatorios de los cuales se valen las células para su funcionamiento. Además, este hecho destaca la importancia de la estructura de la proteína en la formación de dominios particulares con relevancia funcional en las membranas celulares que poseen selectividad en el contenido lipídico y proteico.

Los resultados presentados en este capítulo indican que la deficiencia en el metabolismo de SLs no produce cambios en las propiedades de unión al ligando ni en las propiedades electrofisiológicas del canal. En células SPB-1/SPH la biosíntesis reducida de estos lípidos provoca la disminución de los niveles de receptores en la superficie celular (Roccamo et al., 1999). Baier y col. (Baier and Barrantes, 2007) remarcaron la relación existente entre los niveles de SLs y el tráfico exocítico del AChR, y propusieron la participación de estos lípidos a modo de chaperonas en el proceso de ensamblado del receptor. La importancia de los SLs en la regulación del tráfico proteico está bien documentada. Las proteínas recientemente sintetizadas cuyo destino final es la superficie celular, deben viajar a través de compartimientos conteniendo SLs cuali- y cuantitativamente diferentes. Las alteraciones en los niveles de SLs pueden influir sobre el transporte proteico (Rosenwald et al., 1992). En levaduras, la síntesis alterada de SLs causa defectos en el tráfico de la Fus-Mid-GFP, una proteína residente en microdominios de membrana, desde la red *trans-Golgi* (TGN) a la membrana plasmática (Proszynski et al., 2005). La inhibición de la síntesis de glucosil ceramida (GlcCer) por tratamiento con la droga PDMP (inhibidor de la enzima GlcCer sintasa) reduce la llegada a superficie de la proteína MDR1 en hepatocitos, demostrando la importancia de este SL para el correcto tráfico de esta proteína desde el Golgi a la superficie apical (Wojtal et al., 2006). Más recientemente, Lucic y col. (2007)

observaron que la inhibición de la síntesis de SM reduce la secreción de la proteína apoE por macrófagos y aumenta la retención intracelular de esta proteína.

Obtención y análisis del AChR expresado en PSA-3, una línea celular deficiente en el metabolismo de fosfatidilserina

Antecedentes y objetivos

Las membranas celulares están formadas fundamentalmente por proteínas y una gran diversidad de fosfolípidos, que debido a su carácter anfipático, constituyen lo elementos esenciales de la bicapa lipídica. En la composición de la bicapa participan mayoritariamente cuatro tipos de lípidos: la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS) y la esfingomiélin (SM) (Martínez et al., 2006). En general, en la mayoría de las membranas celulares de mamíferos, la PC es el glicerolípido polar más abundante (40-50%), seguido por PE (20-50%) y PS, que representa 2-10% del total.

El metabolismo de la PS está estrechamente relacionado con el de la PC y el de la PE, tal como se muestra en la Figura 1 (Vance, 2008). La distribución del contenido de PS en las membranas de diferentes tejidos y tipos celulares no es homogénea. Este fosfolípido está enriquecido en membranas del cerebro, particularmente en la fracción subcelular denominada sinaptosoma así como en la retina, lo que sugiere su participación funcional en el sistema nervioso.

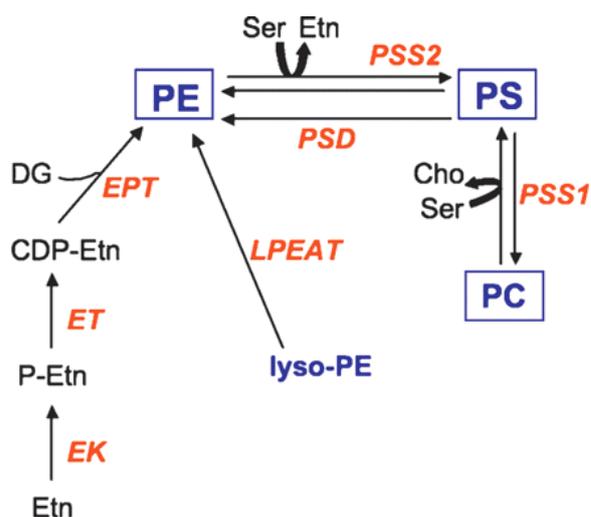


Figura 1. El metabolismo de la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE) en células de mamífero. La PS se produce en el retículo endoplasmático (RE) a través de dos enzimas intercambiadoras de bases, PS sintasa-1 (PSS1) y PS sintasa-2 (PSS2), que intercambian las bases colina (Cho) y etanolamina (Etn) de PC y PE por serina (Ser). La síntesis de PE ocurre por fosforilación de Etn por la etanolamina quinasa (Wojtal et al., 2006) que luego es transformada en CDP-etanolamina por acción de la CTP:fosfoetanolamina citidiltransferasa (ET). En la etapa final, la CDP-etanolamina se une a 1,2-diacilglicerol en una reacción catalizada por CDP-etanolamina:1,2-diacilglicerol etanolaminofosfotransferasa (EPT). Otra de las vías biosintéticas utiliza fosfatidilserina decarboxilasa (PSD) para sintetizar PE a expensas de PS en mitocondrias. PE también se sintetiza a partir de liso-fosfatidiletanolamina por la enzima acyl-CoA aciltransferasa (LPEAT)(Vance, 2008).

En la membrana plasmática de células de mamífero la PS está ubicada casi exclusivamente (>80%) en la hemicapa interna y allí representa ~20% de su superficie. Su topología está finamente regulada por translocación desde la superficie externa a la cara citoplasmática de la bicapa por proteínas tales como las flipasas y las escramblasas. Utilizando estos sistemas, la translocación de PS a la hemicapa externa ocurre en procesos diversos de activación celular, envejecimiento y apoptosis, lo que revela el papel clave de este fosfolípido en la bioquímica celular (Kuge and Nishijima, 2003; Yeung et al., 2008).

La PS se sintetiza en el RE y los mecanismos que regulan su transporte hacia otras membranas son muy poco conocidos. Con respecto a los productos de genes que serían responsables del tráfico de PS a otras membranas, estudios realizados en levaduras deficientes en mecanismos de transporte demostraron que éste se puede mejorar por la expresión de una proteína que es producto del gen MET30. Esta proteína participa en un complejo que une ubiquitina, lo que indicaría la presencia de un mecanismo regulado por ubiquitinilación.

A la luz de nuevos hallazgos experimentales, la PS es considerada, además, un cofactor que activa proteínas de señalización, tales como la proteína quinasa C (Nishizuka, 1992), la proteína quinasa Raf-1 (Ghosh et al., 1994), el factor de coagulación V (Mann et al., 1998), la GTPasa de Dinamina (Powell et al., 2000), la esfingomielinasa neutra (Tomiuk et al., 2000), y la diacilglicerol quinasa (Dries and Newton, 2008), entre otras.

Ciertas proteínas involucradas en procesos de exo- y endocitosis interactúan fuertemente con aminofosfolípidos como PS, a nivel de sus cabezas polares (Kohler et al., 1997; Popoli et al., 1997; Quetglas et al., 2002; Wenk and De, 2004; Hui et al., 2005). En los ensayos en los que se midió *in vitro* la actividad de este tipo de proteínas, se observó un importante deterioro funcional en ausencia de estos lípidos.

Con respecto a nuestra proteína de interés, el AChR, resultados obtenidos a partir de estudios sobre la relación estructural del receptor y los lípidos de la membrana (Arias and Barrantes, 1990; Blanton and Wang, 1990), mostraron una fuerte interacción de la subunidad α , específicamente el segmento α M4, con un análogo fotoactivable de la PS, ^{125}I -ASA-PS. La evidencia experimental de un fosfolípido fuertemente cargado en íntimo contacto con la proteína receptora sugiere una fuerte relación entre ambas moléculas, con implicancias estructurales y funcionales. Por tal motivo, nuestro laboratorio se abocó al estudio de esta relación lípido-proteica con el objeto de determinar la relación funcional entre la PS y el AChR. Para alcanzar dicho objetivo era necesario contar con un sistema celular modelo con alteraciones en el metabolismo de PS y que expresase el AChR, para poder evaluar en forma directa el efecto de la PS sobre la proteína receptora. Recurrimos entonces a la misma estrategia que se desarrollara para estudiar el efecto de la deficiencia de esfingolípidos, generando un sistema celular mutante, deficiente en el metabolismo de PS, que expresa

heterológamente el AChR. A tal efecto nuestro laboratorio solicitó y obtuvo del Prof. Kentaro Hanada, del Departamento de Química de Instituto de Salud del Japón, una línea celular derivada de CHO-K1, denominada PSA-3, aislada y caracterizada por Kuge y col. (Barrantes, 1986; Kuge et al., 1986b). Esta mutante constituye una línea clonal que requiere de PS exógena para su normal crecimiento. Posee una alteración genética que impide el correcto funcionamiento de una de las enzimas que catalizan la síntesis de PS por intercambio de bases de los fosfolípidos con serina.

En la línea celular CHO-K1 se han determinado dos tipos de enzimas que sintetizan PS por intercambio de bases. Uno corresponde a las denominadas intercambiadoras de Tipo I (PSS1) y el otro a las denominadas intercambiadoras de Tipo II (PSS2). Ambas están codificadas por genes diferentes. Las de Tipo I pueden utilizar para el intercambio serina, etanolamina y colina, las de Tipo II, no pueden utilizar PC como sustrato.

La línea mutante PSA-3 utilizada en esta Tesis es deficiente en la transferasa de Tipo I. Cabe señalar que en esta línea celular, esta enzima es la que interviene en el paso crítico en la síntesis de la PS. La mutación se manifiesta fenotípicamente por una disminución del crecimiento celular. Luego de dos días en cultivo, sin el agregado del fosfolípido, el contenido de PS es de 1/3 del que posee la línea parental. Extractos celulares de estas mutantes poseen un 33% de la actividad normal de la enzima intercambiadora de bases entre fosfolípidos y serina, un 45% de la actividad intercambiadora de fosfolípidos con etanolamina, y una actividad intercambiadora de colina prácticamente nula (Albrecht et al., 2005).

El objetivo de los estudios presentados en este capítulo fue establecer un sistema experimental deficiente en PS que exprese el receptor nicotínico muscular en forma estable, en la misma línea celular, y determinar si en condiciones experimentales en las que se manifiesta la deficiencia del fosfolípido, se generan cambios en las propiedades funcionales y/o estructurales del AChR, que demuestren una dependencia de las mismas con la PS.

Resultados

Expresión del AChR muscular de ratón en células PSA-3: creación de una nueva línea celular, PSA/AChR, con deficiencias en el metabolismo de fosfatidilserina

Para determinar el efecto de la deficiencia de PS en la estructura y/o funcionalidad del AChR, generamos y establecimos un modelo celular genéticamente modificado que expresa el receptor en forma heteróloga. Para ello cotransfectamos los ADNc de las cuatro subunidades del AChR en células PSA-3, mutantes deficientes en el metabolismo de PS.

Utilizamos el método de transfección con fosfato de calcio y los mismos vectores recombinantes de expresión eucariota empleados en la obtención de la línea clonal CHO-K1/A5 y SPB-1/SPH, como detallamos en la sección Materiales y Métodos. La mezcla de transfección contenía pSM α , pSM β , pSM ϵ y pSM δ en relación molar 2:1:1:1, más un plásmido adicional, pSV2-Neo, que confiere resistencia al antibiótico G418, en una relación molar diez veces menor (0.1). Esta estrategia, común para todos los protocolos en los que se obtuvieron líneas celulares, nos permitió obtener una población de células resistentes a G418 que expresan la totalidad de las subunidades del AChR.

Finalizado el proceso de selección, en presencia de altas concentraciones de antibiótico (G418, 400 $\mu\text{g/ml}$), se aislaron una decena de clones resistentes, que fueron cultivados como líneas independientes. En una etapa posterior obtuvimos el ARN total de cada clon, para realizar ensayos de RT-PCR con cebadores específicos para cada subunidad. La presencia en un gel de agarosa de los replicones correspondientes a las cuatro subunidades, y la verificación de su identidad por análisis de restricción, permitieron demostrar la inserción genómica y la expresión del receptor completo a nivel del ARN mensajero.

Se ampliaron y se cultivaron las líneas clonales con expresión positiva para las cuatro subunidades del receptor de manera independiente, los clones seleccionados se evaluaron por ensayos de unión al antagonista competitivo de alta afinidad, [^{125}I] α -BTX.

Para determinar la expresión del receptor en la membrana plasmática utilizamos cultivos vivos y concentraciones saturantes de la toxina marcada. Las líneas con mayor valor de radioactividad en superficie, expresada como fmoles/mg de proteína, fueron ampliadas y congeladas. El clon que mostró mayor nivel de expresión en la superficie celular, se denominó **PSA/AChR** y es el que utilizamos para el desarrollo de todos los experimentos realizados en esta parte del trabajo de Tesis.

Cuantificación de la expresión del AChR en células PSA/AChR

Se determinó el número de sitios que unen toxina en la membrana plasmática. Para ello, cultivos vivos de tres días con un grado de confluencia del 70-80% fueron incubados en medio completo con $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ en un rango de concentraciones entre 1 y 80 nM, como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los resultados mostrados en la Figura 2 se comparan con la línea control CHO-K1/A5. Los experimentos se realizaron en paralelo, con ambas líneas, en idénticas condiciones de trabajo.

Los resultados muestran en la línea mutante una $B_{\text{max}} = 495$ fmol/mg de proteína. Este valor representa alrededor del 50% del total de receptores expresados en la línea CHO-K1/A5 donde calculamos una $B_{\text{max}} = 1054$ fmol/mg.

Las constantes de disociación calculadas por las isotermas de saturación y el análisis de Scatchard, dio como resultado una $K_D = 67$ nM para PSA/AChR y una $K_D = 63$ nM para la línea de referencia, mostrando que no hay diferencias significativas de afinidad del AChR por la toxina en nuestras condiciones de trabajo.

Isotermas de saturación

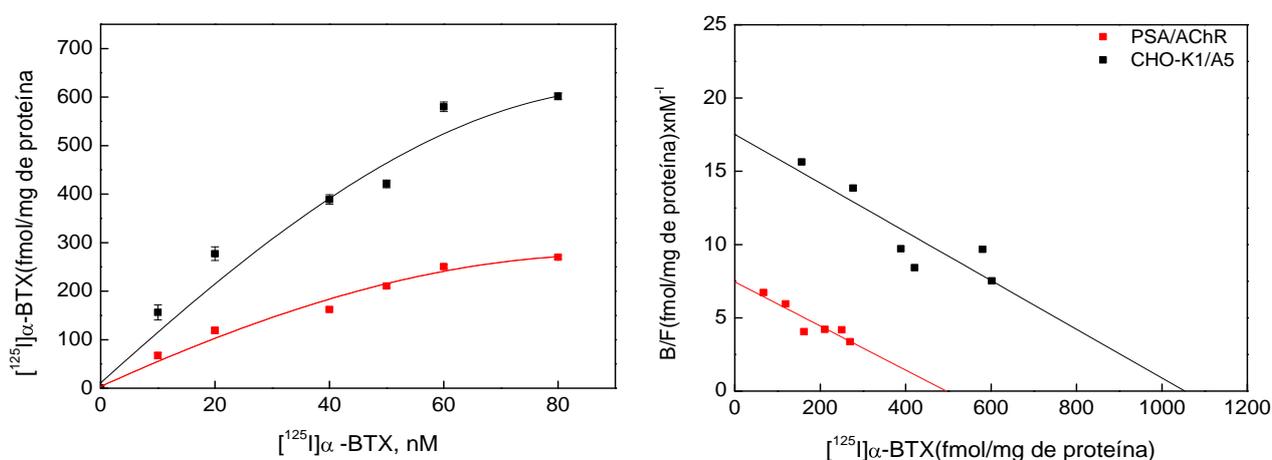


Figura 2. Curvas de saturación de $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ en células PSA/AChR. Los ensayos de unión se realizaron en cultivos vivos con 70-80% de confluencia a concentraciones de toxina crecientes de 0 - 80 nM. La constante de disociación se calculó por las isotermas de saturación y el análisis de Scatchard correspondiente.

Hasta aquí, todos los ensayos se realizaron en medio de cultivo completo (Ham's F12 + 10% de suero fetal bovino), sin el agregado exógeno de PS. En ese medio, las células se cultivaron al menos por tres días y en estas condiciones el contenido de PS en el sistema es 1/3 del correspondiente a la línea parental (Kuge et al., 1986b). Por lo tanto, nuestros

resultados corresponden en un sistema celular que posee una importante disminución del contenido endógeno de PS.

Grados de expresión del AChR en la superficie de células PSA/AChR

Determinamos la expresión del AChR en la membrana plasmática de las células PSA/AChR y CHO-K1/A5 en diferentes condiciones de cultivo. Se realizaron ensayos de unión a [¹²⁵I]α-BTX en: a) medio completo (M.C.), donde se manifiesta la deficiencia en el contenido de PS; b) en medio Nutridoma-BO (Nut.), como modelo de un cultivo carente de lípidos exógenos; y c) en medio de cultivo completo más el agregado de liposomas de PS a una concentración de 30 μM (M.C + PS) (ver Materiales y Métodos). En esta última condición el medio de cultivo aporta la cantidad necesaria del fosfolípido para lograr la concentración óptima y el desarrollo normal de las células (Kuge et al., 1986b). Los resultados obtenidos (Figura 3) muestran que el número de receptores que llegan a la membrana plasmática varía cuantitativamente de acuerdo con la concentración de PS aportada por el medio.

Después de tres días de cultivo en medio completo, el AChR expresado en las células PSA/AChR disminuye significativamente en la superficie celular ($p < 0.0001$). En condiciones de cultivo, con el medio Nutridoma-BO, los valores determinados en superficie disminuyeron aun más, llegando a una reducción de la expresión del AChR del 80% ($p < 0.0001$). Por el contrario, en la condición en la cual se repone el contenido del fosfolípido al sistema, por el agregado de 30 μM de liposomas de PS, los niveles del AChR en la superficie celular de la línea PSA/AChR alcanza los valores de referencia ($p < 0.0001$). Es importante destacar que la línea de referencia CHO-K1/A5 no manifiesta cambios significativos en el número de receptores determinados en la membrana plasmática aun en las condiciones de mínima concentración de fosfolípidos en el medio (Nutridoma-BO).

