



Universidad Nacional del Sur

TESIS

DOCTOR EN BIOQUIMICA

**“Mecanismo de asociación del Receptor de Acetilcolina
Nicotínico a su microentorno lipídico”**

Vicente Bermúdez

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2010

Directores de Tesis: Dr. Francisco José Barrantes

Dra. Marta Isabel Aveldaño

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 de la Universidad Nacional del Sur y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 28 de Septiembre del 2004 y el 13 de Diciembre del 2010, bajo la dirección del Doctor Barrantes, Francisco José; ex Profesor Titular de la Cátedra de Química Biológica I e Investigador Superior del CONICET y de la Doctora Aveldaño, Marta Isabel, Profesora Titular de la cátedra de Fisiopatología Humana e Investigadora Principal del CONICET.

Vicente Bermúdez

13 de Diciembre de 2010

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

Agradecimientos

A mis Directores de Tesis, Dr. Francisco Barrantes y Dra. Marta Aveldaño, por permitirme desarrollar esta Tesis bajo su guía.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) le agradezco el apoyo económico brindado en gran parte de este trabajo de Tesis de Doctorado.

Al INIBIBB y a la Universidad Nacional del Sur por haberme permitido desarrollar las tareas de investigación presentadas en esta Tesis.

A todas las personas que conforman el INIBIBB por su apoyo brindado a lo largo de todos estos años, en especial a mis amigos y compañeros que tanto me han incentivado a seguir con su buen humor y sus consejos a pesar de las dificultades presentadas

A la Dra. Silvia Antollini, por sus consejos y su apoyo constante, tanto en la mesada como en la discusión científica diaria

A mis padres, por su apoyo incondicional en todo sentido a lo largo de estos años, por sus consejos y paciencia,

A mis hermanos que siempre con su aliento y colaboración facilitaron el desarrollo de esta vocación

A Melisa, por su apoyo y paciencia kilométricas, por todo,

A mis amigos, con quienes siempre puedo contar y nunca preguntaron ¿y la Tesis?

A Gaspar, a quien siempre recordaremos por su compañerismo y amistad, por las incontables horas de mesada y no mesada compartidas, por su colaboración en este trabajo de Tesis

Vicente

Resumen

El receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) es una proteína integral de membrana, en íntimo contacto con los lípidos de la misma. El objetivo de este trabajo de Tesis fue analizar si las propiedades intrínsecas del AChR son las que determinan su partición en un determinado dominio de lípidos. Para ello se eligió el tipo de AChR con mejor caracterización, el del tejido eléctrico del pez marino *Torpedo*. El AChR completo, purificado a partir de *T. californica*, se reconstituyó en membranas modelo con proporciones definidas de colesterol, esfingomiélin y fosfatidilcolina, y luego se procedió a su análisis mediante técnicas bioquímicas y biofísicas. Una porción del AChR que se sabe reside normalmente en el interior de la membrana, el péptido sintético γ M4, se estudió de manera similar con el objetivo de aprender acerca de la contribución del anillo exterior del segmento transmembrana, en contacto directo con los lípidos, en la supuesta segregación lateral en la membrana del AChR.

La distribución del AChR o del péptido γ M4 se evaluó por extracción de los liposomas con el detergente no-iónico Triton X-100, y su posterior centrifugación, para obtener membranas resistentes al detergente (DRM). Se ha postulado que tales fracciones serían el homólogo bioquímico de los dominios de lípidos tipo balsa ("*rafts*") preexistentes en la membrana plasmática de células. La contrapartida de tales fracciones, las denominadas "no-rafts", son las membranas solubles en el detergente (DSM). Se estudió también la influencia de la rapsina (una proteína periférica involucrada en agrupamiento del AChR) o de la agregación de dominios tipo-*rafts* (utilizando membranas que contienen al gangliósido GM1 seguido por el entrecruzamiento de GM1).

Los resultados experimentales permiten concluir que el péptido γ M4 exhibe una marcada preferencia por los dominios tipo-*rafts*. Por el contrario el AChR, ya sea solo o en presencia de la proteína rapsina, o de la agregación del gangliósido GM1, no exhibió tal preferencia por los dominios tipo-*rafts*.

La composición lipídica de las fracciones DRM y DSM obtenidas a partir de liposomas compuestos sólo por fosfatidilcolina:esfingomielina:colesterol en proporciones equimolares, o por la misma mezcla de lípidos con γ M4 o AChR incorporado, estaba enriquecida en todos los casos en colesterol y esfingomielina en las fracciones DRM, y enriquecidas en fosfatidilcolina en las fracciones DSM. Estos resultados demuestran que la composición lipídica de estas fases depende principalmente de las propiedades de los lípidos que las componen. Sin embargo, la proporción de cada dominio de lípidos depende de la presencia del AChR o del péptido γ M4. El AChR produjo un aumento significativo en la cantidad total de la fracción DSM, con una reducción concomitante en la cantidad total de la fracción DRM. Por otra parte, γ M4 aumentó la proporción de la fracción DRM. Por lo que inferimos que el péptido γ M4 actuaría como un promotor de DRM y el AChR completo, por el contrario, actuaría como un perturbador de DRM.

La eficiencia de la transferencia de energía resonante de Förster entre la fluorescencia intrínseca de la proteína (o del péptido) y el dehidroergosterol (mimético fluorescente del colesterol) sirve como una medida de la localización de la proteína en la membrana. La sonda fluorescente Laurdan como aceptora se utilizó como control, ya que no muestra ninguna partición preferencial por un dominio en particular. Los valores de la denominada polarización generalizada, calculados a partir de los espectros de fluorescencia de la sonda Laurdan, fueron

utilizados como informativos de las condiciones biofísicas de cada membrana. El AChR purificado no tuvo una partición preferencial entre dominios *rafts* (dominios enriquecidos en colesterol) y dominios *no-rafts*, mientras que el péptido γ M4 se particionó preferentemente en dominios *rafts*.

Podemos inferir que la predilección del AChR en su medio natural por un dominio dado de lípidos no puede ser atribuida exclusivamente a las propiedades fisicoquímicas de ambos o a las interacciones entre el dominio TM de la proteína y el ambiente lipídico, por lo que debería haber señales exteriores en las membranas celulares nativas que direccionen al AChR hacia un dominio de membrana específico.

Abstract

The nicotinic acetylcholine receptor (AChR) is an integral membrane protein, in intimate contact with the lipids in its native membrane. The aim of the present Thesis was to analyze the possibility that it is the intrinsic properties of the AChR that determine its partition into a given lipid domain. For this purpose we chose the best characterized AChR, the one from *Torpedo* electric tissue. The AChR purified from *Torpedo californica* was reconstituted into model membranes with defined proportions of cholesterol, sphingomyelin and phosphatidylcholine, and analyzed by biochemical and biophysical techniques. The synthetic γ M4 peptide was studied using the same experimental approach to learn about the contribution of the lipid-contacting transmembrane outer ring to the putative lateral segregation of the AChR in the membrane.

The distribution of the AChR or the γ M4 peptide was assessed by Triton X-100 extraction of the liposomes combined with centrifugation to yield detergent-resistant membranes (DRMs). These fractions have been postulated to correspond to the biochemical homolog of the lipid rafts domains that preexist in the cellular plasma membrane. Counterparts of those fractions, non-raft domains, are detergent soluble membranes (DSM). The influence of rapsyn (a peripheral protein involved in AChR aggregation) or that of aggregation of *raft*-like domains (using membranes containing the ganglioside GM1 followed by GM1 crosslinking) was also studied. The γ M4 peptide displays a marked preference for *raft*-like domains. In contrast, the AChR alone or in the presence of rapsyn or ganglioside aggregation exhibits no such preference for *raft*-like domains.

The lipid composition of the DRM and DSM fractions obtained from liposomes composed of the equimolar phosphatidylcholine: sphingomyelin:cholesterol mixture alone, or the same lipid mixture with γ M4 or AChR, were all enriched in cholesterol and sphingomyelin in the DRM fractions, and enriched in phosphatidylcholine in the DSM fractions. These results indicate that the lipid composition of these phases depended mainly on the properties of the lipid. However, the amount of each lipid domain depends on the presence of the AChR or the γ M4 peptide. The AChR macromolecule caused a significant increase in the total amount of the DSM fraction, with a concomitant reduction in the total amount of the DRM fraction. On the other hand, the presence of the γ M4 increased the proportion of the DRM fraction. Thus, the γ M4 peptide appears to behave as a DRM promoter and the AChR as a DRM disruptor.

The efficiency of the Förster resonance energy transfer (E) between the protein (or peptide) intrinsic fluorescence and dehydroergosterol (a fluorescent cholesterol mimetic) served as a measure of the protein location in the membrane. Using the fluorescent probe Laurdan as a control acceptor -as it shows no preferential partition into a particular domain- the so-called generalized polarization values calculated from the Laurdan fluorescence spectra were used as a reporter of the biophysical properties of the membrane. Purified AChR displayed no preferential partition between rafts (domains enriched in cholesterol) and *non*-rafts domains, whereas the γ M4 peptide preferentially partitioned into raft domains.

Putting all the data together, it can be inferred that the preference of the AChR for a given lipid domain in its natural milieu cannot be solely ascribed to the physicochemical properties of the two partners or to the interactions between the protein transmembrane domain and the lipid moiety, and that there must therefore

be an external signal in native cell membranes that directs the AChR to a specific membrane domain.

Índice de contenidos

Prefacio.....	3
Agradecimientos.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	9
Índice de contenidos.....	12
Abreviaturas.....	14
Introducción.....	19
Receptor de acetilcolina nicotínico.....	25
El AChR y los lípidos de la membrana plasmática.....	29
El AChR y los rafts lipídicos.....	37
Materiales y métodos.....	46
Materiales.....	47
Métodos.....	48
1. Preparación de vesículas lipídicas unilaminares que contienen al péptido γ M4.....	48
2. Obtención de membranas crudas y enriquecidas en AChR a partir de <i>T. californica</i>	49
3. Purificación de la proteína del AChR por cromatografía de afinidad.....	52
4. Obtención de un extracto alcalino de la membrana postsináptica de <i>T. californica</i> enriquecido en rapsina.....	58
5. Preparación de liposomas de rapsina-AChR.....	59
6. Entrecruzamiento de GM1 con CTxB y Anti-CTx.....	60
7. Obtención de las fracciones DRM y DSM.....	60
8. SDS-PAGE y ensayos de Western blot.....	66
9. Caracterización de los lípidos de las fracciones DSM y DRM.....	67
10. Cálculo del coeficiente de partición (K_p) y de la energía libre de transferencia aparente (ΔG_a).....	71

11. Mediciones de fluorescencia	72
12. Mediciones de la transferencia de energía de resonante de Förster (FRET).....	74
13. Cálculo de la polarización generalizada (GP) utilizando la sonda Laurdan	78
14. Análisis estadístico.....	80
Resultados	81
Solubilidad en detergente del péptido γ M4 reconstituido en el sistema lipídico POPC:SM:Col 1:1:1 (“membrana que contiene rafts”).....	82
Solubilidad en detergentes de AChR purificado y reconstituido en el sistema lipídico POPC:SM:Col 1:1:1 (“membrana que contiene rafts”).....	84
Interacción rapsina-AChR y solubilidad en detergentes	96
Análisis de la composición lipídica de las fracciones DRM y DSM de distintas membranas modelo luego del tratamiento con Triton X-100	98
Energía libre de transferencia desde los dominios DSM hacia los dominios DRM	105
Análisis de las propiedades biofísicas de las membranas modelo.....	107
Análisis por FRET de las interacciones lípido-AChR	109
Discusión.....	118
Conclusiones generales	132
Bibliografía	134
Publicaciones y comunicaciones a congresos originadas en esta tesis	146
Publicaciones	146
Presentaciones a Congresos	146

Abreviaturas

A = Aceptor

Å = Angstrom

AChR = Receptor de acetilcolina nicotínico

BH = Buffer de homogenización

BSM = Esfingomielina de cerebro bovino

C = Cloroformo

CCF = Cromatografía en capa fina

CIGL = Canal iónico gatillado por ligando

Col = Colesterol

CTxB = Subunidad B de la toxina colérica

CTx = Toxina colérica

D = Donante

dil. = Dilución

D.E. = Desvío estándar

DG = Distroglicano

DHE = Dehidroergosterol

DOPC = 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina

DRM = Membrana resistente a detergente

DSM = Membrana soluble en detergente

DTNB = 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico)

DTT = Ditriotreitól

E = Eficiencia de la transferencia de energía resonante

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético

ESR = Resonancia de espín electrónica

FRET = Transferencia de energía resonante fluorescente

g = Gramo

g = Intensidad de la gravedad

ΔG_a = Energía libre de transferencia aparente

GABA = Receptor de ácido- γ -aminobutírico tipo A

GD1b = Gangliósido GD1b

GM1 = Gangliósido GM1

GM2 = Gangliósido GM2

GM3 = Gangliósido GM3

GP = Polarización generalizada

GP_{ex} = Polarización generalizada de excitación

GPI = Glucosilfosfatidilglicerol

$^{\circ}C$ = Grados centígrados

h = Hora

HRP = Peroxidasa de rábano picante

hs = Horas

I_D = Intensidad de emisión de la molécula donante

I_{DA} = Intensidad de emisión de la molécula donante en presencia del aceptor

Kcal = kilocalorías

kDa = Kilodalton

K_p = Coeficiente de partición

L = Litro

l_d = Líquido ordenado

l_o = Líquido desordenado

LUV = Vesículas unilaminares grandes

M = Metanol

µg = Microgramo

µl = Microlitro

µM = Micromolar

mA = Miliamperes

mg = Miligramo

ml = Mililitro

min = Minuto/s

mM = Milimolar

M1 = Segmento transmembranal M1

M2 = Segmento transmembranal M2

M3 = Segmento transmembranal M3

M4 = Segmento transmembranal M4

MuSK= Receptor de tirosina quinasa específico de músculo

N = Normal

nm = Nanometro

nM = Nanomolar

nmoles = Nanomoles

NS = Diferencia no significativa

p/v = Peso/volumen

P = Pellet

PA = Ácido fosfatídico

PC = Fosfatidilcolina

PE = Fosfatidiletanolamina

PG = Fosfatidilglicerol

PMSF = Fenilmetanosulfonilfluoruro

POPC = 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

PS = Fosfatidilserina

PTPase= Fosfatasa tirosina específica

5-HT₃ = Receptor de serotonina

r = Distancia de separación entre el par donante-aceptor

R = Constante molar de los gases

R₀ = Distancia de Förster

rpm = Revoluciones por minuto

S = Sobrenadante

SDS-PAGE = Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SM = Esfingomielina

SNC = Sistema nervioso central

SNP = Sistema nervioso periférico

T = Temperatura en grados kelvin

TBS = Buffer Tris salino

TBST = Buffer Tris salino con 0,05% de Tween 20

TCA =Ácido tricloro acético

T.californica = *Torpedo californica*

T_m = Temperatura de transición líquido-gel

T.marmorata= *Torpedo marmorata*

Trp = Triptofano

Tyr = Tirosina

TM = Transmembrana

UNM = Unión neuromuscular

V = Volts

Introducción

El sistema nervioso es una red de comunicación especializada para recibir información del medio externo e interno del organismo, permitiendo que interactúe de la manera más apropiada con el ambiente. La información recibida por el sistema sensorial es procesada, analizada e integrada para tomar una decisión y generar una respuesta adecuada. La recepción de la información es una función del sistema nervioso periférico (SNP). La integración, el análisis de la información recibida y la toma de decisiones, se llevan a cabo en el sistema nervioso central (SNC), compuesto por el cerebro y la médula espinal. Estos sistemas están conformados por un conglomerado inmenso de neuronas, células especializadas en recibir información y transmitirla, y por células de la neuroglia, especializadas en dar sostén a todo el sistema y cumplir funciones de defensa. Las neuronas constituyen la unidad funcional del sistema nervioso. El cerebro humano contiene un número extraordinario de estas células (en el orden de 10^{11} millones de neuronas), que a su vez pueden ser clasificadas en decenas de tipos distintos, aunque mantienen una arquitectura básica común a todos ellos. Las neuronas generalmente poseen dos tipos de prolongaciones de su cuerpo celular: un axón de longitud variada, que constituye el elemento transmisor de la señal, y varias dendritas, más cortas, que son generalmente las que reciben la señal proveniente de otras neuronas (Figura 1).

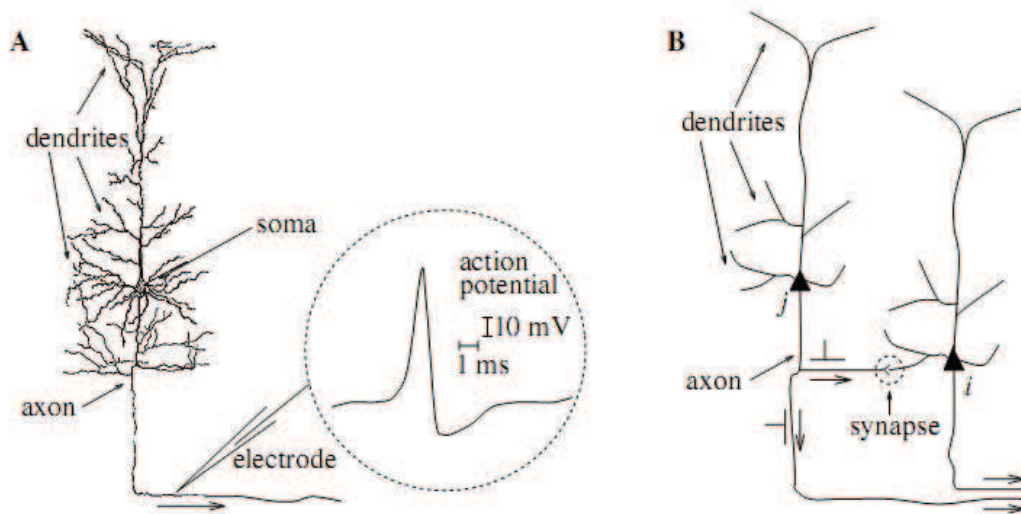


Figura 1. Estructura básica de una neurona. **A.** Dibujo de Ramón y Cajal, en el que se pueden distinguir las dendritas, el soma y el axón. **B.** Transmisión de la señal desde una neurona presináptica *j* a una neurona postsináptica *i*. La sinapsis está marcada con un círculo punteado. Tomada de (Wulfram Gerstner and Werner M.Kistler 2002).

La complejidad del sistema nervioso no depende sólo de la especialización de las neuronas en distintos tipos celulares, sino también de la gran cantidad de distintos tipos de conexiones y circuitos anatómo-citoarquitectónicos que establecen entre ellas y con los receptores sensoriales y los músculos (Eric C.Kandel 2000). En las células nerviosas y musculares la información se propaga en la superficie de las membranas mediante variaciones transitorias de muy corta duración (del orden de los milisegundos) en el potencial de reposo. Estas variaciones, denominadas potenciales de acción, son impulsos nerviosos de tipo todo-nada transmitidos a lo largo del axón, que conservan su amplitud en todo su recorrido. El potencial de acción llega a la porción terminal del axón, denominada terminal sináptico, a través del cual se produce el pasaje de la señal a la célula contigua, denominada *postsináptica* (Figuras 1 y 2). La transmisión de la señal célula-célula se produce precisamente en estructuras especializadas denominadas

sinapsis, siendo la célula nerviosa que transmite la señal denominada como neurona *presináptica*.

Las sinapsis pueden ser eléctricas o químicas según el modo de transmisión de la señal nerviosa. En las primeras, el potencial de acción se transmite a través uniones comunicantes entre ambas células, mientras que las sinapsis químicas constituyen la forma más frecuente de transmisión de la señal nerviosa. En ellas no se produce un contacto directo célula-célula, ya que entre la célula presináptica y la célula postsináptica hay un espacio denominado *hendidura sináptica* que contiene fluido extracelular. La llegada del potencial de acción al terminal sináptico promueve la entrada de calcio al mismo, y esto dispara la liberación de las moléculas de neurotransmisor almacenadas en vesículas presinápticas (Figura 2).

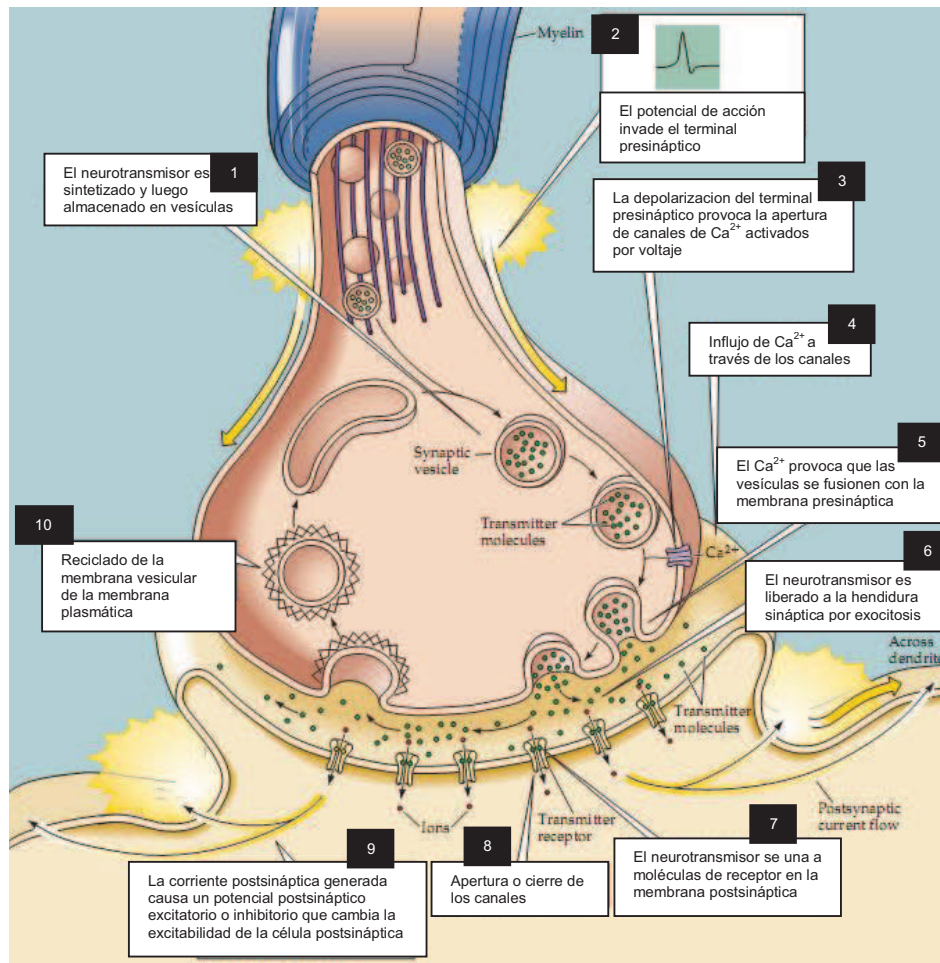


Figura 2. Esquema de una sinapsis química. Se observan los pasos principales de este mecanismo de transmisión. Tomado y adaptado de (George J. Augustine 2004).

El neurotransmisor (generalmente de bajo peso molecular) difunde a través de la hendidura para interactuar con moléculas proteicas específicas denominados receptores, los cuales se encuentran embebidos en la membrana plasmática de la célula postsináptica. De acuerdo al tipo de respuesta fisiológica que generan, los receptores pueden clasificarse en dos grandes grupos: ionotrópicos y metabotrópicos. Estos últimos generan una respuesta más lenta, ya que es necesario que interactúen con miembros de la familia de la proteína G con la posterior generación de segundos mensajeros. Un ejemplo de este tipo de receptores es el receptor nicotínico muscarínico. Por otro lado, los receptores ionotrópicos generan

una respuesta más rápida, mediada por la apertura de un canal iónico que forma parte de la proteína. Los canales iónicos son una clase de proteínas integrales de membrana que se expresan en todas las células del cuerpo y median cambios rápidos del potencial de membrana. Tienen tres propiedades importantes: 1) conducen iones; 2) reconocen y seleccionan específicamente iones, y 3) se abren y se cierran en respuesta a señales eléctricas, mecánicas o químicas específicas. Dentro de los canales activados por señales químicas específicas se encuentran los canales iónicos gatillados por ligando (CIGL), superfamilia a la que pertenecen el receptor de la acetilcolina nicotínico (AChR), el receptor de serotonina (5-HT₃), y los receptores de GABA y de glicina (Ortells M.O. 1998). Los receptores de AChR y de 5-HT₃ son selectivos para cationes, y por lo tanto producen un efecto excitatorio, mientras que los receptores de GABA y de glicina son selectivos para aniones y en consecuencia su efecto es inhibitorio. Todos los receptores de esta familia tienen una alta homología en su secuencia de aminoácidos y presentan características estructurales similares. En la porción amino terminal extracelular de todas sus subunidades hay un lazo de cisteína, formado por un par de cisteínas unidas covalentemente separadas por sólo 13 aminoácidos, por lo que constituyen una *superfamilia* dentro de los CIGL de receptores con lazos de cisteína (Lester *et al.* 2004; Connolly and Wafford 2004). El más estudiado y caracterizado, tanto fisiológicamente como bioquímicamente, de este grupo y de todos los canales biológicos, es el AChR. Este receptor constituye un modelo para el entendimiento de la estructura y función de otros receptores de neurotransmisores.

Receptor de acetilcolina nicotínico

De acuerdo al sitio de expresión, los AChR se pueden clasificar en musculares, tisulares y neuronales. Los receptores neuronales están conformados por varias subunidades α_{2-10} y β_{2-4} o por homopentámeros como en el caso de los receptores formados por cinco subunidades α_7 , y se ubican mayoritariamente en el SNC (Role and Berg 1996;Le *et al.* 2002;Karlin 2002;Romanelli *et al.* 2007). Entre los tisulares se encuentran los que se expresan en la cóclea (Elgoyhen *et al.* 2009;Plazas *et al.* 2005). El AChR de tipo muscular se encuentra localizado principalmente en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular (UNM) del músculo esquelético, en altas concentraciones. Luego de que la neurona presináptica es excitada eléctricamente, el neurotransmisor, la acetilcolina, es secretado en esta unión, donde difunde desde la membrana de la neurona hasta la membrana de la célula muscular esquelética postsináptica. La unión de la acetilcolina inicia en el AChR una serie de cambios conformacionales que llevan a la apertura transitoria del canal del receptor permitiendo el pasaje selectivo de cationes a lo largo de la membrana postsináptica. Este pasaje produce un cambio en el potencial transmembrana que excita eléctricamente a la célula muscular, lo que eventualmente conduce a la contracción de la misma. Los AChR forman en las UNM agrupaciones altamente organizadas en la membrana postsináptica, asegurando una rápida y eficiente transmisión del impulso nervioso. La densidad de receptores en la membrana del músculo adulto llega a ser de más de 10000 receptores/ μm^2 justo por debajo del terminal nervioso, y este número decrece enormemente en las porciones adyacentes extrasinápticas de la membrana hasta una densidad de 10 receptores/ μm^2 (Fertuck and Salpeter 1974;Sanes and Lichtman

2001). Esta alta concentración de receptores, junto a la liberación de la acetilcolina por el nervio -la terminal nerviosa presináptica- en forma cuántica que llega a producir concentraciones milimolares del neurotransmisor en la hendidura sináptica (Barrantes, 1983), genera que un exceso de acetilcolina actúe directamente sobre un exceso de AChR. Con esto, se logra amplificar las pequeñas corrientes que generan el potencial de acción de los axones de las neuronas motoras, para poder alcanzar el potencial de acción necesario en las células musculares (Lindstrom 2003).

El AChR es una glicoproteína de gran tamaño (250 kDa), compuesta por cuatro subunidades distintas pero altamente homólogas entre sí, ensambladas en una estequiometría $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (α , 40 kDa; β , 48 kDa; γ , 58 kDa; y δ , 64 kDa) en el músculo esquelético de vertebrados en su etapa embrionaria y en la sinapsis electromotora de peces eléctricos. En la célula muscular adulta de vertebrados, el receptor adopta un estequiometría $\alpha_2\beta\epsilon\delta$, sustituyendo la subunidad γ por la ϵ durante la primera semana postnatal, cambio que genera una mayor conductividad y un tiempo de estado abierto menor del canal iónico (Mishina *et al.* 1986; Gu and Hall 1988; Sanes and Lichtman 2001). Cada una de estas subunidades posee un gran segmento N-terminal extracelular, cuatro segmentos hidrofóbicos de unos 20 a 30 aminoácidos de longitud, que corresponderían, según los modelos actuales, a los segmentos transmembrana (TM) M1-M4, y una pequeña cola C-terminal extracelular (Figura 3). Todas las subunidades tienen un tamaño similar con dimensiones máximas de 30 Å x 40 Å x 160 Å (Unwin 2005). El AChR posee dos sitios de unión a ligandos que se encuentran en las interfaces de las subunidades α - γ/ϵ y α - δ (Figura 3a). La resolución de la estructura atómica de todo el segmento TM del AChR, determinada por microscopía crioelectrónica, sugiere que todos los

segmentos TM son helicoidales y adoptan en conjunto un motivo de α -hélice antiparalelo (Unwin 2005) (Figura 3b).

En la región transmembrana del AChR pueden distinguirse tres capas concéntricas con respecto al poro del canal iónico (Barrantes 2003;Barrantes 2004) (Figura 3c y d). Los segmentos M2 de todas las subunidades constituyen el anillo más interno, conformando las paredes del canal iónico, aislado del contacto con los lípidos de la membrana (Miyazawa *et al.* 2003;Unwin 2005). Los segmentos TM M1 y M3 forman el anillo medio, separado por su cara interna del anillo conformado por los segmentos TM M2, y en su cara externa se encuentra expuesto a los lípidos de la membrana y al anillo exterior (Figura 3c). Este último se encuentra constituido por los cinco segmentos TM M4, los cuales están totalmente excluidos del contacto con la región del poro del canal iónico y establecen una interacción más directa con los lípidos de la membrana que cualquiera de las otras regiones del receptor. Por lo tanto los anillos medio y exterior son los que están expuestos a los lípidos circundantes y podrían ser modulados por el microambiente lipídico que rodea al receptor (Barrantes 2003;Barrantes 2004). El segmento TM M4 mediante sus interacciones con el resto de los segmentos TM (1-3) por un lado, y con las moléculas lipídicas por el otro, actuaría como nexo entre la dinámica estructural del canal y el ambiente lipídico (Xu *et al.* 2005). Esta hipótesis encuentra apoyo en el hecho de que ciertas mutaciones en los residuos de los segmentos α M4, β M4 y γ M4 afectan la funcionalidad del AChR (Tamamizu *et al.* 2000;Lee *et al.* 1994;Bouzat *et al.* 1998) y en que el ambiente lipídico en el que se encuentra embebido el AChR modula la estabilidad de sus estados funcionales (daCosta *et al.* 2002).

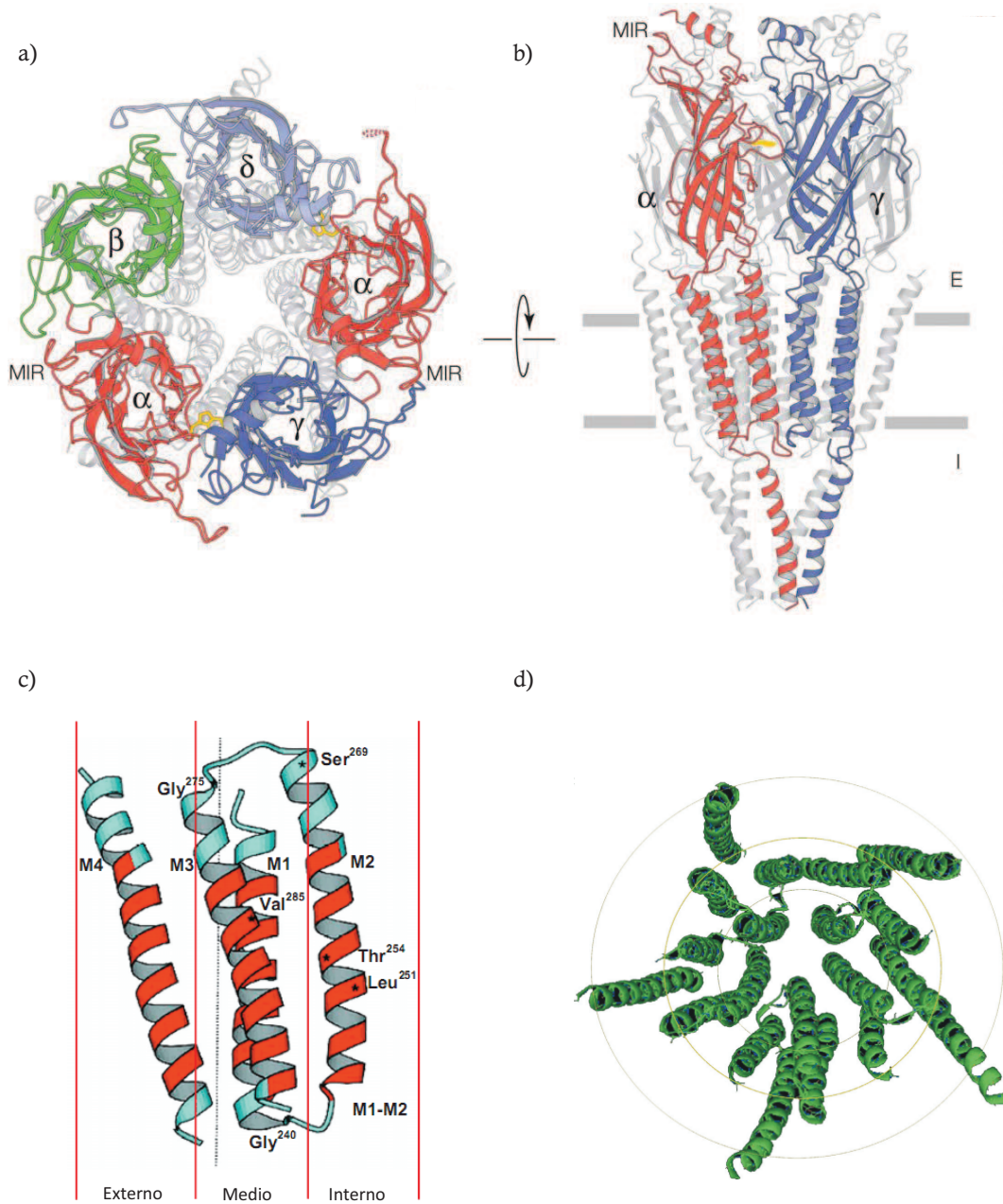


Figura 3. Diagramas de cintas del AChR entero desde a) una vista superior de la hendidura sináptica. Se observa la distribución de las 5 subunidades que lo conforman ($\alpha\gamma\alpha\delta\beta$) y los sitios de unión al ligando en amarillo b) una vista en paralelo a la membrana plasmática. Se pueden observar los segmentos N-terminal extracelular (E), los segmentos que atraviesan la membrana, y la cola C-terminal intracelular (I). En c) se observa una vista lateral de los segmentos TM correspondientes a la subunidad α , con su estructura helicoidal (Miyazawa *et al.* 2003). Se destacan las tres capas concéntricas (externa, media e interna, de izquierda a derecha en el gráfico) alrededor del poro del canal iónico para ésta subunidad. En d) se observa una vista desde el extremo de todos los segmentos TM de las subunidades del AChR, destacándose los tres anillos concéntricos antes mencionados. a) y b) tomados de (Unwin 2005) y b) y c) tomados y adaptados de (Barrantes 2003).