Expresión del AChR en líneas clonales normales y mutantes en diferentes condiciones del cultivo

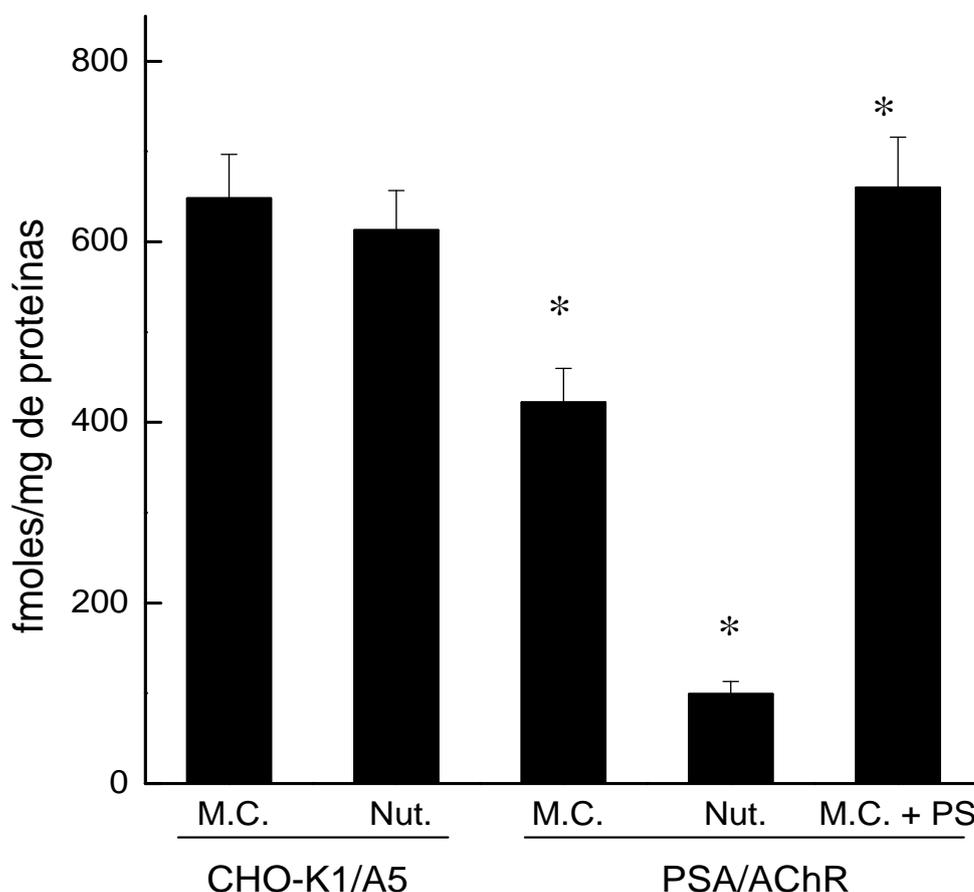


Figura3. Unión de $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ a la membrana plasmática de células normales y mutantes deficientes en PS. Las líneas celulares e diferentes condiciones de cultivo se marcaron con $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ durante 30 minutos a 37°C , se lavaron con PBS y se contaron con un contador gama, con un 80% de eficiencia. La unión inespecífica de toxina se determinó en muestras preincubadas con carbamilcolina 1mM, media hora antes del agregado de la toxina marcada. M.C.medio completo), Nut. (Nutridoma-BO) * $p < 0.0001$.

Distribución topológica del AChR expresado en las células PSA/AChR

La disminución del número de AChRs en la membrana por deficiencia de PS, podría corresponderse con variaciones en el número de receptores intracelulares. Para corroborar esto, calculamos el número total de receptores expresados mediante ensayos de unión de $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ a células previamente permeabilizadas. Al valor obtenido le restamos el valor correspondiente al número de receptores de superficie, calculando de esta manera el número de receptores intracelulares.

En la línea mutante encontramos que alrededor del 45% del AChR sintetizado pertenece al compartimiento intracelular. Este resultado es significativamente mayor que el

valor de 30% calculado para la línea control ($p < 0.005$), tal como se muestra en la Figura 4. Los ensayos se realizaron nuevamente con células de al menos tres días de cultivo, en medio completo. En esas condiciones, con deficiencia de PS, la línea experimental muestra un aumento de los receptores intracelulares con respecto a los de superficie.

Distribución celular del AChRs en PSA/AChR y CHO-K1/A5

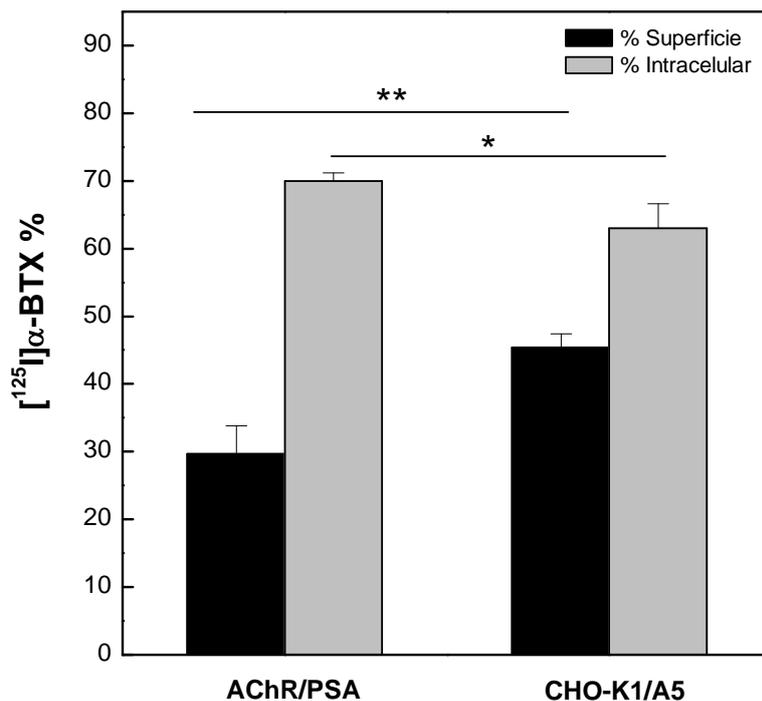


Figura 4. Determinación del % de AChRs de superficie e intracelular de células PSA/AChR y CHO-K1/A5. Ambas líneas celulares cultivadas en medio completo se sometieron a ensayos de unión con $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$. La determinación se realizó en células enteras y permeabilizadas con saponina según se describe en Materiales y Métodos. Las diferencias entre los niveles de AChR de la superficie celular comparados con los valores obtenidos en el compartimiento intracelular de la línea mutante, difieren significativamente de las obtenidas en la línea celular control. * ($p < 0.005$), ** ($p < 0.0001$)

Cinética de asociación del AChR expresado en PSA/AChR.

Para la caracterización farmacológica del AChR expresado en la línea PSA/AChR, analizamos la cinética de asociación de $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ al AChR expresado en superficie. Las curvas se realizaron con 10 nM de $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ en función del tiempo, con células en cultivo vivas. Los resultados muestran que la velocidad de asociación inicial que se tiene entre los 0-10 minutos de incubación es comparable entre ambas líneas celulares y solo difieren en la

cantidad total de receptores, detectada a tiempos más prolongados producto de la diferencia de la expresión de superficie (Figura 5).

Cinética de asociación de [125 I] α -BTX al AChR expresado en PSA/AChR

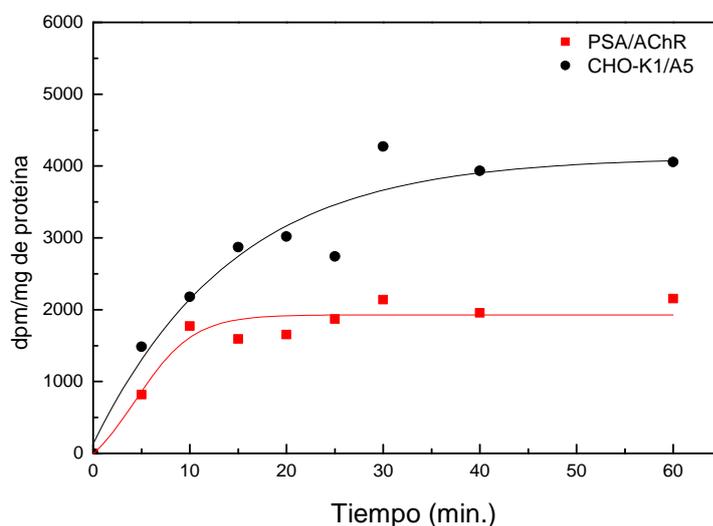


Figura 5. Cinética de asociación de [125 I] α -BTX al AChR expresado en PSA/AChR. Las curvas representan la unión de 10 nM de [125 I] α -BTX a cultivos celulares en placas de 35mm incubados a distintos tiempos a temperatura ambiente. En los tiempos indicados se frenó la reacción por lavados con PBS frío. Los cultivos se levantaron con NaOH 0,1N y se midieron con un contador gama. Cada muestra representa el promedio de 3 placas de cultivo procesadas en forma individual.

Inhibición de la unión de [125 I] α -BTX por el agonista carbamilcolina

Como parte de la caracterización farmacológica del AChR en el sistema mutante, determinamos las curvas de inhibición de la unión de por competición con el agonista carbamilcolina. La Figura 6 muestra el resultado de los ensayos realizados con ambas líneas clonales, determinando una $IC_{50} = 3.2 \mu M$ para la línea CHO-K1/A5 y $2.1 \mu M$ para PSA/AChR. Cada punto de la curva corresponde al promedio de triplicados de un mínimo de 3 experimentos realizados.

Curvas de desplazamiento de [125 I] α -BTX por carbamilcolina

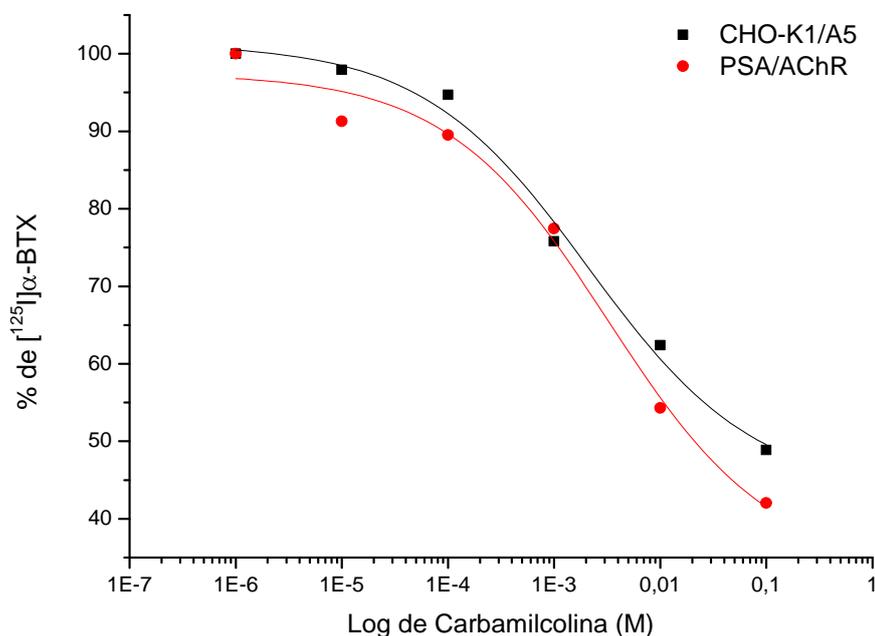


Figura 6. Curvas de desplazamiento de [125 I] α -BTX por carbamilcolina. Células en cultivo vivas se marcaron por 1 hora a temperatura ambiente en presencia de las concentraciones de carbamilcolina que se indican. Finalizado el tiempo de incubación, se lavaron con PBS, se levantaron con NaOH 0.1N y se contaron con un contador gama.

Determinación del perfil de expresión del AChR en PSA/AChR por microscopía de fluorescencia

Para mostrar el perfil de expresión de la proteína receptora en la línea mutante y compararla con la línea normal empleamos la técnica de microscopía de fluorescencia. Utilizamos α -BTX marcada con el fluoróforo Alexa⁴⁸⁸ en células en cultivo vivas para marcar el receptor expresado en superficie. Para marcar el receptor intracelular, usamos α -BTX-Alexa⁵⁹⁴ en células fijadas y permeabilizadas. En este caso, saturamos previamente los receptores de superficie con α -BTX sin marcar. Como muestra la Figura 7, ambas líneas celulares poseen el mismo perfil de marcación intracelular.

De acuerdo con los resultados obtenidos utilizando [125 I] α -BTX, la Figura 8 muestra la diferencia de intensidad de fluorescencia en la superficie celular del clon mutante, cultivado en medio completo y en medio Nutridoma-BO. El clon deficiente utilizado para la marcación es el mismo, cultivado en las dos condiciones indicadas. Se aprecia la disminución de la marcación en superficie de la línea experimental deficiente en PS.

Expresión del AChR en PSA/AChR

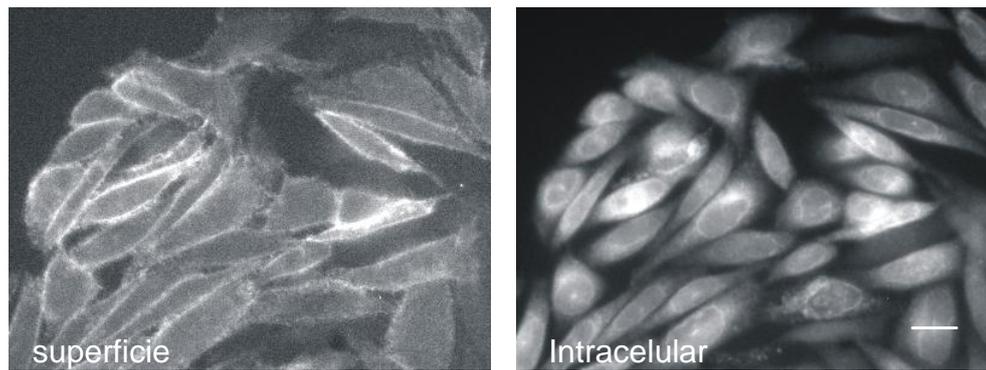


Figura 7. Perfil de marcación de PSA/AChR. Células en cultivo se marcaron vivas con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ durante 50 minutos a 4°C (panel izquierdo). Después de retirar la toxina libre remanente por lavados con M1, se fijaron, se permeabilizaron (según se detalla en Materiales y Métodos) y se marcaron con α -BTX Alexa⁵⁹⁴ (panel derecho). Escala 10 μ m.

PSA/AChR

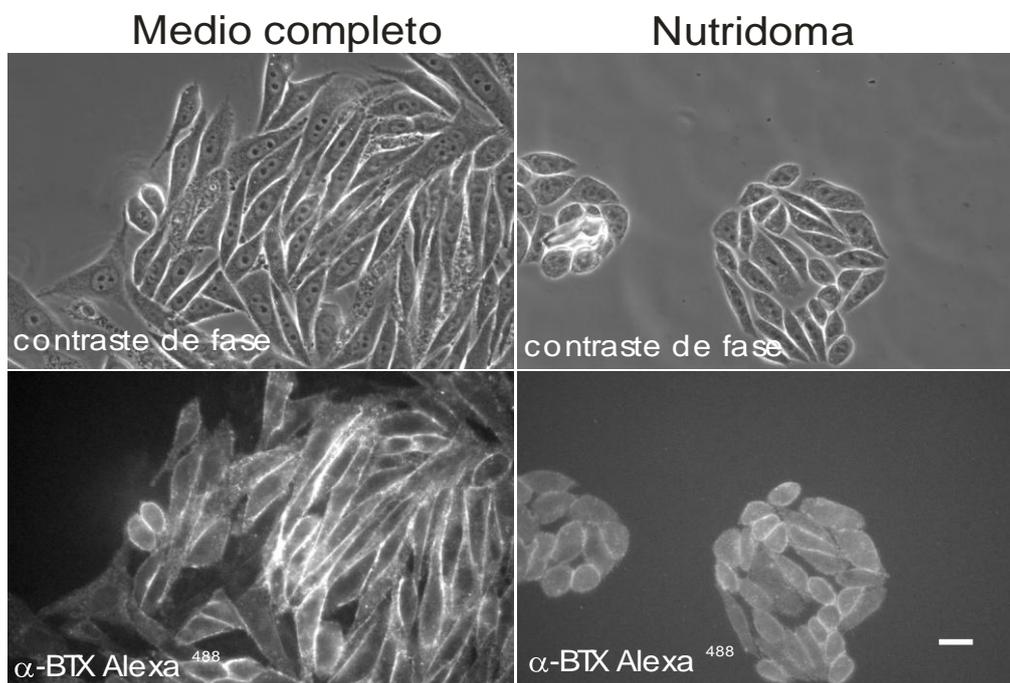


Figura 8. Microscopía de Fluorescencia de la línea celular PSA/AChR. Cultivos celulares sobre cubreobjetos de vidrio se marcaron con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ durante 1 hora a 4°C. Se lavaron con medio M1 y se fotografiaron. Escala 20 μ m.

Determinación del estado de ensamblado del AChR en PSA/AChR por sedimentación en gradientes de sacarosa

Hasta aquí, los resultados experimentales mostraron un aumento significativo del receptor intracelular con respecto al de superficie en el sistema mutante (véase Figura 4). Decidimos, por lo tanto, analizar la población de receptores intracelulares para determinar la capacidad de ensamblado del AChR en condiciones de deficiencia de PS. Por medio de sedimentación en equilibrio en gradientes de sacarosa determinamos la presencia y la cantidad de AChR ensamblado en forma completa, como pentámero, y de subunidades parcialmente ensambladas. Para tal fin, se marcaron lisados celulares con [125 I] α -BTX tal como se describe en Materiales y Métodos, y se sembraron los lisados en gradientes del 5-20% de sacarosa. Los resultados mostrados en la Figura 9 revelan la presencia de las diferentes especies moleculares con capacidad para unir toxina marcada, separadas por centrifugación diferencial. De acuerdo con los controles realizados con proteínas de coeficiente de sedimentación conocido, se observó que la marca correspondiente a las subunidades no ensambladas del AChR (Barrantes et al., 1983) en extractos de células PSA/AChR era mayor, en detrimento del oligomero completamente ensamblado del AChR, que se detecta a 9 S. Los resultados se comparan con un gradiente corrido en paralelo con la línea de referencia.

Determinación de especies oligoméricas del AChR por sedimentación en gradientes de sacarosa

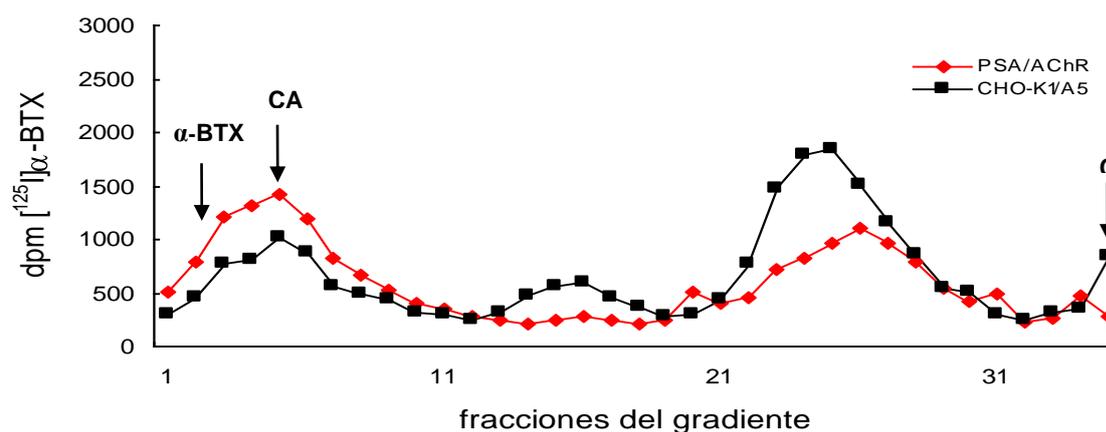


Figura 9. Estado de ensamblado del AChR en células normales y mutantes por sedimentación en equilibrio en gradientes de sacarosa. Las células fueron permeabilizadas con saponina 0.5% y marcadas con [125 I] α -BTX. Las muestras se solubilizaron con Tritón X-100, se sembraron en gradientes de sacarosa 5-20% y se corrieron durante 22 h en un rotor Sorvall SW 41 a 40.000 rpm y 4°C. Se indican el coeficiente de sedimentación en equilibrio de catalasa (C; 11 S), anhidrasa carbónica (CA; 3.3 S) y toxina libre (~1.7 S) (Kreienkamp et al., 1995).