El AChR y los lípidos de la membrana plasmática

La gran extensión de la interfase lípido-proteína del AChR, que involucra tanto a los segmentos TM del AChR como a los lípidos que rodean al receptor en su ambiente más inmediato, generó que se establezca una tercera área de estudio de las propiedades del receptor, que se agrega a las áreas históricamente más desarrolladas del estudio de la permeabilidad iónica y de la unión a ligandos (Barrantes 2003;Barrantes 2004;Barrantes *et al.* 2010;Marsh and Barrantes 1978). Mediante la utilización de la técnica de resonancia de espín electrónica (ESR, de sus siglas en inglés “*electron spin resonance*”) Marsh y Barrantes (Marsh and Barrantes 1978), en membranas enriquecidas en AChR de *Torpedo marmorata*, definieron en el perímetro inmediato del AChR la presencia de un anillo lipídico, región en la cual estos lípidos tienen una movilidad reducida en comparación con los del resto de la membrana (Figura 4). El anillo ha sido caracterizado en detalle tanto en su selectividad lipídica como en su estequiometría (Barrantes 2004). En función de esta caracterización, los lípidos que rodean inmediatamente al receptor puede clasificarse en tres categorías (Barrantes 2004): a) un grupo con alta especificidad, en el cual encontramos a los ácidos grasos como el ácido esteárico, la cardiolipina y el fosfatidilinositol (Mantipragada *et al.* 2003;Barrantes *et al.* 2000); el androstanol (Marsh *et al.* 1981;Barrantes *et al.* 2000), y el ácido fosfatídico (PA) (Ellena *et al.* 1983); b) un grupo de especificidad intermedia, en el cual encontramos a la esfingomielina (SM) (Bonini *et al.* 2002); la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilglicerol (PG) (Mantipragada *et al.* 2003), y c) un grupo con especificidad moderada a baja, en el que se ubican la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), y los gangliosidos GD1b, GM1, GM2 y GM3 (Mantipragada *et al.* 2003). Estas diferencias en la movilidad y el acceso de los

lípidos que se encuentran en el ánulo con respecto a los del resto de la membrana, señalan la existencia de una heterogeneidad lateral en los estados de fase de los lípidos de la membrana.

Para el AChR, el estado de fase de la membrana en la que se encuentra embebido constituye un aspecto importante a tener en cuenta. Por ejemplo, la capacidad de permitir el pasaje de iones en el AChR reconstituido *in vitro* es sensible al estado físico de la membrana, modificándose de acuerdo al nivel de fluidez de la misma (Bhushan and McNamee 1993; Jones and McNamee 1988). Los estudios *in vitro* además permitieron establecer que para preservar la permeabilidad iónica en el AChR reconstituido es necesaria la inclusión de esteroides y de ciertos fosfolípidos (Epstein and Racker 1978), con diferentes contribuciones relativas de cada uno de ellos (Criado *et al.* 1982; Criado *et al.* 1984; Ochoa *et al.* 1983). Antollini *et al.* (Antollini *et al.* 1996) mediante el cálculo de la polarización generalizada (PG) de la sonda fluorescente Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilamino naftaleno) describieron el estado físico de los lípidos de la membrana de *Torpedo* enriquecida en AChR, encontrando que los lípidos del microambiente más inmediato del receptor son más rígidos y presentan un menor grado de penetración de las moléculas de agua en comparación con los lípidos del resto de la membrana. Sin embargo, desde el punto de vista fisicoquímico, todos los lípidos de esta membrana formarían una sola fase líquido ordenada (l_o). Este tipo de fase tiene propiedades que lo ubican a mitad de camino entre las fases lipídicas en gel, donde los lípidos se encuentran altamente condensados, y las fases fluidas, que tienen una condensación de lípidos mucho menor. En la fase l_o las cadenas acílicas de los lípidos se encuentran altamente empaquetadas y extendidas, aunque las moléculas lipídicas individuales mantienen el alto grado de difusión lateral en la membrana y

la alta movilidad rotacional características de una fase líquida (Brown 2006; Veatch and Keller 2005b; Quinn and Wolf 2009).

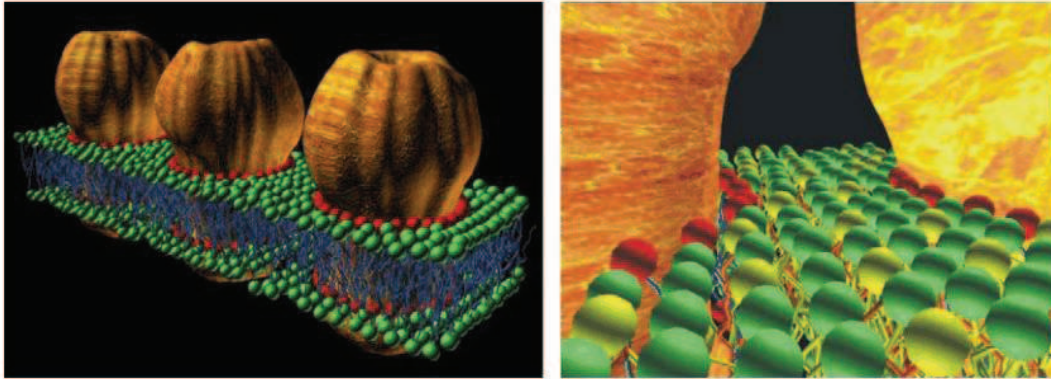


Figura 4. Esquema de una membrana rica en AChR de *Torpedo*, donde se puede observar la distribución de los lípidos que rodean al receptor. Las esferas rojas adyacentes al AChR representan las cabezas polares de los fosfolípidos que corresponden al anillo lipídico; las esferas verdes representan las cabezas polares de los fosfolípidos correspondientes al resto de la membrana. En la figura de la derecha se puede observar que solo 3 o cuatro filas de fosfolípidos separa un anillo lipídico del correspondiente del AChR vecino. Tomada de (Barrantes 2004).

Este modelo de la membrana postsináptica en la que se encuentra embebido el AChR es distinto al modelo clásico de membrana plasmática que se describió hace casi cuarenta años. El modelo clásico de mosaico fluido de la membrana plasmática de Singer y Nicolson (Singer and Nicolson 1972), planteaba que los componentes moleculares de las membranas tenían libertad de movimiento tanto en forma lateral como rotacional, pudiendo distribuirse en la membrana sin un orden definido. La consideraba como una solución bidimensional de proteínas integrales en una bicapa viscosa de fosfolípidos (Figura 5). Sin embargo, y como vimos para la membrana del AChR, actualmente se ha avanzado hacia una organización de la superficie celular mucho más compleja, donde el movimiento de proteínas y lípidos está lejos de ser irrestricto, ya sea por la presencia en la membrana de complejos supramoleculares que limitan la difusión de las proteínas o

por la presencia de dominios lipídicos con características distintivas al resto de la membrana (Jacobson *et al.* 1995; Vereb *et al.* 2003). Debido a la gran variedad de especies moleculares de lípidos, sus distintas siluetas moleculares y propiedades físicas, su distribución asimétrica en la bicapa, y su interacción con una gran cantidad de proteínas embebidas y asociadas a las membranas, se produce una gran heterogeneidad molecular que genera la formación de distintos dominios en la membrana (Vereb *et al.* 2003) (Figura 6).

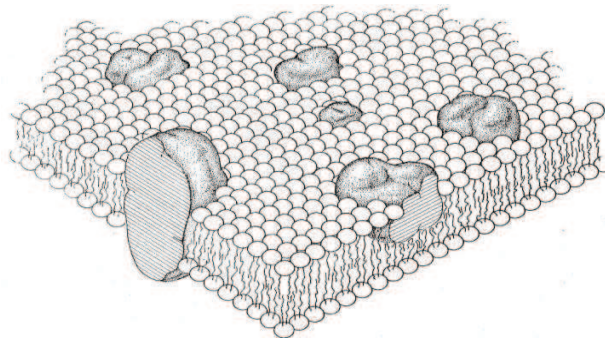


Figura 5. Modelo de membrana de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson. Tomado de (Singer and Nicolson 1972).

Estos dominios de membrana podrían ser macroscópicos y estables o bien pequeños y transitorios (Mayor and Rao 2004). Por dominios de membrana entendemos que son regiones en las membranas celulares caracterizadas por una composición proteica o lipídica específica. Dentro de este contexto, las llamadas balsas (“*rafts*”) lipídicas constituirían una forma particular de dominios (de aquí en adelante nombraremos a estos dominios por su nombre en inglés *rafts*). La hipótesis original planteaba la existencia de microdominios de glicosfingolípidos involucrados en el direccionamiento diferencial de ciertos lípidos y proteínas hacia la membrana apical de las células epiteliales polarizadas (van and Simons 1988; Simons and van 1988). Esta hipótesis luego fue ampliada, y planteaba que

ciertos lípidos, como el colesterol (Col) y la SM, se asociaban entre sí de forma espontánea formando plataformas para la segregación de cierto tipo de proteínas como las proteínas ancladas por glucosilfosfatidil inositol (GPI), dándole el nombre de *rafts* lipídicos a este tipo de microdominio de membrana (Simons and Ikonen 1997) (Figura 6A). Estos dominios altamente enriquecidos en Col y SM muestran un comportamiento biofísico y bioquímico distinto al del resto de la membrana, y contienen un grupo selecto de proteínas integrales o periféricas de membrana (Brown and Rose 1992; Simons and Ikonen 1997; Brown and London 1998; Lingwood and Simons 2010). En membranas celulares enriquecidas en esteroides existen dominios en fase l_0 que comparten la membrana con dominios desordenados (Brown 2006). Los *rafts* constituirían plataformas laterales dinámicas y funcionales de la membrana que conducen a la segregación de proteínas y lípidos específicos con el fin de facilitar el desarrollo de ciertos procesos fisiológicos (Baird *et al.* 1999; Ikonen 2001; Janes *et al.* 2000; Tansey *et al.* 2000; Ma *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2004; Zech *et al.* 2009). Las múltiples interacciones entre proteínas, entre lípidos, y entre proteínas y lípidos que ocurren en las membranas producen este panorama heterogéneo y dinámico de dominios que recién se está comenzando a dilucidar (Figura 6).

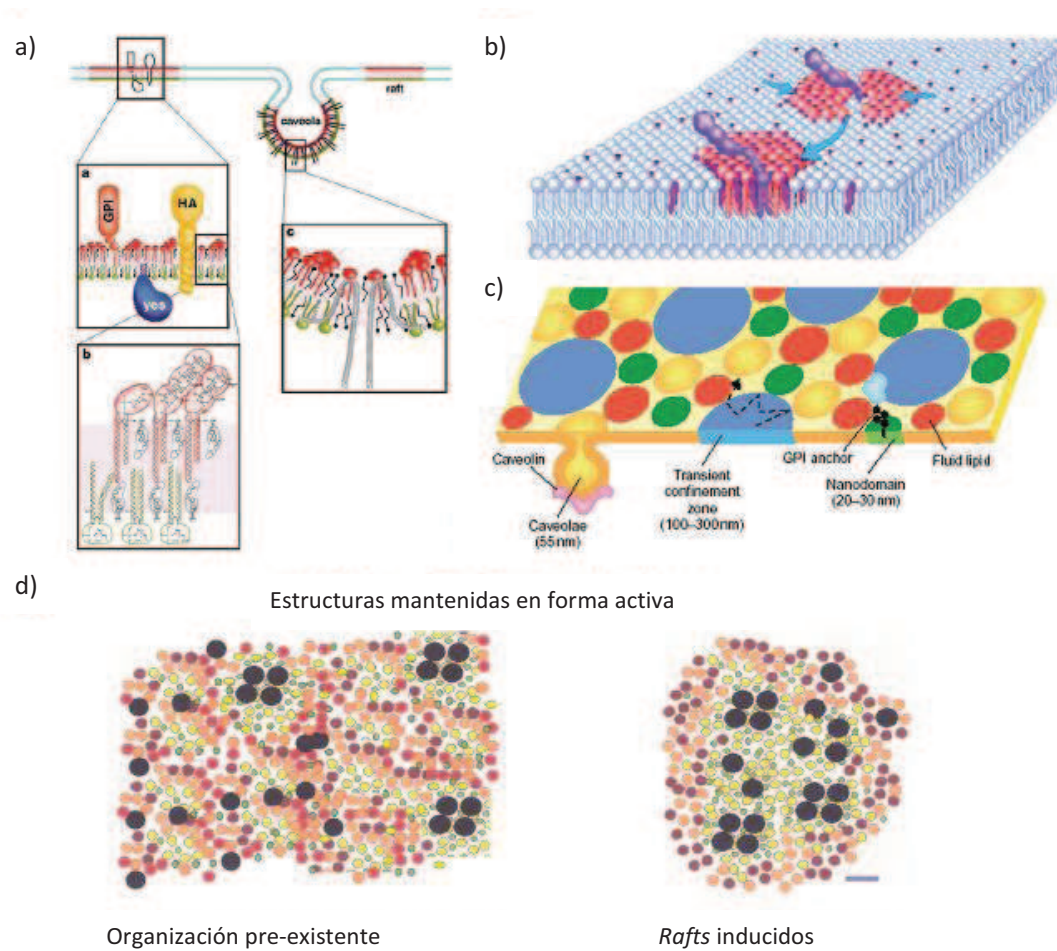


Figura 6. Modelos propuestos de *rafts* lipídicos. A) En el modelo propuesto por Kai Simons y colaboradores (Simons and Ikonen 1997), los *rafts* están enriquecidos en Col y SM, asociados a ciertas proteínas, por ejemplo las ancladas por GPI. B) Modelo de Anderson y Jacobson (Anderson and Jacobson 2002), donde los *rafts* serían armazones de lípidos pequeños y dinámicos, que podrían reclutarse en forma regulada para formar estructuras funcionales. C) En este modelo la membrana tiene un mosaico de dominios tipo *rafts*, y la célula regularía los distintos dominios mediante mecanismos basados en el Col (Maxfield and Tabas 2005) D) Modelo en el que los *rafts* serían dominios de membrana pequeños y dinámicos, que pueden inducidos activamente a formar *rafts* más estables y de mayor tamaño (Sharma *et al.* 2004). Tomado y adaptado de (Mayor and Rao 2004).

Los lípidos principales que componen los *rafts* lipídicos, el Col y la SM, son componentes importantes de las membranas postsinápticas en la que está embebido el AChR. La SM representa un 5% del total del contenido lipídico de las

membranas enriquecidas en AChR obtenidas a partir de electrocitos de la familia *Torpedo* (Gonzalez-Ros *et al.* 1982; Bonini, I *et al.* 1987; Fantini and Barrantes 2009). Se ha descrito la distribución de la SM en estas membranas tanto por citoquímica como por métodos biofísicos (Bonini *et al.* 2002). Estos autores demostraron que la SM tiene una afinidad moderada a baja por el AChR, por lo que se ubica en el grupo intermedio de afinidades por el receptor. Además la SM cumpliría un rol importante en el tráfico del receptor hacia la membrana plasmática (Roccamo *et al.* 1999), siendo necesaria para el correcto ensamblaje de las subunidades del AChR completo, ensamblaje que se requiere para el tráfico exocítico correcto de la proteína (Baier and Barrantes 2007).

Por otro lado el Col constituye un componente abundante de la membrana postsináptica (Barrantes 1989). Se han descrito dos grupos de Col en la membrana enriquecida en AChR de la electroplaca de *Torpedo*, uno asociado fuertemente al AChR y el otro correspondiente al resto de la membrana, más sensible a una extracción (Leibel *et al.* 1987). El Col cumple un rol importante en la modulación de la función de varios canales iónicos, entre los que se encuentra el AChR (Burger *et al.* 2000; Barrantes 2007; Barrantes 2004; Barrantes 2003; Barrantes 1989). Esta modulación la ejerce, por ejemplo, regulando la entrada de iones mediada por el AChR (Criado *et al.* 1982; Criado *et al.* 1984; McNamee *et al.* 1982; Dalziel *et al.* 1980). Los esteroides son necesarios para preservar los estados de transición del AChR inducidos por agonistas (Criado *et al.* 1982; Criado *et al.* 1984; Criado *et al.* 1982). La reconstitución de AChR purificado en membranas modelo de composición lipídica definida, constituye un método muy utilizado para evaluar los componentes moleculares mínimos necesarios para que el receptor cumpla sus funciones básicas. Esta metodología permitió establecer que el receptor en

membranas conformadas por sólo PC se encuentra en un estado análogo al desensibilizado, y la inclusión de Col (o de PA) en este sistema lo lleva a una conformación análoga al estado de reposo del receptor, estado en el que es capaz de generar una transición en su conformación en respuesta a un agonista (daCosta *et al.* 2002). Luego se halló que el incremento del contenido de Col producía un aumento en el grado de estabilización del AChR en el estado de reposo, y este efecto se satura cuando el Col llega al 35% molar del contenido de lípidos (Hamouda *et al.* 2006b). Además el Col es necesario en vesículas reconstituidas de fosfolípidos para incrementar la estabilidad térmica de la proteína (Fernandez-Ballester *et al.* 1994). Por otro lado, los agonistas del AChR no pueden estimular el flujo de cationes cuando se reconstituye al receptor en bicapas lipídicas sin Col (Rankin *et al.* 1997). Este lípido interaccionaría en forma directa con el AChR según los resultados hallados por varias metodologías distintas (Ellena *et al.* 1983; Arias *et al.* 1990; Fong and McNamee 1987). El dominio de unión del Col se encuentra en la interfase lípido-proteica del AChR (Corbin *et al.* 1998). Hamouda *et al.* demostraron que el [3H]azicolesterol, molécula análoga al Col, interacciona con los segmentos TM M1, M3 y M4, siendo este último el segmento con mayor nivel de interacción (Hamouda *et al.* 2006a). Recientemente se ha propuesto en base a resultados de simulaciones (modelado molecular computacional) que también existirían en la estructura interna del AChR sitios capaces de contener Col, y la ausencia del esteroles provocaría el colapso de la estructura del receptor (Brannigan *et al.* 2008).

Otro lípido característico de los *rafts*, que también se encuentra en las membranas postsinápticas ricas en AChR, es el gangliósido GM1. Este glicolípidos se utiliza profusamente como marcador de este tipo de dominio de membrana.

Cuando se analizó la composición y distribución de los gangliósidos de las membranas ricas en AChR de las rayas eléctricas *Torpedo marmorata* y *Dyscopterygichthys*, se encontró que comparten con el AChR la localización en la cara ventral innervada del electrocito, resultando GM1 el gangliósido más abundante (Marcheselli *et al.* 1993). Por otro lado, mediante ESR se encontró que ciertos gangliósidos marcados con el radical nitróxido no exhiben una alta afinidad por el AChR en la membrana nativa de *T. marmorata*, aunque esto no excluye la posibilidad de que se ubiquen en la primera capa de lípidos que rodean al receptor (Mantipragada *et al.* 2003).

El AChR y los rafts lipídicos

Los *rafts* lipídicos podrían cumplir un rol importante en la organización y la compartimentalización de los componentes que intervienen en la transmisión de señales, como por ejemplo la proveniente de los neurotransmisores (Allen *et al.* 2007). Existe numerosa evidencia que prueba una asociación del AChR con los *rafts* lipídicos en células. En este caso, las interacciones lípido-AChR que gobiernan esta asociación, a diferencia de lo que ocurre a nivel del anillo lipídico donde predominan interacciones lípido-proteicas a nivel molecular, ocurren a una escala mayor involucrando a muchos componentes celulares, tanto de la membrana plasmática como del interior celular. Los primeros estudios que avalan esta asociación demostraron que el AChR se encontraba en membranas resistentes a detergentes (DRM) luego del tratamiento de las células con el detergente no iónico Triton X-100 al 1% en frío y posterior centrifugación diferencial. Utilizando este criterio se encontró que el AChR neuronal α_7 de las espinas somáticas de neuronas

ciliares (Bruses *et al.* 2001) y el AChR de tipo muscular expresado en forma heteróloga en células COS-7 se encontraban concentrados en las fracciones DRM (Marchand *et al.* 2002). Estas fracciones serían el homólogo bioquímico de los *rafts* preexistentes en la membrana plasmática (Brown and Rose 1992; Simons and Ikonen 1997). Sin embargo, esta probable homología es controversial, ya que varios estudios sugieren que el tratamiento con detergente introduciría modificaciones propias de la técnica a la estructura original de la membrana celular (Babiychuk and Draeger 2006; Chamberlain 2004; Lichtenberg *et al.* 2005). Es por eso que los estudios siguientes que involucraban al AChR además de incorporar el análisis bioquímico de solubilidad en detergente, incluyeron otras técnicas bioquímicas, biofísicas y de microscopía de fluorescencia complementarias para caracterizar la posible asociación del AChR con los *rafts* lipídicos en diferentes tipos celulares. Además incorporaron al análisis otras proteínas relacionadas al AChR, que intervienen en el proceso de agrupamiento del receptor en la membrana.

Como se describió previamente, una característica sobresaliente de la UNM es la alta densidad de agrupamientos de AChRs en la membrana postsináptica. La agrina, un proteoglicano extracelular sintetizado por las neuronas motoras, inicia la cascada de eventos que dispara los procesos de diferenciación y organización postsinápticos que conducen al agrupamiento del AChR en los miotubos (McMahan 1990; Reist *et al.* 1992; Gautam *et al.* 1996). Aunque las células musculares también expresan agrina, la agrina neuronal es 1000 veces más activa que la agrina muscular en la inducción del agrupamiento de AChR en experimentos *in vitro* (Lin *et al.* 2001). La agrina neuronal activa en la superficie de las células musculares al receptor de tirosina quinasa específico de músculo (MuSK), lo que dispara luego una serie de eventos intracelulares que conducen al

agrupamiento del AChR y de otros componentes de la célula postsináptica (Figura 7). La proteína periférica citoplasmática rapsina sería necesaria para el inicio del proceso de señalización activado por MuSK (Apel *et al.* 1997). Esta proteína citoplasmática, con un peso molecular de 43 kDa (en un principio se la solía llamar 43k), colocaliza con el AChR *in vivo* en las UNM adultas en una estequiometría 1:1 con respecto al AChR (LaRochelle and Froehner 1986;Noakes *et al.* 1993). Además hay evidencia que prueba que en células no musculares que expresan sólo rapsina y AChR, se forman pequeños agrupamientos de ambas moléculas en la membrana plasmática (Froehner *et al.* 1990;Phillips *et al.* 1991). La rapsina mediaría en la unión del AChR al citoesqueleto (Sanes and Lichtman 2001), hecho que permitiría un agrupamiento más eficiente del receptor (Borges and Ferns 2001). Para que se produzca este reagrupamiento de proteínas son necesarios varios procesos de fosforilación/desfosforilación del AChR y de otras proteínas (Wiesner and Fuhrer 2006;Camilleri *et al.* 2007;Qian *et al.* 2008). En resumen, el mecanismo de concentración de AChR en la membrana postsináptica involucra una serie de proteínas extracelulares, citoplasmáticas e integrales de membrana.

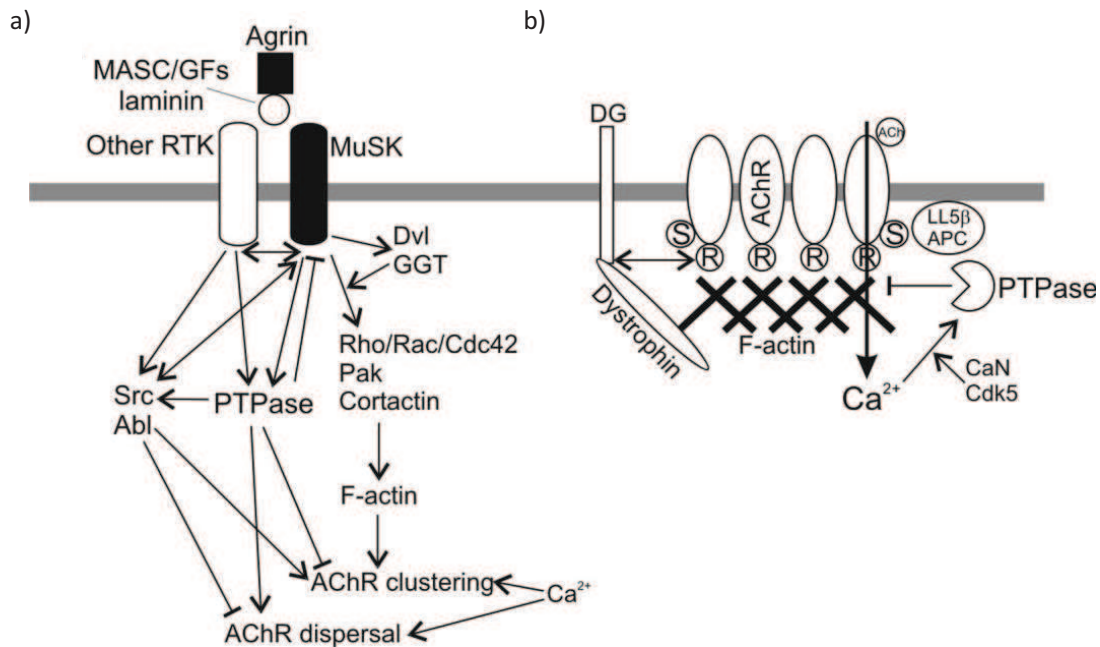


Figura 7. Representación esquemática de la señalización postsináptica y el agrupamiento del AChR en la UNM. a) La agrina activa a MuSK, que se acopla a otras quinasas, para generar una serie de fosforilaciones intracelulares que amplifican la señal de MuSK, y por otro lado estimula proteínas que activan la polimerización de la actina. b) Luego la rapsina activa el agrupamiento de los AChR, y mediante este complejo, se une al citoesqueleto de actina a través de la unión de la rapsina al distroglicano (DG) y al complejo de la distrofina/utrofina. El grado en que los receptores se agrupan podría estar regulado por la actividad misma del AChR, ya que la entrada de Ca^{2+} por su estimulación generaría la activación de una cascada de señales que terminaría en la activación de fosfatasa (PTPase), las cuales promoverían su desunión del citoesqueleto y su dispersión en la membrana. Tomado de (Madhavan and Peng 2005).

Marchand et al. encontraron que el AChR y la rapsina expresados en forma heteróloga en células COS-7 colocalizaban en *rafts* lipídicos en los compartimentos tardíos de la vía exocítica (Marchand *et al.* 2002). Un trabajo más reciente de este grupo demostró que el AChR expresado en forma endógena en las células musculares de ratón C2C12, se encontraba asociado en forma constitutiva a *rafts* lipídicos junto a otros componentes postsinápticos que forman parte de la

maquinaria de agrupamiento del AChR en la membrana plasmática como la sintropina y la rapsina, y esta asociación en todos los casos era independiente de la señalización por agrina (Stetzkowski-Marden *et al.* 2006b). Sin embargo, sí era necesaria la activación de MuSK por la agrina para poder inducir la coalescencia de los *rafts* lipídicos para que se produzca el agrupamiento de los AChRs en la membrana. Willmann *et al.* (Willmann *et al.* 2006) también encontraron en células C2C12 que el AChR y la mayoría de las proteínas que participan de la vía de señalización de la agrina se concentraban en *rafts* lipídicos, y que la pre-incubación de las células con agrina produjo un mayor agrupamiento del AChR, pero no alteró la asociación del AChR, la rapsina o MuSK con los *rafts* lipídicos. Cuando trataron a los miotubos con metil- β -ciclodextrina, una droga que reduce selectivamente el Col de la membrana plasmática, se redujo sensiblemente la formación de agrupamientos del AChR en la membrana plasmática. El Col si bien no participa en forma directa en el agrupamiento del AChR o en la fosforilación de MuSK, es necesario para la estabilidad de los agrupamientos tanto en miotubos como en la UNM de ratón (Willmann *et al.* 2006).

Por el contrario, Zhu y colaboradores (Zhu *et al.* 2006), trabajando también con células C2C12, encontraron que la mayoría de los AChRs estaban asociados a dominios *no-rafts*, pero tanto el AChR como MuSK se trasladan a *rafts* luego de la estimulación con agrina neuronal. Estos autores también indicaron que los *rafts* lipídicos son necesarios para acoplar al AChR con la vía de señalización de la agrina/MuSK, conectando al AChR con el citoesqueleto. Por otro lado, también muestran que si se disgregan los *rafts* lipídicos luego del tratamiento de las células con metil- β -ciclodextrina, se inhibe el agrupamiento del AChR inducido por la agrina, mientras que la rapsina se encuentra asociada a los dominios *rafts* en forma

independiente a la estimulación con agrina. En otro estudio que también se realizó sobre células C2C12, Campagna y Fallon (Campagna and Fallon 2006) indicaron que aunque algunos AChRs se encuentran en *rafts* lipídicos en forma constitutiva, la señalización por agrina desplaza los AChRs hacia estos dominios de membrana incrementando de tal modo el número de receptores asociados a *rafts*. En este contexto, Stetzkowski-Marden y colaboradores (Stetzkowski-Marden *et al.* 2006a) le asignan un papel clave al colesterol en la formación, el tamaño y la estructura de los dominios de *rafts* que ya contenían al AChR, los cuales en respuesta a la agrina se fusionarían para permitir un adecuado agrupamiento de AChRs en la membrana (Figura 8). El agregado de colesterol exógeno a UNMs denervadas protege a los agrupamientos de AChR contra su desensamblaje inducido por denervación (Willmann *et al.* 2006). En resumen, aunque presentan algunas diferencias, especialmente en el papel atribuido a la agrina, todos estos trabajos coinciden en el hecho de que los *rafts* lipídicos serían partícipes necesarios para el ensamblaje de la compleja maquinaria de agrupamiento del AChR en la membrana postsináptica de las UNMs.

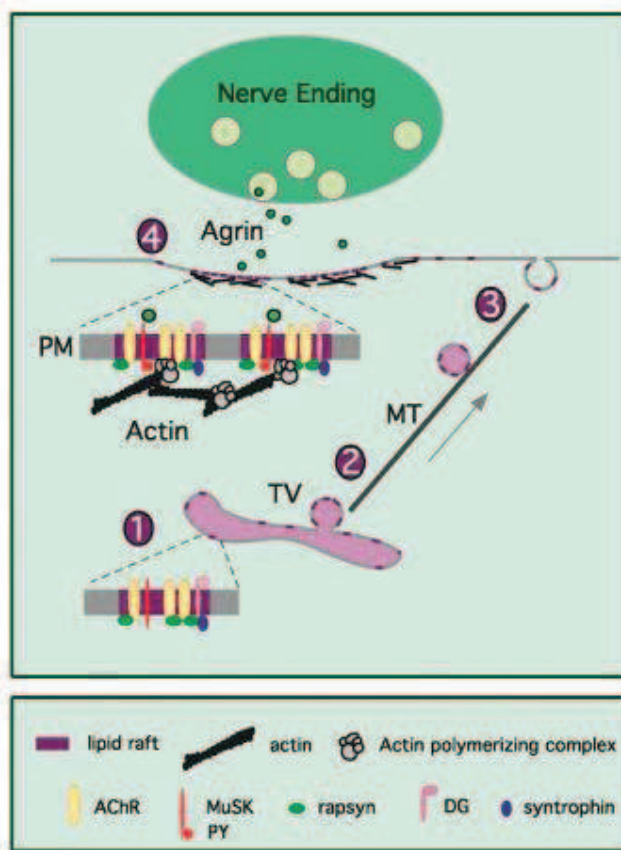


Figura 8. Modelo de Stetzkowski-Marden et al. de la formación del aparato postsináptico por la coalescencia de *rafts* activada por la agrina. 1) Se ensamblan los *rafts* con varios componentes de la membrana postsináptica (AChR, MuSK, Rapsina, sintrofina, etc.) en los compartimentos de transporte exocíticos, 2) se transportan en vesículas, 3) llegan a la membrana plasmática y 4) la activación de MuSK por agrina dispara la coalescencia de los *rafts* mediada por la actina a través de la reorganización del citoesqueleto, proceso en el que también estaría involucrada la rapsina. Tomada de (Stetzkowski-Marden *et al.* 2006a).