Efecto de la PS sobre la estabilidad metabólica del AChR de superficie en células PSA/AChR

Se realizaron a continuación experimentos de demarcación, tal como se describen en Materiales y Métodos, para determinar diferencias en el recambio metabólico del sistema mutante y del control. De acuerdo a lo observado en la Figura 10, la línea celular control CHO-K1/A5, luego de 24 hrs sin el aporte de lípidos por el medio de cultivo, así como la línea mutante en medio completo, mantienen el 60% de los receptores marcados en el período de tiempo evaluado. Cuando las células deficientes PSA/AChR fueron incubadas en medio Nutridoma-BO por el mismo período de tiempo, se observó una rápida demarcación del ligando competitivo [125 I] α -BTX del AChR. En esas condiciones, a la hora de incubación, el sistema sufre una disminución significativa de la marca del 50%, llegando a un 70% de disminución en el período de tiempo final analizado.

Demarcación del AChR unido a [125 I] α -BTX en PSA/AChR

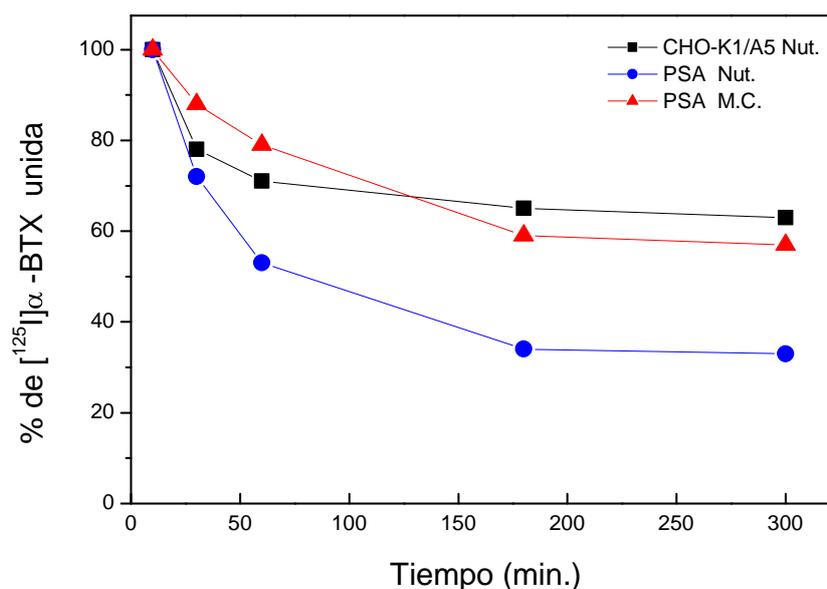


Figura 11. Disociación de la [125 I] α -BTX de los AChR expresados en PSA/AChR. Clones normales y mutantes se incubaron por 24 hs en medio completo (M.C.) y en medio Nutridoma-BO (Nut.) .Luego se marcaron durante 1 h a temperatura ambiente con [125 I] α -BTX, se retiró la toxina libre por lavados con PBS y se incubaron nuevamente por los tiempos indicados. Se lavaron con PBS, se levantaron de la placa de cultivo con NaOH 0,1N y se midió la radioactividad remanente con un contador gama. Cada punto del gráfico es el promedio de triplicados y representativo de n>4 experimentos independientes.

Internalización del AChR en PSA/AChR

Los aminofosfolípidos, y en particular la PS, están enriquecidos en ciertos tejidos y en diferentes organelas de células eucariotas. Actualmente, la asimetría lateral y entre ambas hemicapas de los fosfolípidos de las membranas celulares ha adquirido gran relevancia funcional. A la luz de los nuevos resultados experimentales, sabemos que el transporte de fosfolípidos y su distribución en las membranas está celosamente regulado (Vance, 2008). Sabemos también, que la asimetría estructural del área de las hemicapas en la membrana plasmática por la composición asimétrica de los fosfolípidos, regula la fuerza necesaria para la formación de vesículas en la endocitosis (Farge et al., 1999).

Por otro lado, se ha determinado que la carga negativa aportada por PS modifica la localización celular de ciertas proteínas con epitopes polibásicos a través de interacciones electrostáticas (Yeung et al., 2008). Nos preguntamos entonces si la localización y/o el tráfico del AChR en nuestro sistema deficiente en PS habían sido modificados. Para responder este interrogante, comenzamos por estudiar la internalización del receptor expresado en la membrana plasmática de las células PSA/AChR en diferentes condiciones de cultivo.

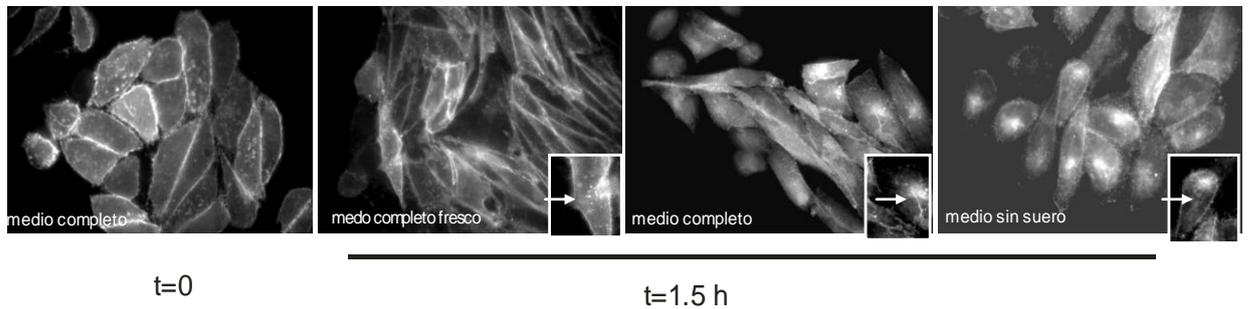
Para ello, después de un tiempo mínimo de tres días de crecimiento en medio completo incubamos las células con concentraciones saturantes ($\sim 0.1-1 \mu\text{M}$) de α -BTX biotina (ver Materiales y Métodos) durante 1 h a 4°C , luego las células se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C por distintos períodos de tiempo, i) en medio completo, ii) en medio completo *fresco* o iii) en medio de cultivo sin suero. Finalizada la incubación, los receptores de membrana, unidos a α -BTX biotina, se marcaron con estreptavidina-Alexa⁴⁸⁸ y se revelaron mediante microscopía de fluorescencia. Luego de 1.5 h de incubación en medio completo, determinamos un porcentaje significativamente menor de AChR en la membrana plasmática de las células PSA/AChR que el observado en la línea control CHO-K1/A5 (Figura 11 b y d), mientras que en las mismas condiciones de cultivo el AChR de superficie en la línea control CHO-K1/A5 disminuye $\sim 20\%$ (Figura 11 d) (Kumari et al., 2008).

Células en cultivo vivas marcadas con α -BTX Alexa⁴⁸⁸, muestran una mayor internalización, manifestada por la presencia de endosomas cuando incubamos con medio Nutridoma-BO o en medio de cultivo sin suero, es decir, deficiente en el fosfolípido, (Figura 11 a). En las mismas condiciones de cultivo y en los mismos períodos de tiempo de incubación no se aprecian cambios significativos en la línea celular de referencia (Figura 11 c)

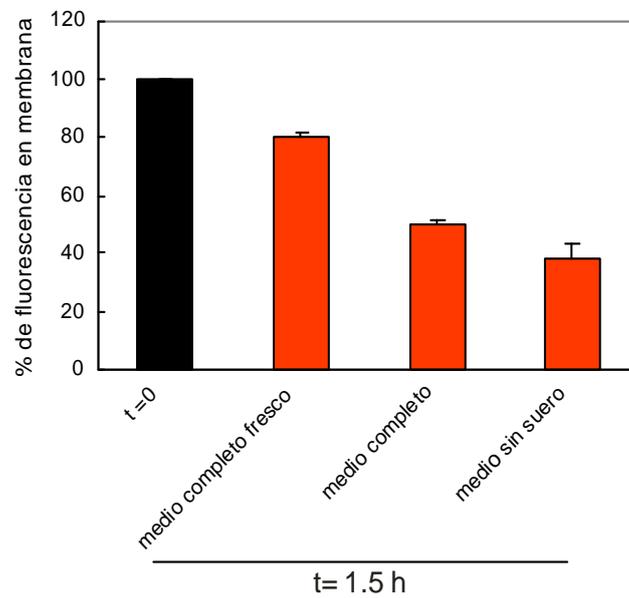
Internalización del AChR

a

PSA/AChR

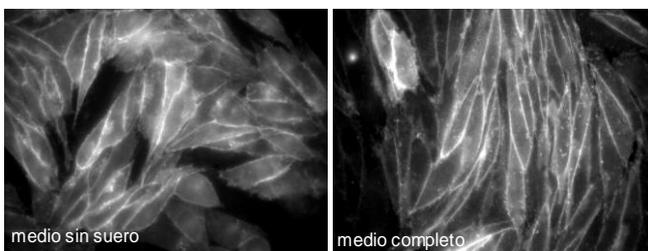


b



c

CHO-K1/A5



d

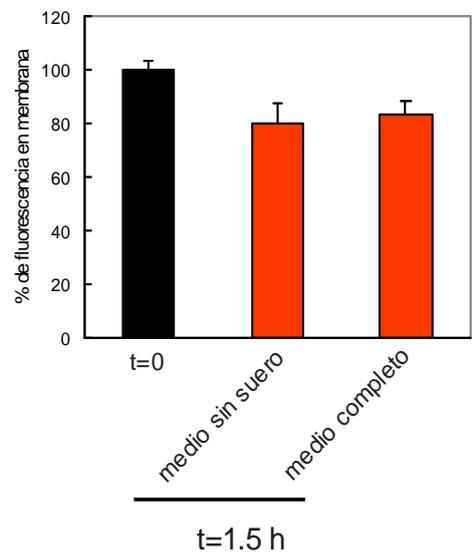


Figura 11. Internalización del AChR en células PSA/AChR. b,d -Las líneas celulares PSA/AChR y CHO-K1/A5 cultivadas en medio completo se marcaron con α -BTX biotina durante 50 min a 4°C. Se lavaron con medio M1 frío y se incubaron a 37 °C en incubador con CO₂ por el tiempo indicado, agregando medio completo fresco, el mismo medio completo en las que fueron cultivadas hasta el momento de marcarlas, o en medio de cultivo sin suero. Finalizado el tiempo de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído 2%, según se indica en Materiales y Métodos, y se marcaron con estreptavidina-Alexa⁴⁸⁸ durante 50 min más. Tras haber sido lavadas nuevamente, se montaron y analizaron por microscopía de fluorescencia. De cada condición se midió la fluorescencia en la membrana y se comparó con el valor medido en el tiempo 0. Los valores obtenidos son el resultado del análisis de por lo menos 100 células de cada condición. **a,c** - Las líneas se marcaron α -BTX⁴⁸⁸ durante 50 min a 4°C, se lavaron con medio M1 frío y se incubaron a 37 °C en incubador por el tiempo y las condiciones indicadas. Luego se fijaron y se montaron para visualizarlas en el microscopio de fluorescencia. Las flechas en cada inserto señalan la presencia de endosomas.

Discusión

La funcionalidad de las proteínas integrales está condicionada por los lípidos de la membrana, que afectan de manera directa su estructura y organización (Nyholm et al., 2007). También el AChR depende de la composición de los lípidos de la membrana para su correcto funcionamiento (Barrantes, 2003b; Barrantes, 2004). Un cúmulo de estudios para determinar la participación de los lípidos en la funcionalidad del AChR se realizaron con la proteína purificada de órgano eléctrico de *Torpedo* reconstituído en sistemas lipídicos de composición variada. Los primeros resultados revelaron que la proteína reconstituída en un liposoma puro de PC no es capaz de adoptar los diferentes estados conformacionales que caracterizan su funcionamiento (Criado et al., 1982a) (Criado et al., 1982a; Criado et al., 1984; Ochoa et al., 1983a).

Estudios de reconstitución funcional del AChR de *Torpedo californica* por ensayos con receptor purificado en vesículas lipídicas de composición conocida demostraron que la presencia del colesterol y del ácido fosfatídico (PA) estabilizan el receptor en el estado de reposo (cerrado). El efecto llega a saturación con 35% de colesterol y 12% de PA. En ausencia de PA el receptor se estabiliza en un estado desensibilizado (no funcional). Dado que la membrana nativa de *T. californica* sólo contiene un 1% de PA, y que en ausencia de este fosfolípido el receptor no se activa, otro fosfolípido aniónico debe reemplazarlo necesariamente en su función.

La inspección de los lípidos obtenidos de membranas ricas en AChR de Torpedinidae (Rotstein et al., 1987a; Rotstein et al., 1987b) inmediatamente ponen de manifiesto que los lípidos aniónicos candidatos para sustituir al PA son la fosfatidilserina (PS) y los polifosfoinosítidos. Si consideramos, además, que el AChR purificado pierde su funcionalidad si no conserva 65 fosfolípidos por molécula (Hamouda et al., 2006), podemos deducir la importancia funcional de los lípidos que rodean a la proteína receptora. La relación del AChR con PA y PS parecería ser única, compleja y posiblemente indirecta. Se ha observado que la incorporación del AChR en mezclas de PC/PS produce una distorsión en la cabeza polar de la PS, posiblemente debido a la unión de cationes divalentes a la superficie de la membrana. Esto soslaya una interacción del AChR con PS y quizás también con PA, (Fernandez-Carvajal et al., 2006; daCosta et al., 2004).

La PS es un fosfolípido al que se le ha asignado una función primordial en mecanismos y procesos que regulan la comunicación entre las células y la señalización intracelular (Elliott et al., 2005).

En este Capítulo se describe la expresión del AChR de tipo muscular adulto murino en forma heteróloga y estable en células PSA-3, mutantes deficientes en el metabolismo del aminofosfolípido PS. Los valores de expresión del AChR en superficie de las células PSA/AChR cultivadas en medio completo (Ham-F12 suplementado con suero) son ~50%

menores que los determinados en la línea control CHO-K1/A5 (Roccamo et al., 1999) en las mismas condiciones de cultivo. Los estudios farmacológicos del AChR en la línea PSA/AChR muestran que la cinética de asociación y la concentración de saturación de la toxina al AChR no evidencian diferencias significativas con la línea control. La curva de desplazamiento del antagonista competitivo [¹²⁵I]α-BTX por el agonista carbamilcolina no difiere del observado en la línea de referencia CHO-K1/A5 (Roccamo et al., 1999). Dado que en la línea PSA/AChR las propiedades farmacológicas de la proteína heteróloga no se modifican con respecto al control, el papel funcional de la PS en este sistema en particular podría estar vinculado a otros mecanismos, como el de transporte, con los que se ha relacionado este lípido en otros sistemas.

Estudios de internalización del AChR realizados por nuestro grupo en células CHO-K1/A5 (Kumari et al., 2008) demostraron un aumento en la velocidad de internalización cuando las células fueron sometidas a la depleción de colesterol (Borroni et al., 2007); (Lahdesmaki and Nyholm, 2007). En este modelo experimental, deficiente en PS, se observa un número significativamente menor de receptores en la membrana plasmática, comparado con el de las células CHO-K1/A5, aun cuando las células sean crecidas en medio de cultivo completo. Esta deficiencia puede hacerse aun mas significativa al incubar las células en un medio deficiente de suero: Por disminución del aporte lipídico al sistema (i.e. mediante cultivo en medio Nutridoma-BO) disminuye hasta un 80% la expresión del AChR en la superficie celular, aumentando concomitantemente los sitios intracelulares de unión a [¹²⁵I]α-BTX. Esta situación se puede revertir adicionando el fosfolípido al medio de cultivo o simplemente por el agregado de suero. Los resultados de esta parte del Capítulo I demuestran, además, un aumento significativo de la velocidad de internalización del AChR que depende de la variación en el contenido de PS en el medio de cultivo, lo cual incide obviamente en los niveles intracelulares de la proteína, que se ven incrementados.

Los estudios del estado de oligomerización del AChR proveniente de células PSA/AChR evidenciaron la disminución de la forma ensamblada completa con respecto al que se halla en células CHO-K1/A5 (Rotstein et al., 1987a). La disminución de las especies ensambladas del AChR de la línea PSA/AChR, con respecto a las células CHO-K1/A5, es probablemente el resultado de una disminución del tráfico exocítico de la proteína, quizás asociado a un mayor direccionamiento a vías de degradación. En estudios anteriores, la PS también ha sido asociada a las propiedades de la bicapa, cambios en la fluidez de la misma, curvatura o presión lateral (Fong and McNamee, 1986), y en algunos casos se le han atribuido efectos específicos sobre la proteína, actuando como modulador alostérico (Jones et al., 1988b; Blanton and Wang, 1990; Fernandez et al., 1993).

En resumen, en esta sección del Capítulo se presenta un sistema celular mutante en el que se puede regular el contenido de PS de manera selectiva y en el que se ha podido lograr la expresión heteróloga y estable del AChR. Este modelo ha permitido estudios tanto estructurales como funcionales de la proteína receptora en condiciones de deficiencia de un fosfolípido, la fosfatidilserina, demostrando una disminución del receptor en la membrana, un aumento del receptor intracelular y un aumento de la velocidad de internalización del mismo.

Capítulo II

Expresión estable de mutaciones generadas en los extremos del segmento α TM4 del AChR

Antecedentes y objetivos

Cuando incluimos el ADNc de las cuatro subunidades del receptor colinérgico nicotínico muscular (AChR) en vectores de expresión y éste se expresa en células eucariotas en cultivo, se obtienen sistemas celulares que expresan la proteína en la membrana con las mismas propiedades funcionales que el expresado en forma endógena (Sine and Claudio, 1991b). Normalmente, las proteínas sintetizadas *de novo* sufren de inmediato un proceso de plegamiento, su estructura se estabiliza por chaperonas y son ensambladas. Ciertas mutaciones producen el plegamiento o el ensamblado incorrecto de la proteína (Smith et al., 1987).

La síntesis y montaje del AChR ocurren en el RE. Sólo los complejos correctamente plegados y armados logran salir del RE y son transportados a la membrana plasmática (Smith et al., 1987; Verrall and Hall, 1992). Cuando alguna de las subunidades no se pliega correctamente y su ensamblado es defectuoso, las subunidades parcialmente ensambladas, normales o mutadas, son retenidas en el RE y enviadas para su ubiquitinilación y degradación en el proteosoma, lo que motiva su desaparición en la superficie celular (Lindstrom et al., 1979; Blount et al., 1990; Blount and Merlie, 1990; Keller et al., 1996). La síntesis de cada subunidad va seguida de la introducción del péptido en la membrana, el plegado y la formación de heterodímeros $\alpha\gamma$ y $\alpha\delta$ que luego interactúan con la subunidad $\beta 1$ para formar el pentámero (Blount et al., 1990).

Cuando se encuentran anormalmente expuestos, ciertos residuos aminoacídicos básicos se unen a la chaperona COP I y permiten la llegada de la subunidad $\alpha 1$ al complejo de Golgi (Keller et al., 1996). En esta organela, estos residuos son ubiquitinilados y el AChR es rápidamente degradado. Cuando estos aminoácidos son mutados, se inhibe la ubiquitinilación y la subunidad α puede llegar a la superficie de la célula (Keller et al., 2001). Cuando un dominio altamente conservado en el segmento TM1 de la subunidad α queda expuesto, provoca la retención de esta subunidad en el RE. Se trata de la secuencia L(F/Y)xxN que no sólo inhibe el transporte del oligómero del AChR sino que también direcciona a las otras subunidades, parcialmente ensambladas, hacia una rápida degradación (Wang et al., 2002).