A pesar de la evidencia de peso en favor de la existencia de los dominios discutidos en la sección anterior, poco se sabe de las interacciones moleculares específicas que determinarían la asociación del AChR a los dominios lipídicos en la membrana. En membranas modelo con una composición lipídica que se aproxima a la de la membrana plasmática se observó la presencia de dominios tipo-*raft*, y al igual que en los sistemas celulares, estos dominios también se caracterizaron como insolubles en detergentes como el Triton X-100 (Brown 2006). En este caso, dos estudios demostraron que la utilización de la insolubilidad en detergente como ensayo para determinar el estado de fase de la membrana modelo podría ser adecuado y no introduciría cambios sustanciales en la distribución original de los dominios de membrana (Ahmed *et al.* 1997;Dietrich *et al.* 2001). Por el contrario, Heerklotz et al. halló que el tratamiento con Triton X-100 de sistemas modelo

induce una separación de fases en mezclas de lípidos que originalmente formaban fases uniformes (Heerklotz 2002). Sin embargo este efecto negativo sería algo menor, por lo que no se invalidaría el uso del detergente para la clasificación de dominios de membrana en sistemas modelo (Brown 2006).

Al análisis de las membranas por este método bioquímico, se le han agregado una gran cantidad de métodos biofísicos no invasivos, que permiten complementar adecuadamente los estudios de los dominios tipo-*raft* en membranas modelo. Uno de los métodos con mayor potencial es el estudio de la transferencia de energía resonante fluorescente (FRET), método de resolución nanométrica, que detecta la existencia de nanodominios en sistemas modelo donde la microscopía de fluorescencia no lo logra (De Almeida *et al.* 2005; Silvius 2003). La reconstitución de péptidos y proteínas de membrana en estos sistemas, y su posterior estudio por métodos bioquímicos y biofísicos, permite ahondar en las interacciones moleculares que determinarían la formación de dominios *rafts* a nivel celular.

La presente Tesis busca contribuir al entendimiento de las interacciones moleculares específicas que intervienen en el comportamiento del AChR en sistemas modelo con coexistencia de dominios lipídicos tipo-*raft* y no *raft*. En la mayoría de los experimentos de esta Tesis se utilizó AChR purificado a partir del órgano eléctrico del elasmobranquio *Torpedo californica*, ya que una parte muy importante de la información disponible sobre las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de la proteína del AChR se ha obtenido a partir de las especies *Torpedinidae* (Barrantes 2004; Barrantes 2003). La presente tesis tiene como objetivo investigar si el AChR de *Torpedo* se localiza en forma espontánea en los dominios de lípidos tipo-*raft*. Con este fin, se comparó el comportamiento de un péptido

sintético que corresponde al anillo exterior de los segmentos TM en contacto directo con los lípidos, el segmento TM γ M4 del AChR, con el comportamiento del AChR purificado de *Torpedo*, tras la reconstitución de cada uno en membranas modelo de composición lipídica definida, las cuales contienen distintas proporciones de los lípidos Col, SM y PC. También se analizó el rol de la coalescencia artificial de los dominios tipo-raft sobre la distribución en la membrana del AChR, en membranas modelo de mezclas de lípidos que contienen al gangliósido GM1 mediante la inducción de su agregación. También se estudió la posible influencia de rapsina sobre la organización lateral del AChR. La distribución del AChR y del péptido γ M4 se evaluó mediante experimentos de extracción con Triton X-100 y estudios de fluorescencia complementarios, y además se realizaron análisis de la distribución lipídica.

Materiales y métodos

Materiales

Un péptido sintético copiando al segmento transmembrana γ M4 y las dos regiones extramembrana correspondientes al AChR de *T.californica*, con la secuencia DKACFWIALLLFSIGTLAIFLTGHFNQV (péptido de 28 AAs) fue adquirido a Biosynthesis Inc., Lewisville, Texas, EEUU. La pureza del péptido fue de más del 90% (Antollini *et al.* 2005) y se mantuvo liofilizado a -80°C hasta su uso. Las muestras de *T. californica* se obtuvieron de la costa del Pacífico, California, EEUU, siendo los peces sacrificados por ablación quirúrgica del cerebro, y los órganos eléctricos obtenidos a partir del mismo disecados y almacenados a -70°C hasta su uso posterior. Las sondas fluorescentes Laurdan y Dehidroergosterol (DHE) fueron adquiridas a Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU). El gel Affi-Gel 10, el ditiotreitól, y las SM2 Biobeads se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU). El POPC utilizado es de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL, EEUU). Los lípidos Col, esfingomielina de cerebro bovino (BSM) y el gangliósido GM1, la subunidad B de la toxina colérica (CTxB), los detergentes Tween 20 y Triton X-100, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). El anticuerpo monoclonal mAb 210 contra la región inmunogénica mayor de la subunidad α del AChR y el anticuerpo monoclonal mAb 124 contra la subunidad β del AChR fueron amablemente proporcionados por el Dr. J. Lindstrom (University of Pennsylvania, School of Medicine, EE.UU). El anticuerpo monoclonal mAb 1234 contra la rapsina fue amablemente proporcionado por el Dr. S. Frohener (University of Washington, EEUU).

Métodos

1. Preparación de vesículas lipídicas unilaminares que contienen al péptido γ M4

Distintas alícuotas de los lípidos sintéticos POPC, SM y Col fueron disueltas en cloroformo:metanol (C:M) (2:1 v/v) para obtener las siguientes composiciones de lípidos: POPC:SM:Col (1:1:1 relación molar, sistema *raft*) y POPC:SM:Col (0.35:1:0.87 relación molar, sistema DRM). Luego se adicionó al péptido γ M4, previamente disuelto en C:M 1:1, en cantidad necesaria para llevar la mezcla a una relación molar lípido:péptido de 250:1. Las muestras se llevaron a sequedad completa bajo una corriente continua de nitrógeno por 1h a temperatura ambiente y posteriormente, siguiendo los procedimientos convencionales, se obtuvieron las vesículas unilaminares grandes (LUVs, sigla de su nombre en inglés “*large unillamellar vesicles*”). Con este fin, a la mezcla seca de lípido:péptido se la resuspendió en buffer de diálisis (100 mM NaCl, 0.1 mM de EDTA, 0,02% NaN₃, 10 mM de fosfato, pH 7,4) con 1% de colato en una relación lípido:buffer 1:1 (p/v), se incubó la mezcla a 45°C durante 10 min y posteriormente se agitó en forma continua en vortex durante por lo menos 1 min. Finalmente la muestra se dializó a 4°C frente a un 1 L de buffer de diálisis realizando cinco cambios del mismo, uno cada 12 hs.

2. Obtención de membranas crudas y enriquecidas en AChR a partir de *T.californica*

Se prepararon membranas crudas de AChR a partir del órgano eléctrico de *T. californica* siguiendo el protocolo tradicional (Barrantes 2007; Criado *et al.* 1982) con algunas modificaciones. El tejido del órgano eléctrico almacenado a -70 °C se descongeló en forma gradual (en cámara fría a 4°C) en presencia del buffer de homogenización (BH, buffer de fosfato de sodio 10 mM de pH 7,4 con NaCl 0,4 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 3 mM, azida de sodio 0,02 % (p/v)). El tejido ya descongelado y mantenido a 4°C en todos los pasos siguientes, fue diseccionado en trozos pequeños en primera instancia, y luego homogeneizado totalmente con un homogeneizador Virtis 60 (The Virtis Company, Inc., Gardiner, NY, EEUU) mediante la aplicación de tres tandas a una velocidad de 30000 rpm de 30 segundos con la obtención de una suspensión homogénea. Durante todo este proceso se tomó el recaudo de mantener la refrigeración adecuada con el fin de evitar que la alta velocidad de homogenización utilizada genere temperaturas elevadas que modifiquen a la muestra. Posteriormente el homogenado fue sometido a una primera centrifugación a 2500g durante 10 min a 4°C (utilizando un rotor Beckman JA17, Centrifuga J2-21 Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU). El pellet obtenido en dicha centrifugación fue descartado al contener restos de tejido conectivo, agrupaciones de células y otras partículas de gran tamaño. El sobrenadante obtenido luego de ser filtrado con una malla de nylon, se sometió a una segunda centrifugación a 30.000g durante 3 horas a 4°C (rotor Beckman JA17, Centrifuga Beckman J2-21). El pellet obtenido en esta centrifugación se resuspendió en buffer de homogenización con sacarosa al 25-30% (p/v) y utilizando un homogeneizador de vidrio se obtuvo una

suspensión homogénea de la muestra. Este preparado corresponde a la totalidad de las membranas plasmáticas de los órganos eléctricos, comúnmente denominadas membranas crudas (Antollini and Barrantes 2007).

Con el fin de obtener las membranas ricas en AChR, la preparación de membranas crudas fue sometida a una nueva centrifugación en un gradiente de sacarosa discontinuo (50%, 39% y 35% de sacarosa (p/v) en buffer fosfato 10 mM de pH 7,4, con NaCl 0,4 mM y EDTA 5 mM), sembrándose las membranas disueltas en buffer, con 20-25% de sacarosa, en la parte superior del gradiente. Se centrifugó a 80.000g (rotor Beckman SW-28, ultracentrífuga Beckman L5-50) durante 3 hs a 4°C (Antollini and Barrantes 2007). Luego de la centrifugación se observaron tres bandas en la interfase de cada solución de sacarosa del gradiente que corresponden a las fracciones superior, media e inferior de membranas, las cuales han sido caracterizadas ampliamente en trabajos previos (Elliott *et al.* 1980). La fracción superior contiene membranas con una proporción de AChR baja, en forma similar a la fracción inferior que casi no posee AChR, mientras que la fracción media corresponde a las membranas enriquecidas en AChR. Estas fracciones contienen la mayor actividad específica obtenida mediante ensayos de unión de α -bungarotoxina marcada con ^{125}I teniendo en cuenta que cada receptor posee dos sitios de unión al ligando, resultando tener un valor del orden de 2,0-2,8 nmoles de sitios de α -bungarotoxina por miligramo de proteína según estudios previos de nuestro laboratorio (Barrantes 1982). Posteriormente, cada una de estas fracciones se diluyó dos veces con buffer fosfato 10 mM de pH 7,4, con NaCl 0,4 mM y EDTA 5 mM, sin sacarosa, con el objeto de eliminarla. Por lo que a las fracciones diluidas se las sometió a una nueva centrifugación a 138000g (rotor Beckman Ti 70.1, ultracentrífuga Beckman L5-50) durante 1 h a 4°C. Se descartó el

sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en un pequeño volumen de buffer fosfato 10 mM, pH 7,4. Finalmente, se tomaron pequeñas alícuotas de las distintas fracciones de membrana (tanto de la membrana cruda como la presente en las fracciones superior, media e inferior obtenidas a partir del gradiente de sacarosa) para poder determinar la concentración proteica de las muestras por medio del método colorimétrico de Lowry y colaboradores (LOWRY *et al.* 1951b).

Para la determinación de la concentración de proteínas, las muestras de las distintas fracciones se disolvieron en hidróxido de sodio (NaOH) en concentración 0,1 N. Como solución proteica control para la realización de la curva estándar se utilizó seroalbúmina bovina (1 mg/ml) en 0,1 N de NaOH. Este método de detección involucra en primera instancia el acomplejamiento con Cu^{2+} de la proteína presente en una solución alcalina. Luego se adiciona el reactivo de fenol de Folin (también conocido como reactivo de Folin-Ciocalteu), y los grupos fenólicos de los residuos tirosina y triptófano presentes en la proteína reducen los aniones de fosfomolibdato y fosfotungstato del reactivo, proceso facilitado por el efecto catalizador del Cu^{2+} previamente acomplejado. Esta reacción vira hacia un color azul intenso y luego de 15 min de incubación de la reacción a temperatura ambiente, se determina su absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro. Con la lectura de absorbancias correspondientes a la curva de calibrado y a las muestras se realizaron los cálculos necesarios para obtener la cantidad de proteína presente. Las membranas correspondientes a la fracción media, enriquecidas en receptor, fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

3. Purificación de la proteína del AChR por cromatografía de afinidad

3.1 Preparación de la columna de afinidad

La preparación de la columna de afinidad se realizó en varios pasos, en una cámara fría a 4°C. En primer lugar y con el fin de drenar el isopropanol que actuaba como solvente de dicho gel, se colocaron 8 ml de Affigel® en una columna de plástico (0,5 cm de diámetro y 5 cm de altura), luego de lo cual con el fin de drenar el isopropanol que actuaba como solvente de dicho gel, y se lavó abundantemente con agua bidestilada (calidad MiliQ®, Milipore Corporation, Billerica, MA, EEUU) hasta notar la ausencia de isopropanol. A continuación se volcó el gel en un vaso de precipitado, se agregó 20 ml de solución de cloruro de cistamina (20 mg/ml), se expuso la mezcla a una atmosfera de nitrógeno gaseoso cubriéndose el vaso con Parafilm® M, y luego se agitó suavemente durante una hora. Como resultado de este proceso la cistamina se une en forma covalente a las aminas primarias presentes en el gel. Luego el sobrenadante acuoso se removió y el gel fue lavado nuevamente con abundante agua bidestilada (calidad Mili Q®). Posteriormente se agregaron 20 ml de solución de ditioneitol (DTT, en concentración 0,0288 g/ml en buffer fosfato de sodio 0,1 M a pH 8), con posterior burbujeo con nitrógeno gaseoso, y agitación suave y constante en frío. Con el agregado de DTT se reducen las uniones disulfuro de la cistamina, liberando los grupos sulfidrilos (-SH). El gel en estas condiciones fue colocado en la columna nuevamente, dejando drenar el eluato para evaluarlo con el ensayo con DTNB (5,5'-Ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico)), también conocido como prueba de Ellman (ELLMAN 1959), para la búsqueda de grupos sulfidrilos libres. Luego del agregado del DTT, el ensayo con DTNB en el eluato debe dar positivo (la solución de DTNB

vira a un color amarillo intenso luego del agregado de 50 μ l del eluato). Luego se procedió al lavado de la columna con agua bidestilada de calidad MiliQ[®] hasta poder eliminar el exceso de DTT, y para asegurarnos de esto realizamos en el eluato del lavado la prueba de DTNB hasta que esta arrojó un resultado negativo (demostrando la ausencia de grupos sulfhidrilos libres y la no presencia de DTT). Se lavó nuevamente la columna con buffer fosfato 0,1 M pH 7,4, y se tomó una muestra del gel para realizar el ensayo de DTNB, la cual dio positiva, indicando la presencia de grupos sulfhidrilos libres en la superficie del mismo. De esta manera, la columna se encuentra preparada para el agregado de bromuro de bromoacetilcolina, la cual se une en forma covalente a los grupos sulfhidrilos (-SH) libres del gel. Para esto, se agregó 0,2 mg de la misma a la columna, y se agitó suavemente durante una hora para distribuirla en forma homogénea en toda la columna y permitir su unión a los grupos -SH. Luego se lavó nuevamente la columna con un exceso de agua bidestilada de calidad Mili Q[®], removiendo toda la bromoacetilcolina no unida a los grupos -SH del gel. Se tomó una nueva muestra del mismo para la prueba de DTNB, y en este caso la reacción debe dar negativa, ya que estaría indicando que todos los grupos sulfhidrilos libres han reaccionado con la bromoacetilcolina. La columna, previo a su almacenamiento, se lavó primero con agua bidestilada de calidad Mili Q[®] y luego con buffer de almacenamiento (preparado a partir de una mezcla de 5,74 ml de ácido acético concentrado, 5 ml de NaN₃ al 4% y 0,5 g de iodoacetamina, llevados a un volumen de 1L con agua bidestilada de calidad Mili Q[®]), cuyo pH ácido contribuye a evitar la hidrólisis de la unión covalente de la bromoacetilcolina y el Affigel[®]. La columna se almacenó en cámara fría hasta su uso, período que no debe prolongarse más de cuatro semanas.

3.2 Purificación del AChR

Para la purificación del AChR, se disolvieron membranas crudas obtenidas a partir de órganos eléctricos de *T. californica* como se describió en el punto 2 de esta sección, por 45 min a 4°C en un buffer de fosfato 10 mM, pH 7,4 y colato de sodio al 1 %, llevándolas a una concentración de 2 mg/ml de proteína. Posteriormente la muestra solubilizada se centrifugó durante una hora a 74000g (rotor Beckman 70.1 Ti, ultracentrífuga Beckman L5-50), y el material insoluble resultante se descartó. El sobrenadante se cargó en la columna de afinidad previamente preparada como se describió en el punto anterior. Se hizo pasar todo el sobrenadante dos veces a través de la columna, a una velocidad de flujo promedio de 1 ml/min, controlando ésta mediante el uso de una bomba de flujo variable (Mini Variable Flow Pump, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EEUU). De esta manera, el AChR presente en el sobrenadante se une a la bromoacetilcolina fijada covalentemente a la columna, mientras que las otras proteínas presentes en el mismo pasan de largo y son eliminadas por el eluato. La purificación del AChR por cromatografía de afinidad se hizo en presencia de lípidos sintéticos en forma similar a lo descrito por da Costa et al. (daCosta *et al.* 2004; daCosta *et al.* 2002) para obtener distintos sistemas lipídicos conteniendo al AChR purificado. La sustitución total de los lípidos endógenos que acompañan al AChR que se unió a la bromoacetilcolina requirió del lavado de la columna con un gradiente de lípidos sintéticos específicos (Col, SM y POPC) disueltos en buffer de diálisis con colato al 1%, en una proporción molar de cada lípido definida de acuerdo al sistema AChR:lípido a preparar. Para lograr esto, la columna se lavó en primera instancia con una solución de lípidos en concentración 1,3 mM, seguido por un gradiente de concentración escalonado creciente hasta una solución de lípidos en una concentración de 3,2 mM y,

finalmente, seguido por un gradiente escalonado decreciente hasta una solución de lípidos de concentración de 0,13 mM (daCosta *et al.* 2002). Como resultado de este proceso se reemplazaron todos los lípidos endógenos remanentes por los lípidos exógenos ofrecidos. A continuación, el AChR fue eluido de la columna con un buffer de elución conteniendo los lípidos específicos en concentración igual a la final del gradiente (0,13 mM), 250 mM de NaCl, 0.1 mM de EDTA, 0,02% de NaN, fosfato 5 mM, a un pH de 7,8 con colato al 1% y 10 mM de carbamilcolina. Esta última molécula, al ser un agonista del AChR y estar en concentración saturante, desplaza al AChR de su unión a la bromoacetilcolina y permite su liberación. La evolución de la elución del AChR de la columna fue seguida mediante la medición de la absorbancia a 280 nm, correspondiente a la absorción de los aminoácidos triptofanos del AChR de las fracciones que se iban recolectando (Figura 9). Las alícuotas eluidas (0,5 ml) que tenían una absorbancia superior a 0,05 fueron seleccionadas y juntadas (Figura 9). Este eluato conteniendo al AChR purificado junto con los lípidos agregados fue dializado frente a un 1 L de buffer de diálisis, con cinco cambios de buffer (uno cada 12 hs) a 4°C. Siguiendo este procedimiento se prepararon diferentes sistemas modelos de lípidos que contienen al AChR purificado (POPC:SM:Col 1:1:1 y POPC:SM:Col 0.35:1:0.87, relación molar). Uno de los sistemas preparados incluyó al gangliósido GM1 en una composición POPC:SM:GM1:Col (1:0.98:0,02:1 relación molar), y fue preparado adicionando el gangliósido al sistema proveniente de la purificación inmediatamente antes de la diálisis. Cuando se requirió de una relación molar AChR:lípido menor a la obtenida por el método recién descrito (1:130), se terminó el gradiente escalonado decreciente de lípidos específicos en una concentración lipídica mayor a 0,13 mM de acuerdo a la relación requerida. De esta manera se

obtuvieron distintas relaciones molares AChR:lípido (1:130, 1:250, 1:400 y 1:800). La concentración de proteínas de las muestras purificadas se determinó por el método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951a).

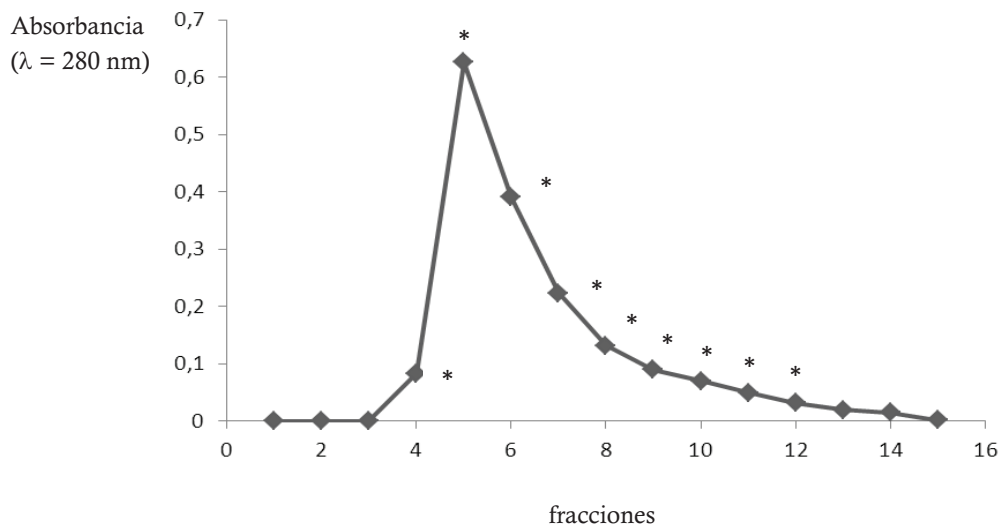


Figura 9. Perfil de elución típico de una purificación de AChR por agregado de carbamilcolina en cantidades saturantes. Las fracciones con un valor de absorbancia mayor a 0,05 fueron seleccionadas (*), para luego ser dializadas.

3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

La composición de la muestra de AChR purificado obtenida fue verificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico para comprobar que efectivamente la única proteína obtenida correspondía al receptor en su forma completa. Con este fin, una alícuota de la muestra (50 µg de proteína) se trató con una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, luego de lo cual se aceleró la precipitación de las proteínas de la muestra mediante una centrifugación a 14000 rpm en una microcentrífuga de mesada (Eppendorf, Eppendorf AG,

Hamburgo, Alemania). El sobrenadante obtenido fue eliminado y el pellet resultante se lavó dos veces con 1 ml acetona, centrifugándose luego de cada lavado a 14000 rpm por 10 min. Se dejó evaporar la acetona remanente del pellet final, y a continuación se resuspendió la proteína presente en buffer de siembra Laemmli 1X (Laemmli 1970) (50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 100mM DTT, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol). En los casos en que la resuspensión adquirió un color amarillento como producto de la acidez presente en la muestra, se agregó a la misma una alícuota de NaHCO₃ hasta revertir el color hacia el azul. A continuación se procedió a disolver y desnaturalizar completamente el contenido de cada muestra calentado la mezcla a 100°C por 5 min. La muestra totalmente disuelta y desnaturalizada en buffer de Laemmli se sembró en un gel de poliacrilamida al 10%, superpuesto por un gel de apilamiento o *stacking* de acrilamida al 5%, y luego se procedió a realizar la corrida, a 40 V constantes iniciales hasta que el frente de corrida pasó el gel de *stacking* , luego de lo cual se aplicaron 15 mA de corriente constante hasta que el frente de corrida llegó al final del gel (Mini protean II, Bio Rad, Richmond, CA, EEUU). El gel primero se tiñó con una solución de azul de Coomassie durante toda la noche a temperatura ambiente, y a continuación se decoloró utilizando una solución de metanol/ácido acético hasta el momento en que se visualizaron y distinguieron las bandas de proteínas. Se fotografió el gel teñido, y comparando las distintas bandas de proteínas obtenidas con las correspondientes a los marcadores de peso molecular, se comprobó que efectivamente obtuvimos el AChR en forma pura, ya que sólo se observaron bandas de proteínas de los pesos moleculares correspondientes a las distintas subunidades del AChR.

4. Obtención de un extracto alcalino de la membrana postsináptica de *T. californica* enriquecido en rapsina

Mediante la incubación a pH 11 de las membranas enriquecidas en AChR de *T. californica* obtenidas como se describió en el punto 2 de esta sección se extrajeron rapsina y otras proteínas periféricas de la membrana postsináptica (Neubig *et al.* 1979). Las membranas enriquecidas en AChR fueron sedimentadas por centrifugación a 85000g durante 1 h (Rotor 70 Ti, ultracentrífuga Beckman L5-50) y se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4, con una concentración final de proteína de 3 mg/ml. El pH de esta suspensión fue ajustado a 11,0 por adición gota a gota de NaOH 1N y la preparación se incubó a 4°C durante 1 h con agitación suave. Luego las membranas alcalinas se centrifugaron a 85000g durante 20 minutos, tras lo cual el sobrenadante fue neutralizado mediante la adición de HCl 1 M. Cualquier material insoluble remanente se eliminó del extracto mediante una nueva centrifugación a 85000g durante 20 min y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso. Una alícuota de la muestra se analizó por SDS-PAGE, en forma similar a la detallada en el punto anterior de esta sección (Figura 10). Las bandas de proteína presentes se cuantificaron luego de la obtención de las imágenes digitales de los geles utilizando el software de imágenes Image J (una aplicación para el análisis y tratamiento de imágenes, de dominio público disponible libremente para su uso, desarrollada y mantenida por Wayne Rasband en el Research Services Branch, National Institute of Mental Health, EEUU). Este análisis permitió determinar que alrededor del 80% de la proteína del extracto alcalino obtenido correspondía a la rapsina, sin detectar contaminación de las subunidades del AChR, en concordancia con los datos experimentales reportados previamente en la literatura (Musil *et al.* 1988).

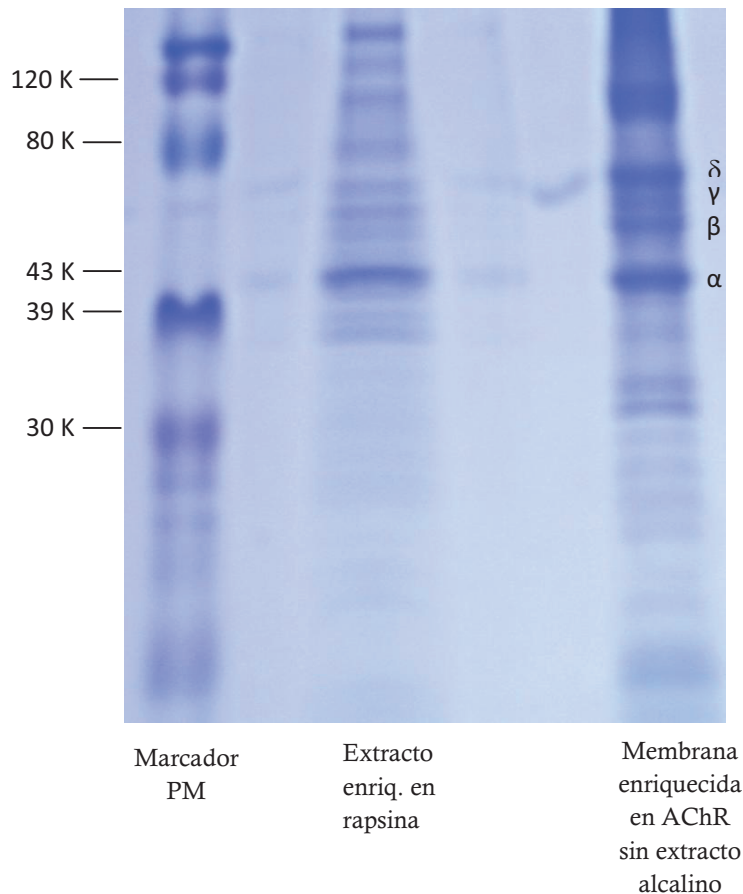


Figura 10. Extracto alcalino de la membrana postsináptica de *T. californica* enriquecido en rapsina. Se observa la banda principal de 43 kDa correspondiente a la rapsina (~80% del contenido proteico). Se observa también el perfil proteico de la membrana enriquecida en AChR sin el extracto alcalino, notándose la ausencia de rapsina. El contenido proteico de cada muestra se precipitó con TCA, se solubilizó con buffer de Laemmli y se sometió a SDS-PAGE en un gel al 10%, seguido de tinción por azul de Coomassie.

5. Preparación de liposomas de rapsina-AChR

Distintas cantidades del extracto enriquecido en rapsina se adicionaron al AChR purificado previamente a la reconstitución en liposomas POPC:SM:Col 1:1:1 con el objeto de obtener liposomas con diferentes relaciones molares de rapsina:AChR (1:1, 2:1, 4:1). Con este fin, la mezcla rapsina:AChR se preparó en buffer de diálisis

con colato al 1% y fue dializada en contra de 1 L de buffer de diálisis, con cinco cambios más del buffer, uno cada 12 hs (4°C). Luego de la diálisis, las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 104000g durante 45 min a 4°C, utilizando un rotor TLA 100.4 en una centrífuga marca Beckman modelo Optima TLX, con el fin de separar la rapsina no incorporada en el liposoma. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

6. Entrecruzamiento de GM1 con CTxB y Anti-CTx

Los liposomas que contienen GM1 (POPC:SM:GM1:Col, 1:0.98:0,02:1, relación molar) fueron tratados con CTxB (dil. 1:1000) durante 30 min a 4°C con agitación suave, en algunos casos seguido de la adición de anti-CTx (dil. 1:500) e incubación durante otros 30 minutos a 4°C también con agitación suave, para inducir en ambos casos el entrecruzamiento del gangliósido GM1 antes del tratamiento con detergente.

7. Obtención de las fracciones DRM y DSM

Distintos sistemas de liposomas de composición lipídica definida solos o con proteína o péptido (50 a 300 µg de AChR purificado o 20 µg de péptido γ M4) fueron tratados con Triton X-100 al 1% (o con el también detergente no-iónico Tween 20 al 2,5%, donde se indica) durante 20 min a 4°C con agitación suave. En el caso de los liposomas puros o de los liposomas que incluían al péptido γ M4, luego de su tratamiento con detergente se separó la muestra en membranas solubles

en detergentes (DSMs) y membranas resistentes a detergentes (DRMs) mediante una centrifugación a alta velocidad de 100400g durante 3h a 4°C, utilizando para tal fin un rotor TLA 100.4 en una centrífuga de marca Beckman modelo Optima TLX (Figura 11). Luego de la centrifugación, se removió y guardó el sobrenadante (fracción soluble en detergente, DSM), y el precipitado (fracción insoluble en detergente, DRM) se resuspendió con un volumen equivalente de buffer (fosfato 10 mM, pH 7,4). El contenido de ambas fracciones se almacenó a -20°C hasta su uso.

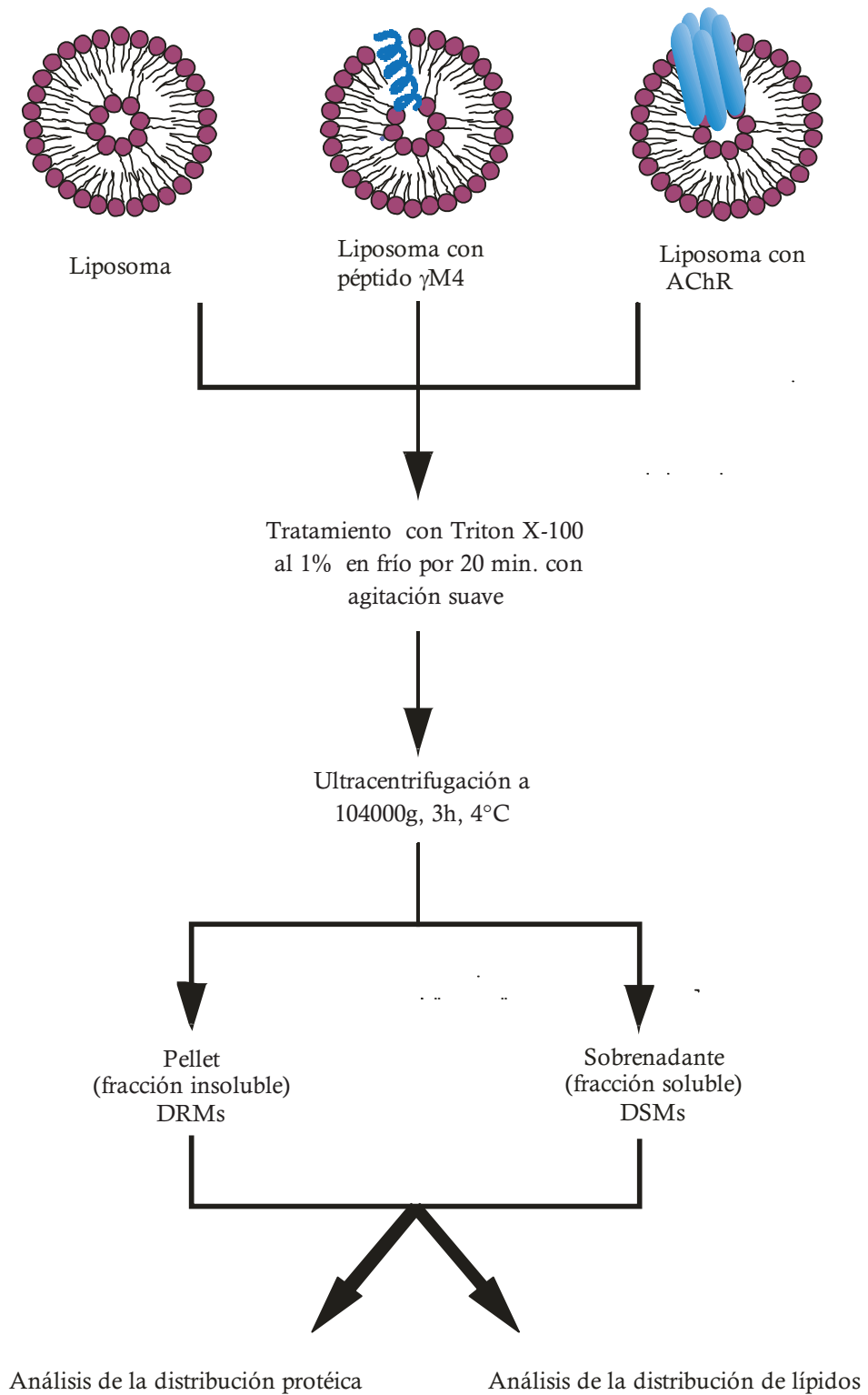


Figura 11. Protocolo de obtención de las fracciones DRM y DSM, luego del tratamiento con Triton X-100 de los distintos sistemas modelo estudiados, mediante centrifugación a alta velocidad.