Estudios de tipo estructural demostraron que ciertas especies lipídicas estabilizan la estructura secundaria de los segmentos proteicos del AChR inmersos en la membrana (Schiebler and Hucho, 1978; Fernandez-Ballester et al., 1992 ; Fernandez-Ballester et al., 1994). Las subunidades del AChR presentan una gran homología estructural. Cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas que forman el pentámero, posee cuatro segmentos transmembrana, denominados TM1, TM2, TM3 y TM4. Los grupos de trabajo que se han ocupado del análisis estructural de la proteína coinciden en la ubicación topológica externa

del TM4. De todos ellos, es el más hidrofóbico y el que está más expuesto a los lípidos de la bicapa (Blanton and Cohen, 1992). Necesariamente entonces, su composición en aminoácidos sería determinante del tipo de lípidos que lo circundan con los cuales mantiene un contacto íntimo permitiendo el desarrollo de una correcta funcionalidad (Tamamizu et al., 1999). Por lo tanto, es importante determinar la relevancia de estas relaciones a través del efecto que producen cambios de aminoácidos que están estructuralmente ubicados a nivel de las cabezas polares de los fosfolípidos en la bicapa. Los residuos flanqueantes del TM4 de la subunidad α del receptor poseen carga positiva, lo que sugiere una interacción con fosfolípidos acídicos del tipo de fosfatidilserina (PS) (Kuge and Nishijima, 2003).

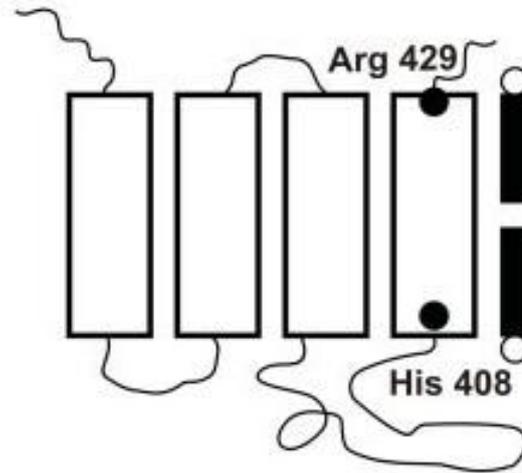
Estudios bioquímicos determinaron la existencia de dos poblaciones de lípidos relacionados estructural y funcionalmente con el receptor. Una población es la de los lípidos anulares formada preferentemente por fosfolípidos que se encuentran en el microentorno de la proteína receptora. La otra población es la de los lípidos no anulares entre los que se encuentra mayoritariamente el colesterol y de la cual los fosfolípidos estarían excluidos (Jones et al., 1988b; Jones et al., 1988a). De acuerdo con lo expuesto, y dado el interés en determinar el papel que juegan los lípidos en la estructura y en la función del receptor, se realizó el análisis de ambos aspectos en un sistema celular.

En este capítulo se emplea como estrategia, la expresión heteróloga de la proteína AChR modificada por mutación en un sistema celular eucariota con metabolismo y contenido lipídico normal. Con este propósito generamos mutaciones en residuos que se ubicarían en la porción más externa del receptor a ambos lados de la bicapa, en íntimo contacto con la membrana plasmática y a la altura de las cabezas polares de los fosfolípidos. El objetivo era explorar el papel que desempeñan los residuos que flanquean la interfase membrana-agua en regiones de la proteína íntimamente relacionada con los lípidos, sobre las propiedades funcionales del receptor. El estudio se focaliza en los fosfolípidos cargados negativamente, entre los que se encuentra la PS (Dreger et al., 1997). Utilizando un análogo fotoactivable de la fosfatidilserina, ^{125}I ASA – PS, en un sistema de membranas reconstituídas de *T.marmorata*, Blanton y col, (Blanton and Wang, 1990; Blanton and Cohen, 1992; Blanton and Wang, 1990) demostraron una fuerte interacción de la sonda con la subunidad α , fundamentalmente con el TM4. La carga negativa de PS sugiere una fuerte interacción con aminoácidos positivamente cargados en la proteína.

Si analizamos la secuencia del TM4 de la subunidad α en la Figura **1C**, veremos que está flanqueada por residuos con carga neta positiva. Un residuo histidina en la posición 408 y un residuo arginina en la posición 429 constituyen patrones conservados de $\alpha 1$ en ratón y en otras especies como aves y peces eléctricos (Figura **1B**). Se seleccionaron por

ende tales residuos para estudiarlos y poder determinar su participación en la estructura y funcionalidad del AChR (Figura 1A).

A



B

```

NICA1BX   M-KSDQE--SN-KASEEWK FVAMVLDHILLAVFMTVCVIGTLAVFAGR--I IEMNQE--
NICA1AX   M-KSDQE--ST-KASEEWK FVAMVLDHLLLAVFMIVCIIGTLAIFAGR--L IELHMQG--
NICA1DR   M-KSDEE--SN-NAAEEWK FVAMVLDHILLCVFMAVCIIGTLGVFAGR--L IELSML---
NICA1BT   M-KSDQE--SN-NAAEEWK YVAMVMDHILLAVFMLVCIIGTLAVFAGR--L IELNQQG--
NICA1HS   M-KSDQE--SN-NAAAEWK YVAMVMDHILLGVFMLVCIIGTLAVFAGR--L IELNQQG--
NICA1MM   M-KSDQE--SN-NAAEEWK YVAMVMDHILLGVFMLVCLIGTLAVFAGR--L IELHQQG--
NICA1RR   M-KSDQE--SN-NASEEWK YVAMVMDHILLGVFMLVCLIGTLAVFAGR--L IELHQQG--
NICA1TC   M-KSDEE--SS-NAAEEWK YVAMVIDHILLCVFMLICIIIGTVSVFAGR--L IELSQEG--
    
```

C

	408																			429			
α mouse	H	I	L	L	G	V	F	M	L	V	C	L	I	G	T	L	A	V	F	A	G	R	L
β mouse	R	L	F	L	W	T	F	I	V	F	T	S	V	G	T	L	V	I	F	L	D	A	T
ϵ mouse	N	V	C	F	W	A	A	L	V	L	F	S	V	G	S	T	L	I	F	L	G	G	Y
δ mouse	R	L	C	L	F	V	V	T	P	V	M	V	V	G	T	A	W	I	F	L	Q	G	V

Figura 1. **A** - Esquema de la ubicación de los residuos Histidina 408 y Arginina 429 en la subunidad α del AChR muscular de ratón. **B** - El alineamiento de las subunidades α de diferentes especies muestra que los residuos en azul, que fueron mutados, están altamente conservados. **C**- El alineamiento de la secuencia proteica de los TM4 de las subunidades del AChR murino indica que la presencia de residuos positivamente cargados en ambos extremos de los segmentos es una particularidad de la subunidad α .

Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos con diferentes sistemas celulares modelo, implementados en nuestro laboratorio con la línea CHO-K1 salvaje.

Se crearon líneas celulares con capacidad permanente para expresar en forma heteróloga, cinco versiones diferentes del AChR mutado.

Las mutaciones puntuales, simples y dobles, están dirigidas a residuos ubicados en los extremos del TM4 de la subunidad α . Estos modelos han permitido analizar el efecto que producen cambios en la carga iónica de estos aminoácidos, por residuos sin carga y/o residuos con carga opuesta.

Mutaciones del segmento TM4 α del AChR adulto de ratón

El alineamiento de los residuos proteicos de la subunidad α de diferentes especies (Figura 1B) permite comparar las secuencias de los segmentos transmembrana α TM4. En los extremos, el segmento posee residuos con carga positiva, altamente conservados en la posición en la que se supone que están ubicadas las cabezas polares de los fosfolípidos. En la interfase citoplasmática, el α TM4 tiene un residuo histidina (posición 408) y en la interfase extracelular, un residuo arginina (posición 429). Si comparamos α TM4 con el resto de las subunidades del receptor, como se muestra en la Figura 1C, se observa que las subunidades β y δ , mantienen una carga positiva fuerte en el extremo correspondiente a la interface citoplasmática. En esa posición, ambas subunidades poseen un residuo arginina.

Para determinar la importancia estructural y/o funcional de estos residuos cargados, se decidió generar mutaciones y analizar posibles cambios en sistemas celulares que expresan receptores mutados de manera heteróloga. Inicialmente se realizó una mutación puntual, cambiando el aminoácido natural cargado por alanina, un aminoácido sin carga. Las mutaciones se realizaron por introducción, a modo de "cassette", de oligonucleótidos sintetizados que poseen en su estructura la mutación deseada. Para ello, se aislaron y purificaron segmentos obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción específicas del vector de expresión pSM α , de acuerdo con el diseño teórico que se detalla en el esquema II y III de la sección Materiales y Métodos.

Los segmentos obtenidos y purificados del gel de agarosa se unieron, por una reacción con la enzima T4 ADN ligasa, con el oligonucleótido sintético que introduce la mutación. Con el total de la reacción se transformaron bacterias (ver sección Materiales y Métodos) y el ADN de los plásmidos aislados de las colonias bacterianas resistentes, se sometió a un nuevo análisis con enzimas de restricción. Para realizar la transfección, los vectores estructuralmente correctos se ampliaron, se purificaron y se secuenciaron por el método de Sanger. Se generaron de esta manera dos unidades vectoriales de expresión,

denominadas pSM α His408Ala y pSM α Arg429Ala. En una etapa posterior se realizaron mutaciones múltiples reemplazando ambos residuos a la vez. Con este propósito, se obtuvieron pSM α His408Ala/ Arg429Ala (Esquema III). Para obtener esta doble mutación, se utilizó una estrategia similar a la empleada en la mutación simple, cambiando la posición 429 en la construcción plasmídica mutada en la posición 408.

En base al análisis de los resultados obtenidos, se realizó una nueva mutación cambiando la posición 429 por un residuo de similar tamaño pero con carga de signo contrario. En este caso, se cambió el residuo arginina por ácido glutámico (Figura 2) y se obtuvieron cinco versiones mutadas del plásmido pSM α : pSM α H⁴⁰⁸A, pSM α R⁴²⁹A, pSM α H⁴⁰⁸A/R⁴²⁹A, pSM α R⁴²⁹E y pSM α H⁴⁰⁸A/R⁴²⁹E. En todos los casos la estructura de los vectores recombinantes modificados se verificó por análisis de restricción y secuenciación.

Las líneas clonales de expresión permanente del AChR logradas con las mutaciones puntuales y múltiples generadas en la subunidad α , se muestran en el esquema de la Figura 2.

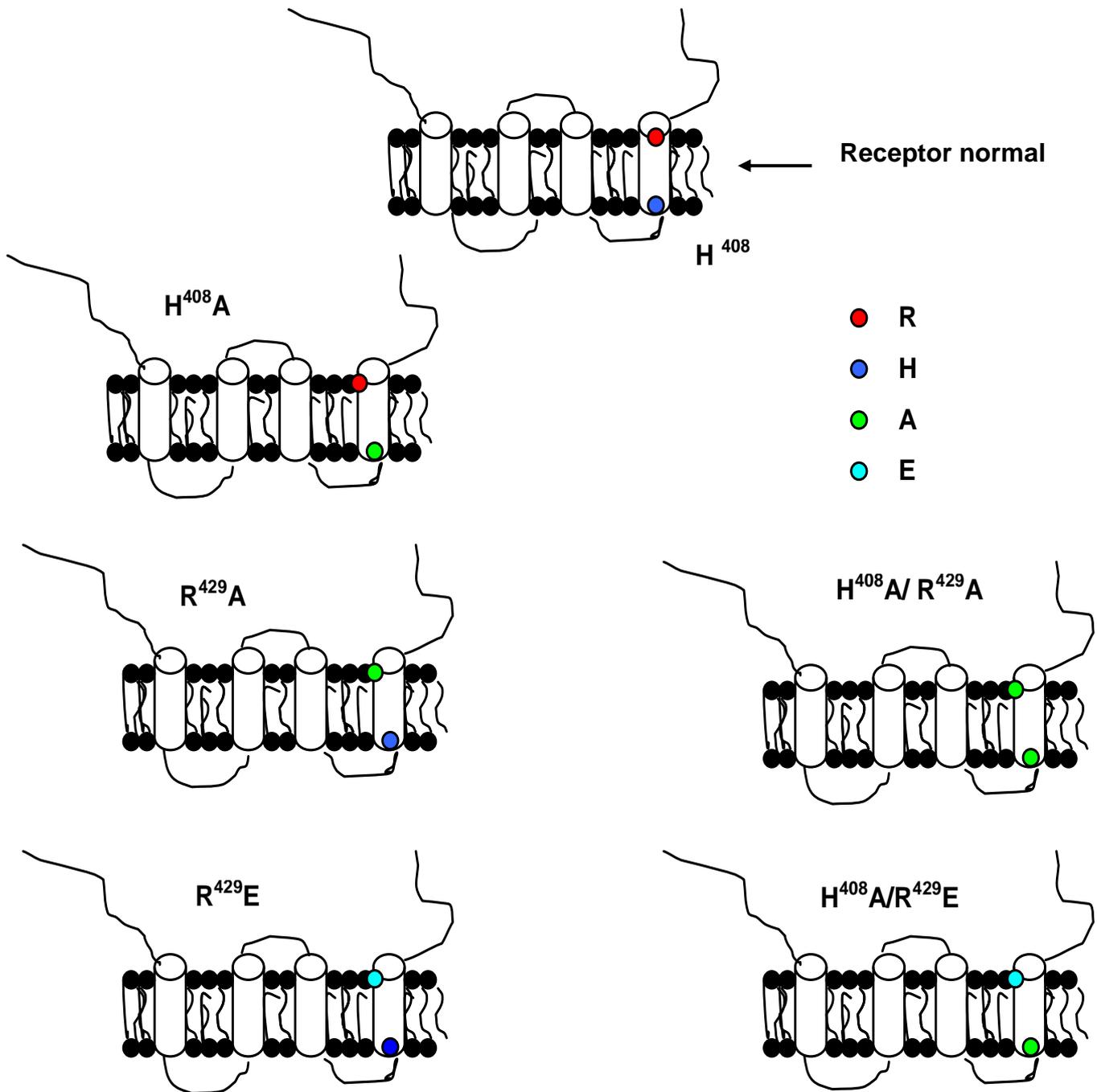


Figura 2. Diagrama de las mutaciones realizadas en la subunidad α del AChR muscular de ratón.

Expresión estable de mutantes de TM4 α AChR en células CHO-K1

Para analizar y cuantificar el efecto de las mutaciones inducidas sobre los parámetros funcionales del receptor, se generaron líneas celulares estables capaces de expresar las diferentes versiones del receptor mutado. Para ello, se transfectaron células CHO-K1 con el método de fosfato de calcio, utilizando plásmidos con secuencias normales y mutadas obtenidos con un alto grado de pureza (D.O. 260/280 no menor de 1.8). Cada mezcla de transfección posee, según el caso, una de las subunidades (α) mutada, acompañada por el resto de las subunidades del receptor normal en una relación molar de 2:1:1:1.

Para obtener líneas celulares con alta homología de expresión para cada una de las versiones mutantes del receptor, se utilizó la estrategia ya descrita en el capítulo anterior. Se agregó a la mezcla de transfección, un plásmido que confiere resistencia al antibiótico G418 en eucariotas, en una relación molar diez veces menor (0.1). Esto posibilita la selección de células positivamente transfectadas con altas probabilidades de poseer los cuatro plásmidos codificantes de las subunidades del receptor insertados en el genoma celular.

Luego del proceso de selección en presencia del antibiótico, según se detalla en la sección Materiales y Métodos, se utilizaron cilindros de clonado para aislar entre quince y veinte clones de cada mutante y se cultivaron individualmente como nuevas líneas modificadas. Para establecerlas, se determinó primero la presencia del ARN mensajero (ARNm) de cada una de las subunidades del receptor.

A partir del aislamiento y purificación del ARN total de cada clon, se realizó una reacción de RT-PCR con cebadores específicos para cada subunidad. Los clones que manifestaron la presencia del ARNm de todas las unidades vectoriales del receptor (Figura 3) fueron ampliados y congelados. En todos los estudios realizados con mutantes se usó como control la línea de expresión heteróloga CHO-K1/A5.

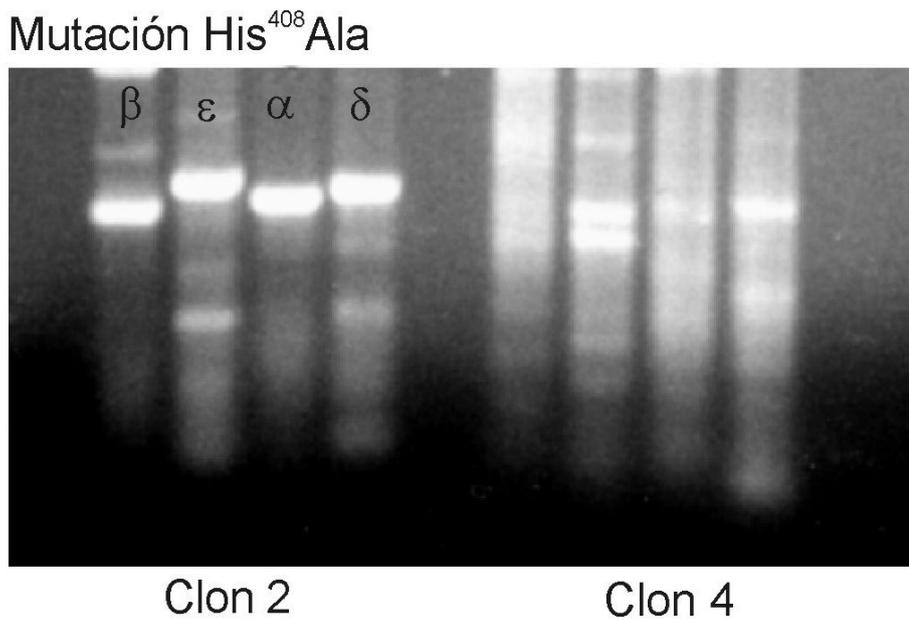


Figura 3. Análisis de la expresión del AChR mutante en los clones seleccionados. La expresión de las cuatro subunidades se determinó por electroforesis de los productos de una reacción de RT-PCR en un gel de agarosa 1,2%. Cada muestra es el resultado de ensayos realizados con cebadores específicos para cada subunidad, a partir del ARN total aislado de los clones seleccionados por G418 en el medio de cultivo y obtenidos por transfección de células CHO-K1 con una mezcla de pSM α -His⁴⁰⁸Ala, los plásmidos que codifican las subunidades normales del AChR adulto de ratón y el marcador de selección pSV₂ neo.

Ensayos de unión a [¹²⁵I] α -BTX

Después de establecer y seleccionar cada una de las líneas clonales por análisis con RT-PCR, se evaluó la expresión del receptor a través de ensayos de unión al antagonista competitivo de alta afinidad [¹²⁵I] α -BTX. Este ensayo se realizó en células enteras para determinar el receptor expresado en superficie y en células permeabilizadas con saponina para cuantificar el total de los sitios de unión al antagonista. De los clones positivos para la reacción de RT-PCR, se seleccionaron los que presentaron el mayor nivel de marcación en superficie.