En el caso de los proteoliposomas (liposomas que contienen al AChR) utilizamos dos métodos diferentes para separar las fracciones DRM y DSM luego del tratamiento de la muestra con detergente: centrifugación de alta velocidad como se indicó en el párrafo anterior por un lado, y centrifugación de alta velocidad en gradientes de densidad de sacarosa por el otro. Este último método es comúnmente utilizado para separar estas fracciones a partir de membranas celulares (Brown and Rose 1992), mientras que con sistemas de proteoliposomas existe poca experiencia con respecto a su utilización. Para este caso tuvimos en cuenta las modificaciones introducidas en el protocolo clásico de gradientes de sacarosa descritas en el trabajo de Ayuyan y colaboradores (Ayuyan and Cohen 2008). Las fracciones DRM y DSM fueron separadas en un gradiente de sacarosa con capas de 4 ml de sacarosa al 40%, 30% y 5% en buffer (p/v, fosfato 10 mM, pH 7,4). La muestra se cargó de dos maneras distintas para obtener este gradiente, ya sea desde abajo o desde arriba del gradiente (Figura 12). Cuando se cargó desde la parte de abajo, se procedió a mezclar un volumen de 2 ml de la muestra ya tratada con detergente con 2 ml de sacarosa al 80% en buffer, de manera de obtener el segmento de 40% de sacarosa del gradiente, y luego se agregaron las capas de 30% y 5% de sacarosa restantes, y entonces el gradiente completo se sometió luego a la centrifugación. Cuando la muestra fue cargada desde la parte superior, se depositaron primero las fracciones de 40% y 30% de sacarosa, y luego se procedió a mezclar un volumen de 2 ml de la muestra ya tratada con detergente con 2 ml de sacarosa al 10%, de manera de obtener la capa superior del gradiente de 5% de sacarosa, luego de lo cual se centrifugó a alta velocidad. Ambos tipos de gradientes se centrifugaron a 260000g durante 20 hs a 4°C, en un rotor SW 41 Ti, en una centrífuga marca Beckman modelo Optima L-90 k, luego de lo cual se extrajeron 12 fracciones de 1

ml cada una desde la parte superior a la inferior del tubo del gradiente. Se identificaron las fracciones DRM de los distintos gradientes de densidad mediante la realización de la técnica de gota en punto (comúnmente conocida por su denominación en inglés *dot blot*) para la caracterización cualitativa del contenido del lípido residente de *rafts* GM1, mediante su identificación por unión a la subunidad β de la toxina colérica marcada (Tong *et al.* 2009). Para esto, alícuotas de cada fracción se sembraron y secaron en una membrana de nitrocelulosa durante un tiempo aproximado de por lo menos 2 horas, luego se bloqueó con 2% (p/v) de leche descremada en buffer Tris salino con 0,05% de Tween 20 (TBST) por 45 minutos, y por último se incubó con 0,5% BSA (albúmina sérica bovina, Sigma-Aldrich) en buffer TBST con una dilución de 1:20,000 de la subunidad B de la toxina colérica acoplada a una peroxidasa de rábano picante (HRP, de su nombre en inglés horseradish peroxidase) por 45 minutos. Se hicieron varios lavados con buffer TBST y un lavado final con buffer TBS (TBST sin Tween 20). Las gotas inmunoreactivas fueron identificadas por un sistema de detección quimioluminiscente mejorado (Amersham ECL Plus, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EEUU) exponiendo la señal a placas para detección quimioluminiscente (Kodak Biomax[®], Eastman Kodak Company). Finalmente, luego de la obtención de la imagen digital de la placa quimioluminiscente, el contenido de GM1 fue cuantificado por densitometría utilizando el software de análisis de imágenes de uso libre Image J. Las fracciones DRM corresponden a aquellas con mayores niveles de GM1.

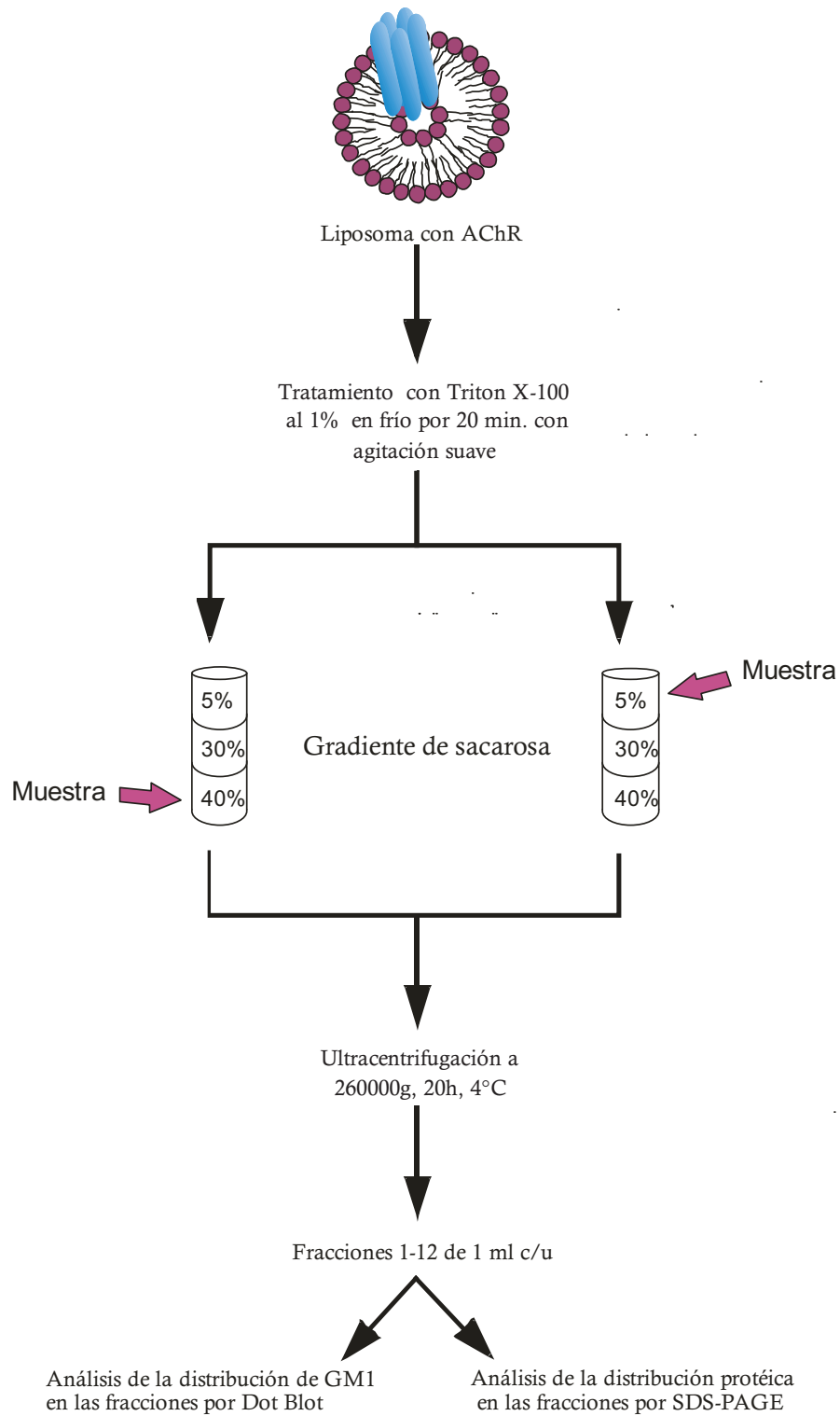


Figura 12. Protocolo de obtención de las fracciones DRM y DSM de los proteoliposomas luego del tratamiento con Triton X-100 mediante la utilización de gradientes de densidad de sacarosa.

8. SDS-PAGE y ensayos de Western blot

La distribución del contenido proteico entre las fracciones DRM y DSM obtenidas a partir de proteoliposomas con AChR fue analizado por SDS-PAGE y posterior ensayos de Western blot. Las proteínas de ambas fracciones fue precipitada por el tratamiento combinado con TCA y acetona como se describió en el punto 3.3 de esta sección. Los precipitado se disolvieron en buffer de Laemmli y el contenido proteico de cada fracción fue caracterizado luego de correr un gel de poliacrilamida al 10% por SDS-PAGE. En el caso del péptido γ M4, el contenido peptídico de las fracciones DRM y DSM se precipitó utilizando una mezcla de metanol-cloroformo-agua (Wessel and Flugge 1984), método que permite recuperar proteínas hidrofóbicas en forma adecuada a partir de muestras con gran cantidad de lípidos y en presencia de detergentes como el Triton X-100. Los precipitados obtenidos se disolvieron en buffer de Laemmli y se corrieron en un Tricina-SDS-PAGE (Schagger 2006). Este tipo de electroforesis permite resolver mejor la separación de proteínas de bajo peso molecular y de péptidos, y está basado en la utilización del sistema de buffer Tris-Tricina, en vez del sistema Tris-Glicina que se utiliza en la SDS-PAGE convencional. Para la visualización de las bandas, ambos tipos de gel fueron revelados con las tinciones de azul de Coomassie o de nitrato de plata (más sensible), dependiendo de la cantidad de proteína o péptido presente en el gel. En otros casos, las proteínas del gel de acrilamida se electrotransfirieron a una membrana de PVDF Inmobilon-P® (Millipore, Billerica, MA, EEUU). Las membranas transferidas se bloquearon con una solución al 5% (p/v) de leche en polvo descremada disuelta en buffer TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl y 0,1% (p/v) de Tween 20) durante 2 hs a temperatura ambiente, seguida de la incubación con el anticuerpo primario de la molécula a detectar [anti-AChR

subunidad α (mAb 210, dil. 1:5000), anti-AChR subunidad β (mAb124, dil. 1:2000), y anti-rapsina (mAb1234, dil. 1:500)] durante toda la noche a 4°C . Posteriormente las membranas fueron lavadas cinco veces con buffer TBST y luego fueron expuestas al anticuerpo secundario correspondiente conjugado a HRP (anti-rata (dil. 1:3000) o anti-ratón (dil. 1:5000)) durante 2 hs a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron nuevamente con buffer TBST cuatro veces, seguido de un lavado adicional con TBS (buffer TBST sin Tween 20) y luego las bandas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia mejorada (Amersham ECL Plus), mediante la exposición de placas para detección quimioluminiscente (Kodak Biomax[®]) a dicha señal. El contenido proteico de las fracciones DRM y DSM, ya sea en el caso de los geles teñidos con azul de Coomassie o nitrato de plata, o bien en las placas obtenidas luego de los Western blots, luego de la obtención de sus imágenes digitales, fue cuantificado por densitometría utilizando el software de análisis de imágenes de uso libre Image J.

9. Caracterización de los lípidos de las fracciones DSM y DRM

9.1 Eliminación del Tritón

El Triton X-100 fue eliminado de las fracciones DSM y DRM mediante su adsorción y eliminación a SM-2 Bio-Beads[®] (Bio Rad). Este adsorbente no polar de poliestireno ha sido utilizado para la remoción exitosa del detergente no iónico Triton X-100 (Holloway 1973). Utilizamos el método de *batch* o lote descrito en el manual del fabricante, en el cual se agrega en forma directa a las muestras con Triton X-100 la cantidad de perlas o *beads* necesarias para remover todo el

detergente, teniendo en cuenta que la capacidad de adsorción de Triton X-100 de las BioBeads® es de 0,07g de Tritón/g de *bead*. Una vez agregadas a la muestra, se incubó por 2 hs a temperatura ambiente con agitación, de manera de que todo el contenido de Triton X-100 entre en contacto con el adsorbente. Luego se separó la muestra de las BioBeads®, y se continuó con su análisis lipídico.

9.2 Extracción de los lípidos

A las fracciones DRM y DSM libres de Triton X-100, se les extrajeron los lípidos siguiendo el procedimiento de Bligh y Dyer (BLIGH and DYER 1959). Con este fin a la muestra se le agregó una mezcla de cloroformo:metanol (C:M 1:2, v/v) hasta llegar a una proporción C:M:agua (1:2:0.8, v/v/v), se dejó transcurrir solo 30 min para la extracción ya que se trata de un sistema lipídico artificial en solución, y se agregaron luego cloroformo y agua ultrapura de calidad Mili Q® de manera de lograr una nueva proporción C:M:agua (2:2:1,8, v/v/v). Posteriormente, los tubos se sometieron a una agitación en vortex para mezclar todo su contenido en forma homogénea y luego se los centrifugó a 900g por 10 min, obteniéndose dos fases, una superior acuosa y una fase inferior orgánica. En la interfase quedó el contenido proteico, que fue descartado junto con la fase superior. La fase orgánica inferior se llevó a sequedad bajo una atmósfera de N₂ y se resuspendió en un volumen adecuado de C:M 2:1.

9.3 Cromatografía en capa fina

Para la separación y caracterización de las distintas clases lipídicas presentes en cada fracción se procedió a la realización de una cromatografía en capa fina (CCF)

en placas de sílica gel G previamente activadas a 50°C. La CCF se realizó utilizando como primer solvente una mezcla de C:M:ácido acético:0,15 M NaCl (20:10:3.2:1, v/v/v/v) con el fin de separar a la SM de la PC, seguido por éter como segundo solvente hasta la parte superior de las placas, para poder separar el Col de los fosfolípidos.

9.4 Caracterización del fósforo fosfolipídico

Las manchas que migraron en la placa a las mismas alturas que las muestras estándares correspondientes a SM y PC se desprendieron de la placa por raspado y los lípidos fueron cuantificados mediante la determinación de fósforo utilizando los productos y las reacciones químicas descritas por Rouser et al. (Rouser *et al.* 1970). Brevemente, en primera instancia se digirió la materia orgánica (en este caso los fosfolípidos) por tratamiento con ácido perclórico por una hora a 170°C, liberándose así el fosfato inorgánico. Éste, al agregar luego molibdato de amonio, reaccionó formando fosfomolibdato de amonio, el cual luego fue reducido por el agregado de ácido ascórbico a una mezcla de óxidos de molibdato de valencia menor a 7 de coloración azul estable. Esta reacción fue acelerada por calentamiento a 100°C durante 5 min en un baño de agua. El color azul desarrollado se determinó con un espectrofotómetro, mediante la medición de las absorbancias correspondientes a cada muestra a una longitud de onda de 800 nm. Paralelamente se realizó una curva de calibrado utilizando como estándar KH_2PO_4 . Las absorbancias resultantes se leyeron contra el blanco de reacción, y se pudo determinar los μg de fósforo inorgánico correspondientes a las distintas muestras, luego de la comparación de las absorbancias de las muestras contra la curva estándar.

9.5 Determinación del contenido de colesterol

Las manchas que corrieron en la placa a la misma altura que el estándar de Col se desprendieron por raspado, y el Col se eluyó de la sílica al mezclarla fuertemente por agitación en vortex con una mezcla de C:M:agua (5:5:1, v/v/v), luego la mezcla se centrifugó y se obtuvo el eluato, repitiéndose este proceso un par de veces más, hasta obtener finalmente una solución con los tres eluatos recolectados. A estos se les agregó cuatro volúmenes de agua y luego se centrifugó a 900g por 10 min. Se obtuvieron dos fases, una fase superior acuosa de coloración amarilla/verdosa por la presencia de fluoresceína, y una fase inferior orgánica que contenía el Col. Este proceso de separación de fases se repitió hasta asegurarnos el total pasaje de la fluoresceína a la parte acuosa, ya que su color interfiere con la posterior cuantificación del contenido de colesterol. Una vez descartada la fase acuosa y eliminada la fluoresceína, se procedió al secado de la fase orgánica bajo una atmósfera de N₂, y posterior resuspensión en 100 µl de isopropanol (agitando vigorosamente en *vortex* por unos minutos) para luego realizar la cuantificación del colesterol mediante el kit enzimático Colestat AA[®] (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con la utilización este kit comercial se realizan en forma secuencial las siguientes reacciones enzimáticas:

- 1) La enzima colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol generando como productos colesterol y ácidos grasos libres.
- 2) La enzima colesterol oxidasa oxida al colesterol a colestén-3-ona, formándose también H₂O₂

- 3) El H₂O₂ formado más la 4-aminofenazona más un aceptor, por acción de una peroxidasa, forma una quinonimina roja, cuyo color se detecta a una longitud de onda de 505 nm en un espectrofotómetro.

Para la cuantificación del Col presente en las muestras, las absorbancias obtenidas, se compararon con una curva estándar de colesterol.

10. Cálculo del coeficiente de partición (K_p) y de la energía libre de transferencia aparente (ΔG_a)

Se calculó el coeficiente de partición molar desde los dominios DSM a los dominios DRM para el péptido γM4 o el AChR a partir de la siguiente ecuación (McIntosh *et al.* 2003) :

$$K_p = \frac{[P]_{\text{DRM}}}{[P]_{\text{DSM}}} \times \frac{[L]_{\text{DSM}} + [P]_{\text{DSM}}}{[P]_{\text{DRM}} + [P]_{\text{DRM}}} \quad (1)$$

donde [P]_{DRM} y [P]_{DSM} son las concentraciones molares del péptido γM4 o del AChR en los dominios DRM y DSM, respectivamente, y [L]_{DRM} y [L]_{DSM} las concentraciones molares de lípido total (Col + SM + POPC) en las fracciones DRM y DSM, respectivamente.

En el caso del cálculo del mismo coeficiente para los lípidos individuales (Col, SM o POPC) se utilizó la siguiente ecuación, tomando en este caso como ejemplo al Col:

$$K_p = \left[\frac{[\text{Col}]_{\text{DRM}}}{[\text{Col}]_{\text{DSM}}} \right] \times \left[\frac{[\text{L}]_{\text{DSM}}}{[\text{L}]_{\text{DRM}}} \right] \quad (2)$$

donde $[\text{Col}]_{\text{DRM}}$ y $[\text{Col}]_{\text{DSM}}$ representan las concentraciones molares del colesterol en los dominios DRM y DSM, respectivamente.

Para el cálculo de la energía libre de transferencia aparente desde los dominios DSM hacia los dominios DRM de cada una de las moléculas para las que se calculó el K_p , se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta G_a = -R.T. \ln (K_p) \quad (3)$$

donde R es la constante molar de los gases y T es la temperatura en grados Kelvin. La energía térmica (R.T) es equivalente a 0,55 kcal/mol a 4°C. Para poder aplicar estas ecuaciones se asumió en forma implícita que el Tritón X-100 al 1% no alteró la distribución de los lípidos o del péptido γM4 o del AChR en los dominios DRM y DSM. Es por eso que nos referimos al cálculo de ΔG_a como energía libre “aparente”.

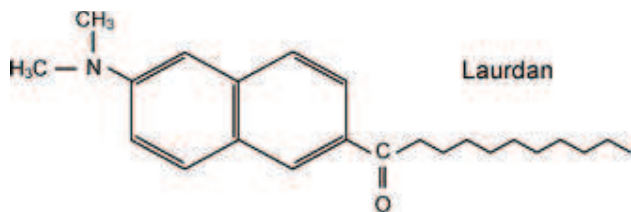
11. Mediciones de fluorescencia

Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro SLM[®] modelo 4800 ISC (SLM Instruments, Urbana, IL, EEUU) utilizando formato T. Este aparato utiliza un haz de luz proveniente de una lámpara Hannovia[®] de 200-W con un arco de mercurio/xenón. El haz es polarizado verticalmente con un polarizador Glan-Thompson[®] (con rendijas de emisión y excitación de 4-nm). Para las lecturas de las muestras, éstas se cargaron

en cubetas de cuarzo de 1 ml. La temperatura de trabajo se fijó con un baño circulante de agua con termostato (Haake[®], Darmstadt, Alemania) que mantiene la temperatura deseada $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Cada una de las lecturas fue realizada luego de incubar la muestra durante un período de 15 min a la temperatura deseada.

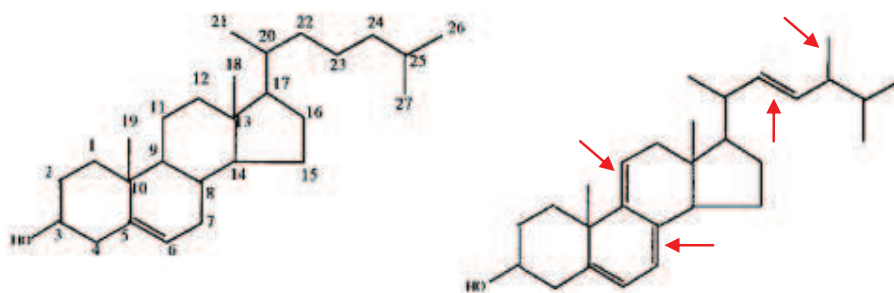
Las soluciones madre de las sondas fluorescentes Laurdan (Fig. 13a) y DHE (Fig. 13b) se prepararon en etanol, y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Cada sonda fluorescente se incorporó a los liposomas (en una proporción menor al 5% molar con respecto a los lípidos totales) en dos formas diferentes: a) antes de la etapa de diálisis, lo cual se hizo en la oscuridad, y b) directamente a los liposomas, seguido de 45 min de incubación para lograr su estabilización, manteniendo la cantidad de disolvente orgánico por debajo del 0,5% a lo largo de todos los experimentos. Se obtuvieron resultados similares con ambas formas de adición de las sondas. Para las mediciones de fluorescencia, los liposomas se suspendieron en buffer HEPES 20 mM, NaCl 150 mM y MgCl_2 0,25 mM (pH 7,4), hasta obtener una solución de 8 μg de AChR, o de 20 μg de péptido γM4 , en un volumen final de 700 μl .

a)



6-Dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno

b)



Colesterol

Dehidroergosterol (DHE)

Figura 13. Estructura molecular de las sondas fluorescentes a) Laurdan y b) DHE. En este último caso se compara su estructura con la del colesterol, pudiendo observarse que difiere del mismo en que tiene 3 dobles enlaces adicionales y un grupo metilo extra (diferencias señaladas con flechas rojas).

12. Mediciones de la transferencia de energía de resonante de Förster (FRET)

El proceso de FRET es un fenómeno que ocurre entre dos moléculas, donde una de ellas, la molécula donante (D), se encuentra en el estado excitado, mientras que la molécula aceptora (A) se encuentra en su estado basal (Lakowicz 2006)

(Figura 14). Para que este proceso ocurra, se requiere que haya una compatibilidad energética entre los dos componentes del FRET. Esta compatibilidad implica que la molécula donante emita a una longitud de onda más corta que se superponga con el espectro de absorción de la molécula aceptora. La transferencia de energía es un proceso en el que no hay ni emisión ni reabsorción de fotones, ya que resulta de interacciones dipolo-dipolo entre la molécula donante y la aceptora (de ahí que se la denomina *resonancia*).

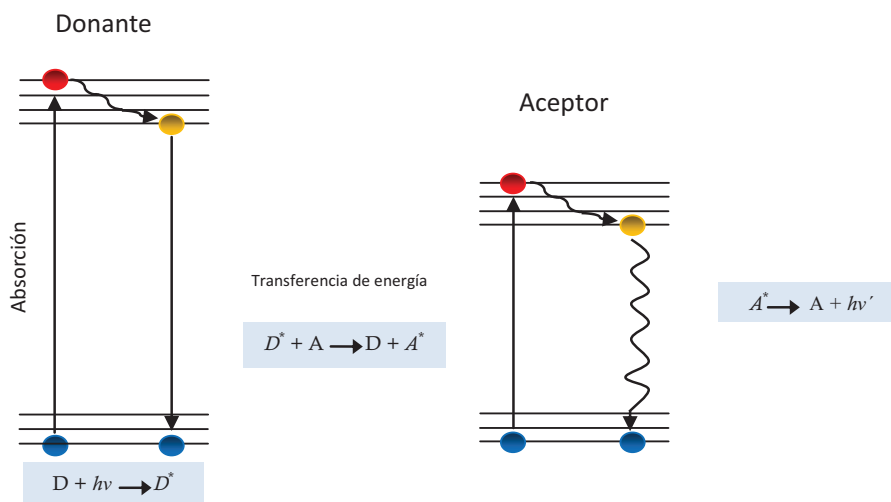


Figura 14. Diagrama de Jablonski que ilustra el proceso de transferencia de energía esperado en un proceso de FRET, para un dado par donante (D)-aceptor (A).

La magnitud de la transferencia de energía depende de varios factores, siendo los más relevantes: 1) el grado de superposición del espectro de emisión del donante con el espectro de absorción del aceptor; 2) el rendimiento cuántico del donante; 3) la orientación relativa de los dipolos de transición tanto del donante como del aceptor; y 4) la distancia existente entre estas dos moléculas. Según la teoría de

Förster (Förster 1948a), la eficiencia de la transferencia de energía (E) depende de la inversa de la distancia entre el donante y el aceptor elevada a la sexta potencia, como se indica en la siguiente ecuación:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (4)$$

donde R_0 es la distancia que existe entre las moléculas donante y aceptora cuando el proceso de FRET alcanza el 50% de eficiencia (también denominada distancia de Förster); r es la distancia de separación entre el par D-A. Esta ecuación muestra que la transferencia de energía depende enormemente de la distancia r (Figura 15), y por lo tanto, la cuantificación de la transferencia de energía que ocurre entre el par de moléculas D-A permite de forma indirecta medir la distancia existente entre ellas. Debido a esta característica del método, se ha calificado al proceso de FRET como una “regla espectroscópica” (WEBER 1960). De la ecuación 4 se desprende que el valor de E se acerca a 1,0 cuanto menor es la distancia r con respecto a R_0 . Por el contrario, el valor decrece a cero cuanto mayor es el valor de r con respecto a R_0 . Por lo tanto el uso de FRET es posible cuando las distancias se encuentran en el rango desde $r = 0,5 \times R_0$ hasta $r = 2 \times R_0$ (Figura 15) (Lakowicz 2006). Esta distancia r depende de las características espectroscópicas del par D-A participante, y generalmente se ubica en el rango de los 20-90 Å, siendo medidas comparables con el tamaño de muchas biomoléculas y con sus distancias intermoleculares. De esta manera, la técnica de FRET es un método válido para el estudio tanto de las

interrelaciones existentes entre distintas moléculas dentro de una membrana como de posibles asociaciones/disociaciones macromoleculares.

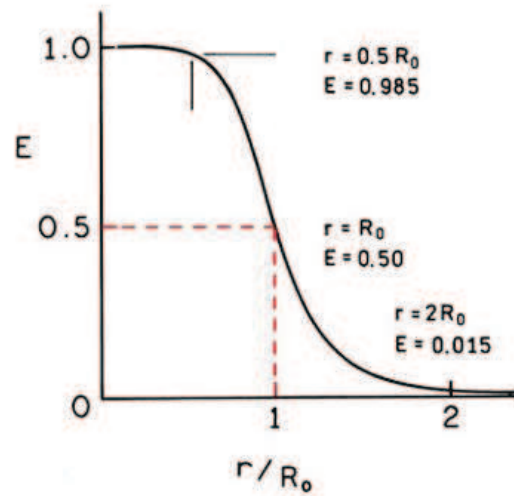


Figura 15. Dependencia de la eficiencia de la transferencia de energía (E) de la distancia (r) entre las moléculas D-A en relación a la distancia de Förster (R₀) del par. Extraída de (Lakowicz 2006), pág. 446.

Según la teoría de Förster (Förster 1948b) la E se puede calcular como sigue:

$$E = 1 - \left[\frac{I_{DA}}{I_D} \right] \quad (5)$$

donde I_{DA} e I_D son las intensidades de emisión de la molécula donante en presencia y en ausencia del aceptor, respectivamente. En nuestro caso, I corresponde a la máxima intensidad de emisión de la fluorescencia intrínseca de la proteína o del péptido (AChR o γ M4), que ocurre a los 330 nm. Esta emisión de fluorescencia está dada principalmente por los triptófanos (Trp) del AChR (51 en total por molécula)

o el único Trp de γ M4. La longitud de onda de excitación se fijó en 290 nm. Cuando E se midió en presencia de diferentes cantidades de moléculas aceptoras, se introdujo una nueva corrección para compensar cualquier modificación de la fluorescencia intrínseca del Trp por cualquier otro mecanismo de extinción, a saber:

$$E_{corr} = E (+ \text{aceptor}) - E (-\text{aceptor}) \quad (6)$$

donde E_{corr} es el valor calculado de E corregido por la extinción de la fluorescencia intrínseca provocada por las moléculas aceptoras; los valores correspondientes a $E (+ \text{aceptor})$ y $E (-\text{aceptor})$ se calcularon utilizando la ecuación 4 en presencia o en ausencia de las moléculas aceptoras (Laurdan o DHE), respectivamente. Los pares de moléculas donantes-aceptoras han sido utilizadas en trabajos previos de nuestro laboratorio (Antollini *et al.* 1996; Antollini and Barrantes 1998; De Almeida *et al.* 2004), reuniendo las condiciones necesarias para que el proceso de FRET ocurra.

13. Cálculo de la polarización generalizada (GP) utilizando la sonda Laurdan

La molécula de Laurdan tiene la capacidad de reaccionar con gran sensibilidad a la polaridad y la dinámica molecular del ambiente lipídico de su entorno inmediato mediante procesos de relajación molecular en función de los dipolos presentes en ese ambiente (Parasassi *et al.* 1990; Parasassi *et al.* 1991). Teniendo en cuenta que los principales dipolos que detecta la sonda son los correspondientes a las moléculas de agua circundantes, la relajación dipolar de las

moléculas de Laurdan depende del grado de penetración del agua en la membrana. Presenta una gran sensibilidad frente a este hecho, que se ve reflejada en cambios importantes en su espectro en función del estado de fase de la región de la membrana en que se encuentre. Cuando las moléculas de Laurdan se encuentran rodeadas de lípidos en fase gel, sufren un proceso de relajación dipolar menor que aquellas localizadas en un ambiente de fase líquido-cristalina. La fase gel provee un ambiente de baja polaridad con un alto nivel de orden, mientras que un ambiente en fase líquido cristalina es mucho más polar y de menor orden. A mayor nivel de orden en los lípidos de la membrana hay menor penetración del agua, y por lo tanto, menor relajación dipolar de la molécula de Laurdan.

El espectro de emisión de fluorescencia de Laurdan tiene dos picos característicos, uno a una longitud de onda de mayor energía (434 nm) correspondiente a moléculas de Laurdan en un entorno lipídico ordenado, típico de una fase gel, y otro de menor energía (490 nm) correspondiente a moléculas de Laurdan en un entorno lipídico desordenado, típico de una fase líquido-cristalina. Teniendo en cuenta este comportamiento diferencial del espectro de emisión de la sonda Laurdan, Gratton y colaboradores (Parasassi *et al.* 1990; Parasassi *et al.* 1991), a partir de las intensidades de emisión características de cada fase, desarrollaron un parámetro al que denominaron Polarización Generalizada de excitación (GP_{ex} , de su nombre en inglés Generalized Polarization) y que se determina con la siguiente fórmula:

$$GP_{ex} = \frac{I_{434} - I_{490}}{I_{434} + I_{490}} \quad (7)$$

Con esta fórmula calculamos el GP de los sistemas de liposomas utilizados. Los valores de excitación de GP se obtuvieron a partir de los espectros de emisión obtenidos con una longitud de onda de excitación directa de la sonda Laurdan de 360 nm.

14. Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de análisis de la varianza unidireccional (*one-way ANOVA*, de su terminología inglesa) con los valores representativos de la media \pm D.E. del número de muestras indicado en las leyendas de cada figura.

Resultados

Tal como se detalló en la Introducción de este trabajo de Tesis, investigaciones recientes aportaron una variada evidencia que relaciona a los *rafts* con el AChR y su agrupamiento en la membrana. Sin embargo, aún hoy no existe una evidencia directa que demuestre que el AChR se encuentra en *rafts* en sistemas celulares, ni cuáles serían los potenciales condicionantes de esta hipotética interacción: ¿la presencia de proteínas participantes en el agrupamiento de los AChR en la UNM (rapsina, MuSK, etc.)? o ¿cierta preferencia del AChR por los lípidos principales de los dominios *rafts*? entre otras posibilidades. Así, estudiamos la interrelación lípido-AChR, no con lípidos individuales, sino con microdominios de membrana completos, recurriendo a sistemas lipídicos modelos conteniendo únicamente al AChR purificado de membranas de *T. californica* o al péptido sintético γ M4, correspondiente a la región transmembrana M4 de la subunidad γ , región del AChR con mayor exposición a los lípidos de su microentorno.