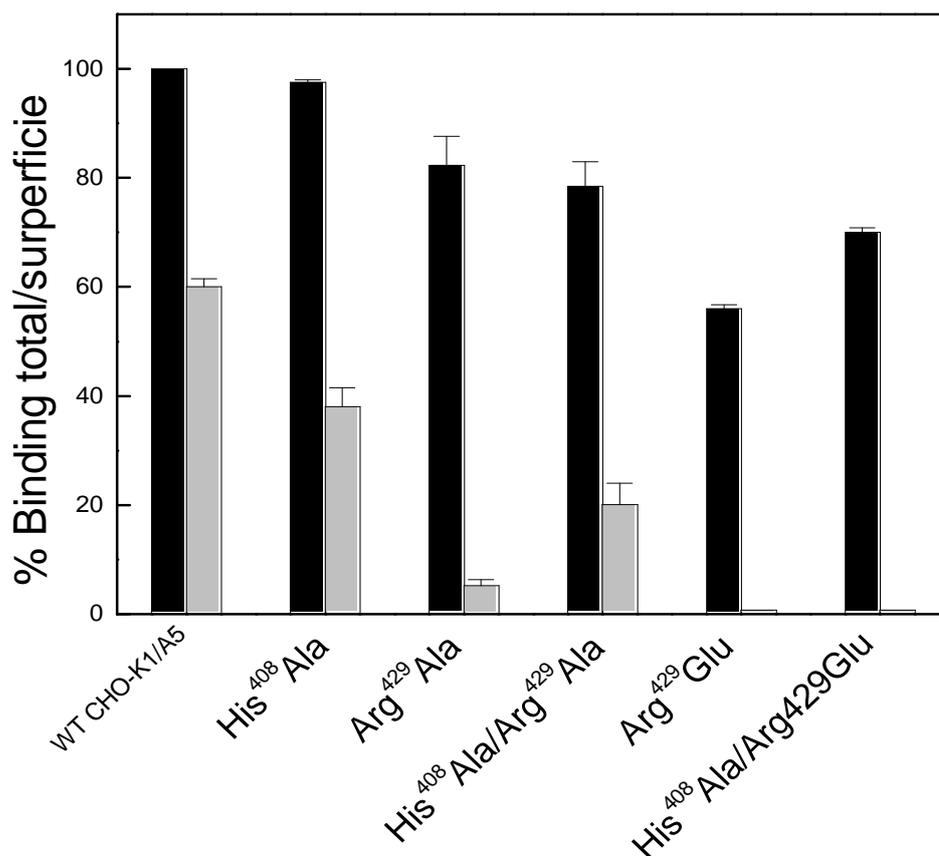


Figura 4. Cuantificación de la expresión total y de superficie del AChR normal y mutado. Para determinar el total (■) de los sitios de unión, se usaron células permeabilizadas con saponina 1%, incubadas con 40 nM de [¹²⁵I]α-BTX por 1h a 4°C. La determinación de los receptores en la superficie (■) se realizó en cultivos vivos. La unión inespecífica se calculó con muestras preincubadas durante 60 minutos con 10mM de carbamilcolina en cultivos vivos y con 10 μM de α-BTX en células permeabilizadas. Los valores de los clones mutantes están normalizados a los valores obtenidos en la línea control.

En la Figura 4 se muestran los resultados normalizados a 100% del ensayo de unión con [¹²⁵I]α-BTX para el AChR salvaje (“WT”), representado por CHO-K1/A5 y las versiones mutadas del AChR. Las barras en color gris corresponden a los receptores que llegan a la superficie celular mientras que las de color negro indican la totalidad de sitios capaces de unir toxina marcada en células permeabilizadas.

El cambio del aminoácido histidina por alanina, **His⁴⁰⁸Ala**, del αTM4 produce una disminución del 60% de la radioactividad de [¹²⁵I]α-BTX unida al receptor en preparaciones de células vivas. En las mismas condiciones de trabajo, el ensayo en la doble mutante, **His⁴⁰⁸Ala/Arg⁴²⁹Ala** indicó una disminución del 80% en la marca de toxina unida a la superficie celular.

Cuando el residuo flanqueante ubicado en la interface extracelular, Arg429, es sustituido por un residuo de carga opuesta como ácido glutámico, **Arg⁴²⁹Glu**, se obtienen valores casi

nulos de expresión en superficie, con una reducción del 95%. Los mismos resultados se observaron con la doble mutante **His⁴⁰⁸Ala/Arg⁴²⁹Glu**.

El análisis de los resultados obtenidos con células permeabilizadas con saponina para evaluar el total de sitios con capacidad de unir [¹²⁵I]α-BTX y cuantificar el receptor total, indica que el clon **His⁴⁰⁸Ala** posee valores comparables a los de la línea control, disminuyendo sólo en menos de un 20% cuando uno o ambos residuos positivamente cargados se cambian por alanina, **His⁴⁰⁸Ala** y **His⁴⁰⁸Ala/Arg⁴²⁹Ala**.

Cuando la posición 429 se sustituye por un residuo de carga negativa **Arg⁴²⁹Glu**, **His⁴⁰⁸Ala/Arg⁴²⁹Glu**, la unión de toxina representa entre un 30% y 40% de la línea control.

Curvas de saturación de mutantes

Para evaluar un posible cambio de afinidad por la toxina de la proteína mutada y determinar el número de receptores modificados que llegan a la superficie de la célula, se realizaron curvas de saturación para cada una de las líneas. En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos por ensayos de unión con [¹²⁵I]α-BTX a concentraciones entre 0 y 80 nM. Sólo fue posible calcular la curva de Scatchard para la mutante **His⁴⁰⁸Ala**. El valor encontrado para la K_D en esta mutante es de 30 nM, es decir, del mismo orden que el obtenido para la línea control.

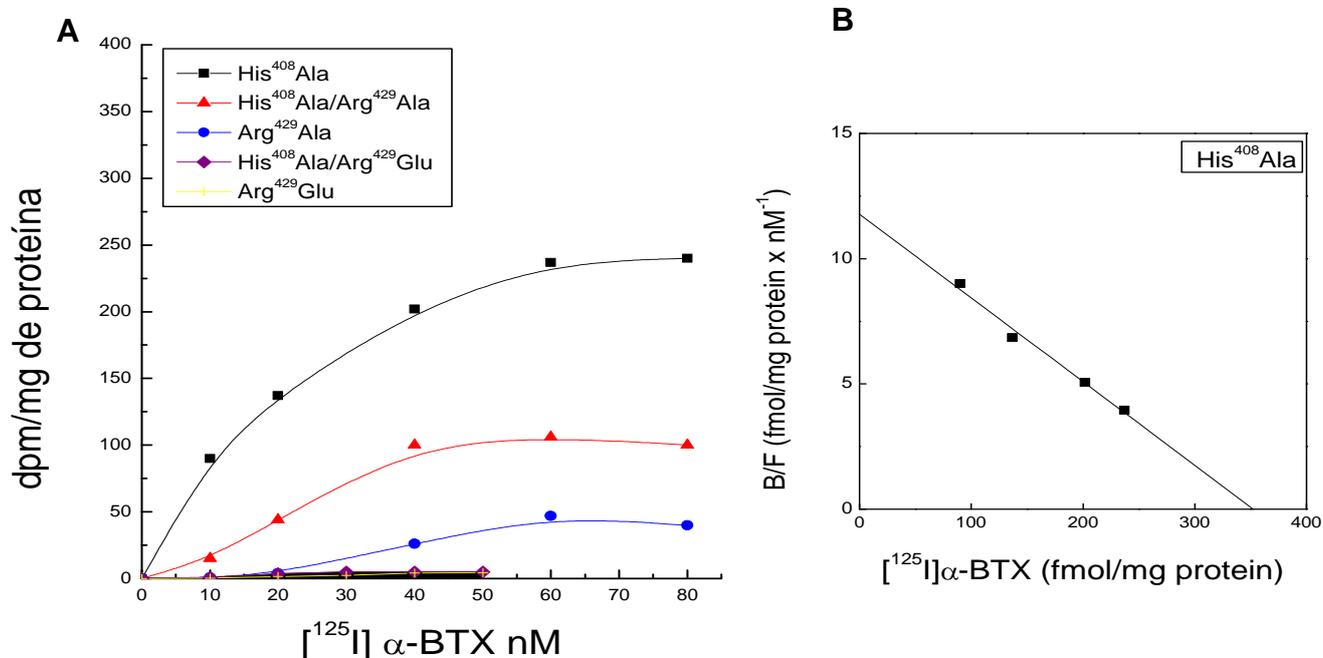


Figura 5. A) Curvas de saturación de las líneas mutantes. Los ensayos de unión se realizaron sobre cultivos vivos de cada uno de los clones durante una hora a temperatura ambiente con [¹²⁵I]α-BTX entre 0 y 80 nM. A cada punto de la curva se le descontó el valor de la unión inespecífica, obtenido por preincubación de las muestras en presencia de carbamilcolina 1mM.- **B)** En base a los resultados obtenidos se calculó la curva de Scatchard para la mutante **His⁴⁰⁸Ala**

Microscopía de fluorescencia

Los niveles de radioactividad obtenidos en los ensayos de unión a [125 I] α -BTX permiten cuantificar el nivel de expresión del receptor en superficie y evaluar la presencia de subunidad α con capacidad de unión a la toxina. Para determinar el perfil de expresión en cada uno de los clones obtenidos y estudiar el efecto de la mutación en cada caso, se realizaron experimentos de marcación con α -BTX Alexa⁴⁸⁸. La unión de la toxina marcada con un fluoróforo en células enteras y permeabilizadas permitió analizar por microscopía de fluorescencia los niveles y el tipo de expresión.

Como se observa en la Figura 6, cuando se mutó el residuo de α His408 por un residuo sin carga (**His⁴⁰⁸Ala**), la línea clonal obtenida marcada con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ muestra un perfil de distribución intracelular que no difiere de la línea control. En la línea mutante, en cambio, se observa una marca fluorescente de menor intensidad en concordancia con los valores obtenidos por unión a [125 I] α -BTX.

Cuando se mutó el aminoácido α Arg429 ubicado en el extremo extracelular del segmento TM4, por un residuo sin carga o por uno de carga opuesta, (**R⁴²⁹A**, **R⁴²⁹E**), no se detecta fluorescencia en la superficie de las células (Figuras 6 y 7). Si se analizan células permeabilizadas con saponina, se observa que la marcación de α -BTX Alexa⁵⁹⁴ presenta una distribución diferente. Se puede ver una marca homogénea que, por sus características, correspondería al retículo endoplasmático (RE). Este hecho indicaría la presencia de la subunidad α parcialmente ensamblada o monomérica, incapaz de sortear el RE y alcanzar la superficie celular (Figuras 6 y 7). Los resultados de los experimentos de microscopía de fluorescencia por unión de α -BTX marcada con un fluoróforo concuerdan con los resultados bioquímicos obtenidos con [125 I] α -BTX.

Expresión de la línea clonal mutante Arg⁴²⁹Glu

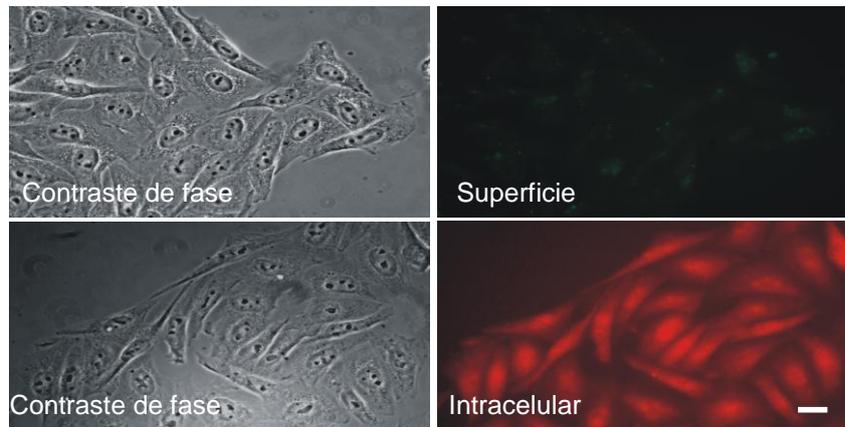


Figura 6. Expresión del AChR α Arg⁴²⁹Glu en células CHO-K1. En el panel izquierdo se muestra el contraste de fase del clon α Arg⁴²⁹Glu y en el panel derecho el perfil de marcación de receptores en superficie e intracelular. Las células se marcaron en placas de cultivo, vivas (superficie) o fueron fijadas y permeabilizadas antes de marcarlas con α -BTX Alexa⁵⁹⁴ (intracelular). Escala 10 μ m

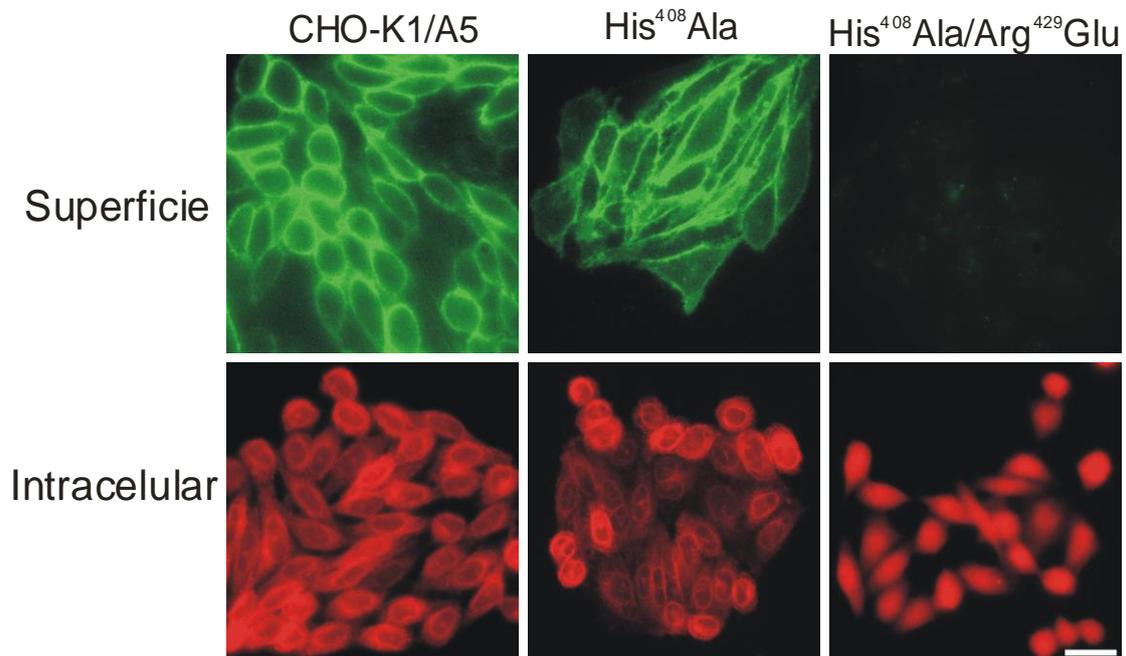


Figura 7. Marcación del AChR con α -BTX fluorescente. Cultivos celulares subconfluentes se marcaron con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ por 50 minutos a 4°C, se lavaron con PBS y se montaron sobre cubreobjetos para visualizarlas vivas, con el microscopio de fluorescencia (superficie). Para determinar la marcación intracelular, las células fueron fijadas y permeabilizadas antes de marcarlas con α -BTX Alexa⁵⁹⁴ (intracelular). Ver la sección Materiales y Métodos, Escala 50 μ m

Determinación del estado de asociación de la subunidad α en presencia de carbamilcolina

El agonista carbamilcolina tiene la capacidad de unirse solamente a receptores total o parcialmente ensamblados. La unión de la toxina marcada en presencia de este compuesto se debe por lo tanto exclusivamente a la presencia de la subunidad α desensamblada o monomérica (Baier and Barrantes, 2007).

Se realizaron una serie de experimentos para evaluar mediante microscopía de fluorescencia la unión de α -BTX fluorescente en presencia y en ausencia de carbamilcolina 10 mM con el fin de cuantificar el porcentaje de subunidades monoméricas en relación con el receptor total o parcialmente ensamblado. Se cultivaron clones mutantes sobre cubreobjetos de vidrio hasta alcanzar un grado de confluencia del 50%. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron y se marcaron con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ en presencia y en ausencia de carbamilcolina 10 mM. Los resultados se compararon con los obtenidos en experimentos controles, realizados en paralelo con la línea CHO-K1/A5. La Figura 8 muestra que el porcentaje de unión de α -BTX Alexa⁴⁸⁸ en las mutantes no cambia significativamente en ausencia y en presencia de carbamilcolina, como sí ocurre, en la línea celular que expresa el receptor normal en superficie. Estos resultados indican que la marca intracelular fluorescente está asociada mayoritariamente a la subunidad α monomérica ya que esta subunidad es capaz de unir toxina cuando está en estado monomérico plegado. Del mismo modo, se puede decir que la subunidad α es incapaz de unirse al resto de las subunidades cuando tiene mutado el residuo Arg429.

Determinación del ensamblado del AChR normal y mutado

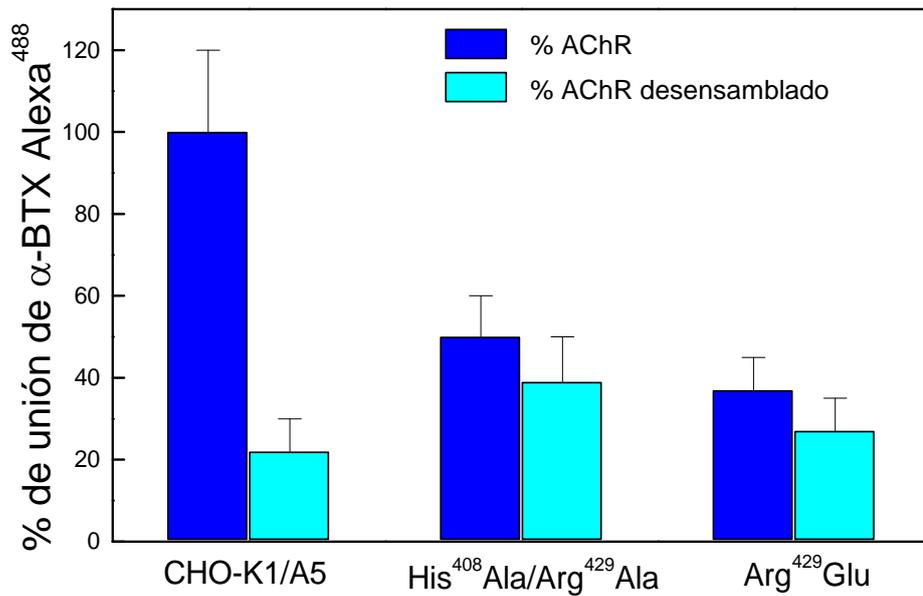


Figura 8. Determinación del ensamblado del AChR. La figura muestra el nivel de marcación de cultivos subconfluente con α -BTX Alexa⁴⁸⁸, en ausencia ■ y en presencia ■ de carbamilcolina 10 mM, tal como se describe en la sección Materiales y Métodos. Los valores se obtuvieron del análisis de 100 células, por cada condición. Se muestra el resultado de dos mutantes, una simple, y una doble, en el residuo Arg429. Ambas se comparan con la línea CHO-K1/A5, control. El clon His⁴⁰⁸Ala/Arg⁴²⁹Glu fue analizado y dio los mismos resultados (no se muestra).