Solubilidad en detergente del péptido γ M4 reconstituido en el sistema lipídico POPC:SM:Col 1:1:1 (“membrana que contiene rafts”)

En nuestro laboratorio se han realizado estudios con un péptido sintético correspondiente al segmento transmembrana γ M4 del AChR para poder conocer más sobre esta región de la proteína, región que tiene un contacto más íntimo con los lípidos de la membrana que el resto de la proteína del receptor (Barrantes *et al.* 2000). En primera instancia, mediante estudios de fluorescencia se pudo determinar que este péptido se encuentra dispuesto en una configuración del tipo α -hélice en la membrana (Williamson *et al.* 2005). Luego a través de estudios complementarios basados en la utilización de resonancia magnética nuclear de estado sólido y de

espectroscopia de dicroísmo circular se pudo demostrar que el péptido γ M4, luego de ser reconstituido en vesículas lipídicas o en bicelas alineadas por magnetismo, adopta una conformación helicoidal lineal con un ángulo de 15° con respecto a la normal de la membrana (Williamson *et al.* 2005). Mediante estudios de fluorescencia y modelado molecular, se pudo demostrar que existen cambios en el ángulo de torsión del péptido γ M4 lípido-dependientes, los cuales podrían ser el resultado de mantener un buen emparejamiento entre la longitud de los segmentos hidrofóbicos del AChR (constante) y el ancho hidrofóbico de la bicapa (dependiente del tipo de lípido presente). Precisamente una de las diferencias fundamentales entre los dominios *rafts* y *no-rafts* está en el ancho de membrana que éstos abarcan (Sprong *et al.* 2001; Gandhavadi *et al.* 2002), y por lo tanto el emparejamiento hidrofóbico entre la longitud del segmento transmembrana de la proteína y el ancho de la membrana podría constituir un factor condicionante en la partición preferencial del péptido γ M4 o del AChR completo hacia uno de estos dominios. En particular hemos investigado la preferencia del péptido γ M4 por los dominios *rafts* o *no-rafts*. Para tal fin reconstituimos al péptido en un sistema lipídico modelo que contiene la mezcla de lípidos más utilizada como contenedora de *rafts*, de composición POPC:SM:Col (1:1:1, relación molar) (Brown and Rose 1992). A esta muestra se la trató con el detergente Tritón X-100, a una temperatura de 4°C por 20 min, luego de lo cual se procedió a su separación por ultracentrifugación en una fracción (pellet) de membranas resistentes a detergente (DRM) y en una fracción (sobrenadante) de membranas solubles en detergente (DSM). Ambas fracciones se sembraron en un gel de tricina (Tricina-SDS-PAGE), específico para separar péptidos de bajo peso molecular. El péptido γ M4 se ubicó preferentemente en la

fracción DRM (Figura 16 y Tabla 1).



Figura 16. Solubilidad en Tritón X-100 del péptido γ M4. Liposomas de composición lipídica POPC:SM:Col (1:1:1) que contienen al péptido sintético γ M4 fueron tratados con 1% Triton X-100 a 4°C y posteriormente ultracentrifugados como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose las fracciones DSM y DRM (sobrenadante (S) y pellet (P), respectivamente). Para precipitar el péptido cada fracción fue tratada con metanol/cloroformo/agua. Luego, el contenido peptídico de las fracciones se solubilizó con buffer de Laemmli y se resolvió por electroforesis no desnaturizante en gel de Tricina, seguido de tinción con azul de Coomassie. La banda correspondiente al péptido γ M4 es representativa de tres experimentos diferentes.

Solubilidad en detergentes de AChR purificado y reconstituido en el sistema lipídico POPC:SM:Col 1:1:1 (“membrana que contiene rafts”)

Con el objetivo de investigar si la macromolécula completa del AChR se comporta de manera similar al péptido γ M4 (es decir, preferentemente asociado a los dominios DRM), reconstituimos al AChR purificado por cromatografía de afinidad a partir de *T. californica* en liposomas compuestos por los lípidos POPC:SM:Col (1:1:1, relación molar) en dos estequiometrías AChR:lípido distintas (1:130 y 1:400, relación molar). Los liposomas con el receptor fueron tratados con Tritón X-100 a 4°C por un tiempo de 20 min, luego de lo cual se obtuvieron las fracciones DRM y DSM por centrifugación a alta velocidad, de igual manera a como se hizo con el

péptido γ M4. El contenido proteico de las fracciones DRM y DSM obtenidas se separó mediante electroforesis de tipo SDS-PAGE, visualizando la presencia del AChR por Western blot (Figura 17). El análisis densitométrico de la banda correspondiente a la subunidad α del AChR indicó que se encontraba en ambas fracciones, estando casi la mitad del total del receptor presente en la fracción DRM, no mostrando diferencias entre las dos estequiometrías AChR:lípido testeadas (Tabla 1).

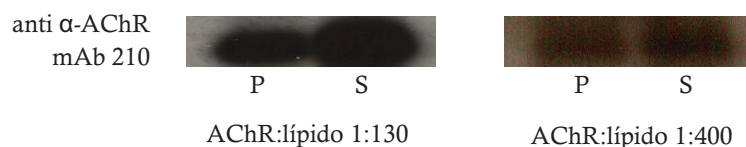


Figura 17. Solubilidad en Triton x-100 del AChR. Liposomas de POPC:SM:Col (1:1:1) conteniendo AChR purificado y reconstituido en dos estequiometrías AChR:lípido distintas (1:130 y 1:400, relación molar), fueron tratados con Triton X-100 1% a 4°C durante 20 min y posterior centrifugación como se describe en Materiales y Métodos. Las fracciones DSM y DRM fueron recolectadas como sobrenadante (S) y pellet (P) respectivamente. Para precipitar al AChR, cada fracción fue tratada con TCA. Luego el contenido proteico de cada fracción se solubilizó con buffer de Laemmli, se resolvió por SDS-PAGE al 10% y se transfirió a una membrana de PVDF. Los *blots* fueron revelados luego de la incubación durante toda la noche en frío con el anticuerpo primario mAb 210 (anticuerpo monoclonal contra la subunidad α del AChR de *T. californica*), y por dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa. Los *immunoblots* son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Si bien la metodología de obtención de las fracciones DRM y DSM mediante el tratamiento de la muestra con Triton X-100 y su posterior centrifugación a alta velocidad es ampliamente utilizada en el caso de liposomas solos o de liposomas que contienen péptidos (como en el caso de γ M4), no existe mucha información en el caso de utilizar proteoliposomas que contienen proteínas

de gran tamaño como el AChR, por lo que nos planteamos ciertas dudas con respecto a esta estrategia. Podría ocurrir que las micelas de detergente y lípidos al contener una proteína de gran tamaño como el receptor completo, resulten lo suficientemente densas como para precipitar luego de la centrifugación a alta velocidad, independientemente de la solubilidad de las membranas en Triton X-100, por lo que se mezclaría en forma errónea el contenido correspondiente a las fracciones DSM y DRM. Con el objetivo de verificar que no estábamos frente a esta posible fuente de error, decidimos utilizar la metodología de obtención de fracciones DRM y DSM clásica para membrana plasmática realizando gradientes de densidad de sacarosa discontinuos luego del tratamiento de los proteoliposomas con Triton X-100 (Figura 18 y Tabla 1) (ver sección de Materiales y métodos). Este método ha sido utilizado profusamente desde hace ya varios años para separar estas fracciones a partir de membranas celulares (Brown and Rose 1992; Pike and Casey 2002; Brown 2006), mientras que con sistemas de proteoliposomas la experiencia es mucho más reducida (Ayuyan and Cohen 2008; Tong *et al.* 2009). En nuestro caso comenzamos con el protocolo clásico (Brown and Rose 1992), que consiste en agregarle sacarosa a la muestra tratada previamente con el detergente (40 % de sacarosa) y colocarla en el fondo del gradiente, completando con capas de 30% y 5% de sacarosa, seguido por una centrifugación a alta velocidad de 20 hs a 4°C (ver Materiales y métodos). Luego se recogieron 12 fracciones de 1 ml cada una desde la parte superior a la inferior del gradiente, y se procedió a la caracterización del contenido de AChR de las fracciones por SDS-PAGE. Evaluamos tres estequiometrías AChR:lípido distintas (1:130, 1:400 y 1:800) y en todos los casos la mayoría del AChR (~80%) se ubicó en las últimas 4 fracciones del gradiente, las más densas del mismo (Figuras 18a y 18c). De ser correcto, este resultado estaría

indicando que el AChR, en las estequiometrías AChR:lípido testeadas, se encuentra casi exclusivamente en las fracciones solubles en detergente, a diferencia de lo que observamos con el método de ultracentrifugación, sin gradiente. Si bien este podía ser un resultado correcto, había que considerar que al encontrarse la gran mayoría del AChR en la porción de 40% de sacarosa, también está indicando que la muestra quedó donde se cargó inicialmente, sin moverse del lugar. Esto podría deberse a que los proteoliposomas tratados con Triton X-100 no se ubiquen en el gradiente de sacarosa de acuerdo a las propiedades de densidad de la membrana del liposoma. Esta pregunta se pudo responder al salir publicado en ese momento un trabajo indicando que la utilización del gradiente de sacarosa para la separación de fracciones DRM y DSM cuando la muestra consiste en liposomas ricos en SM y Col, debe incluir una modificación fundamental en el protocolo usualmente utilizado, para obtener un resultado válido (Ayuyan and Cohen 2008). En dicho trabajo, los autores demuestran que la SM estabiliza los liposomas e impide su ruptura por lisis osmótica al incrementar la tensión que una membrana puede soportar sin lisarse, lo cual sería fundamental para la correcta flotación de los liposomas en el gradiente. Los investigadores plantean que para que los liposomas puedan moverse hacia arriba en el gradiente de acuerdo a la densidad de sus membranas, el agua debe entrar en las vesículas en cada paso del gradiente de manera de evitar una diferencia de tonicidad entre el interior de la vesícula y el exterior de la misma, cosa que no ocurriría si la muestra rica en SM se carga en el fondo del gradiente, como indica el protocolo tradicional e hicimos en nuestro caso. Una segunda explicación que describen para este comportamiento de los liposomas ricos en SM, menciona la posibilidad de que el Triton X-100 efectivamente permeabiliza los liposomas, pero al migrar estos a fracciones del gradiente libres de

detergente podrían reformarse de alguna manera como consecuencia de un efecto de acción de masas que genere que el detergente abandone las membranas de los liposomas. Considerando esta segunda posibilidad, incorporamos Triton X-100 al 1% a todas las capas del gradiente para evitar este posible efecto, incorporando la muestra en la capa de 40%. En coincidencia con el trabajo de Ayuyan y Cohen, no observamos ningún cambio en el patrón de distribución del AChR en el gradiente para cualquiera de las tres estequiometrías AChR:lípido testeadas (1:130 y 1:800, Figura 18b y 18c), ubicándose nuevamente casi en forma exclusiva en las últimas 4 fracciones.

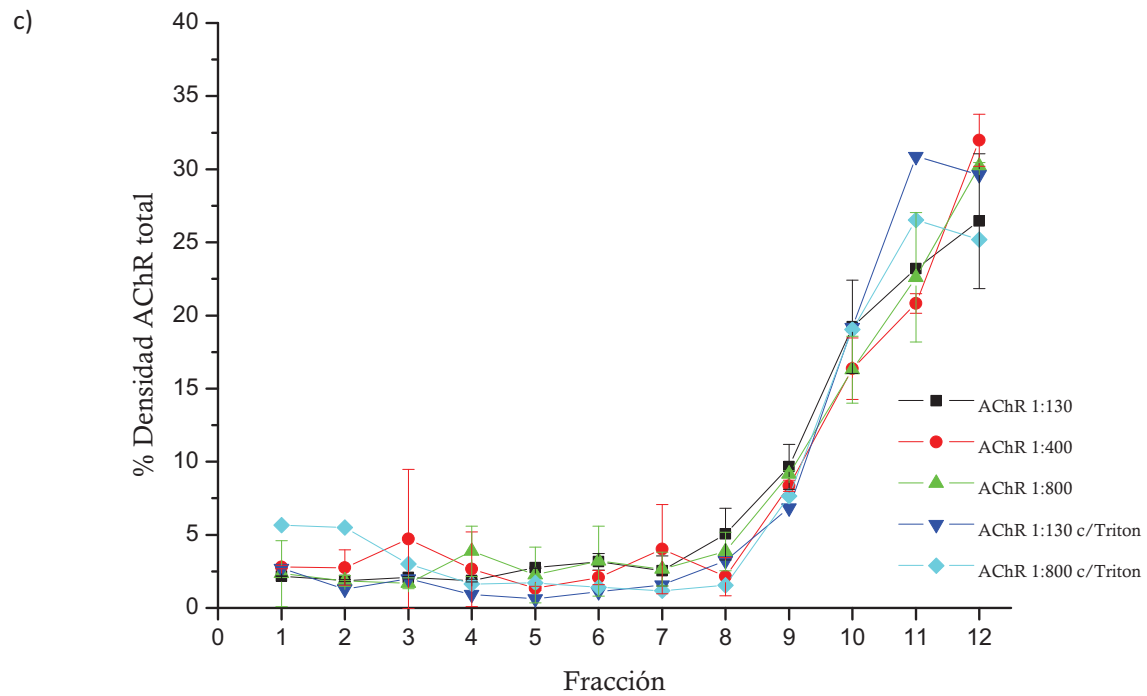
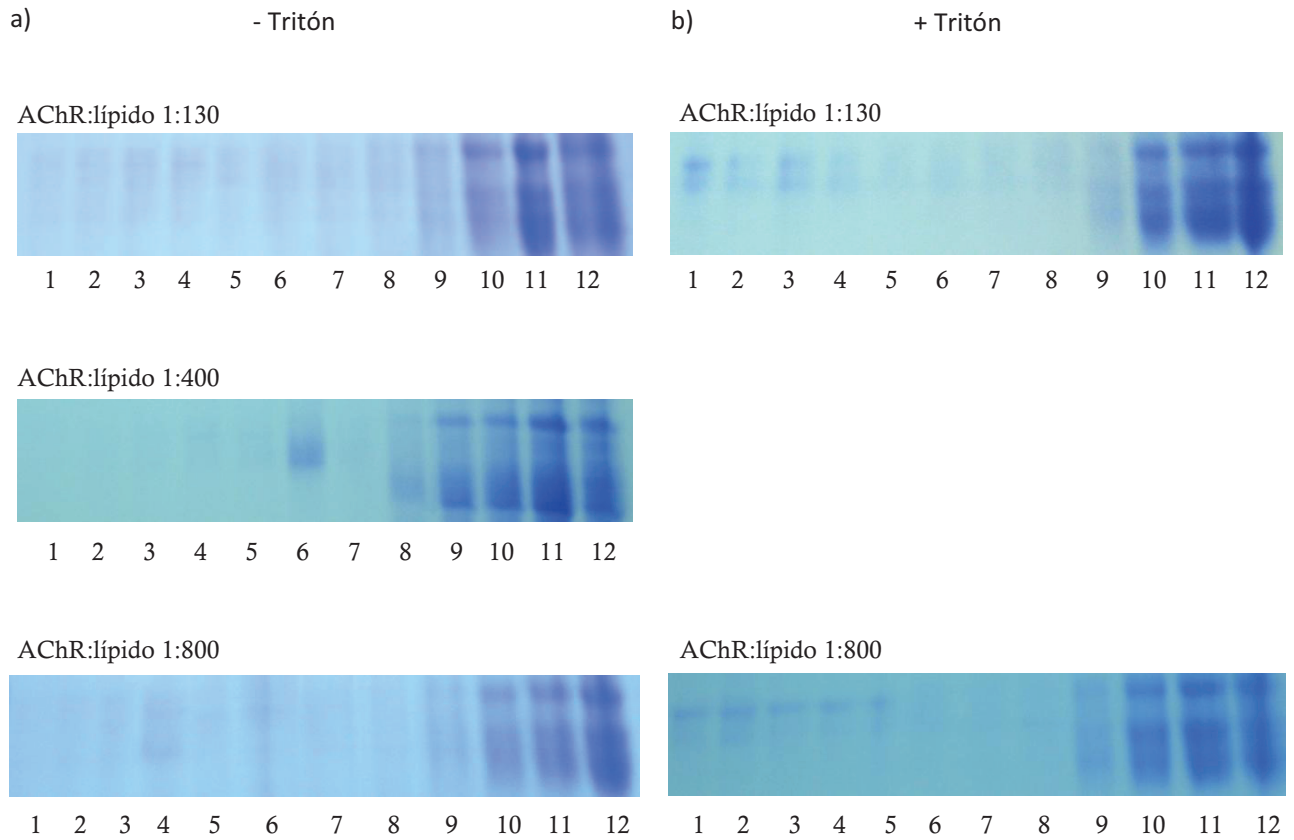


Figura 18. AChR purificado y reconstituido en el sistema POPC:SM:Col (1:1:1) en distintas estequiometrías AChR:lípido (1:130, 1:400, y 1:800, relación molar). Los liposomas se trataron con Triton X-100 al 1% durante 20 min a 4°C, y posteriormente se realizó su fraccionamiento en DRM y DSM mediante gradientes de densidad de sacarosa: a) con Tritón X-100 al 1% sólo en la fracción de la muestra (40% sacarosa); b) con Triton X-100 al 1% en todas las fracciones del gradiente. En ambos casos se cargó la muestra en la porción inferior del gradiente como se describe en la sección de Materiales y métodos. Los geles de acrilamida al 10% se resolvieron por SDS-PAGE y fueron teñidos con azul de Coomassie. Los geles son representativos de al menos tres experimentos independientes. c) Análisis densitométrico de las bandas del AChR correspondientes a los geles de a) y b).

Teniendo en cuenta la otra posibilidad, Ayuyan y Cohen recomiendan para separar membranas DRM y DSM cargar el material que contiene *rafts* en la parte superior del gradiente de sacarosa, ya que en este caso las vesículas a medida que se desplazan a porciones más densas del mismo se van encogiendo y por lo tanto no es necesario que se lisen para mantener la tonicidad con el medio exterior. De esta manera la muestra se ubicaría en el gradiente de acuerdo a la densidad de la membrana. Una desventaja de esta estrategia es que las proteínas solubles podrían quedar en la parte superior en forma errónea. En nuestro caso esto último no importa ya que la única proteína de nuestro sistema es el AChR. Cuando cargamos la muestra en la parte superior del gradiente (ver Materiales y métodos) obtuvimos una distribución del AChR en diferentes fracciones del gradiente (Figura 19 y Tabla 1). En este caso además incluimos en el liposoma al gangliósido GM1, para luego mediante un dot blot de alícuotas del contenido de cada fracción identificar las fracciones GM1 positivas, asociadas a las DRM. Realizamos un SDS-PAGE con el resto del contenido de las fracciones, con posterior tinción del contenido proteico con azul de Coomassie y se realizó el análisis densitométrico de las bandas correspondientes al AChR en las distintas fracciones para su cuantificación. Mediante este análisis se pudo establecer que casi la mitad del total del receptor se

encontraba presente en la fracción DRM en ambas estequiometrías AChR:lípido testeadas (1:130 y 1:800) (Figura 19 y Tabla 1). Este resultado coincide con el obtenido inicialmente por el método de centrifugación a alta velocidad sin gradiente.

La muy alta densidad de moléculas de AChR en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular, formando agregados supramoleculares del receptor, constituye una característica única y distintiva de la misma (Barrantes 2004; Sanes and Lichtman 2001). Por lo tanto quisimos evaluar el efecto de la concentración del AChR en el perfil de partición del AChR en la membrana. Con ese objetivo utilizamos muestras con distintas estequiometrías AChR:lípido, con alta concentración de AChR (1:130), con concentración intermedia (1:400) y con un concentración más de 6 veces menor que la primera (1:800), y separamos las muestras en DRM y DSM empleando métodos de separación de las fracciones con o sin gradiente de sacarosa. En todos los casos el perfil de distribución del AChR fue similar, no observándose diferencias significativas (Figuras 17 y 19 y Tabla 1), indicando que no existe un efecto dependiente de la concentración del AChR en el perfil de partición del mismo en las fracciones DRM y DSM. Este resultado sugiere que el proceso de agrupamiento del receptor no es dependiente de la concentración del AChR y que solo dependería de la presencia de otras proteínas localizadas junto con el AChR en la membrana postsináptica. Por lo tanto, mientras que para el péptido γ M4, la relación péptido/membrana (emparejamiento hidrofóbico) podría dirigirlo hacia los dominios tipo-*rafts* más anchos y rígidos, en el receptor completo intervendría un mecanismo más complejo ya que en sistemas modelo éste no demuestra una partición preferencial, encontrándose presente en ambas fracciones.

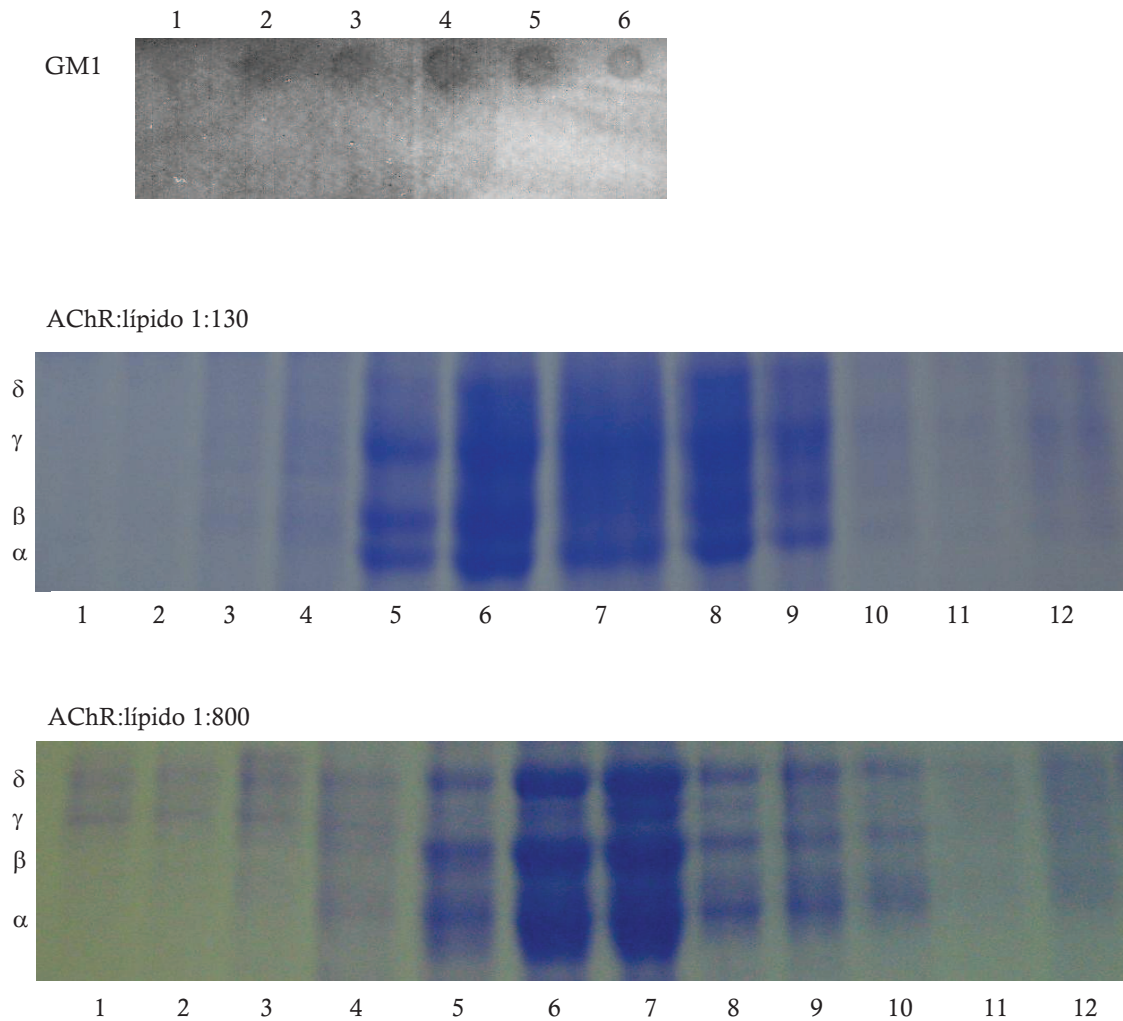


Figura 19. AChR purificado y reconstituido en el sistema POPC:SM:Col (1:1:1) en dos estequiometrías AChR:lipido distintas (1:130 y 1:800, relación molar). Los liposomas fueron tratados con Triton X-100 al 1% durante 20 min a 4°C, y posteriormente se realizó su fraccionamiento en DRM y DSM mediante gradientes de densidad de sacarosa cargando la muestra en la parte superior del gradiente (5% de sacarosa) como se describe en la sección de Materiales y métodos. En la imagen superior se muestra un dot blot de GM1 representativo de las fracciones 1-12, el cual indica que las DRMs se encuentran en las fracciones 3-6. Los geles sometidos a SDS-PAGE y teñidos con azul de Comassie son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, en los siguientes experimentos se separaron las fracciones DRM/DSM solo por centrifugación a alta

velocidad y a partir de una muestra de estequiometría molar AChR:lípido de 1:130 excepto donde se indique. Los mismos liposomas de membranas con presencia de *rafts* con AChR purificado fueron tratados con otro detergente no iónico, el *Tween* 20 (2,5 % v/v de concentración final), y se observó un pequeño incremento en la cantidad de AChR que particionó en la fracción DRM en comparación con el observado con Triton X-100 (de 45,5% con Triton X-100 a 56 % por Tween 20, Figura 20), que podría deberse a la menor fuerza de solubilización de *Tween* 20 en comparación con la del Triton X-100 (Babiychuk and Draeger 2006). Por lo tanto podemos establecer que el AChR no tiene una preferencia marcada por uno de los dominios en particular independientemente del detergente no iónico utilizado en la partición.

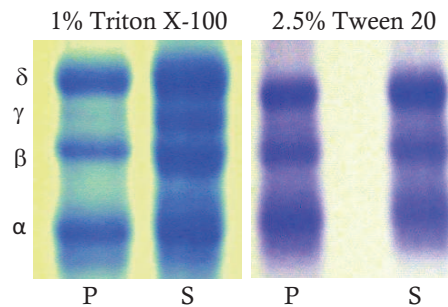


Figura 20. Solubilidad en detergentes de sistemas modelos conteniendo AChR. Liposomas compuestos por AChR purificado y POPC:SM:Col (1:1:1, AChR:lípido 1:130), fueron tratados con Triton X-100 1% o Tween 20 2.5% a 4°C durante 20 min y posteriormente ultracentrifugados como se describe en Materiales y Métodos. Las fracciones DSM y DRM fueron recolectadas como sobrenadante (S) y pellet (P) respectivamente. Para precipitar el AChR, cada fracción fue tratada con TCA. Luego el contenido proteico de cada fracción se solubilizó con buffer de Laemmli y se sometió a SDS-PAGE en un gel al 10%, seguido de tinción por azul de Coomasie.

Tabla 1. Solubilidad de los distintos sistemas modelo estudiados conteniendo el péptido γ M4 o el AChR purificado en Triton X-100 1%

Sistema modelo de liposoma	Fracción DRM (%)	Fracción DSM (%)
Distribución del péptido γM4		
γ M4/PC:SM:Col (1:1:1)	75,9 \pm 16,1	24,1 \pm 16,1
Distribución del AChR		
AChR/PC:SM:Col (1:1:1) (AChR:lip 1:130)	45,5 \pm 7,4	54,0 \pm 7,4
AChR/PC:SM:Col (1:1:1) (AChR:lip 1:130) ^a	49,0 \pm 12,7	51,5 \pm 12,7
AChR/PC:SM:Col (1:1:1) (AChR:lip 1:400)	55,8 \pm 12,5	44,2 \pm 12,5
AChR/PC:SM:Col (1:1:1) (AChR:lip 1:800) ^a	43,8 \pm 4,2	56,2 \pm 4,2
AChR/PC:SM:GM1:Col (1:0.98:0.02:1)	57,5 \pm 9,9	42,5 \pm 9,9
AChR/PC:SM:GM1:Col (1:0.98:0.02:1) + CTxB	46,9 \pm 6,6	53,1 \pm 6,6
AChR/PC:SM:GM1:Col (1:0.98:0.02:1) + CTxB + anti-CTx	33,5 \pm 6,2*	66,6 \pm 6,2*
AChR:rapsina (1:1)/PC:SM:Col (1:1:1)	50,8 \pm 11,0	49,2 \pm 11,0
AChR:rapsina (1:2)/ PC:SM:Col (1:1:1)	52,1 \pm 14,1	47,9 \pm 14,1
AChR:rapsina (1:4)/PC:SM:Col (1:1:1)	49,2 \pm 14,6	50,8 \pm 14,6

Los valores representan la media \pm D.E. de al menos tres mediciones independientes.

^aDRM y DSM separados mediante gradientes de densidad de sacarosa.

* Diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control (sin CTxB y anti-CTxB) ($p < 0,01$) y con respecto a la tratada solo con CTx ($p < 0,05$).

Una estrategia utilizada habitualmente para concentrar *rafts* lipídicos y facilitar su detección agregando entre sí ciertas moléculas presentes en este tipo de dominio, consiste en el entrecruzamiento de GM1, glicolípido señalado usualmente como un componente residente de los *rafts* lipídicos en las células vivas (Simons and Ikonen 1997; Simons and Toomre 2000), con la subunidad B de la toxina colérica (CTxB) (Mayor *et al.* 1994; Mayor and Maxfield 1995; Friedrichson and Kurzchalia 1998; Harder *et al.* 1998; Hammond *et al.* 2005). CTxB es pentavalente para GM1 por lo que el entrecruzamiento de GM1 conduce a la formación de agrupaciones más grandes del gangliósido (Merritt *et al.* 1994; Spiegel *et al.* 1984). Con la intención de

realizar agrupamientos de dominios en nuestros sistemas modelo, reconstituimos al AChR en liposomas que incluían al gangliósido GM1, en una concentración del 2% relativa al total de esfingolípidos (POPC:SM:GM1:Col, 1:0.98:0.02:1 relación molar). Inicialmente estudiamos si la inclusión de este lípido alteraba la distribución (no preferencial) del AChR en los sistemas con coexistencia de dominios. Sin embargo, luego del tratamiento con Triton X-100 al 1% en frío y separación por ultracentrifugación de las fracciones, se encontraron cantidades similares de AChR distribuidas en las fracciones DRM y DSM; es decir, no se observaron diferencias significativas en el perfil de partición del AChR con la inclusión de GM1 (Figura 21 y Tabla 1). A continuación, sistemas modelo que contenían GM1 se expusieron a CTxB, luego se trataron con Triton X-100 al 1%, y el contenido proteico de las fracciones DRM y DSM obtenidas se resolvió por SDS-PAGE, se transfirió seguidamente a una membrana de PVDF y se detectó por Western blot. Se pudo apreciar un pequeño aumento en la proporción de AChR que particiona en la fracción DSM como consecuencia del entrecruzamiento de GM1 con CTxB (Figura 21 y Tabla 1). Un segundo experimento consistió en la adición de un anticuerpo secundario contra la CTxB luego de agregada esta última a liposomas conteniendo GM1. La inducción de un mayor entrecruzamiento del gangliósido condujo a un incremento, ahora estadísticamente significativo, del AChR en la fracción DSM, tanto con respecto a la muestra con GM1 sin tratar como a la muestra tratada sólo con CTx (Figura 21 y Tabla 1).

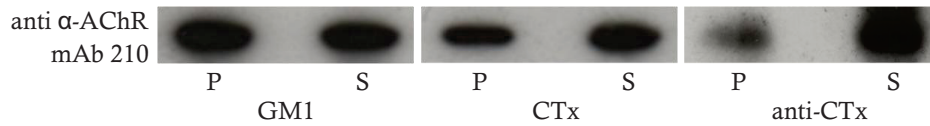


Figura 21. Solubilidad en Triton X-100 de sistemas modelo con AChR y GM1. Liposomas de AChR purificado y PC:SM:GM1:Col (1:0.98:0.02:1) i) control (GM1), ii) tratados con la subunidad B de la toxina colérica (CTxB) para el entrecruzamiento de GM1, iii) tratados con CTxB para el entrecruzamiento de GM1 seguido de la adición del anticuerpo anti-toxina colérica (anti-CTx) para el entrecruzamiento de CTxB. Los liposomas controles o tratados fueron sometidos luego a extracción con Triton X-100 1% a 4°C durante 20 min y posterior centrifugación como se describe en Materiales y Métodos. Las fracciones DSM y DRM fueron recolectadas como sobrenadante (S) y pellet (P) respectivamente. El contenido proteico de cada fracción se solubilizó con buffer de Laemmli, se resolvió por SDS-PAGE en un gel al 10% y se transfirió a una membrana de PVDF. Los *immunoblots* fueron revelados luego de la incubación durante toda la noche en frío con el anticuerpo primario mAb 210 (anticuerpo monoclonal contra la subunidad α del AChR de *T. californica*), y por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa. Los *immunoblots* son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Interacción rapsina-AChR y solubilidad en detergentes

La rapsina es una proteína periférica miristoilada que se encuentra anclada a la cara citoplasmática de la membrana muscular postsináptica. Ha sido señalada como residente en dominios tipo *raft* y es la responsable en última instancia del agrupamiento del AChR en la membrana postsináptica. Con la intención de incorporar esta proteína a los sistemas modelo que contienen AChR, para ver si su presencia alteraba la distribución del receptor en estos dominios de la membrana, aislamos una fracción citoplasmática altamente enriquecida en rapsina mediante un tratamiento alcalino de membranas de *T. californica* (Neubig *et al.* 1979). Adicionamos una alícuota de esta fracción durante el proceso de reconstitución del sistema modelo con AChR-de manera que la rapsina se dirija a la cara interna de

los liposomas POPC:SM:Col (1:1:1, relación molar). Preparamos tres mezclas de rapsina:AChR con diferentes relaciones estequiométricas molares (rapsina:AChR 1:1, 2:1 y 4:1). Los liposomas cargados con rapsina fueron tratados con Triton X-100 al 1% y se obtuvieron las fracciones DRM y DSM por ultracentrifugación, como se describió en la sección de Materiales y Métodos. En el análisis de los Western blots correspondientes a estas fracciones se utilizaron dos anticuerpos primarios distintos: anticuerpos anti-rapsina y anti-AChR. En la figura 22 se muestra que la distribución de la rapsina y del AChR entre las fracciones DRM y DSM fue bastante similar. La cuantificación por densitometría de los Western blots reveló que la rapsina y el AChR se localizan -tanto en dominios tipo *rafts* como no-*rafts*, por lo que la presencia de rapsina no tendría efecto sobre la partición de la proteína del AChR entre las fracciones DRM y DSM (Tabla 2).