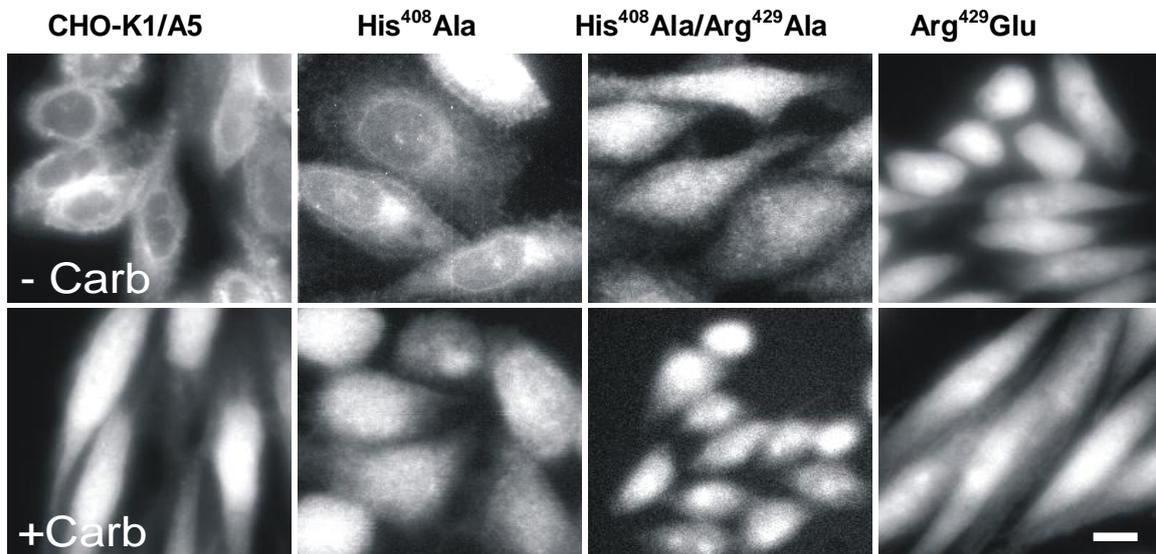


Figura 9. Perfil de marcación del AChR intracelular Las diferentes líneas celulares en cultivo, se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con α -BTX Alexa⁴⁸⁸ en presencia (+Carb) y en ausencia (-Carb) de carbamilcolina 10 mM, según detalles experimentales de la sección Materiales y Métodos. Escala 10 μ m.

Colocalización del AChR intracelular normal y mutado con calnexina

Estudios previos han demostrado que existen muchos factores involucrados en el proceso que se inicia con la síntesis de las subunidades y el ensamblado del receptor en el RE y que continúa con el tráfico hacia la superficie celular. Entre ellos se incluyen la glicosilación, la asociación de subunidades entre sí y la asociación de las subunidades con chaperonas (Paulsen et al., 1991; Blount and Merlie, 1991; Forsayeth et al., 1992; Gelman et al., 1995).

La calnexina es una chaperona residente en el RE capaz de asociarse a la subunidad α monomérica con un grado de plegamiento que le permite ser reconocida por el anticuerpo monoclonal mAb35, pero no puede unirse a otra subunidad y formar un dímero (Keller et al., 1996). Para realizar un análisis estructural y establecer la capacidad de la subunidad α mutada de unir la calnexina, se realizaron experimentos de doble marcación con los clones mutantes permeabilizados. Se unió α -BTX fluorescente junto con el anticuerpo anti-calnexina, revelado con un segundo anticuerpo fluorescente, en un ensayo de colocalización. La Figura 10 muestra la marcación del AChR intracelular (α -BTX Alexa⁵⁹⁴), de calnexina y la superposición de ambas imágenes que demuestran la presencia de la subunidad α , retenida en el RE y unida a calnexina.

La Figura 11 muestra en detalle la distribución del AChR intracelular señalizado con α -BTX Alexa⁵⁹⁴, de calnexina y la superposición de ambas imágenes captadas a través de un microscopio de fluorescencia confocal.

Los resultados obtenidos y presentados hasta aquí permiten establecer que la mutación en el residuo Arg429 de la subunidad α , modifica a la proteína de modo tal que ésta puede unirse a α -BTX aunque queda retenida en el RE y es incapaz de llegar a la membrana plasmática.

Colocalización de calnexina con la línea mutante His⁴⁰⁸Ala/Arg⁴²⁹Glu

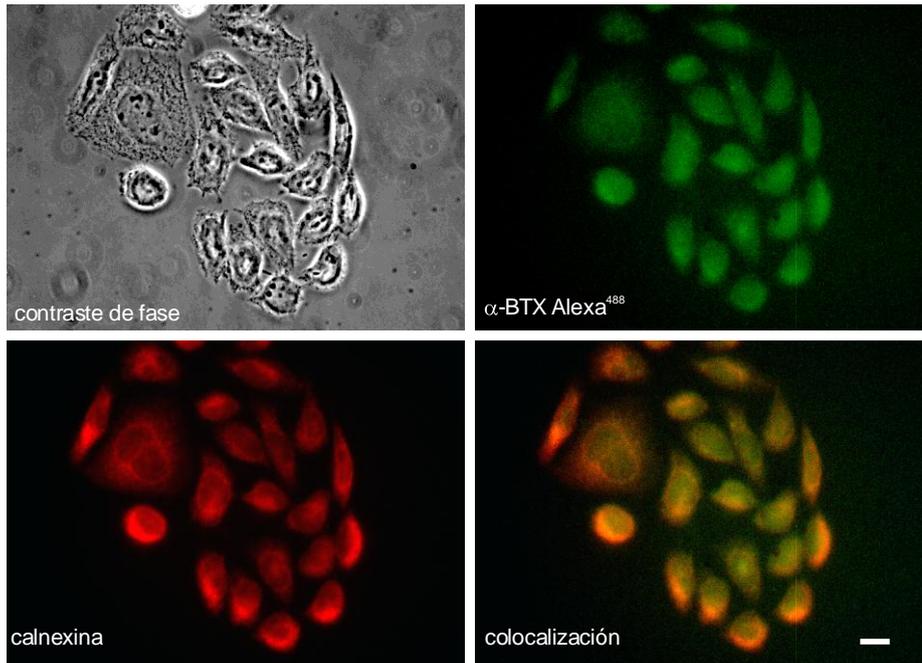


Figura 10. Colocalización del AChR con calnexina por microscopía de fluorescencia. Las células normales y las mutantes fijadas y permeabilizadas se marcaron con α-BTX Alexa⁴⁸⁸ y con un anticuerpo específico para la calnexina, una proteína marcadora del RE. Escala:10 μm

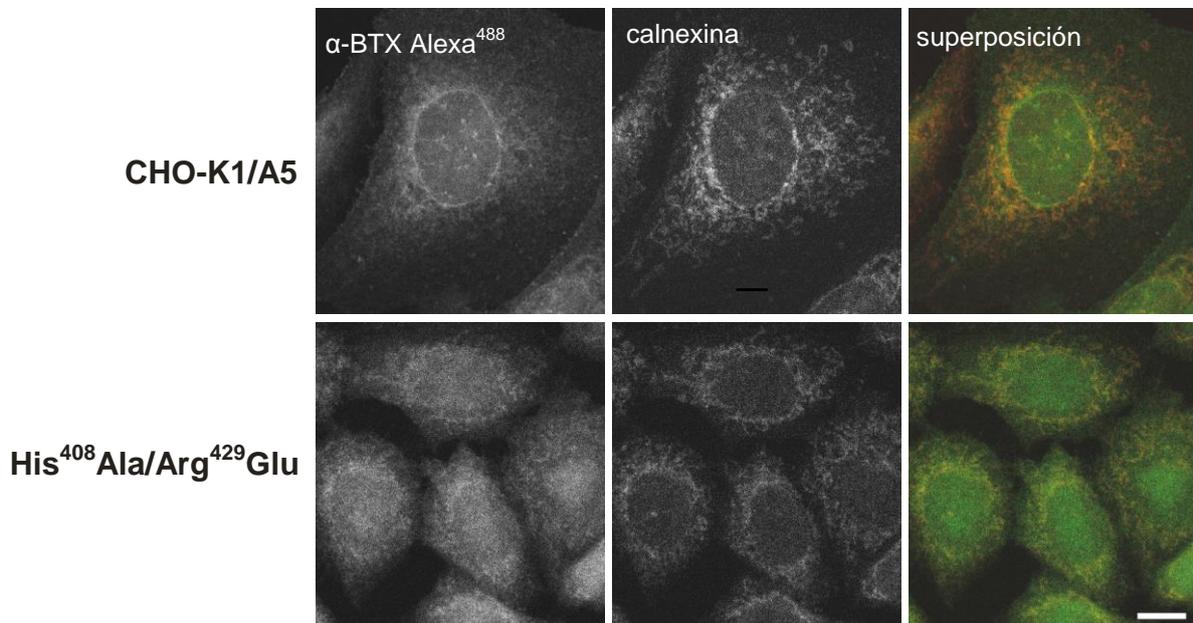


Figura 11. Colocalización con calnexina del AChR normal y mutado por microscopía de fluorescencia confocal. Las células normales y las mutantes fijadas y permeabilizadas se marcaron con α-BTX Alexa⁴⁸⁸ y con un anticuerpo específico para la calnexina. Escala: 10 μm

Análisis del estado conformacional del AChR normal y mutado por gradientes de sacarosa

Se abordaron estudios para definir el estado conformacional de la subunidad α y determinar si la mutación es responsable de un cambio estructural que no le permite la unión a ϵ y/o a δ para formar el dímero, continuar con el proceso de montaje y llegar a formar el pentámero. Así, se llevaron a cabo experimentos con la finalidad de separar e identificar subunidades parcialmente ensambladas a través de la centrifugación de las diferentes líneas clonales en gradientes de sacarosa.

Las células normales y mutantes se marcaron con $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$. La toxina libre se eliminó a través de lavados y luego de una extracción en presencia de Tritón X-100, el sobrenadante se colocó en un gradiente de sacarosa del 3% al 20% en presencia del detergente. Los controles correspondieron a gradientes corridos en paralelo y cargados con proteínas de valores de unidades de sedimentación conocidos.

El perfil proteico se determinó por el valor de absorbancia leída a 280 nm de cada una de las fracciones del gradiente y la cuantificación por el método de Lowry (Lowry et al., 1951a). A los controles realizados con proteínas individuales se sumó un gradiente de $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ a fin de determinar la ubicación de la toxina libre. El valor de la radioactividad de cada fracción se obtuvo por medición en un contador de centelleo gama. Como en todos los experimentos realizados con mutantes, se incluyó un gradiente que corresponde a la línea de expresión heteróloga normal, CHO-K1/A5, utilizada como control.

La Figura 12 muestra el resultado de un gradiente donde se marcaron y corrieron en paralelo, una alícuota de la toxina radioactiva libre y la mutante Arg⁴²⁹Glu que no presenta expresión en superficie.

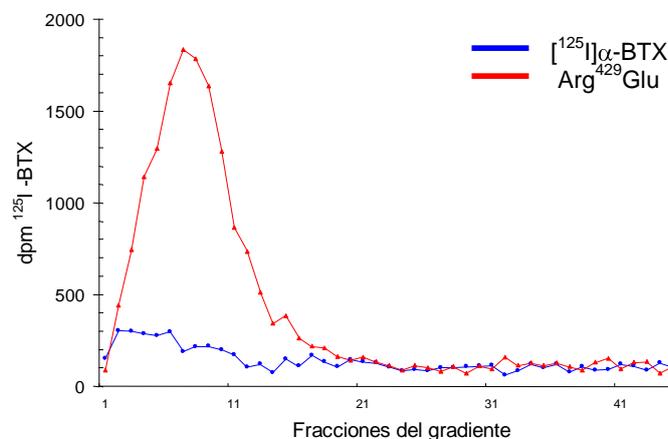


Figura 12. Perfil de marcación de las fracciones del gradiente. Distribución y nivel de radioactividad de fracciones obtenidas de gradientes de sacarosa de 3-20 % correspondientes a la línea clonal mutante que no expresa al AChR en superficie y una alícuota de la toxina libre, corridos en paralelo (Ver Materiales y Métodos).

En la Figura 13 se presenta la distribución en el gradiente de sacarosa de las especies oligoméricas del AChR marcadas, en las diferentes líneas celulares. En la línea CHO-K1/A5 control, determinamos la presencia de subunidades plegadas, parcial y totalmente ensambladas. Observamos también que el perfil de la curva correspondiente a la mutación His⁴⁰⁸Ala, es similar al de la línea control, en concordancia con la facultad que posee este receptor mutado, de llegar a la superficie celular. En las líneas mutadas en la posición Arg429 y la doble mutante, observamos claramente un pico mayoritario de radioactividad en la fracción cuyo coeficiente de sedimentación corresponde a las subunidades monoméricas o aisladas y desensambladas. De estos resultados podemos deducir que la radioactividad corresponde a la subunidad α monomérica, dado que de todas las subunidades del AChR, la subunidad α , es la única con capacidad para unir toxina radioactiva cuando está desensamblada.

Determinación de especies oligoméricas del AChR normal y mutado

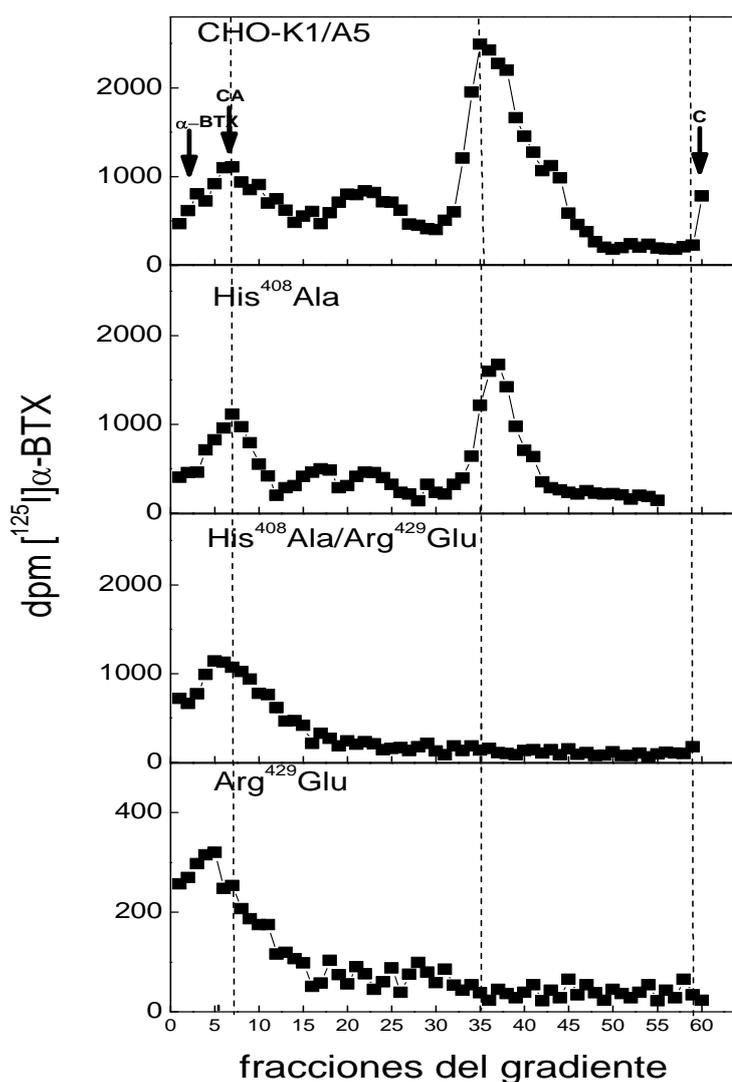


Figura 13. Determinación del estado de oligomerización del AChR. Líneas clonales normales y mutantes permeabilizadas con saponina 0.5% fueron marcadas con [¹²⁵I]α-BTX por 1 h a 4°C, solubilizadas con tritón X-100 y sembradas en gradientes de sacarosa del 3-20 % y centrifugados por 22 hs a 40000 rpm en un rotor Sorvall SW41. Para determinar valores controles de sedimentación se corrieron en paralelo, Catalasa (C, 11S), Anhidrasa Carbónica (CA, 3.3S) y toxina libre (α-BTX, 1.7S) (Kreienkamp et al., 1995).

Discusión

En este capítulo presentamos los resultados logrados empleando estrategias complementarias para el análisis estructural y funcional del receptor y su relación con los lípidos de la membrana.

Mediante técnicas de biología molecular modificamos residuos de ácidos nucleicos codificantes de la proteína y obtuvimos cinco versiones mutadas del AChR, que expresamos de manera heteróloga y estable en células eucariotas, obteniendo cinco líneas celulares diferentes.

En las nuevas líneas celulares analizamos el papel funcional de los residuos aminoacídicos cargados, tales como His408 y Arg429 ubicados en los extremos del segmento TM4 de la subunidad α . Estos residuos poseen características únicas en la subunidad y están altamente conservados en otras especies (Figura 1-.B).

Para reemplazar los aminoácidos básicos de la proteína, elegimos residuos sin carga o de carga opuesta y analizamos su participación en el proceso de montaje y en los mecanismos de transporte del receptor a la membrana plasmática.

Resultados anteriores, obtenidos con ovocitos de *Xenopus*, mostraron muy bajos niveles de expresión en la superficie de la membrana plasmática cuando se cambió el residuo Arg209 de la subunidad α , de *Torpedo californica*, por Ala o por Glu (Tamamizu et al., 1995). La mutación del residuo Ala209 de la subunidad $\alpha 7$ del receptor neuronal (ubicado en el extremo extracelular del segmento TM1), por Glu o por Leu, deteriora de manera notoria la expresión en superficie (Vicente-Agullo et al., 2001).

Los estudios realizados sobre los mecanismos que dirigen la inserción de las proteínas integrales en la bicapa y los procesos de montaje de proteínas multiméricas, sostienen la hipótesis de que estos mecanismos estarían regulados por la asimetría de cargas en los residuos flanqueantes de los segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana. Un exceso de cargas positivas en uno de los extremos definiría el dominio citoplasmático (von and Gavel, 1988). Otra de las hipótesis propuesta para proteínas integrales en sistemas eucariotas, sostiene como regla, la diferencia neta de cargas. De acuerdo con esta regla, la orientación del TM depende más de la diferencia cuantitativa de carga entre los extremos del segmento, que de su signo (Hartmann et al., 1989). De esta manera, residuos con carga negativa poseen la misma capacidad topológica que los cargados positivamente para el direccionamiento de la inserción y el montaje de estas proteínas (Schulein, 2004).

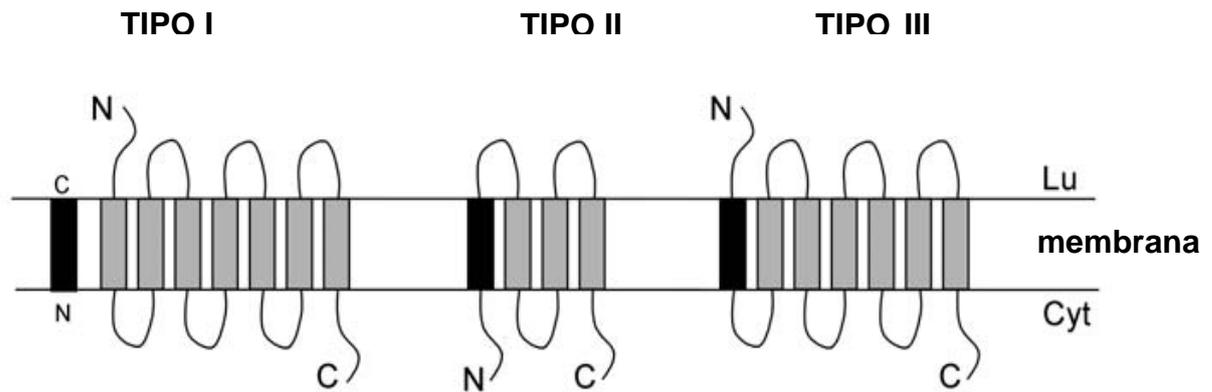


Figura 14. Diferentes tipos de proteínas integrales. La clasificación corresponde a Goderand Spiess (2001). La secuencia señal para la proteasa o para dirigir la inserción se indica con color negro.

Otros autores sugieren la existencia de epitopes proteicos comprometidos en el direccionamiento e inclusión de los segmentos hidrofóbicos. Una secuencia señal en segmentos de proteínas como las denominadas, de tipo I (Figura 14) serían reconocidos en el RE por proteasas específicas. Otras secuencias estarían ubicadas cercanas al NH^+ y/o al COO^- terminal. Sin embargo, la estructura del AChR no se encuadra en ninguno de los tres tipos de proteína presentados. Las subunidades poseen ambos extremos orientados hacia el espacio extracelular.

Hemos analizado los factores topológicos inherentes a la estructura de la proteína pero es importante considerar otros factores, que podrían estar involucrados. Modificaciones pos-transduccionales y la asistencia de chaperonas participan en el plegado y el montaje de proteínas en el RE (Dineley and Patrick, 2000; Drisdell and Green, 2000; Keller et al., 2001; Vicente-Agullo et al., 2001; Schroeder et al., 2003).

El lazo citoplasmático entre TM3 y TM4 de la subunidad α contiene dos residuos básicos adyacentes, Arg313 y Lys314. Ambos están involucrados en mecanismos de reconocimiento y retención de la subunidad en el RE.

En células de la línea HEK transfectadas con el AChR, el complejo COPI reconoce este motivo y por procesos de ubiquitilación regula el transporte desde el RE a la superficie (Keller et al., 2001). Se ha determinado además, la presencia de una secuencia señal ubicada en α TM1 que tiene la capacidad de evitar la salida del receptor del RE cuando queda expuesta por fallas en el ensamblado. La señal fue identificada por barrido de alaninas y corresponde a la secuencia PLFYxxN (Wang et al., 2002). Esta señal evita la llegada de las subunidades monoméricas y los receptores parcialmente ensamblados a la superficie celular. Más aun, dirige a la proteína hacia caminos de degradación.

En el receptor neuronal de tipo $\alpha 7$ el residuo Arg209 situado antes del TM1 es esencial para el transporte del receptor a la membrana (Vicente-Agullo et al., 2001). Cuando se mutó la posición equivalente en el receptor muscular por la carga de signo opuesto, exhibió además una ganancia de función en términos de conductancia iónica del canal (Tamamizu et al., 1995).

Pruebas de sustitución del lazo citoplasmático de $\alpha 7$ por el del AChR $\alpha 3$ ó $\alpha 5$ producen una localización diferencial en sistemas celulares neuronales en cultivo (Williams et al., 1998; Temburni et al., 2004). Trabajos realizados con unidades quiméricas compuestas por $\alpha 7$ y porciones variables de 5-HT₃ y mutaciones puntuales, contribuyeron a la identificación de dominios y residuos de aminoácidos requeridos para el montaje del receptor $\alpha 7$ funcional (Dineley and Patrick, 2000). El cambio de Cys418 del α TM4 por Gly, expresado en *Xenopus*, no permitió la llegada del receptor a la membrana (Tamamizu et al., 1999).

Los residuos utilizados en este trabajo de Tesis fueron elegidos teniendo en cuenta su ubicación, a la altura de las cabezas polares de los fosfolípidos, y sus características únicas en cuanto al tipo de cargas en los extremos del segmento hidrofóbico de la proteína. Estos residuos están expuestos a los lípidos de la membrana y si bien no son los únicos involucrados en el proceso de montaje del receptor en el RE y su tránsito a la membrana plasmática, podemos decir con los resultados presentados, que participan activamente en ambos procesos.

Referencias

- Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P and Karlin A (1994) Identification of Acetylcholine Receptor Channel-Lining Residues in the Entire M2 Segment of the Alpha Subunit. *Neuron* **13**:919-927.
- Albrecht C, McVey J H, Elliott J I, Sardini A, Kasza I, Mumford A D, Naoumova R P, Tuddenham E G, Szabo K and Higgins C F (2005) A Novel Missense Mutation in ABCA1 Results in Altered Protein Trafficking and Reduced Phosphatidylserine Translocation in a Patient With Scott Syndrome 4. *Blood* **106**:542-549.
- Antollini SS and Barrantes F J (2002) Unique Effects of Different Fatty Acid Species on the Physical Properties of the Torpedo Acetylcholine Receptor Membrane. *J Biol Chem* **277**:1249-1254.
- Antollini SS 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.
- Arias HR and Barrantes F J (1990) Phosphoinositides and Inositol Phosphates in Discopyge Tschudii Electrocyte Membranes. *Int J Biochem* **22**:1387-1392.
- Baenziger JE, Miller K W and Rothschild K J (1992) Incorporation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor into Planar Multilamellar Films: Characterization by Fluorescence and Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy. *Biophys J* **61**:983-992.
- Baier CJ and Barrantes F J (2007) Sphingolipids Are Necessary for Nicotinic Acetylcholine Receptor Export in the Early Secretory Pathway. *J Neurochem* **101**:1072-1084.
- Barenholz Y and Thompson T E (1980) Sphingomyelins in Bilayers and Biological Membranes 1. *Biochim Biophys Acta* **604**:129-158.
- Barrantes FJ (2004) Structural Basis for Lipid Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Function. *Brain Res Brain Res Rev* **47**:71-95.
- Barrantes FJ (1986) Correlation of the molecular structure with functional properties of the acetylcholine receptor protein, in *Ionic Channels in Cell and Model Systems* (Latorre R ed) pp 385-400, New York, Plenum Publ.Corp.
- Barrantes FJ (1993a) Structural-Functional Correlates of the Nicotinic Acetylcholine Receptor and Its Lipid Microenvironment. *FASEB J* **7**:1460-1467.
- Barrantes FJ (1993b) The lipid annulus of the nicotinic acetylcholine receptor as a locus of structural-functional interactions., in *New Comprehensive Biochemistry* (Watts A ed) pp 231-257, Elsevier, Amsterdam.
- Barrantes FJ (2001) Structural Studies of the Acetylcholine Receptor in the Membrane Environment. *Current Science* **81**:983-991.
- Barrantes FJ (2002) Lipid Matters: Nicotinic Acetylcholine Receptor-Lipid Interactions (Review). *Mol Membr Biol* **19**:277-284.

- Barrantes FJ (2003a) 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. Transmembrane modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* 6. 2003b. Ref Type: In Press
- Barrantes FJ (2007) Cholesterol Effects on Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J Neurochem* **103 Suppl 1**:72-80.
- Barrantes FJ, Mieskes G and Wallimann T (1983) A Membrane-Associated Creatine Kinase (EC 2.7.3.2) Identified As an Acidic Species of the Non-Receptor, Peripheral Nu-Proteins in Torpedo Acetylcholine Receptor Membranes. *FEBS Lett* **152**:270-276.
- Betz H (1990) Ligand-Gated Ion Channels in the Brain: the Amino Acid Receptor Superfamily. *Neuron* **5**:383-392.
- Blanton MP and Cohen J B (1992) Mapping the Lipid-Exposed Regions in the Torpedo Californica Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biochemistry* **31**:3738-3750.
- Blanton MP, Li Y M, Stimson E R, Maggio J E and Cohen J B (1994) Agonist-Induced Photoincorporation of a P-Benzoylphenylalanine Derivative of Substance P into Membrane-Spanning Region 2 of the Torpedo Nicotinic Acetylcholine Receptor Delta Subunit. *Mol Pharmacol* **46**:1048-1055.
- Blanton MP, McCardy E A, Huggins A and Parikh D (1998) Probing the Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor With the Hydrophobic Photoreactive Probes [125I]TID-BE and [125I]TIDPC/16. *Biochemistry* **37**:14545-14555.
- Blanton MP and Wang H H (1990) Photoaffinity Labeling of the Torpedo Californica Nicotinic Acetylcholine Receptor With an Aryl Azide Derivative of Phosphatidylserine 15. *Biochemistry* **29**:1186-1194.
- Blanton MP, Xie Y, Dangott L J and Cohen J B (1999) The Steroid Promegestone Is a Noncompetitive Antagonist of the Torpedo Nicotinic Acetylcholine Receptor That Interacts With the Lipid-Protein Interface. *Mol Pharmacol* **55**:269-278.
- Blount P and Merlie J P (1989) Molecular Basis of the Two Nonequivalent Ligand Binding Sites of the Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Neuron* **3**:349-357.
- Blount P and Merlie J P (1990) Mutational Analysis of Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Assembly. *J Cell Biol* **111**:2613-2622.
- Blount P and Merlie J P (1991) Characterization of an Adult Muscle Acetylcholine Receptor Subunit by Expression in Fibroblasts. *J Biol Chem* **266**:14692-14696.
- 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.
- Bon F, Lebrun E, Gomel J, Van R R, Cartaud J, Popot J L and Changeux J P (1984) Image Analysis of the Heavy Form of the Acetylcholine Receptor From Torpedo Marmorata 2. *J Mol Biol* **176**:205-237.

- Bonini dR, I, Aveldano M I and Barrantes F J (1990) Asymmetric Distribution of Phospholipids in Acetylcholine Receptor-Rich Membranes From *T. Marmorata* Electric Organ. *Int J Biochem* **22**:785-789.
- Borroni V, Baier C J, Lang T, Bonini I, White M M, Garbus I and Barrantes F J (2007) Cholesterol Depletion Activates Rapid Internalization of Submicron-Sized Acetylcholine Receptor Domains at the Cell Membrane. *Mol Membr Biol* **24**:1-15.
- Boulter J, Evans K, Martin G, Mason P, Stengelin S, Goldman D, Heinemann S and Patrick J (1986) Isolation and Sequence of cDNA Clones Coding for the Precursor to the Gamma Subunit of Mouse Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor 5. *J Neurosci Res* **16**:37-49.
- Bouzat C and Barrantes F J (1993a) Hydrocortisone and 11-Desoxycortisone Modify Acetylcholine Receptor Channel Gating. *NeuroReport* **4**:143-146.
- Bouzat C and Barrantes F J (1996) Modulation of Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptors by the Glucocorticoid Hydrocortisone. Possible Allosteric Mechanism of Channel Blockade. *J Biol Chem* **271**:25835-25841.
- Bouzat CB and Barrantes F J (1993b) Effects of Long-Chain Fatty Acids on the Channel Activity of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Receptors Channels* **1**:251-258.
- Brejck K, van Dijk W J, Klaassen R V, Schuurmans M, van Der O 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.
- Brisson A and Unwin P N (1984) Tubular Crystals of Acetylcholine Receptor. *J Cell Biol* **99**:1202-1211.
- Buonanno A, Mudd J, Shah V and Merlie J P (1986) A Universal Oligonucleotide Probe for Acetylcholine Receptor Genes. Selection and Sequencing of cDNA Clones for the Mouse Muscle Beta Subunit1. *J Biol Chem* **261**:16451-16458.
- Camacho P, Liu Y, Mandel G and Brehm P (1993) The Epsilon Subunit Confers Fast Channel Gating on Multiple Classes of Acetylcholine Receptors32. *J Neurosci* **13**:605-613.
- Cartaud J, Benedetti E L, Cohen J B, Meunier J C and Changeux J P (1973) Presence of a Lattice Structure in Membrane Fragments Rich in Nicotinic Receptor Protein From the Electric Organ of *Torpedo Marmorata*. *FEBS Lett* **33**:109-113.
- Changeux JP, Bessis A, Bourgeois J P, Corringer P J, villers-Thierry A, Eisele J L, Kerszberg M, Lena C, Le N N, Picciotto M and Zoli M (1996) Nicotinic Receptors and Brain Plasticity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**:343-362.
- Charnet P, Labarca C and Lester H A (1992) Structure of the Gamma-Less Nicotinic Acetylcholine Receptor: Learning From Omission 4. *Mol Pharmacol* **41**:708-717.
- Claudio T (1987) Stable Expression of Transfected *Torpedo* Acetylcholine Receptor Alpha Subunits in Mouse Fibroblast L Cells 25. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:5967-5971.
- Claudio T, Paulson H L, Green W N, Ross A F, Hartman D S and Hayden D (1989) Fibroblasts Transfected With *Torpedo* Acetylcholine Receptor Beta-, Gamma-, and Delta-Subunit cDNAs Express Functional Receptors When Infected With a Retroviral Alpha Recombinant. *J Cell Biol* **108**:2277-2290.

- Conti-Tronconi BM and Rafferty M A (1982) The Nicotinic Cholinergic Receptor: Correlation of Molecular Structure With Functional Properties 10. *Annu Rev Biochem* **51**:491-530.
- Corringer PJ, Le N N and Changeux J P (2000) Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:431-458.
- 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, 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.
- Criado M, Eibl H and Barrantes F J (1982b) Effects of Lipids on Acetylcholine Receptor. Essential Need of Cholesterol for Maintenance of Agonist-Induced State Transitions in Lipid Vesicles. *Biochemistry* **21**:3622-3629.
- daCosta CJ, Wagg I D, McKay M E and Baenziger J E (2004) Phosphatidic Acid and Phosphatidylserine Have Distinct Structural and Functional Interactions With the Nicotinic Acetylcholine Receptor 12. *J Biol Chem* **279**:14967-14974.
- Damle VN and Karlin A (1980) Effects of Agonists and Antagonists on the Reactivity of the Binding Site Disulfide in Acetylcholine Receptor From Torpedo Californica 1. *Biochemistry* **19**:3924-3932.
- Dellisanti CD, Yao Y, Stroud J C, Wang Z Z and Chen L (2007) Crystal Structure of the Extracellular Domain of NACHR Alpha1 Bound to Alpha-Bungarotoxin at 1.94 A Resolution. *Nat Neurosci* **10**:953-962.
- Dickson RC and Lester R L (1999) Metabolism and Selected Functions of Sphingolipids in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1438**:305-321.
- Dineley KT and Patrick J W (2000) Amino Acid Determinants of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Surface Expression 2. *J Biol Chem* **275**:13974-13985.
- Dreger M, Krauss M, Herrmann A and Hucho F (1997) Interactions of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Transmembrane Segments With the Lipid Bilayer in Native Receptor-Rich Membranes 10. *Biochemistry* **36**:839-847.
- Dries DR and Newton A C (2008) Kinetic Analysis of the Interaction of the C1 Domain of Protein Kinase C With Lipid Membranes by Stopped-Flow Spectroscopy 15. *J Biol Chem* **283**:7885-7893.
- Drisdel RC and Green W N (2000) Neuronal Alpha-Bungarotoxin Receptors Are Alpha7 Subunit Homomers 1. *J Neurosci* **20**:133-139.
- Edelstein SJ and Changeux J P (1998b) Allosteric Transitions of the Acetylcholine Receptor. *Adv Protein Chem* **51**:121-184.
- Edelstein SJ and Changeux J P (1998a) Allosteric Transitions of the Acetylcholine Receptor. *Adv Protein Chem* **51**:121-184.

- Ellena JF, Blazing M A and McNamee M G (1983) Lipid-Protein Interactions in Reconstituted Membranes Containing Acetylcholine Receptor. *Biochemistry* **22**:5523-5535.
- Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg F M, Cooper J C, Cassady-Cain R L, Wooding C, Linton K, Alexander D R and Higgins C F (2005) Membrane Phosphatidylserine Distribution As a Non-Apoptotic Signalling Mechanism in Lymphocytes 1. *Nat Cell Biol* **7**:808-816.
- Farge E, Ojcius D M, Subtil A and utry-Varsat A (1999) Enhancement of Endocytosis Due to Aminophospholipid Transport Across the Plasma Membrane of Living Cells 8. *Am J Physiol* **276**:C725-C733.
- Fernandez AM, Fernandez-Ballester G, Ferragut J A and Gonzalez-Ros J M (1993) Labeling of the Nicotinic Acetylcholine Receptor by a Photoactivatable Steroid Probe: Effects of Cholesterol and Cholinergic Ligands 34. *Biochim Biophys Acta* **1149**:135-144.
- Fernandez-Ballester G, Castresana J, Arrondo J L, Ferragut J A and Gonzalez-Ros J M (1992) Protein Stability and Interaction of the Nicotinic Acetylcholine Receptor With Cholinergic Ligands Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy 36. *Biochem J* **288** (Pt 2):421-426.
- Fernandez-Ballester G, Castresana J, Fernandez A M, Arrondo J L, Ferragut J A and Gonzalez-Ros J M (1994) Role of Cholesterol As a Structural and Functional Effector of the Nicotinic Acetylcholine Receptor 32. *Biochem Soc Trans* **22**:776-780.
- Fernandez-Carvajal AM, Encinar J A, Poveda J A, de J E, Martinez-Pinna J, Ivorra I, Ferragut J A, Morales A and Gonzalez-Ros J M (2006) Structural and Functional Changes Induced in the Nicotinic Acetylcholine Receptor by Membrane Phospholipids 1. *J Mol Neurosci* **30**:121-124.
- Finer-Moore J and Stroud R M (1984) Amphipathic Analysis and Possible Formation of the Ion Channel in an Acetylcholine Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:155-159.
- Fong TM and McNamee M G (1986) Correlation Between Acetylcholine Receptor Function and Structural Properties of Membranes. *Biochemistry* **25**:830-840.
- Forsayeth JR, Franco A, Jr., Rossi A B, Lansman J B and Hall Z W (1990c) Expression of Functional Mouse Muscle Acetylcholine Receptors in Chinese Hamster Ovary Cells 1. *J Neurosci* **10**:2771-2779.
- Forsayeth JR, Franco A, Jr., Rossi A B, Lansman J B and Hall Z W (1990b) Expression of Functional Mouse Muscle Acetylcholine Receptors in Chinese Hamster Ovary Cells 1. *J Neurosci* **10**:2771-2779.
- Forsayeth JR, Franco A, Jr., Rossi A B, Lansman J B and Hall Z W (1990a) Expression of Functional Mouse Muscle Acetylcholine Receptors in Chinese Hamster Ovary Cells 1. *J Neurosci* **10**:2771-2779.
- Forsayeth JR, Gu Y and Hall Z W (1992) BiP Forms Stable Complexes With Unassembled Subunits of the Acetylcholine Receptor in Transfected COS Cells and in C2 Muscle Cells 1. *J Cell Biol* **117**:841-847.
- Gardner PD (1990) Nucleotide Sequence of the Epsilon-Subunit of the Mouse Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor 23. *Nucleic Acids Res* **18**:6714.

- Gelman MS, 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 7. *J Biol Chem* **270**:15085-15092.
- Ghosh S, Xie W Q, Quest A F, Mabrouk G M, Strum J C and Bell R M (1994) The Cysteine-Rich Region of Raf-1 Kinase Contains Zinc, Translocates to Liposomes, and Is Adjacent to a Segment That Binds GTP-Ras 38. *J Biol Chem* **269**:10000-10007.
- Green WN and Claudio T (1993) Acetylcholine Receptor Assembly: Subunit Folding and Oligomerization Occur Sequentially. *Cell* **74**:57-69.
- Grosman C and Auerbach A (2001) The Dissociation of Acetylcholine From Open Nicotinic Receptor Channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14102-14107.
- Grosman C, Zhou M and Auerbach A (2000) Mapping the Conformational Wave of Acetylcholine Receptor Channel Gating. *Nature* **403**:773-776.
- Gu Y, Franco A, Jr., Gardner P D, Lansman J B, Forsayeth J R and Hall Z W (1990) Properties of Embryonic and Adult Muscle Acetylcholine Receptors Transiently Expressed in COS Cells. *Neuron* **5**:147-157.
- Hakomori S (1981) Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis 10. *Annu Rev Biochem* **50**:733-764.
- Hamouda AK, Sanghvi M, Sauls D, Machu T K and Blanton M P (2006) Assessing the Lipid Requirements of the Torpedo Californica Nicotinic Acetylcholine Receptor 10. *Biochemistry* **45**:4327-4337.
- Hanada K and Fukasawa M (1999) [Biosynthesis and Intracellular Trafficking of Ceramide] 4. *Seikagaku* **71**:1239-1243.
- 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 3. *J Biol Chem* **267**:23527-23533.
- Hanley MR (1987) Analysis of Receptor-Coupled Events in Neuropeptide Action Using Clonal Cell Lines. *Prog Brain Res* **72**:189-196.
- Hannun YA and Bell R M (1989) Regulation of Protein Kinase C by Sphingosine and Lysosphingolipids 1. *Clin Chim Acta* **185**:333-345.
- Hannun YA and Obeid L M (1997) Ceramide and the Eukaryotic Stress Response 1. *Biochem Soc Trans* **25**:1171-1175.
- Harikumar KG, 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 17. *J Biol Chem* **280**:2176-2185.