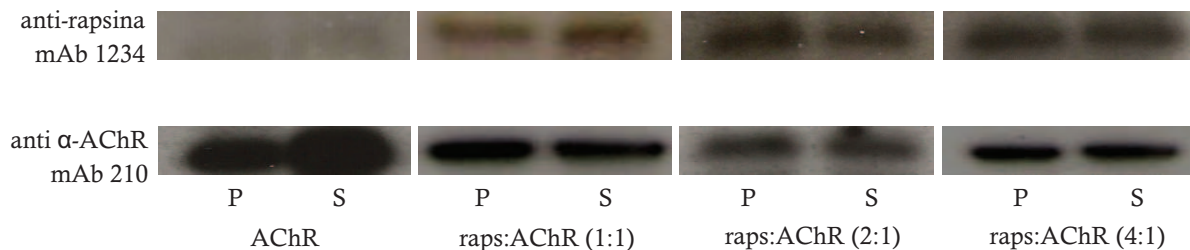


Figura 7. Solubilidad en Triton X-100 de sistemas modelo conteniendo AChR y distintas cantidades de rapsina. Liposomas de AChR purificado y POPC:SM:Col (1:1:1), en ausencia (AChR) o presencia de un extracto enriquecido en rapsina en tres diferentes relaciones estequiométricas molares rapsina:AChR (rapsina:AChR 1:1, 2:1 y 4:1) fueron tratados con Triton X-100 1% a 4°C durante 20 min. y posteriormente ultracentrifugados como se describe en Materiales y Métodos. Las fracciones DSM y DRM fueron recolectadas como sobrenadante (S) y pellet (P), respectivamente. El contenido proteico de cada fracción se solubilizó con buffer de Laemmli, se resolvió por SDS-PAGE en un gel al 12% y se transfirió a una membrana de PVDF. Los *blots* fueron revelados luego de la incubación durante toda la noche en frío con los anticuerpos primarios mAb 1234 (anticuerpo monoclonal contra la rapsina) o mAb 210 (anticuerpo monoclonal contra la subunidad α del AChR de *T. californica*), y por dos horas a temperatura ambiente con los respectivos

anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-ratón. Los *immunoblots* son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Tabla 2. Solubilidad en Triton X-100 al 1% de sistemas modelo de POPC:SM:Col 1:1:1 conteniendo AChR purificado y la proteína rapsina

Relación molar	Distribución AChR		Distribución rapsina	
	Fracción DRM (%)	Fracción DSM (%)	Fracción DRM (%)	Fracción DSM (%)
	AChR:raps. 1:1	50,8 ± 11,0	49,2 ± 11,0	45,0 ± 6,5
AChR:raps. 1:2	52,1 ± 14,1	47,9 ± 14,1	50,8 ± 9,1	49,2 ± 9,1
AChR:raps. 1:4	49,2 ± 14,6	50,8 ± 14,6	49,4 ± 7,7	50,6 ± 7,7

Los valores representan la media ± D.E.; n=3.

Análisis de la composición lipídica de las fracciones DRM y DSM de distintas membranas modelo luego del tratamiento con Triton X-100

Con el objetivo de conocer la composición lipídica de los dos tipos de dominio (DRM y DSM), en ausencia o en presencia del péptido γ M4 o del AChR, primeramente se trataron liposomas de POPC:SM:Col solos (1:1:1 relación molar) con Triton X-100 a 4°C por 20 min, luego de lo cual se obtuvieron las fracciones DRM y DSM a caracterizar. La composición lipídica de ambas fracciones fue analizada como se describió en Materiales y Métodos. El análisis lipídico del sistema modelo sin proteína reveló que la fracción DRM se encuentra altamente enriquecida en Col y SM, mientras que la fracción DSM está enriquecida en POPC (Figura 23a y 24), al igual que lo encontrado en trabajos previos de otros autores que realizaron este análisis utilizando sistemas modelo de composición similar (Gandhavadi *et al.* 2002; Schroeder *et al.* 1994). Cuando en el sistema lipídico se incluyó al gangliósido GM1 (POPC:SM:GM1:Col, 1:0,98:0,02:1, relación molar), la distribución de los lípidos en las fracciones DRM y DSM no sufrió cambios

siendo casi idéntica a la del mismo sistema sin GM1 (Figura 23b). Al análisis de la composición lipídica incorporamos dos sistemas modelo adicionales: un sistema modelo símil-DRM, rico en Col y SM (POPC:SM:Col 0,35:1:0,87, relación molar, sin AChR), y un sistema modelo símil-DSM, pobre en Col y SM (POPC:SM:Col 1:0,11:0,24 relación molar, sin AChR). La elección de las composiciones de estos dos sistemas se basó en las proporciones de lípidos de las fracciones DRM y DSM obtenidas en el trabajo de McIntosh et al. (McIntosh *et al.* 2003). Como era de esperar, los liposomas símil-DRM prácticamente no presentaron la fase soluble luego del tratamiento con Triton X-100, mientras que la fase insoluble predominante se encontraba altamente enriquecida en Col y SM, con un proporción de Col más alta que la obtenida para el DRM del sistema que contiene *rafts* (Figuras 23a y 24). Por otro lado, tal como también era esperable, el sistema símil-DSM resultó ser casi en su totalidad soluble en detergente, con su fracción soluble altamente enriquecida en POPC, y con una composición lipídica comparable con la del DSM obtenido a partir del sistema que contiene *rafts* (Figuras 23a y 24).

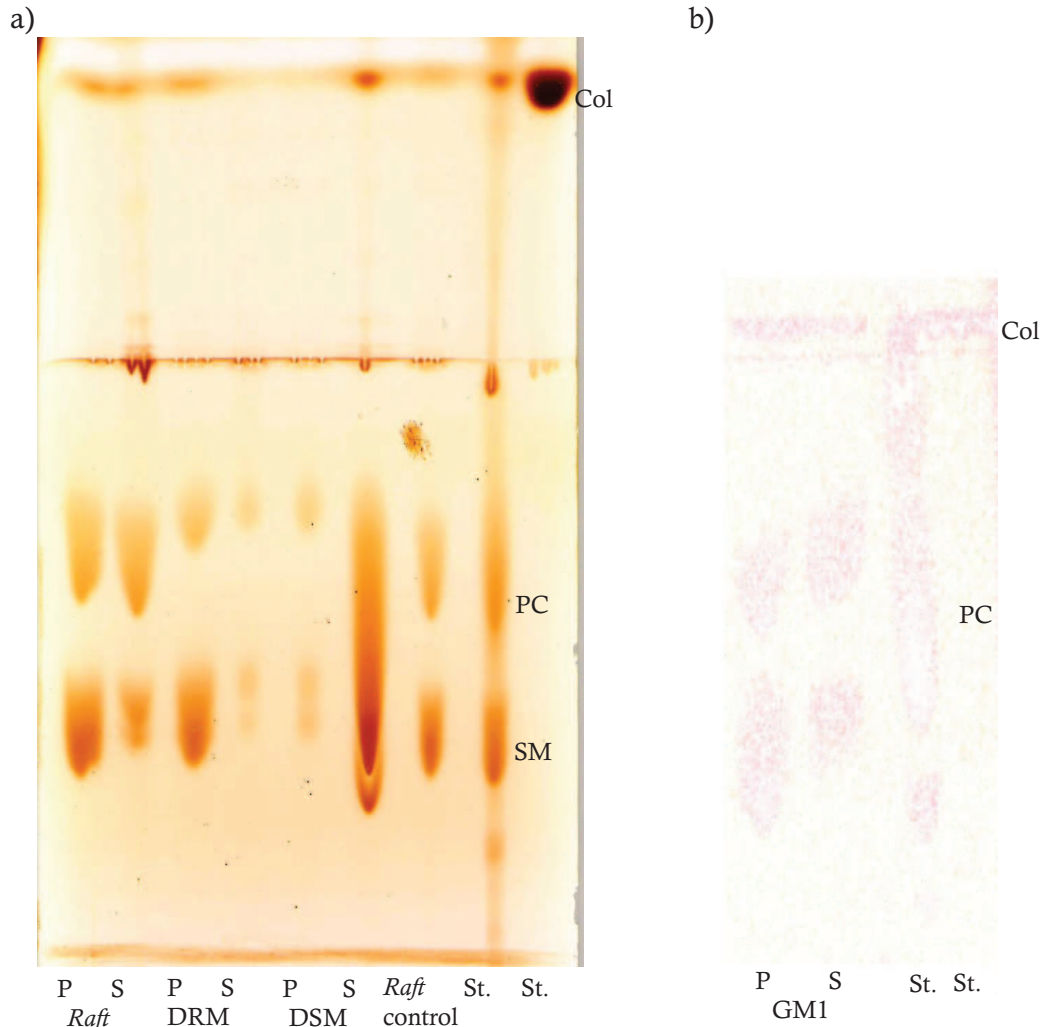


Figura 23. Análisis del contenido lipídico de las fracciones de membrana solubles o DSM (sobrenadante, S) e insolubles o DRM (pellet, P), obtenidas luego del tratamiento con Triton X-100 y posterior ultracentrifugación a partir de tres sistemas de lípidos reconstituidos: una membrana conteniendo dominios *raft*, dominios insolubles en detergente, al igual que los *rafts* aislados de membranas plasmáticas (*Raft*, PC:SM:Col, 1:1:1); un modelo tipo DRM, que es una bicapa lipídica compuesta por lípidos de la clase y la proporción que se ha informado que conforman solo dominios insolubles en detergente (DRM, PC:SM:Col, 0.35:1:0.87), y un modelo tipo DSM, que es una bicapa lipídica compuesta por lípidos de la clase y la proporción que se ha demostrado que conforman membranas con una alta solubilidad en detergente (DSM, PC:SM:Col 9:1:2.125). Cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones DRM (P) y DSM (S) de **a)** los tres sistemas lipídicos estudiados junto a un extracto lipídico completo de una membrana que contiene *rafts* que no fue sometida al tratamiento con detergente (*Raft* control) y a los estándares correspondientes a PC, SM y Col.; y **b)** un sistema modelo conteniendo dominios *rafts* que incluyó al gangliósido GM1 (GM1, POPC:SM:GM1:Col, 1:0,98:0,02:1). En ambas placas, para la separación de los lípidos PC, SM y Col se utilizó como primer solvente la mezcla cloroformo:metanol:ácido acético:0,15 M NaCl (20:10:3,2:1, por vol.), y en segundo lugar éter. Las manchas lipídicas se revelaron mediante exposición a vapores de yodo en **a)** y a diclorofluoresceína en **b)**, como se detalla en materiales y métodos.

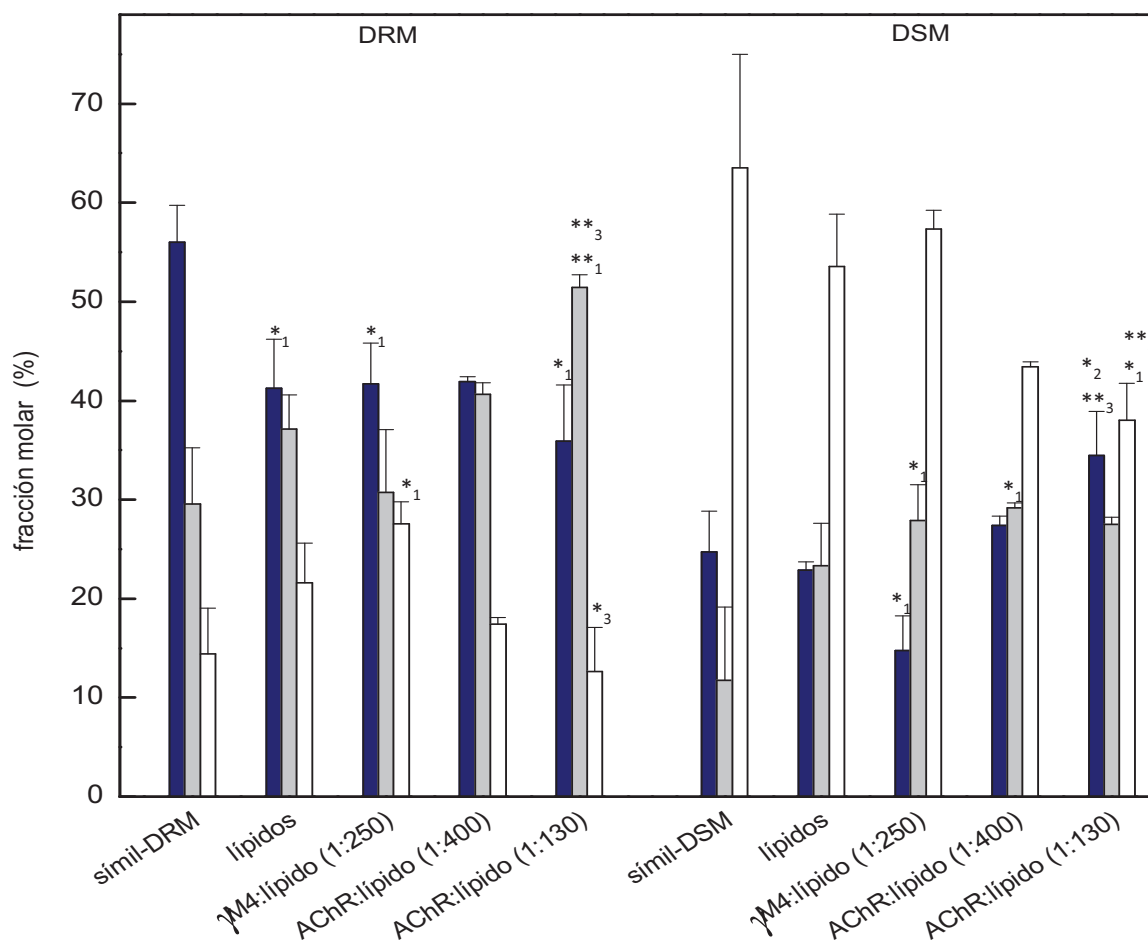


Figura 24. Composición lipídica de las fracciones DRM y DSM obtenidas a partir de los distintos sistemas modelo estudiados: modelos símil-DRM y símil-DSM (sin proteína), y cuatro modelos de membranas que contienen *rafts*: en ausencia del AChR (lípidos), en presencia del péptido γ M4 (1:250), y en presencia de dos diferentes relaciones molares de AChR:lipido (1:400 y 1:130). Las fracciones molares de Col, SM y PC están representadas por columnas azules, grises y blancas, respectivamente. Cada columna corresponde a la media \pm D.E. de al menos tres mediciones independientes. *, ** Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente). Los subíndices indican el sistema de lípidos con el que se está comparando: 1) modelos símil-DRM o DSM, 2) modelo *raft* de solo lípidos, y 3) modelo *raft* conteniendo γ M4.

A continuación analizamos la composición lipídica de las fracciones DRM y DSM obtenidas a partir de liposomas conteniendo dominios *rafts* y al péptido γ M4. Las proporciones molares de Col, SM y PC en ambas fracciones resultaron similares a las obtenidas con la membrana modelo que contiene *rafts* formada solo

con lípidos, mientras que en comparación con los sistemas *símil-DRM* y *símil-DSM* hubo diferencias en los niveles de Col (menor proporción en la fracción DRM) y SM (mayor proporción en la fracción DSM) (Figuras 24 y 25). También estudiamos la distribución de los lípidos luego del tratamiento con detergente en sistemas de composición lipídica POPC:SM:Col (relación molar 1:1:1) a los que se les incorporó AChR purificado, en dos relaciones molares AChR:lípido diferentes (1:130 y 1:400). La composición de lípidos de las fracciones DRM y DSM fue similar para ambas relaciones molares AChR:lípido, y además resultaron semejantes a la del mismo sistema lipídico sin AChR (Figuras 24 y 25). Estos resultados sugieren que la composición lipídica de ambas fases estaría gobernada principalmente por las propiedades fisicoquímicas de los lípidos y no por las posibles interacciones lípido-proteína que pudieran ocurrir. De la comparación de las composiciones lipídicas de las fases obtenidas a partir de sistemas con AChR con las obtenidas para las fases de los sistemas *símil-DRM* y *símil-DSM* surgieron ciertas diferencias. En el caso de los liposomas con relación molar AChR:lípido de 1:400, la composición lipídica de sus fracciones DRM y DSM fue similar a la de los sistemas *símil-DRM* y *símil-DSM*, salvo que presentó un nivel mayor de SM en el DSM. Por el contrario, en el caso de los liposomas con relación molar AChR:lípido de 1:130, la composición lipídica de ambas fases resultó diferente a la de los sistemas *símil-DRM* y *símil-DSM*, con mayor proporción de SM y menor de Col en la fracción DRM y menor proporción de POPC en la fracción DSM (Figuras 24 y 25). Además este sistema AChR:lípido 1:130 presentó diferencias significativas con el sistema que contiene a γ M4, al tener mayor proporción de SM y menor de POPC en el DRM, y en el DSM mayor proporción de Col y menor de POPC.

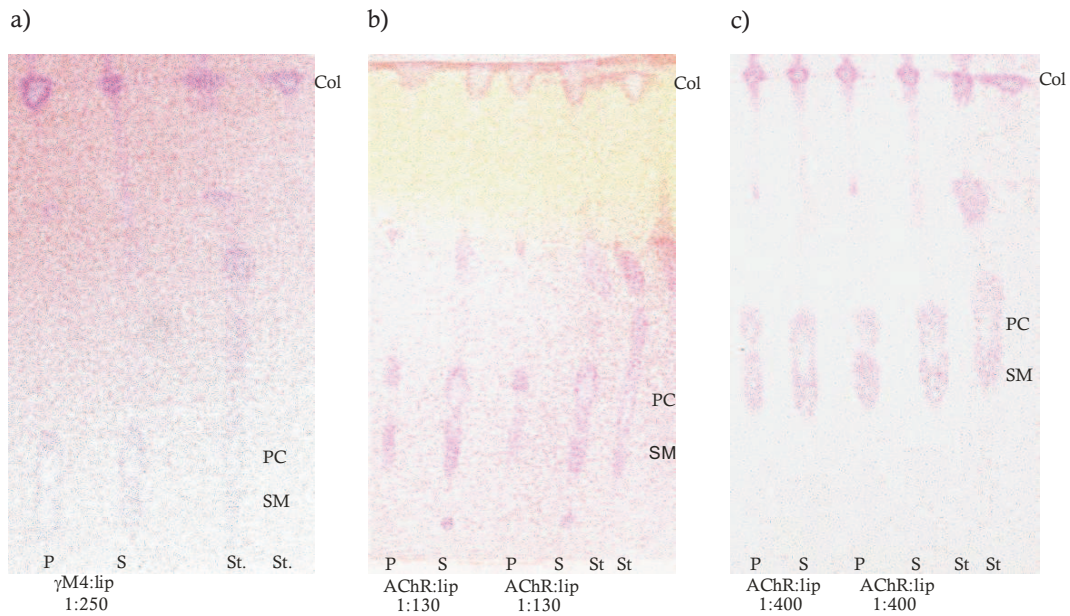


Figura 25. Análisis del contenido lipídico de las fracciones de membrana solubles (sobrenadante, S) e insolubles (pellet, P), obtenidas luego del tratamiento con Triton X-100 y posterior ultracentrifugación, a partir de tres sistemas de lípidos reconstituidos en una membrana conteniendo dominios *rafts* (PC:SM:Col, 1:1:1) en presencia de a) el péptido γ M4 en relación molar péptido:lípido 1:250, b) AChR purificado en relación molar AChR:lípido 1:130, y c) AChR purificado en relación molar AChR:lípido 1:400. Cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones DRM (P) y DSM (S) de los tres sistemas estudiados, junto a los estándares de lípidos correspondientes a PC, SM y Col. Para la separación de los lípidos PC, SM y Col se utilizó como primer solvente cloroformo:metanol:ácido acético:0,15 M NaCl (20:10:3,2:1, por vol.), y en segundo lugar éter. Se revelaron las manchas lipídicas mediante el rociado de la placa con diclorofluoresceína como se detalla en materiales y métodos. En cada caso se trata de muestras representativas de al menos tres experimentos independientes.

A pesar de que las composiciones de las fracciones DRM y DSM no sufrieron mayores modificaciones en presencia del AChR completo o del péptido γ M4, sí hubo un cambio importante en la cantidad de lípido total correspondiente a cada fracción. La presencia del péptido γ M4 produjo un incremento en la cantidad de lípidos correspondiente a la fracción DRM con una concomitante disminución en la fracción DSM. Por el contrario, la sola presencia del AChR provocó un incremento estadísticamente significativo en el contenido de lípidos totales de la

fracción DSM, incremento que no depende de la relación molar AChR:lípido utilizada (Figura 26). Estos hallazgos nos permitirían inferir que el péptido γ M4 actuaría como un promotor de DRM y el AChR, por el contrario, actuaría como un perturbador de DRM.

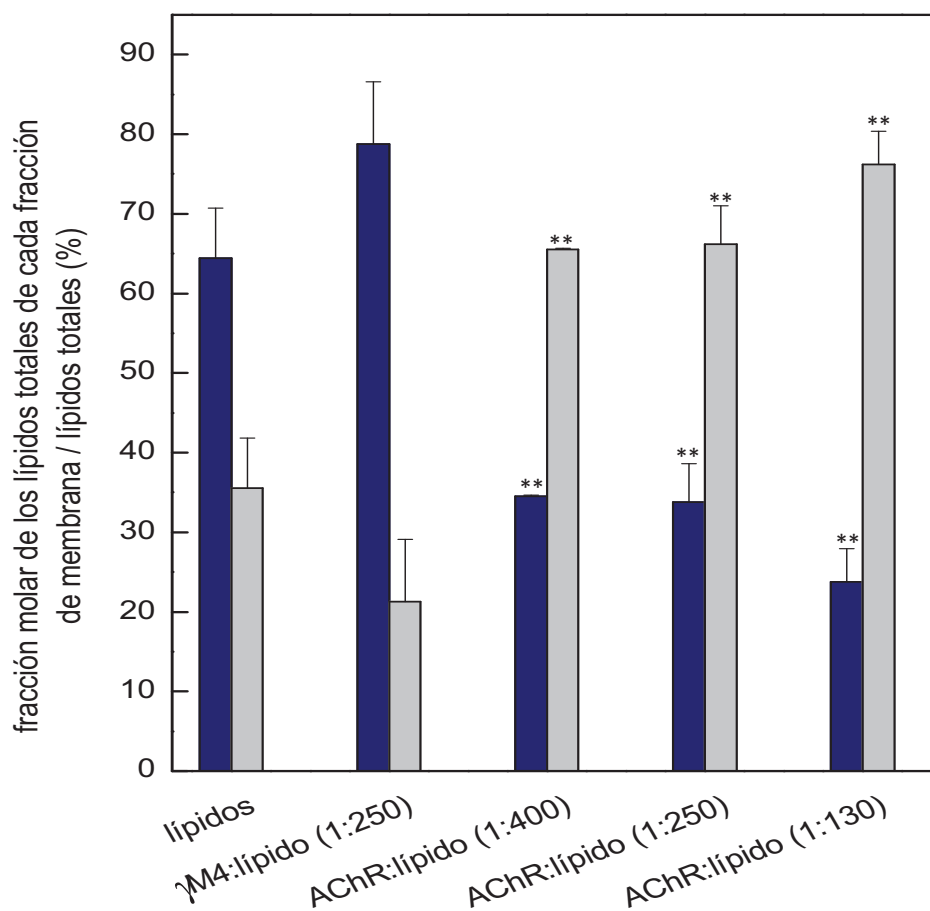


Figura 26. Distribución de los lípidos totales de cada dominio (DRM y DSM) con respecto al total de los lípidos de los distintos sistemas modelo estudiados: en ausencia del AChR (lípidos), en presencia del péptido γ M4 (1:250), y en presencia de tres diferentes relaciones molares de AChR:lípido (1:400, 1:250 y 1:130). Las fracciones molares de los lípidos de los dominios DRM y DSM están representadas por columnas azules y grises, respectivamente. Cada barra corresponde a la media \pm D.E. de al menos tres mediciones independientes. ** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al sistema de lípidos en ausencia de AChR y al sistema modelo en presencia del péptido γ M4 ($p < 0,01$).

Energía libre de transferencia desde los dominios DSM hacia los dominios DRM

Teniendo en cuenta las distribuciones del péptido γ M4, del AChR y de los lípidos luego del tratamiento con detergente de los distintos liposomas de composición lipídica POPC:SM:Col 1:1:1, decidimos analizarlas desde un punto de vista termodinámico, de forma similar a lo hecho por McIntosh y colaboradores (McIntosh *et al.* 2003). En primer lugar es necesario asumir que el Triton X-100 no cambia la composición de los DRMs de los liposomas, y teniendo en cuenta esto, analizamos el comportamiento termodinámico de los distintos componentes de las membranas. Para tal fin calculamos los coeficientes de partición molar (K_p) y las energías aparentes de transferencia (ΔG_a) desde las fracciones DSM hacia las fracciones DRM, utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3 de la sección de materiales y métodos. En la tabla 3 se observan los valores de K_p y ΔG_a para el péptido γ M4, el AChR y los lípidos individuales (Col, SM y POPC). En el caso de estos últimos, para el sistema modelo de solo lípidos, el valor de ΔG_a fue negativo para el Col y SM y positivo para el POPC. Por lo tanto para el Col y la SM resulta favorable energéticamente particionar hacia los dominios DRM desde los dominios DSM, y lo contrario ocurre para el POPC, como era esperable en todos los casos. En el caso del péptido γ M4 su valor de ΔG_a resultó muy cercano a 0, es decir al equilibrio. Por lo que γ M4 puede ubicarse en los dominios DRM desde dominios DSM sin gastos de energía, comportamiento opuesto al de muchos péptidos de características similares estudiados hasta ahora que tienen una marcada preferencia por dominios l_d (Pokorny *et al.* 2006; Gandhavadi *et al.* 2002; McIntosh *et al.* 2003; Vidal and McIntosh 2005; Bacia *et al.* 2004; Fastenberg *et al.* 2003; Hammond *et al.* 2005; Kalvodova *et al.* 2005). Además, la presencia del péptido en la bicapa

generaría un ambiente más favorable para la partición del Col en los dominios DRM, al presentar un valor más negativo de ΔG_a en comparación con el valor obtenido para el Col en el sistema lipídico sin péptido (Tabla 3). Este hecho apoya lo expresado previamente en nuestro análisis del contenido lipídico total de las fracciones, en el cual destacamos el rol del péptido $\gamma M4$ como promotor de dominios DRM. Por otro lado, para el AChR se obtuvieron valores negativos de ΔG_a para ser transferido desde los dominios DSM a los dominios DRM en ambas relaciones AChR:lípido estudiadas (Tabla 3), por lo que le resulta favorable energéticamente particionar hacia dominios DRM. En este sistema se observó una disminución de la magnitud de la ΔG_a del Col (se hace menos negativa) en presencia del AChR comparada con el comportamiento del lípido en el sistema sin receptor, de manera dependiente de la relación molar AChR:lípido utilizada (Tabla 3). Como mencionamos anteriormente, el AChR actuaría entonces como un perturbador de los dominios DRM, hecho que se ve reflejado en la disminución de la magnitud de ΔG_a del Col (se hace menos negativa) en presencia del AChR comparada con el comportamiento del lípido en el sistema sin receptor, de manera dependiente de la relación molar AChR:lípido utilizada (Tabla 3). Debemos aclarar que las magnitudes de las energías libres de transferencias para la mayoría de las moléculas estudiadas fueron similares o menores a la magnitud de la energía térmica (0,55 kcal/mol). Esto implicaría que la formación de distintos dominios de membrana sería un mecanismo con una efectividad parcial en la separación de estas moléculas en los sistemas estudiados.

Tabla 3. Coeficientes de partición (K_p) y energías libres de transferencias aparentes (ΔG_a) desde las fracciones DSM hacia las DRM para el péptido γ M4, el AChR y los distintos lípidos.

Molécula	Pép./Prot.	Temperatura	K_p	ΔG_a (kcal/mol)
Col	---	4°C	$1,80 \pm 0,20$	$-0,32 \pm 0,06$
Col	γ M4	4°C	$2,99 \pm 1,06$	$-0,58 \pm 0,18$
Col	AChR 1:400	4°C	$1,53 \pm 0,07$	$-0,23 \pm 0,02$
Col	AChR 1:130	4°C	$1,04 \pm 0,03$	$-0,02 \pm 0,02$
SM	---	4°C	$1,72 \pm 0,20$	$-0,29 \pm 0,06$
SM	γ M4	4°C	$1,69 \pm 0,21$	$-0,29 \pm 0,07$
SM	AChR 1:400	4°C	$1,39 \pm 0,06$	$-0,18 \pm 0,02$
SM	AChR 1:130	4°C	$1,87 \pm 0,01$	$-0,34 \pm 0,00$
POPC	---	4°C	$0,38 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,06$
POPC	γ M4	4°C	$0,48 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,06$
POPC	AChR 1:400	4°C	$0,41 \pm 0,00$	$0,49 \pm 0,00$
POPC	AChR 1:130	4°C	$0,33 \pm 0,08$	$0,62 \pm 0,14$
γ M4	γ M4	4°C	$1,24 \pm 1,04$	$0,00 \pm 0,43$
AChR	AChR 1:400	4°C	$2,66 \pm 1,50$	$-0,48 \pm 0,28$
AChR	AChR 1:130	4°C	$2,77 \pm 0,70$	$-0,55 \pm 0,13$

Los valores son representativos de la media \pm D.E. de tres o cuatro experimentos independientes.

Análisis de las propiedades biofísicas de las membranas modelo

El análisis de la polarización generalizada (PG) de la sonda *Laurdan* proporciona una medida de la polaridad de la membrana, brindando indirectamente información acerca del grado de orden de la misma (Parasassi *et al.* 1990; Parasassi *et al.* 1991; Antollini and Barrantes 1998; Antollini and Barrantes 2002; Antollini and Barrantes 2007). Este análisis aprovecha la propiedad de la sonda *Laurdan* de percibir con gran sensibilidad la polaridad y el dinamismo molecular de los dipolos presentes en su ambiente inmediato, reflejado en cambios importantes en su espectro de emisión como consecuencia de un proceso de relajación molecular que experimenta la sonda en presencia de estos dipolos. En una membrana biológica, los principales dipolos con los que la sonda *Laurdan*

interacciona son los provenientes de las moléculas de agua. Cuando la molécula de Laurdan se encuentra en una membrana lipídica en fase gel, es decir una membrana con un alto grado de orden lipídico y por tanto una baja polaridad, sufre un proceso de relajación molecular mucho menor que cuando esta sonda se ubica en una membrana de mayor polaridad o menor orden como es el caso de una fase líquido-cristalina, hechos que se reflejan en los espectros de emisión de la sonda fluorescente. A partir de estos espectros se calcula un valor de PG utilizando dos máximos característicos, uno correspondiente a la fase gel (I_{434}) y el otro a la fase líquido cristalina (I_{490}) (ver ecuación 7 en Materiales y métodos). Por lo tanto, frente a un bajo contenido de agua en la membrana no se produce la relajación de la sonda y los valores de la PG permanecen altos (es decir, a mayor orden de membrana, menor grado de penetración de las moléculas de agua, y mayor valor de PG).

En nuestro caso se obtuvieron los espectros de emisión de Laurdan luego de excitar la sonda en forma directa a 360 nm, lo que brinda información sobre el orden lipídico de la totalidad del sistema modelo de membrana estudiado. La Figura 27 muestra que a 4°C un sistema modelo conteniendo dominios *rafts* presenta un valor intermedio de la PG, entre el correspondiente al sistema modelo tipo-DSM, (POPC: SM: Col, 1:0,11:0,24), el cual tiene el menor orden de membrana, y el sistema modelo tipo-DRM, enriquecido en Col y SM, de mayor orden. La presencia del gangliósido GM1 en el modelo que contiene *rafts* no induce cambios en la PG (datos no mostrados). El aumento de la temperatura a 42°C produjo una disminución de los valores de PG en los tres sistemas analizados, lo que indica una disminución en el orden de las membranas en general; sin embargo, las diferencias de orden entre los modelos, relacionadas con su diferente

composición lipídica, persisten a esta temperatura.

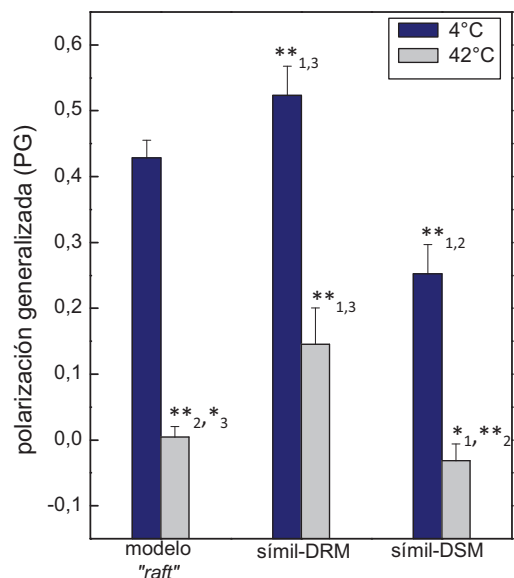


Figura 27. Polarización generalizada de la sonda Laurdan en tres modelos de membranas conteniendo AChR (1:250): membrana modelo *raft*, *símil-DRM* y *símil-DSM*. Los valores de GP fueron obtenidos a dos temperaturas distintas (4 y 42°C, columnas azules y grises, respectivamente). Cada columna corresponde a la media \pm D.E. de al menos cuatro mediciones independientes. *, ** Diferencias estadísticamente significativas entre las columnas de color azul o entre las columnas de color gris ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente), los subíndices indican el sistema de lípidos con el que la comparación mostró diferencias estadísticamente significativas (1, membrana que contiene *raft*, 2, modelo *símil-DRM*, y 3, modelo *símil-DSM*). Aunque no se muestra en la figura, las diferencias entre las columnas en gris y en azul en cada sistema de lípidos son estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

Análisis por FRET de las interacciones lípido-AChR

El estudio de los *rafts* de lípidos es complejo debido a su tamaño nanoscópico y a su comportamiento dinámico. La transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) constituye uno de los métodos directos más prometedores que se puede emplear en la actualidad para el estudio de los dominios

rafts, dada su resolución de escala nanométrica (Brown *et al.* 2007b; Brown *et al.* 2007a). Por lo que complementamos los estudios obtenidos mediante la utilización del detergente no-iónico Triton X-100 (método indirecto) con las mediciones de FRET entre la fluorescencia intrínseca de un solo triptófano del péptido γ M4, o de los 51 triptófanos del AChR completo, en calidad de donantes, y las sondas fluorescentes DHE o Laurdan comoceptoras (método directo). DHE, un análogo fluorescente del Col que se localiza preferentemente en los dominios lipídicos ordenados, ha sido utilizado en trabajos previos de nuestro laboratorio que permitieron determinar la partición preferencial del péptido γ M4 en fases ricas en Col en sistemas lipídicos binarios compuestos por POPC y Col (De Almeida *et al.* 2006; De Almeida *et al.* 2004). El análogo fluorescente del ácido láurico, la sonda fluorescente Laurdan, al no tener una partición preferencial por alguna de las fases lipídicas l_o o l_d , fue utilizado como sonda fluorescente control (Dietrich *et al.* 2001; Bagatolli *et al.* 1999).

En este análisis se compararon dos sistemas modelo de lípidos: un modelo que contiene *rafts* (relación molar POPC:SM:Col 1:1:1) y un sistema modelo similar-DRM (relación molar POPC:SM:Col 0.35:1:0.87) (Figura 28).

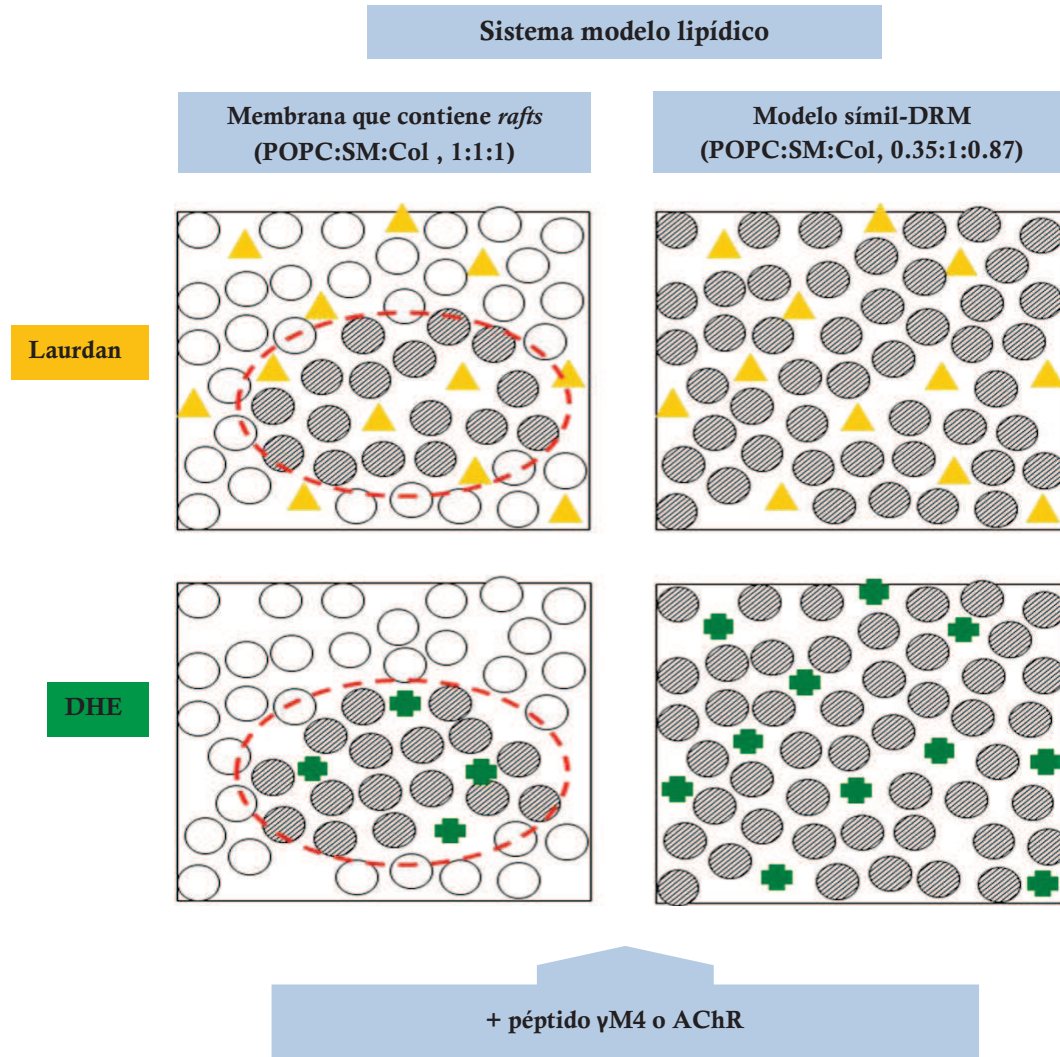


Figura 28. Sistemas modelo de lípidos utilizados en los estudios de FRET: una membrana que contiene *rafts* (POPC:SM:Col, 1:1:1 relación molar), donde hay una coexistencia de dos dominios diferentes de lípidos (\ominus , \circ para los dominios l_o análogos a los DRM y para los dominios l_d análogos a los DSM, respectivamente) y el modelo simil-DRM (POPC:SM:Col, 0.35:1:0.87 relación molar) que consiste en un único dominio l_o (\ominus). La sonda fluorescente Laurdan (\blacktriangle), utilizada como una sonda control, no muestra una partición preferencial por un dominio en particular. DHE (\oplus), utilizado como un mimético fluorescente del Col, marca los dominios l_o . Se obtuvieron las mediciones de FRET entre la fluorescencia intrínseca del péptido γ M4 o el AChR como sondas donantes, y Laurdan o DHE como sondas aceptoras.

La eficiencia del proceso de FRET (E) está relacionada con el grado de

solapamiento existente entre el espectro de emisión de las molécula donante y el espectro de absorción de las molécula aceptora, el rendimiento cuántico del donante, la orientación relativa de los dipolos de transición tanto del donante como del aceptor, y – lo más relevante aquí- la distancia entre las moléculas donante y aceptora (Lakowicz 1999). La E entre las moléculas donantes y las sondas aceptoras depende de la sexta potencia de la distancia presente entre ellas (ver Ecuación 4 en Materiales y métodos) (Lakowicz 2006). Utilizamos la relación entre dos valores de E calculados (razón o cociente E) como una medida del grado de localización del AChR en el plano de la membrana. Con este fin calculamos el cociente entre la E obtenida con el sistema modelo que contiene *rafts* y la obtenida con el sistema modelo símil-DRM (E_{raft}/E_{DRM}) utilizando la sonda DHE como aceptora (Ecuaciones 5 y 6 en Materiales y métodos). Como el sistema símil-DRM está constituido por sólo una fase, las moléculas donantes (AChR o péptido γ M4) y las moléculas aceptoras de DHE comparten entonces el mismo entorno en la membrana encontrándose cerca una de la otra, y en consecuencia, el valor de E calculado es el más alto posible. ¿Qué sucede en un sistema que presenta una coexistencia de fases tal como el sistema modelo que contiene *rafts*? DHE se encuentra predominantemente en el ámbito del *raft* o dominio l_o de la membrana, pudiendo ocurrir que el donante también se encuentre en este ámbito (es decir, las moléculas donantes y las moléculas aceptoras comparten el dominio) así el valor de E calculado debería ser similar al obtenido con el sistema símil-DRM, y por lo tanto, el cociente E (E_{raft}/E_{DRM}) sería cercano o igual a la unidad. Ahora, si el donante se encuentra en ambos dominios lipídicos, resultaría entonces en un cociente E significativamente menor (es decir, una fracción de las moléculas de donantes ubicadas en el dominio l_d no interactuarían con las moléculas aceptoras

ubicadas únicamente en el dominio l_o); y, finalmente se obtendría un cociente E cercano a cero si las moléculas donantes particionaran preferentemente en los dominios *no-raft* o l_d (véase las Figuras 28 y Figura 29).

Raft vs DRM

$$E_{raft}/E_{DRM} \geq 1 \quad \text{AChR} / \gamma\text{M4 en dominios } raft$$

$$E_{raft}/E_{DRM} < 1 \quad \text{AChR} / \gamma\text{M4 sin preferencia por dominios } raft$$

$$E_{raft}/E_{DRM} \sim 0 \quad \text{AChR} / \gamma\text{M4 en dominios } no-raft$$

DHE vs Laurdan

$$E_{DHE}/E_{Laurdan} > 1 \quad \text{AChR} / \gamma\text{M4 en dominios } raft$$

$$E_{DHE}/E_{Laurdan} > 0,5 \quad \text{AChR} / \gamma\text{M4 tiene preferencia por dominios } raft$$

$$E_{DHE}/E_{Laurdan} \sim 0,5 \quad \text{AChR} / \gamma\text{M4 sin preferencia por dominios } raft$$

$$E_{DHE}/E_{Laurdan} \sim 0 \quad \text{AChR} / \gamma\text{M4 en dominios } no-raft$$

Figura 29. Resumen de los posibles resultados para los distintos cocientes de las E utilizados para determinar la localización del AChR (o del péptido γM4) en la membrana en dominios *raft* o *no-raft*. Ver texto para una explicación más detallada.

En nuestros experimentos, el cociente E_{raft}/E_{DRM} obtenido fue algo superior a la unidad para el caso del péptido γM4 y por debajo de la unidad para el sistema con AChR (Figura 30). En concordancia con datos previos de nuestro laboratorio (De Almeida *et al.* 2006; De Almeida *et al.* 2004), estos resultados muestran que el péptido γM4 tiene una preferencia por los dominios *rafts* (enriquecidos en colesterol), mientras que el AChR parece no tener preferencia por alguno de los dominios.

En otra serie de experimentos, los dos sistemas modelo de lípidos reconstituidos, en este caso conteniendo al AChR en forma completa, fueron incubados a 42°C, temperatura a la cual el sistema que contiene *rafts* sólo presenta una fase (De Almeida *et al.* 2003), por lo que se obtendría un cociente E cercano a la unidad. Como se muestra en la Figura 30, la razón E obtenida a 42°C aumentó en forma significativa comparado con la obtenida a 4°C, lo que sugiere que a temperaturas más altas las moléculas de DHE establecen contacto con todas las macromoléculas de AChR, como ocurría en el caso del modelo símil-DRM.

La E -ratio también se midió utilizando como sonda aceptora Laurdan en lugar del DHE. Las moléculas de Laurdan particionan de manera uniforme en los dominios de lípidos l_o y l_d , y por lo tanto el cociente E es cercano a la unidad, independientemente de la partición de los donantes en una o en ambos tipos de fase (Figura 30).

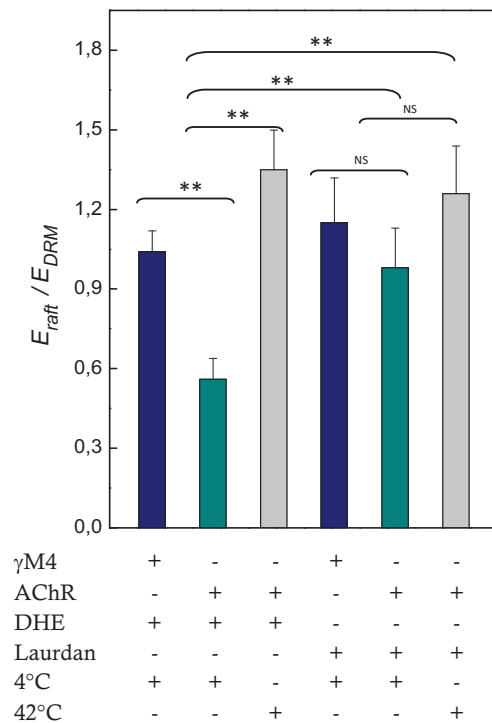


Figura 30. Cociente de las eficiencias de FRET entre la fluorescencia intrínseca del AChR purificado -o el péptido γ M4- como moléculas donantes y DHE -o Laurdan- como moléculas

aceptoras, obtenidas con el sistema de membrana que contiene *rafts* (E_{raft}) y con el sistema modelo símil-DRM (E_{DRM}), a 4°C y a 42°C.

Un parámetro adicional, que involucra al cociente de los valores E obtenidos con las dos sondas aceptoras, ($E_{DHE}/E_{Laurdan}$), se calculó a partir de los datos obtenidos con el sistema modelo que contiene *rafts*. Es necesario aclarar que se tuvieron en cuenta tanto las diferencias en el rendimiento cuántico como en la coincidencia entre los espectros de absorción de cada una de las dos moléculas aceptoras con respecto al espectro de emisión de fluorescencia de las moléculas donantes, realizando las correcciones necesarias (Figura 31). Para lograr esto, asumimos que los dos pares de donantes-aceptores tendrían la misma probabilidad de FRET en el sistema símil-DRM (al tener éste solo un fase), y por lo tanto, el cociente $E_{DHE}/E_{Laurdan}$ debería ser igual a la unidad. Los dos valores E calculados diferían, como consecuencia de las diferentes características de los dos pares donante-aceptor que se mencionaron previamente, por lo que la razón E se dividió por sí misma para obtener un valor de unidad. Para los cálculos a partir del modelo que contiene *rafts* se utilizó este cociente E como un factor de corrección. En este sistema, cuando las moléculas de los donantes residen en ambas fases en forma equivalente, el valor de E_{DHE} sería cercano a la mitad del valor de $E_{Laurdan}$ y por lo tanto el cociente $E_{DHE}/E_{Laurdan}$ sería aproximadamente 0,5; si las moléculas de los donantes se localizan en los dominios *rafts*, E_{DHE} sería significativamente más alto que $E_{Laurdan}$, y su cociente mayor que uno; por otro lado si los donantes prefieren los dominios no-*rafts* (ver Figuras 28 y 29 para una explicación más extensa), el cociente sería cercano a cero. En el caso del péptido γ M4, se obtuvo una razón $E_{DHE}/E_{Laurdan}$ cercana a la unidad (Figura 32), concordante con la información derivada del cociente E_{raft}/E_{DRM} y también con los datos obtenidos en los

experimentos de extracción con detergente, lo que indica que el péptido γ M4 se localiza preferentemente en los dominios enriquecidos en Col. En el caso del AChR, el cociente E fue significativamente menor que el obtenido con γ M4, indicando que el AChR no tiene una afinidad preferencial por los dominios enriquecidos en Col. (Figura 32). Cuando las mediciones en el sistema modelo que contiene *rafts* y al AChR se tomaron a 42°C, se obtuvo una razón $E_{DHE}/E_{Laurdan}$ cercana a la unidad, señalando que a temperaturas más altas, tanto DHE como Laurdan establecen contacto con todas las moléculas de AChR indicando que la separación en dominios del sistema tiende a desaparecer.

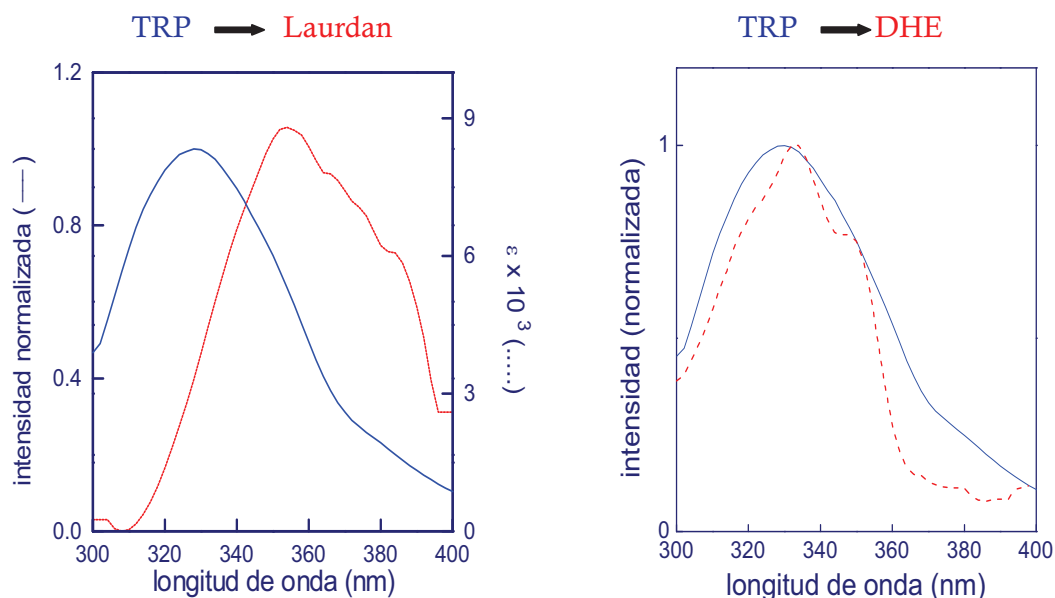


Figura 31. Solapamiento del espectro de absorción de cada una de las sondas aceptoras (Laurdan o DHE, línea punteada roja) con el espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca del péptido γ M4 o del AChR (línea continua azul). Como se puede observar el DHE presenta una mayor coincidencia de los espectros, por lo que se efectuaron las correcciones detalladas en el texto para el cálculo del cociente $E_{DHE}/E_{Laurdan}$.

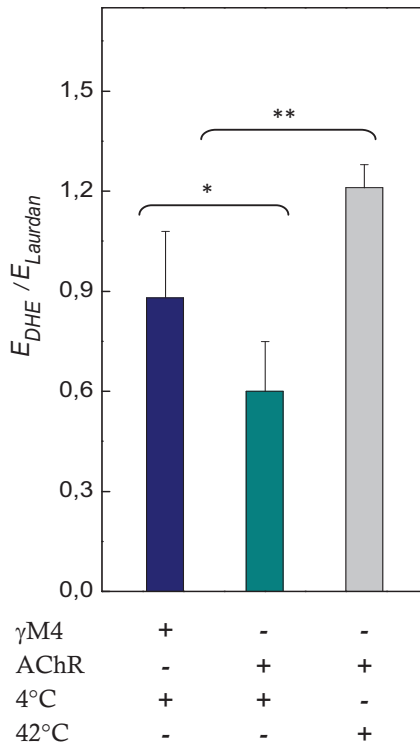


Figura 32. Cociente de las eficiencias de FRET entre la fluorescencia intrínseca del AChR purificado -o el péptido γ M4- como moléculas donantes y DHE (E_{DHE}) o Laurdan ($E_{Laurdan}$) como moléculas aceptoras en el sistema de membrana que contiene *rafts*, a 4°C y 42°C. Cada columna corresponde a la media \pm D.E. de al menos cuatro mediciones independientes. *, ** Diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas de lípidos unidos por el corchete ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente). NS, sin diferencias significativas ($p < 0,05$).

Discusión

En la presente Tesis se buscó profundizar en la caracterización de la interrelación del AChR con su entorno lipídico, no en cuanto a algún lípido en particular, sino con respecto a dominios lipídicos completos separados lateralmente en la membrana. Tales "heterogeneidades laterales" constituyen verdaderas plataformas involucradas en multiplicidad de sistemas de señalización celular. Para ello se eligió el tipo de AChR con mejor caracterización en la literatura, el obtenido a partir del tejido eléctrico de *Torpedo*. El AChR completo purificado a partir de *T. californica*, se reconstituyó en membranas modelo con proporciones definidas de Col, SM y PC, y luego se procedió al análisis de su distribución en la membrana mediante técnicas bioquímicas y biofísicas. El comportamiento del receptor completo en estos sistemas modelo se comparó con el del péptido sintético γ M4, con el objetivo de aprender acerca de la contribución del anillo exterior del segmento TM, en contacto directo con los lípidos, en la supuesta segregación lateral en la membrana del AChR.

Las mezclas ternarias de lípidos se utilizan para generar sistemas modelo con coexistencia de fases de dominios líquido-ordenados y líquido desordenados, distribución lateral que se asemejaría a la formación de dominios *rafts*, los cuales tendrían características de fase l_0 en la membrana celular (Brown 2006). Usualmente están compuestas por un lípido con alta temperatura de transición gel-líquido (T_m) –una PC saturada o un esfingolípidos-, por un lípido con baja T_m (usualmente una PC insaturada) y Col (Ahmed *et al.* 1997; Silvius 2005; De Almeida *et al.* 2003). En nuestro sistema elegimos para el primer caso a la SM de cerebro bovino, como lípido de baja T_m a POPC, y por último al Col. Este sistema sería

más relevante biológicamente, ya que la SM proviene de una fuente natural, y POPC es un componente importante de los lípidos extraídos de algunas muestras biológicas, como por ejemplo la PC del huevo (Veatch and Keller 2005a;De Almeida *et al.* 2003). De esta manera se trabaja con un entorno bien controlado, y se puede determinar en forma directa la afinidad intrínseca (o la falta de ella) que el AChR o el péptido γ M4 muestran por los dominios lipídicos l_o .

Los análisis bioquímicos demostraron que el péptido γ M4 reconstituido en un sistema modelo de POPC:SM:Col de proporciones equimolares, particionó preferentemente en la fracción DRM (Figura 16), mientras que el AChR completo no mostró una partición preferencial entre las fracciones DRM y DSM (Figuras 17 y 19). Para el caso de los proteoliposomas con AChR, luego del tratamiento con Triton X-100, además del método de solo centrifugación, se realizaron también gradientes de densidad de sacarosa discontinuos, para descartar un posible error metodológico por el gran peso que incorpora a los liposomas la presencia del AChR. A su vez en esta metodología complementaria, incorporamos la modificación que recomiendan Ayuyan y Cohen (Ayuyan and Cohen 2008), que implica cargar el material que contiene *rafts* en la parte superior del gradiente de sacarosa, y de esta manera la muestra se ubicaría en el gradiente de acuerdo a la densidad de la membrana. De esta manera obtuvimos un resultado similar (Figura 19 y Tabla 1) al del método de solo ultracentrifugación, validando esta última metodología para proteoliposomas.

Si bien la insolubilidad en Triton X-100 en frío es un criterio generalmente aceptado para evaluar el estado de fase en las membranas modelo (Brown 2006), resulta controvertida la extrapolación del estado de fase de membranas biológicas

nativas a partir de su solubilidad en detergente. Por esta razón, los resultados de los experimentos con Triton X-100 fueron confrontados con los de otra estrategia experimental que no involucra una separación física de las fracciones de lípidos. Con este fin, se hicieron experimentos de FRET utilizando DHE, una sonda mimética del Col, como aceptor de la fluorescencia intrínseca del AChR completo o del péptido γ M4, para evaluar la coexistencia de dominios de membrana en los sistemas modelo estudiados. La fluorescencia intrínseca del AChR proviene de los 51 residuos de Trp y de los 80 residuos de Tyr que están presentes en el AChR de *T.californica*, aunque la emisión de los Trp domina el espectro y es la que evaluamos experimentalmente (Barrantes 2004). En el caso del péptido γ M4, la fluorescencia intrínseca proviene solo de un Trp en su estructura, que se encuentra en la posición 6 de los 28 AA que lo conforman. Se necesitaron varios controles para los experimentos de FRET: liposomas que presentan sólo un dominio de lípidos enriquecido en Col, el uso de la sonda fluorescente Laurdan que particiona tanto en dominios l_o como en dominios l_d , la exposición a diferentes temperaturas, etc. En los experimentos de FRET se calcularon un par de cocientes a partir de las E obtenidas con el sistema modelo que contiene *rafts* y el sistema DRM con las sondas aceptoras DHE y Laurdan, para poder determinar la partición del péptido γ M4 y del AChR en los dominios de membrana, ya sean ricos en Col donde se encuentra mayormente DHE o pobres en Col. El cociente entre la E obtenida con el sistema modelo que contiene *rafts* y la obtenida con el sistema modelo símil-DRM (E_{raft}/E_{DRM}), utilizando la sonda DHE como aceptora, para el caso del péptido γ M4 fue algo superior a la unidad y de $\sim 0,5$ para el sistema con AChR (Figura 30). Estos valores indican que el péptido γ M4 se encuentra en dominios ricos en colesterol, mientras que el AChR no tiene una afinidad preferencial por alguno de los

dominios. Por otro lado, el cociente de los valores E obtenidos con las dos sondas aceptoras, ($E_{DHE}/E_{Laurdan}$), se calculó a partir de los datos obtenidos con el sistema modelo que contiene *rafts*. En el caso del péptido γ M4 se obtuvo una razón cercana a la unidad, y para el AChR, el cociente E fue significativamente menor que el obtenido con γ M4 (Figura 32). Por lo que el péptido γ M4 se encuentra preferentemente en los dominios ricos en Col, mientras que el AChR presentaría una ubicación similar en los dominios ricos en Col y en los dominios pobres en Col, concordante en ambos casos con la información derivada del cociente E_{raft}/E_{DRM} . En conjunto, estos resultados señalan de forma inequívoca que el péptido γ M4 se localiza en forma preferencial en dominios enriquecidos en Col (Figuras 30 y 32), en acuerdo con los resultados de los experimentos bioquímicos. Por el contrario, el AChR completo en un sistema modelo con coexistencia de dominios lipídicos (4°C) no mostró una afinidad preferencial por los dominios enriquecido en Col, al igual que lo que se observó en los experimentos con detergente. En los experimentos de Zhu et al. (Zhu *et al.* 2006), en condiciones "basales" la mayoría del AChR se asocia con dominios de membrana *no-raft*, y ciertos estímulos como la agrina neuronal desplaza una fracción del AChR y de MuSK hacia los dominios *rafts*.

A 42°C, el sistema modelo presenta sólo una fase lipídica, y por lo tanto las moléculas donantes y aceptoras comparten el mismo ambiente, y esto se refleja en los cocientes de FRET cercanos a la unidad en ambos casos (Figuras 30 y 32).

En un trabajo previo de nuestro laboratorio, Antollini y colaboradores (Antollini *et al.* 2005) hallaron que la orientación del péptido γ M4 en la membrana

es sensible al espesor de bicapa y a su composición lipídica, variando su ángulo de inclinación en función del ancho de la bicapa y del contenido de Col. En otros trabajos se encontró que en liposomas compuestos por POPC y Col, la presencia de una fase l_0 rica en Col favorece la formación de parches enriquecidos en el péptido γ M4 (De Almeida *et al.* 2004;De Almeida *et al.* 2006). Estos trabajos coinciden en postular que la adaptación del péptido al espesor bicapa implica la superación de la desigualdad hidrofóbica que se produciría entre la longitud del péptido y el ancho de la membrana. Los DRM extraídos de bicapas que contienen *rafts* tienen una estructura hidrocarbonada un ~25% más ancha que la de los DSM (Gandhavadi *et al.* 2002). Las fracciones DRM obtenidas a partir del sistema POPC:SM:Col 1:1:1 que contiene el péptido γ M4, estaban enriquecidas en Col y SM (Figura 24), en acuerdo con lo hallado en estudios previos en sistemas similares (Schroeder *et al.* 1994). En las fracciones de DRM los lípidos presentes formarían una fase l_0 (Dietrich *et al.* 2001;Ahmed *et al.* 1997). La preferencia demostrada del péptido γ M4 por los dominios l_0 constituye un hecho poco común, ya que en la mayoría de los casos estudiados, los péptidos transmembrana en membranas modelo se ubican en la fase l_d (Gandhavadi *et al.* 2002;McIntosh *et al.* 2003;Vidal and McIntosh 2005;Kalvodova *et al.* 2005;Hammond *et al.* 2005;Bacia *et al.* 2004;Fastenberg *et al.* 2003).

El monosialogangliósido GM1 es un glicoesfingolípido cuya porción lipídica lo une a la hemicapa exterior de la membrana celular, y se ha asociado su presencia con los *rafts* lipídicos, a tal punto que se lo utiliza como marcador de este tipo de dominios. En nuestro laboratorio se demostró previamente que GM1 es una de los principales gangliósidos en las membranas enriquecidas en AChR purificadas a partir del tejido eléctrico de *T. marmorata* y colocaliza con el AChR en la

membrana ventral innervada de los electrocitos (Marcheselli *et al.* 1993). También se ha encontrado que GM1 colocaliza con el AChR y el Col en la UNM del músculo esternocleidomastoideo de rata (Pato *et al.* 2008), y en el músculo del diafragma de rata y en miotubos C2C12 (Zhu *et al.* 2006). La sustitución del 2% de la SM por GM1 en el sistema 1:1:1 POPC:SM:Col no produjo ningún efecto estadísticamente significativo en la partición del AChR entre las fracciones DRM y DSM (Tabla 1).

La agrupación artificial de lípidos se ha utilizado como una herramienta para caracterizar la posible asociación de proteínas y lípidos con los *rafts* en membranas modelo (Hammond *et al.* 2005; Kalvodova *et al.* 2005) y en células (Mitchell *et al.* 2002; Harder *et al.* 1998; Mitchell *et al.* 2009). Cuando se entrecruzó GM1 mediante CTxB y un anticuerpo contra CTx, se produjo un aumento significativo de la cantidad de AChR en la fracción de DSM (Figura 21 y Tabla 1). Esto podría implicar que el entrecruzamiento de GM1 con CTxB provoca una disminución en la afinidad del AChR por los dominios DRM. Otra posible explicación, sería una posible repulsión estérica que prevenga la presencia del AChR en los dominios agregados que contienen GM1. Cabe señalar que la afinidad y selectividad de los gangliósidos por el AChR en su membrana nativa es más bien baja (Mantipragada *et al.* 2003).

La unión neuromuscular madura se caracteriza por la alta densidad de moléculas de AChR en la membrana postsináptica, en grandes agrupaciones supramoleculares (Barrantes 2004; Lin *et al.* 2001). En estudios previos se ha propuesto que el agrupamiento de ciertas proteínas puede modificar su partición en *rafts* (Tong *et al.* 2009), y en el caso del AChR, varios trabajos señalan que los *rafts* serían necesarios para su agrupamiento en la membrana (Willmann *et al.* 2006; Zhu

et al. 2006; Stetzkowski-Marden *et al.* 2006a; Pato *et al.* 2008; Campagna and Fallon 2006). Aquí mostramos que el AChR solo, en una muestra muy concentrada, no parece formar agregados de orden superior, ya que no se observa un cambio en la distribución del AChR en el gradiente de sacarosa luego del tratamiento con detergente (Figuras 17 y 19). El proceso de agrupamiento del AChR en la membrana postsináptica es un mecanismo que implica proteínas extracelulares, integrales y periféricas de la membrana, y dentro de estas últimas se encuentra la rapsina, proteína que juega un papel clave en este proceso. La rapsina estaría asociada a *rafts* lipídicos, junto con el AChR, en los compartimentos finales de la vía exocítica (Marchand *et al.* 2002) y en la membrana plasmática (Stetzkowski-Marden *et al.* 2006b; Willmann *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2006). La rapsina es objeto de modificaciones postranslacionales, una de las cuales es la acilación con el ácido graso mirístico, covalentemente unido a la *pars* proteica (Musil *et al.* 1988), el cual es necesario para su unión a la membrana. Marchand *et al.* (16) postularon que esta modificación de la proteína puede ser la responsable de su asociación con las *rafts* lipídicos, ya que muchas proteínas aciladas, algunas de ellas miristoiladas, están asociadas a los *rafts* lipídicos. En este trabajo de Tesis, liposomas de POPC:SM:Col 1:1:1 conteniendo AChR y un extracto enriquecido en rapsina, en diferentes proporciones rapsina:AChR (1:1, 2:1, 4:1), se sometieron a la extracción por detergente. Independientemente de sus cantidades relativas en el sistema inicial, después del tratamiento con Triton X-100 la rapsina y el AChR particionaron conjuntamente, sin mostrar diferencias significativas en relación con los resultados de partición del AChR obtenidos para el mismo sistema sin rapsina (Figura 22, Tabla 1). Por lo tanto, la incorporación de rapsina al sistema no produjo ningún efecto sobre la asociación del AChR con los DRM.