- Hartmann E, Rapoport T A and Lodish H F (1989) Predicting the Orientation of Eukaryotic Membrane-Spanning Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5786-5790.
- Hilf RJ and Dutzler R (2008) X-Ray Structure of a Prokaryotic Pentameric Ligand-Gated Ion Channel. *Nature* **452**:375-379.
- Huganir RL (1987) Regulation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor by Protein Phosphorylation. *J Recept Res* **7**:241-256.
- Hui E, Bai J, Wang P, Sugimori M, Llinas R R and Chapman E R (2005) Three Distinct Kinetic Groupings of the Synaptotagmin Family: Candidate Sensors for Rapid and Delayed Exocytosis 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5210-5214.
- Isenberg KE, Mudd J, Shah V and Merlie J P (1986) Nucleotide Sequence of the Mouse Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha Subunit 16. *Nucleic Acids Res* **14**:5111.
- Jones OT, Eubanks J H, Earnest J P and McNamee M G (1988a) A Minimum Number of Lipids Are Required to Support the Functional Properties of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biochemistry* **27**:3733-3742.
- Jones OT, Eubanks J H, Earnest J P and McNamee M G (1988b) Reconstitution of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Using a Lipid Substitution Technique. *Biochim Biophys Acta* **944**:359-366.
- Karlin A (2002) Emerging Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Nat Rev Neurosci* **3**:102-114.
- Keller SH, Lindstrom J, Ellisman M and Taylor P (2001) 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 1. *J Biol Chem* **276**:18384-18391.
- Keller SH, 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 1. *J Biol Chem* **271**:22871-22877.
- Kistler J and Stroud R M (1981) Crystalline Arrays of Membrane-Bound Acetylcholine Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:3678-3682.
- Kohler G, Hering U, Zschornig O and Arnold K (1997) Annexin V Interaction With Phosphatidylserine-Containing Vesicles at Low and Neutral PH 19. *Biochemistry* **36**:8189-8194.
- Kopta C and Steinbach J H (1994) Comparison of Mammalian Adult and Fetal Nicotinic Acetylcholine Receptors Stably Expressed in Fibroblasts 3. *J Neurosci* **14**:3922-3933.
- Kreienkamp HJ, Maeda R K, Sine S M and Taylor P (1995) Intersubunit Contacts Governing Assembly of the Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptor 2. *Neuron* **14**:635-644.
- Kuge O and Nishijima M (2003) Biosynthetic Regulation and Intracellular Transport of Phosphatidylserine in Mammalian Cells 14. *J Biochem* **133**:397-403.
- Kuge O, Nishijima M and Akamatsu Y (1986a) Phosphatidylserine Biosynthesis in Cultured Chinese Hamster Ovary Cells. III. Genetic Evidence for Utilization of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine As Precursors. *J Biol Chem* **261**:5795-5798.

- Kuge O, Nishijima M and Akamatsu Y (1986b) Phosphatidylserine Biosynthesis in Cultured Chinese Hamster Ovary Cells. II. Isolation and Characterization of Phosphatidylserine Auxotrophs 5. *J Biol Chem* **261**:5790-5794.
- Kumari S, Borroni V, Chaudhry A, Chanda B, Massol R, Mayor S and Barrantes F J (2008) Nicotinic Acetylcholine Receptor Is Internalized Via a Rac-Dependent, Dynamin-Independent Endocytic Pathway. *J Cell Biol* **181**:1179-1193.
- Lahdesmaki I and Nyholm L (2007) Intensive Care and Eriksson's Theory of Caritative Caring in 2050. *Nurs Sci Q* **20**:332-333.
- Langley JN (1907) On the Contraction of Muscle, Chiefly in Relation to the Presence of "Receptive" Substances: Part I. *J Physiol* **36**:347-384.
- LaPolla RJ, Mayne K M and Davidson N (1984) Isolation and Characterization of a cDNA Clone for the Complete Protein Coding Region of the Delta Subunit of the Mouse Acetylcholine Receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:7970-7974.
- Lindstrom J, Merlie J and Yogeewaran G (1979) Biochemical Properties of Acetylcholine Receptor Subunits From Torpedo Californica. *Biochemistry* **18**:4465-4470.
- Lowry OH, Rosebrough H N J, Farr A L and Randall R J (1951a) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent 1. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Lucic D, Huang ZH, Gu D, Subbaiah PV, Mazzone ET (2007) Cellular Sphingolipids Regulates Macrophage Apolipoprotein E Secretion. *Biochemistry* **46**:11196-11204
- Mann KG, van't V C, Cawthorn K and Butenas S (1998) The Role of the Tissue Factor Pathway in Initiation of Coagulation 3. *Blood Coagul Fibrinolysis* **9 Suppl 1**:S3-S7.
- Marsh D (1978) Spin-Label Studies of Protein-Lipid Interactions [Proceedings]. *Biochem Soc Trans* **6**:42-43.
- Marsh D (2001) Application of Electron Spin Resonance for Investigating Peptide-Lipid Interactions, and Correlation With Thermodynamics. *Biochem Soc Trans* **29**:582-589.
- 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**:4329-4333.
- 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**:97-101.
- Martinez MC, Kunzelmann C and Freyssinet J M (2006) Phosphatidylserine and Signal Transduction: Who Needs Whom? 15. *Sci STKE* **2006**:e3.
- Mishina M, Kurosaki T, Tobimatsu T, Morimoto Y, Noda M, Yamamoto T, Terao M, Lindstrom J, Takahashi T, Kuno M and . (1984) Expression of Functional Acetylcholine Receptor From Cloned cDNAs 2. *Nature* **307**:604-608.
- 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 11. *Nature* **321**:406-411.
- Mitra AK, McCarthy M P and Stroud R M (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.
- 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.
- Montal M and Opella S J (2002) The Structure of the M2 Channel-Lining Segment From the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biochim Biophys Acta* **1565**:287-293.
- Nishizuka Y (1992) Intracellular Signaling by Hydrolysis of Phospholipids and Activation of Protein Kinase C. *Science* **258**:607-614.
- 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.
- Norred WP, Plattner R D, Vesonder R F, Bacon C W and Voss K A (1992) Effects of Selected Secondary Metabolites of *Fusarium Moniliforme* on Unscheduled Synthesis of DNA by Rat Primary Hepatocytes. *Food Chem Toxicol* **30**:233-237.
- Nyholm TK, Ozdirekcan S and Killian J A (2007) How Protein Transmembrane Segments Sense the Lipid Environment. *Biochemistry* **46**:1457-1465.
- Ochoa EL, Dalziel A W and McNamee M G (1983a) Reconstitution of Acetylcholine Receptor Function in Lipid Vesicles of Defined Composition. *Biochim Biophys Acta* **727**:151-162.
- Ochoa EL, de Jimenez Bonino M B, Cascone O, Medrano S and Cousseau M B (1983b) The Nicotinic Acetylcholine Receptor From *Drosophila melanogaster*: Purification, Characterization and Reconstitution into Liposomes. *Comp Biochem Physiol C* **76**:313-317.
- Okazaki T, Bell R M and Hannun Y A (1989) Sphingomyelin Turnover Induced by Vitamin D₃ in HL-60 Cells. Role in Cell Differentiation. *J Biol Chem* **264**:19076-19080.
- Olson EN, Glaser L and Merlie J P (1984) Alpha and Beta Subunits of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Contain Covalently Bound Lipid. *J Biol Chem* **259**:5364-5367.
- Ortells MO, Cockcroft V B, Lunt G G, Marsh D and Barrantes F J (1992) The nicotinic acetylcholine receptor and its lipid microenvironment, in *Membrane Proteins: Structures, Interactions and Models* (Pullman A, Jortner J and Pullman B eds) pp 185-198, Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers.
- Ortells MO and Lunt G G (1995) Evolutionary History of the Ligand-Gated Ion-Channel Superfamily of Receptors. *Trends Neurosci* **18**:121-127.
- Paulsen H, Pollex-Kruger A and Sinnwell V (1991) [Conformational Analysis of N-Terminal O-Glycopeptide Sequences of Interleukin-2]. *Carbohydr Res* **214**:199-226.
- Pediconi MF, Politi L E, Bouzat C B, De los Santos E B and Barrantes F J (1992) Myogenic Differentiation of the Muscle Clonal Cell Line BC3H-1 Is Accompanied by Changes in Its Lipid Composition. *Lipids* **27**:669-675.

- Popoli M, Venegoni A, Buffa L and Racagni G (1997) Ca²⁺/Phospholipid-Binding and Syntaxin-Binding of Native Synaptotagmin I 1. *Life Sci* **61**:711-721.
- Powell KA, Valova V A, Malladi C S, Jensen O N, Larsen M R and Robinson P J (2000) Phosphorylation of Dynamin I on Ser-795 by Protein Kinase C Blocks Its Association With Phospholipids
6. *J Biol Chem* **275**:11610-11617.
- Proszynski TJ, Klemm R W, Gravert M, Hsu P P, Gloor Y, Wagner J, Kozak K, Grabner H, Walzer K, Bagnat M, Simons K and Walch-Solimena C (2005) A Genome-Wide Visual Screen Reveals a Role for Sphingolipids and Ergosterol in Cell Surface Delivery in Yeast 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:17981-17986.
- Quetglas S, Iborra C, Sasakawa N, De H L, Kumakura K, Sato K, Leveque C and Seagar M (2002) Calmodulin and Lipid Binding to Synaptobrevin Regulates Calcium-Dependent Exocytosis 1. *EMBO J* **21**:3970-3979.
- Rafferty MA, Hunkapiller M W, Strader C D and Hood L E (1980) Acetylcholine Receptor: Complex of Homologous Subunits. *Science* **208**:1454-1456.
- Rankin SE, Watts A and Pinheiro T J (1998) Electrostatic and Hydrophobic Contributions to the Folding Mechanism of Apocytochrome c Driven by the Interaction With Lipid. *Biochemistry* **37**:12588-12595.
- Reiter MJ, Cowburn D A, Prives J M and Karlin A (1972) Affinity Labeling of the Acetylcholine Receptor in the Electroplex: Electrophoretic Separation in Sodium Dodecyl Sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**:1168-1172.
- Reynolds JA and Karlin A (1978) Molecular Weight in Detergent Solution of Acetylcholine Receptor From Torpedo Californica. *Biochemistry* **17**:2035-2038.
- Roccamo AM, Pediconi M F, Aztiria E, Zanella 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.
- Rosenwald AG, Machamer C E and Pagano R E (1992) Effects of a Sphingolipid Synthesis Inhibitor on Membrane Transport Through the Secretory Pathway 2. *Biochemistry* **31**:3581-3590.
- Rotstein NP, Arias H R, Avelano M I and Barrantes F J (1987a) Lipid Metabolism in Electroplex. *J Neurochem* **49**:1341-1347.
- Rotstein NP, Arias H R, Barrantes F J and Avelano M I (1987b) Composition of Lipids in Elasmobranch Electric Organ and Acetylcholine Receptor Membranes. *J Neurochem* **49**:1333-1340.
- Sakmann B, Patlak J and Neher E (1980) Single Acetylcholine-Activated Channels Show Burst-Kinetics in Presence of Desensitizing Concentrations of Agonist. *Nature* **286**:71-73.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning A Laboratory Manual . second edition .Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Santiago J, Guzman G R, Rojas L V, Marti R, smar-Rovira G A, Santana L F, McNamee M and Lasalde-Dominicci J A (2001) Probing the Effects of Membrane Cholesterol in the

Torpedo Californica Acetylcholine Receptor and the Novel Lipid-Exposed Mutation Alpha C418W in Xenopus Oocytes. *J Biol Chem* **276**:46523-46532.

Schiebler W and Hucho F (1978) Membranes Rich in Acetylcholine Receptor: Characterization and Reconstitution to Excitable Membranes From Exogenous Lipids 3. *Eur J Biochem* **85**:55-63.

Schmidt J and Raftery M A (1973) A Simple Assay for the Study of Solubilized Acetylcholine Receptors. *Anal Biochem* **52**:349-354.

Schofield PR, Darlison M G, Fujita N, Burt D R, Stephenson F A, Rodriguez H, Rhee L M, Ramachandran J, Reale V, Glencorse T A and . (1987) Sequence and Functional Expression of the GABA A Receptor Shows a Ligand-Gated Receptor Super-Family. *Nature* **328**:221-227.

Schroeder JJ, Crane H M, Xia J, Liotta D C and Merrill A H, Jr. (1994) Disruption of Sphingolipid Metabolism and Stimulation of DNA Synthesis by Fumonisin B1. A Molecular Mechanism for Carcinogenesis Associated With Fusarium Moniliforme 1. *J Biol Chem* **269**:3475-3481.

Schroeder KM, Wu J, Zhao L and Lukas R J (2003) Regulation by Cycloheximide and Lowered Temperature of Cell-Surface Alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression on Transfected SH-EP1 Cells 2. *J Neurochem* **85**:581-591.

Schulein R (2004) The Early Stages of the Intracellular Transport of Membrane Proteins: Clinical and Pharmacological Implications 7. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **151**:45-91.

Simons K and van M G (1988) Lipid Sorting in Epithelial Cells 32. *Biochemistry* **27**:6197-6202.

Sine SM (2002) The Nicotinic Receptor Ligand Binding Domain. *J Neurobiol* **53**:431-446.

Sine SM (1993) Molecular Dissection of Subunit Interfaces in the Acetylcholine Receptor: Identification of Residues That Determine Curare Selectivity 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9436-9440.

Sine SM and Claudio T (1991a) Gamma- and Delta-Subunits Regulate the Affinity and the Cooperativity of Ligand Binding to the Acetylcholine Receptor 1. *J Biol Chem* **266**:19369-19377.

Sine SM and Claudio T (1991b) Stable Expression of the Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor in Mouse Fibroblasts. Comparison of Receptors in Native and Transfected Cells 2. *J Biol Chem* **266**:13679-13689.

Sine SM and Taylor P (1981) Relationship Between Reversible Antagonist Occupancy and the Functional Capacity of the Acetylcholine Receptor. *J Biol Chem* **256**:6692-6699.

Slotte JP and Bierman E L (1988) Fatty Acid Specificity of the Lysosomal Acid Cholesterol Esterase in Intact Human Arterial Smooth Muscle Cells 4. *Biochim Biophys Acta* **958**:308-312.

Smith MM, 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 12. *J Biol Chem* **262**:4367-4376.

- Spiegel S (1999) Sphingosine 1-Phosphate: a Prototype of a New Class of Second Messengers. *J Leukoc Biol* **65**:341-344.
- Stroud RM, McCarthy M P and Shuster M (1990) Nicotinic Acetylcholine Receptor Superfamily of Ligand-Gated Ion Channels 1. *Biochemistry* **29**:11009-11023.
- Sunshine C and McNamee M G (1992) Lipid Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Function: the Role of Neutral and Negatively Charged Lipids 5. *Biochim Biophys Acta* **1108**:240-246.
- Tamamizu S, Lee Y, Hung B, McNamee M G and Lasalde-Dominicci J A (1999) Alteration in Ion Channel Function of Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor by Mutations in the M4 Transmembrane Domain 23. *J Membr Biol* **170**:157-164.
- Tamamizu S, Todd A P and McNamee M G (1995) Mutations in the M1 Region of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Alter the Sensitivity to Inhibition by Quinacrine 1. *Cell Mol Neurobiol* **15**:427-438.
- Taubman MB, Smith C W, Izumo S, Grant J W, Endo T, Andreadis A and Nadal-Ginard B (1989) The Expression of Sarcomeric Muscle-Specific Contractile Protein Genes in BC3H1 Cells: BC3H1 Cells Resemble Skeletal Myoblasts That Are Defective for Commitment to Terminal Differentiation 5. *J Cell Biol* **108**:1799-1806.
- Temburni MK, Rosenberg M M, Pathak N, McConnell R and Jacob M H (2004) Neuronal Nicotinic Synapse Assembly Requires the Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor Protein 1. *J Neurosci* **24**:6776-6784.
- Tomiuk S, Zumbansen M and Stoffel W (2000) Characterization and Subcellular Localization of Murine and Human Magnesium-Dependent Neutral Sphingomyelinase. *J Biol Chem* **275**:5710-5717.
- Unwin N (2005) Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4Å Resolution 9. *J Mol Biol* **346**:967-989.
- Unwin N (1993) Nicotinic Acetylcholine Receptor at 9 Å Resolution. *J Mol Biol* **229**:1101-1124.
- Vance JE (2008) Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in Mammalian Cells: Two Metabolically Related Aminophospholipids 87. *J Lipid Res* **49**:1377-1387.
- 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 4. *Cell* **68**:23-31.
- Vicente-Agullo F, Rovira J C, Sala S, Sala F, Rodriguez-Ferrer C, Campos-Caro A, Criado M and Ballesta J J (2001) Multiple Roles of the Conserved Key Residue Arginine 209 in Neuronal Nicotinic Receptors 2. *Biochemistry* **40**:8300-8306.
- von HG and Gavel Y (1988) Topogenic Signals in Integral Membrane Proteins 2. *Eur J Biochem* **174**:671-678.
- Wang JM, Zhang L, Yao Y, Viroonchatapan N, Rothe E and Wang Z Z (2002) A Transmembrane Motif Governs the Surface Trafficking of Nicotinic Acetylcholine Receptors 15. *Nat Neurosci* **5**:963-970.

- Weiland G, Frisman D and Taylor P (1979) Affinity Labeling of the Subunits of the Membrane Associated Cholinergic Receptor. *Mol Pharmacol* **15**:213-226.
- Wenk MR and De C P (2004) Protein-Lipid Interactions and Phosphoinositide Metabolism in Membrane Traffic: Insights From Vesicle Recycling in Nerve Terminals 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8262-8269.
- Whittaker VP (1998) Arcachon and Cholinergic Transmission. *J Physiol Paris* **92**:53-57.
- Williams BM, Temburni M K, Levey M S, Bertrand S, Bertrand D and Jacob M H (1998) The Long Internal Loop of the Alpha 3 Subunit Targets NACHRs to Subdomains Within Individual Synapses on Neurons in Vivo 1. *Nat Neurosci* **1**:557-562.
- Wilson GG and Karlin A (1998) The Location of the Gate in the Acetylcholine Receptor Channel. *Neuron* **20**:1269-1281.
- Wojtal KA, de V E, Hoekstra D and van Ijzendoorn S C (2006) Efficient Trafficking of MDR1/P-Glycoprotein to Apical Canalicular Plasma Membranes in HepG2 Cells Requires PKA-R11alpha Anchoring and Glucosylceramide 5. *Mol Biol Cell* **17**:3638-3650.
- Yeung T, Gilbert G E, Shi J, Silvius J, Kapus A and Grinstein S (2008) Membrane Phosphatidylserine Regulates Surface Charge and Protein Localization 5. *Science* **319**:210-213.
- Zhang H and Karlin A (1997) Identification of Acetylcholine Receptor Channel-Lining Residues in the M1 Segment of the Beta-Subunit. *Biochemistry* **36**:15856-15864.