La distribución de los lípidos entre las fracciones DRM y DSM después de la extracción con detergente de los liposomas POPC:SM:Col 1:1:1, en ausencia de proteína, reveló que la fracción de DRM estaba altamente enriquecida en Col y SM, mientras que la fracción DSM estaba altamente enriquecida en POPC (Figuras 23 y 24), en concordancia con estudios previos en sistemas modelo similares (Gandhavadi *et al.* 2002; Schroeder *et al.* 1994; McIntosh *et al.* 2003). Cuando se incluyó al AChR purificado o al péptido γ M4 en el sistema reconstituido en diferentes proporciones lípido:proteína, no se observaron diferencias significativas en la composición lipídica de las fracciones DRM y DSM, lo que sugiere que la composición lipídica de las fracciones es independiente del contenido de proteína (Figuras 24 y 25). En estudios recientes utilizando vesículas de lípidos con la misma composición que la usada en el presente trabajo (Col/SM/POPC), se observó una coexistencia de dominios ($l_d + l_o$) con técnicas de resolución nanométrica (Pokorny *et al.* 2006; Frazier *et al.* 2007), o sólo un tipo de dominio utilizando microscopía de fluorescencia (Veatch and Keller 2003), que tiene una menor resolución de escala micrométrica. Es interesante comparar las composiciones lipídicas de las fracciones DRM y DSM obtenidas a partir de los liposomas estudiados (Figura 24), con el diagrama de fase postulado por Pokorny y colaboradores (Pokorny *et al.* 2006) (Figura 33), teniendo en cuenta que con la extracción de detergente a 4°C se trata de un sistema cuaternario. Como se muestra en la figura 33, la composición de las fracciones DRM obtenidas para todos los sistemas evaluados caen dentro de la región que corresponde a dominios l_o , al igual que otros DRM obtenidas a partir de liposomas formados con otros tipos de lípidos aunque de similar composición (PC de hígado de bovino, Col, y SM (50) y DOPC, Col, y SM (51)). Por el contrario,

todas las fracciones DSM obtenidas caen dentro de la región de coexistencia de fases $l_o + l_d$, lo que sugiere que esta fracción no es una fase homogénea.

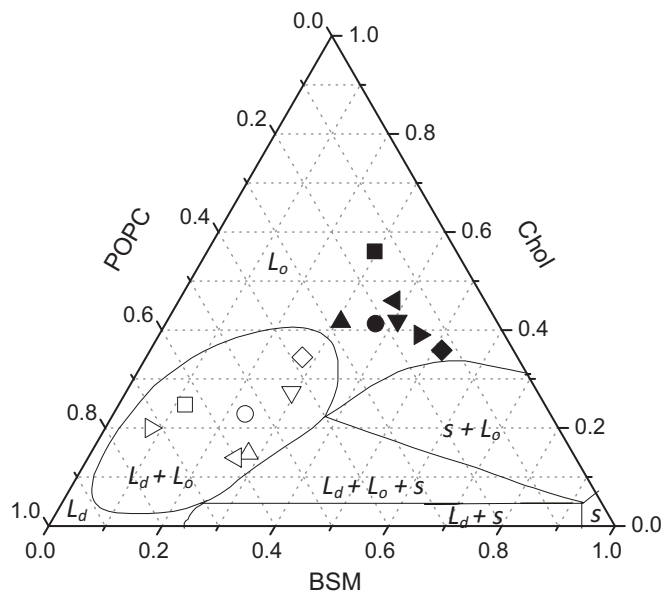


Figura 33. Triángulo de Gibbs que muestra las composiciones de las DRM (sólido) y DSM (abierto) para todos los sistemas estudiados en este trabajo: tipo-DRM (■), tipo-DSM (□), distintas membranas que contienen *rafts* i) en ausencia de AChR (●, ○), ii) en presencia del péptido γ M4 (1:250 ▲, △), y iii) en presencia de diferentes relaciones molares AChR:lípido (1:400 ▼, ▽, y 1:130 ◆, ◇). Se indican también las composiciones lipídicas de DRM y DSM propuestas por Schroeder et al. (Schroeder *et al.* 1994) y McIntosh et al. (McIntosh *et al.* 2003) (<, <; y >, >, respectivamente). También se muestran las líneas que dividen el diagrama de fases en las distintas fases puras (*s*, sólida, l_o , líquida ordenada, y l_d , líquida desordenada) y las diferentes regiones con coexistencia de fases a 22 ° C ($s + l_o$; $l_d + l_o + s$; $l_d + s$, y $l_d + l_o$), propuesto por Pokorny y colaboradores (Pokorny *et al.* 2006).

La presencia del AChR completo o del péptido en los sistemas lipídicos introdujo cambios en la cantidad de lípido total obtenida para las fracciones DRM

y DSM. En el caso del péptido γ M4 se produjo un incremento en la cantidad de lípidos correspondiente a la fracción DRM, con una concomitante disminución en la fracción DSM. La presencia del AChR provocó una disminución significativa en los lípidos totales correspondientes a la fracción DRM en forma independiente a la relación molar AChR:lípido utilizada (Figura 26). Por lo que inferimos que el péptido γ M4 actuaría como un promotor de DRM y el AChR, por el contrario, actuaría como un perturbador de DRM.

Otra manera de entender la distribución del péptido γ M4, del AChR y de los distintos lípidos en las fracciones, fue mediante el cálculo de variantes termodinámicas como la energía libre aparente de transferencia (ΔG_a) desde las fracciones DSM hacia las fracciones DRM.

En el sistema de solo lípidos, tanto para el Col como la SM se requerían \sim 0,3 kcal/mol para transferirlos, mientras que para POPC se necesitaban \sim 0,5 kcal/mol (Tabla 3). Por lo tanto para el Col y la SM resulta favorable energéticamente particionar hacia los dominios DRM desde los dominios DSM, y lo contrario ocurre para el POPC, como era esperable en todos los casos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por McIntosh y colaboradores (McIntosh *et al.* 2003), aunque de magnitud un poco menor en todos los casos, probablemente debido a que utilizaron DOPC mientras que en este trabajo se utilizó POPC. La presencia de este último lípido en el sistema generaría menores diferencias entre los dominios l_o y l_d , pero el hecho de que contenga POPC, en vez de DOPC, lo hace más relevante biológicamente (De Almeida *et al.* 2003).

El péptido γ M4 obtuvo un valor de ΔG_a muy cercano a 0, es decir al equilibrio, resultado diferente al hallado por McIntosh y colaboradores (McIntosh

et al. 2003) con péptidos de tamaño similar que arrojaron valores positivos de ΔG_a . Por lo que $\gamma M4$ particiona hacia los dominios DRM desde los dominios DSM sin gastos de energía, lo cual no coincidiría con el comportamiento de muchos péptidos de características similares que tienen una marcada preferencia por los dominios l_d , como se mencionó previamente en esta sección. En cuanto al comportamiento de los lípidos en el sistema que contiene péptido, resulta únicamente significativo el valor de ΔG_a para el Col, ya que presentó un valor más negativo en comparación con el valor obtenido para el Col en el sistema lipídico sin péptido (Tabla 3). Esto significaría que la presencia del péptido en la bicapa generaría un ambiente más favorable para la partición del Col en los dominios DRM. Este resultado sostiene el propuesto rol del péptido $\gamma M4$ como promotor de dominios DRM. De esta manera, la mayor cantidad de péptido localizado en estos dominios, ahora predominantes, se encontrarían en una concentración semejante a la de los pocos péptidos localizados en los dominios DSM minoritarios (Tabla 4 y Figura 34).

Tabla 4. Concentración del péptido $\gamma M4$ y del AChR en las fracciones DRM y DSM

Sistema modelo	[P/L] mol/mol	[P/L] mol/mol
	DRM	DSM
$\gamma M4$ 1:250	0,0038 \pm 0,0005	0,0043 \pm 0,0022
AChR 1:400	0,0040 \pm 0,0009	0,0017 \pm 0,0005
AChR 1:130	0,0149 \pm 0,0018	0,0055 \pm 0,0007

[P/L] corresponde a la relación molar del contenido de péptido $\gamma M4$ o de AChR con respecto al contenido lipídico total de las fracciones DRM o DSM. Los valores son representativos de la media \pm D.E. de tres o cuatro experimentos independientes.

Para el AChR se obtuvieron valores negativos de ΔG_a similares en las dos proporciones de AChR:lípido estudiadas (Tabla 3). Por lo tanto, a la

macromolécula receptora completa le resulta energéticamente favorable el cambio de ubicación hacia los dominios DRM. Por otro lado, en estos sistemas el Col mostró una disminución de la magnitud de la ΔG_a (se hace menos negativa) en comparación con los valores obtenidos en el sistema sin receptor, de manera dependiente de la relación molar AChR:lípido utilizada (Tabla 3). Este resultado es consecuente con la disminución del tamaño del dominio DRM observada previamente en este sistema. Así, la proporción de AChR en los disminuidos dominios DRM estaría en una concentración superior a la correspondiente al AChR en los dominios DSM mayoritarios, en las dos relaciones AChR:lípido evaluadas (Tabla 4 y Figura 34).

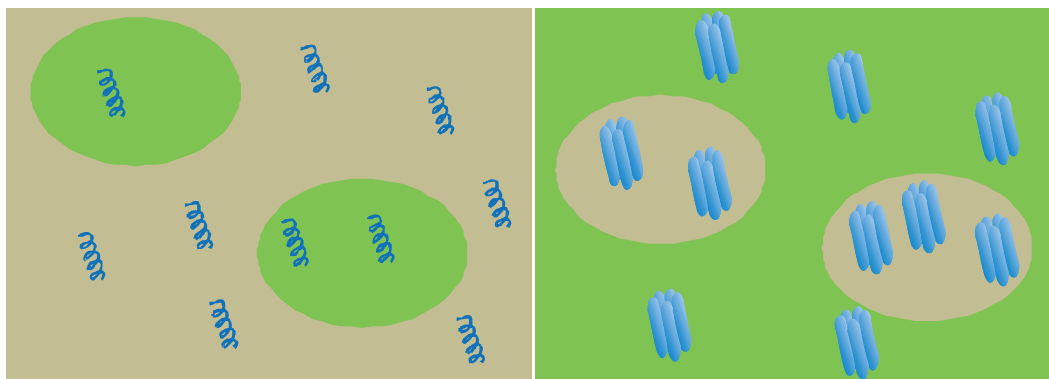


Figura 34. Distribución del péptido $\gamma M4$ y del AChR en el sistema Col:SM:POPC 1:1:1 entre los dominios *rafts* (■) y los dominios *no-rafts* (■).

Estos resultados indicarían que a pesar de que el AChR particiona en forma energéticamente favorable en los DRM, la disminución del tamaño de los mismos llevaría a la distribución del AChR en proporciones casi equivalentes entre los dominios DRM y DSM (Tabla 1). *El AChR actuaría entonces como un perturbador de los dominios DRM.*

Conclusiones generales

En esta Tesis, focalizada en aspectos bioquímicos y fisicoquímicos del receptor de acetilcolina nicotínico, se propuso estudiar con qué tipo de organización lipídica establece contactos, predominantemente, esta proteína integral de membrana utilizando como modelo el AChR de tipo muscular embrionario presente en el órgano eléctrico de peces marinos, y una región de dicha proteína (el segmento γ M4 del AChR de *Torpedo*).

Demostramos que el paradigmático segmento transmembrana de mayor contacto con los lípidos (el péptido γ M4) se encuentra predominantemente en los dominios líquido-ordenados. Por otro lado, el AChR completo no muestra preferencias ni por dominios lipídicos líquido-ordenados ni por los dominios DSM. Estos resultados indican que el anillo exterior de la región transmembrana del AChR en contacto directo con los lípidos es capaz de autosegregarse lateralmente en la membrana, si bien otras fuerzas contribuyen para que la molécula completa del AChR guarde otro comportamiento. Por otra parte, el AChR se comporta *in vitro* como perturbador de DRM, ya que su presencia induce una disminución significativa en la cantidad de fracción DRM, ocurriendo lo contrario para γ M4, que se comporta como promotor de DRM, aumentando la proporción de DRM.

Podemos inferir que la predilección del AChR en su medio natural por un dominio dado de lípidos no puede ser atribuida exclusivamente a las propiedades fisicoquímicas de ambos o a las interacciones entre el dominio TM de la proteína y el ambiente lipídico, por lo que debería haber señales exteriores en las membranas celulares nativas que direccionen al AChR hacia un dominio de membrana específico.

Bibliografía

Bibliografia

- Ahmed S. N., Brown D. A. and London E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 36, 10944-10953.
- Allen J. A., Halverson-Tamboli R. A. and Rasenick M. M. (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 128-140.
- Anderson R. G. and Jacobson K. (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296, 1821-1825.
- Antollini S. S. and Barrantes F. J. (1998) Disclosure of discrete sites for phospholipid and sterols at the protein-lipid interface in native acetylcholine receptor-rich membrane. *Biochemistry* 37, 16653-16662.
- Antollini S. S. 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 S. S. and Barrantes F. J. (2007) Laurdan studies of membrane lipid-nicotinic acetylcholine receptor protein interactions. *Methods Mol. Biol.* 400, 531-542.
- Antollini S. S., Soto M. A., Bonini d. R., I, Gutierrez-Merino C., Sotomayor P. and Barrantes F. J. (1996) Physical state of bulk and protein-associated lipid in nicotinic acetylcholine receptor-rich membrane studied by laurdan generalized polarization and fluorescence energy transfer. *Biophys. J.* 70, 1275-1284.
- Antollini S. S., Xu Y., Jiang H. and Barrantes F. J. (2005) Fluorescence and molecular dynamics studies of the acetylcholine receptor gammaM4 transmembrane peptide in reconstituted systems. *Mol. Membr. Biol.* 22, 471-483.
- Apel E. D., Glass D. J., Moscoso L. M., Yancopoulos G. D. and Sanes J. R. (1997) Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* 18, 623-635.
- Arias H. R., Sankaram M. B., Marsh D. and Barrantes F. J. (1990) Effect of local anaesthetics on steroid-nicotinic acetylcholine receptor interactions in native membranes of *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochim. Biophys. Acta* 1027, 287-294.
- Ayuyan A. G. and Cohen F. S. (2008) Raft composition at physiological temperature and pH in the absence of detergents. *Biophys. J.* 94, 2654-2666.
- Babiychuk E. B. and Draeger A. (2006) Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem. J.* 397, 407-416.
- Bacia K., Schuette C. G., Kahya N., Jahn R. and Schwille P. (2004) SNAREs prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *J. Biol. Chem.* 279, 37951-37955.
- Bagatolli L. A., Parasassi T., Fidelio G. D. and Gratton E. (1999) A model for the interaction of 6-lauroyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with lipid environments: implications for spectral properties. *Photochem. Photobiol.* 70, 557-564.

- Baier C. J. and Barrantes F. J. (2007) Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J. Neurochem.* 101, 1072-1084.
- Baird B., Sheets E. D. and Holowka D. (1999) How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys. Chem.* 82, 109-119.
- Barrantes F. J. (1982) Oligomeric forms of the membrane-bound acetylcholine receptor disclosed upon extraction of the Mr 43,000 nonreceptor peptide. *J. Cell Biol.* 92, 60-68.
- Barrantes F. J. (1989) The lipid environment of the nicotinic acetylcholine receptor in native and reconstituted membranes. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24, 437-478.
- Barrantes F. J. (2003) Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 6, 620-632.
- Barrantes F. J. (2004) Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 47, 71-95.
- Barrantes F. J. (2007) Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *J. Neurochem.* 103 Suppl 1, 72-80.
- Barrantes F. J., Antollini S. S., Blanton M. P. and Prieto M. (2000) Topography of nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *J. Biol. Chem.* 275, 37333-37339.
- Barrantes F. J., Bermudez V., Borroni M. V., Antollini S. S., Pediconi M. F., Baier J. C., Bonini I., Gallegos C., Roccamo A. M., Valles A. S., Ayala V. and Kamerbeek C. (2010) Boundary lipids in the nicotinic acetylcholine receptor microenvironment. *J. Mol. Neurosci.* 40, 87-90.
- Bhushan A. and McNamee M. G. (1993) Correlation of phospholipid structure with functional effects on the nicotinic acetylcholine receptor. A modulatory role for phosphatidic acid. *Biophys. J.* 64, 716-723.
- Bligh. G. and Dyer W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 37, 911-917.
- Bonini d. R., I, Roccamo de Fernandez A. M. and Barrantes F. J. (1987) Extraction of peripheral proteins is accompanied by selective depletion of certain glycerophospholipid classes and changes in the phosphorylation pattern of acetylcholine-receptor-rich-membrane proteins. *Biochem. J.* 245, 111-118.
- Bonini I. C., Antollini S. S., Gutierrez-Merino C. and Barrantes F. J. (2002) Sphingomyelin composition and physical asymmetries in native acetylcholine receptor-rich membranes. *Eur. Biophys. J.* 31, 417-427.
- Borges L. S. and Ferns M. (2001) Agrin-induced phosphorylation of the acetylcholine receptor regulates cytoskeletal anchoring and clustering. *J. Cell Biol.* 153, 1-12.
- Bouzat C., Roccamo A. M., Garbus I. and Barrantes F. J. (1998) Mutations at lipid-exposed residues of the acetylcholine receptor affect its gating kinetics. *Mol. Pharmacol.* 54, 146-153.
- Brannigan G., Henin J., Law R., Eckenhoff R. and Klein M. L. (2008) Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 14418-14423.
- Brown A. C., Towles K. B. and Wrenn S. P. (2007a) Measuring raft size as a function of membrane composition in PC-based systems: Part 1--binary systems. *Langmuir* 23, 11180-11187.

- Brown A. C., Towles K. B. and Wrenn S. P. (2007b) Measuring raft size as a function of membrane composition in PC-based systems: Part II--ternary systems. *Langmuir* 23, 11188-11196.
- Brown D. A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology. (Bethesda.)* 21, 430-439.
- Brown D. A. and London E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 111-136.
- Brown D. A. and Rose J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Bruses J. L., Chauvet N. and Rutishauser U. (2001) Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J. Neurosci.* 21, 504-512.
- Burger K., Gimpl G. and Fahrenholz F. (2000) Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 1577-1592.
- Camilleri A. A., Willmann R., Sadasivam G., Lin S., Ruegg M. A., Gesemann M. and Fuhrer C. (2007) Tyrosine phosphatases such as SHP-2 act in a balance with Src-family kinases in stabilization of postsynaptic clusters of acetylcholine receptors. *BMC. Neurosci.* 8, 46.
- Campagna J. A. and Fallon J. (2006) Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* 138, 123-132.
- Chamberlain L. H. (2004) Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett.* 559, 1-5.
- Connolly C. N. and Wafford K. A. (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 529-534.
- Corbin J., Wang H. H. and Blanton M. P. (1998) Identifying the cholesterol binding domain in the nicotinic acetylcholine receptor with [125I]azido-cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1414, 65-74.
- Criado M., Eibl H. and Barrantes F. J. (1982) Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. *Biochemistry* 21, 3622-3629.
- Criado M., 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.
- daCosta C. J., Ogrel A. A., McCardy E. A., Blanton M. P. and Baenziger J. E. (2002) Lipid-protein interactions at the nicotinic acetylcholine receptor. A functional coupling between nicotinic receptors and phosphatidic acid-containing lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 277, 201-208.
- daCosta C. J., 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. *J. Biol. Chem.* 279, 14967-14974.
- Dalziel A. W., Rollins E. S. and McNamee M. G. (1980) The effect of cholesterol on agonist-induced flux in reconstituted acetylcholine receptor vesicles. *FEBS Lett.* 122, 193-196.

- De Almeida R. F., Fedorov A. and Prieto M. (2003) Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.* 85, 2406-2416.
- De Almeida R. F., Loura L. M., Fedorov A. and Prieto M. (2005) Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J. Mol. Biol.* 346, 1109-1120.
- De Almeida R. F., Loura L. M., Prieto M., Watts A., Fedorov A. and Barrantes F. J. (2004) Cholesterol modulates the organization of the gammaM4 transmembrane domain of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 86, 2261-2272.
- De Almeida R. F., Loura L. M., Prieto M., Watts A., Fedorov A. and Barrantes F. J. (2006) Structure and dynamics of the gammaM4 transmembrane domain of the acetylcholine receptor in lipid bilayers: insights into receptor assembly and function. *Mol. Membr. Biol.* 23, 305-315.
- Dietrich C., Bagatolli L. A., Volovyk Z. N., Thompson N. L., Levi M., Jacobson K. and Gratton E. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.* 80, 1417-1428.
- Elgoyhen A. B., Katz E. and Fuchs P. A. (2009) The nicotinic receptor of cochlear hair cells: a possible pharmacotherapeutic target? *Biochem. Pharmacol.* 78, 712-719.
- Ellena J. F., Blazing M. A. and McNamee M. G. (1983) Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor. *Biochemistry* 22, 5523-5535.
- Elliott J., Blanchard S. G., Wu W., Miller J., Strader C. D., Hartig P., Moore H. P., Racs J. and Raftery M. A. (1980) Purification of *Torpedo californica* post-synaptic membranes and fractionation of their constituent proteins. *Biochem. J.* 185, 667-677.
- Ellman G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Epstein M. and Racker E. (1978) Reconstitution of carbamylcholine-dependent sodium ion flux and desensitization of the acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.* 253, 6660-6662.
- Eric C. Kandel (2000) Nerve cells and behaviour, in *Principles of neural science*, (Eric C. Kandel, James H. Schwartz and Thomas M. Jessel, eds), McGraw-Hill, New York, USA.
- Fantini J. and Barrantes F. J. (2009) Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 2345-2361.
- Fastenberg M. E., Shogomori H., Xu X., Brown D. A. and London E. (2003) Exclusion of a transmembrane-type peptide from ordered-lipid domains (rafts) detected by fluorescence quenching: extension of quenching analysis to account for the effects of domain size and domain boundaries. *Biochemistry* 42, 12376-12390.
- Fernandez-Ballester G., Castresana J., Fernandez A. M., Arrondo J. L., Ferragut J. A. and Gonzalez-Ros J. M. (1994) A role for cholesterol as a structural effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 33, 4065-4071.
- Fertuck H. C. and Salpeter M. M. (1974) Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 71, 1376-1378.
- Fong T. M. and McNamee M. G. (1987) Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry* 26, 3871-3880.
- Förster T. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys. (Leipzig)* 2, 55-75.

- Frazier M. L., Wright J. R., Pokorny A. and Almeida P. F. (2007) Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. *Biophys. J.* 92, 2422-2433.
- Friedrichson T. and Kurzchalia T. V. (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 394, 802-805.
- Froehner S. C., Luetje C. W., Scotland P. B. and Patrick J. (1990) The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 5, 403-410.
- Gandhavadi M., Allende D., Vidal A., Simon S. A. and McIntosh T. J. (2002) Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys. J.* 82, 1469-1482.
- Gautam M., Noakes P. G., Moscoso L., Rupp F., Scheller R. H., Merlie J. P. and Sanes J. R. (1996) Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85, 525-535.
- George J. Augustine (2004) Synaptic transmission, in *Neuroscience*, (Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. Mc.Namara and S. Mark Williams, eds), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EEUU.
- Gonzalez-Ros J. M., Llanillo M., Paraschos A. and Martinez-Carrion M. (1982) Lipid environment of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 21, 3467-3474.
- Gu Y. and Hall Z. W. (1988) Immunological evidence for a change in subunits of the acetylcholine receptor in developing and denervated rat muscle. *Neuron* 1, 117-125.
- Hammond A. T., Heberle F. A., Baumgart T., Holowka D., Baird B. and Feigenson G. W. (2005) Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 6320-6325.
- Hamouda A. K., Chiara D. C., Sauls D., Cohen J. B. and Blanton M. P. (2006a) Cholesterol interacts with transmembrane alpha-helices M1, M3, and M4 of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor: photolabeling studies using [3H]Azicholesterol. *Biochemistry* 45, 976-986.
- Hamouda A. K., Sanghvi M., Sauls D., Machu T. K. and Blanton M. P. (2006b) Assessing the lipid requirements of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 45, 4327-4337.
- Harder T., Scheiffele P., Verkade P. and Simons K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* 141, 929-942.
- Heerklotz H. (2002) Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys. J.* 83, 2693-2701.
- Holloway P. W. (1973) A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.* 53, 304-308.
- Ikonen E. (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 470-477.
- Jacobson K., Sheets E. D. and Simson R. (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268, 1441-1442.
- Janes P. W., Ley S. C., Magee A. I. and Kabouridis P. S. (2000) The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* 12, 23-34.

- Jones O. T. and McNamee M. G. (1988) Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 27, 2364-2374.
- Kalvodova L., Kahya N., Schwille P., Eehalt R., Verkade P., Drechsel D. and Simons K. (2005) Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J. Biol. Chem.* 280, 36815-36823.
- Karlin A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 102-114.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakowicz J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, NY
- LaRochelle W. J. and Froehner S. C. (1986) Determination of the tissue distributions and relative concentrations of the postsynaptic 43-kDa protein and the acetylcholine receptor in Torpedo. *J. Biol. Chem.* 261, 5270-5274.
- Le N. N., Corringer P. J. and Changeux J. P. (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.* 53, 447-456.
- Lee Y. H., Li L., Lasalde J., Rojas L., McNamee M., Ortiz-Miranda S. I. and Pappone P. (1994) Mutations in the M4 domain of Torpedo californica acetylcholine receptor dramatically alter ion channel function. *Biophys. J.* 66, 646-653.
- Leibel W. S., Firestone L. L., Legler D. C., Braswell L. M. and Miller K. W. (1987) Two pools of cholesterol in acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo. *Biochim. Biophys. Acta* 897, 249-260.
- Lester H. A., Dibas M. I., Dahan D. S., Leite J. F. and Dougherty D. A. (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci.* 27, 329-336.
- Lichtenberg D., Goni F. M. and Heerklotz H. (2005) Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* 30, 430-436.
- Lin W., Burgess R. W., Dominguez B., Pfaff S. L., Sanes J. R. and Lee K. F. (2001) Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410, 1057-1064.
- Lindstrom J. M. (2003) Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 998, 41-52.
- Lingwood D. and Simons K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46-50.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farra A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Ma L., Huang Y. Z., Pitcher G. M., Valtschanoff J. G., Ma Y. H., Feng L. Y., Lu B., Xiong W. C., Salter M. W., Weinberg R. J. and Mei L. (2003) Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J. Neurosci.* 23, 3164-3175.

- Madhavan R. and Peng H. B. (2005) Molecular regulation of postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *IUBMB. Life* 57, 719-730.
- Mantipragada S. B., Horvath L. I., Arias H. R., Schwarzmann G., Sandhoff K., Barrantes F. J. and Marsh D. (2003) Lipid-protein interactions and effect of local anesthetics in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry* 42, 9167-9175.
- Marchand S., villers-Thierry A., Pons S., Changeux J. P. and Cartaud J. (2002) Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J. Neurosci.* 22, 8891-8901.
- Marcheselli V., Daniotti J. L., Vidal A. C., Maccioni H., Marsh D. and Barrantes F. J. (1993) Gangliosides in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* and *Discopyge tschudii*. *Neurochem. Res.* 18, 599-603.
- Marsh D. and Barrantes F. J. (1978) Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 4329-4333.
- 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.
- Maxfield F. R. and Tabas I. (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612-621.
- Mayor S. and Maxfield F. R. (1995) Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol. Biol. Cell* 6, 929-944.
- Mayor S. and Rao M. (2004) Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.* 5, 231-240.
- Mayor S., Rothberg K. G. and Maxfield F. R. (1994) Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* 264, 1948-1951.
- McIntosh T. J., Vidal A. and Simon S. A. (2003) Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts. *Biophys. J.* 85, 1656-1666.
- McMahan U. J. (1990) The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55, 407-418.
- McNamee M. G., Ellena J. F. and Dalziel A. W. (1982) Lipid-protein interactions in membranes containing the acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 37, 103-104.
- Merritt E. A., Sarfaty S., Van den A. F., L'Hoir C., Martial J. A. and Hol W. G. (1994) Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci.* 3, 166-175.
- Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C. and Sakmann B. (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406-411.
- Mitchell J. S., Brown W. S., Woodside D. G., Vanderslice P. and McIntyre B. W. (2009) Clustering T-cell GM1 lipid rafts increases cellular resistance to shear on fibronectin through changes in integrin affinity and cytoskeletal dynamics. *Immunol. Cell Biol.* 87, 324-336.

- Mitchell J. S., Kanca O. and McIntyre B. W. (2002) Lipid microdomain clustering induces a redistribution of antigen recognition and adhesion molecules on human T lymphocytes. *J. Immunol.* 168, 2737-2744.
- Miyazawa A., Fujiyoshi Y. and Unwin N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-955.
- Musil L. S., Carr C., Cohen J. B. and Merlie J. P. (1988) Acetylcholine receptor-associated 43K protein contains covalently bound myristate. *J. Cell Biol.* 107, 1113-1121.
- Neubig R. R., Krodel E. K., Boyd N. D. and Cohen J. B. (1979) Acetylcholine and local anesthetic binding to Torpedo nicotinic postsynaptic membranes after removal of nonreceptor peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 690-694.
- Noakes P. G., Phillips W. D., Hanley T. A., Sanes J. R. and Merlie J. P. (1993) 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev. Biol.* 155, 275-280.
- Ochoa E. L., Dalziel A. W. and McNamee M. G. (1983) Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochim. Biophys. Acta* 727, 151-162.
- Ortells M.O. (1998) Evolution of the AChR and other ligand-gated ion channels, in *The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends*, (Barrantes F. J., ed), Landes Bioscience, Austin, Texas, USA.
- Parasassi T., De S. G., d'Ubaldo A. and Gratton E. (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* 57, 1179-1186.
- Parasassi T., De S. G., Ravagnan G., Rusch R. M. and Gratton E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* 60, 179-189.
- Pato C., Stetzkowski-Marden F., Gaus K., Recouvreur M., Cartaud A. and Cartaud J. (2008) Role of lipid rafts in agrin-elicited acetylcholine receptor clustering. *Chem. Biol. Interact.* 175, 64-67.
- Phillips W. D., Kopta C., Blount P., Gardner P. D., Steinbach J. H. and Merlie J. P. (1991) ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kilodalton protein. *Science* 251, 568-570.
- Pike L. J. and Casey L. (2002) Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry* 41, 10315-10322.
- Plazas P. V., Katz E., Gomez-Casati M. E., Bouzat C. and Elgoyhen A. B. (2005) Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J. Neurosci.* 25, 10905-10912.
- Pokorny A., Yandek L. E., Elegbede A. I., Hinderliter A. and Almeida P. F. (2006) Temperature and composition dependence of the interaction of delta-lysine with ternary mixtures of sphingomyelin/cholesterol/POPC. *Biophys. J.* 91, 2184-2197.
- Qian Y. K., Chan A. W., Madhavan R. and Peng H. B. (2008) The function of shp2 tyrosine phosphatase in the dispersal of acetylcholine receptor clusters. *BMC. Neurosci.* 9, 70.
- Quinn P. J. and Wolf C. (2009) The liquid-ordered phase in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 33-46.

- Rankin S. E., Addona G. H., Kloczewiak M. A., Bugge B. and Miller K. W. (1997) The cholesterol dependence of activation and fast desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 73, 2446-2455.
- Reist N. E., Werle M. J. and McMahan U. J. (1992) Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron* 8, 865-868.
- Roccamo A. M., Pediconi M. F., Aztiria E., Zanello L., Wolstenholme A. and Barrantes F. J. (1999) Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1615-1623.
- Role L. W. and Berg D. K. (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16, 1077-1085.
- Romanelli M. N., Gratteri P., Guandalini L., Martini E., Bonaccini C. and Gualtieri F. (2007) Central nicotinic receptors: structure, function, ligands, and therapeutic potential. *ChemMedChem.* 2, 746-767.
- Rouser G., Fkeischer S. and Yamamoto A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5, 494-496.
- Sanes J. R. and Lichtman J. W. (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 791-805.
- Schagger H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 16-22.
- Schroeder R., London E. and Brown D. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 12130-12134.
- Sharma P., Varma R., Sarasij R. C., Ira, Gousset K., Krishnamoorthy G., Rao M. and Mayor S. (2004) Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 116, 577-589.
- Silvius J. R. (2003) Fluorescence energy transfer reveals microdomain formation at physiological temperatures in lipid mixtures modeling the outer leaflet of the plasma membrane. *Biophys. J.* 85, 1034-1045.
- Silvius J. R. (2005) Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 193-202.
- Simons K. and Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons K. and Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.
- Simons K. and van M. G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202.
- Singer S. J. and Nicolson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Spiegel S., Kassis S., Wilchek M. and Fishman P. H. (1984) Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes. *J. Cell Biol.* 99, 1575-1581.

- Sprong H., van der S. P. and van M. G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 504-513.
- Stetzkowski-Marden F., Gaus K., Recouvreur M., Cartaud A. and Cartaud J. (2006a) Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J. Lipid Res.* 47, 2121-2133.
- Stetzkowski-Marden F., Recouvreur M., Camus G., Cartaud A., Marchand S. and Cartaud J. (2006b) Rafts are Required for Acetylcholine Receptor Clustering. *J. Mol. Neurosci.* 30, 37-38.
- Suzuki S., Numakawa T., Shimazu K., Koshimizu H., Hara T., Hatanaka H., Mei L., Lu B. and Kojima M. (2004) BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J. Cell Biol.* 167, 1205-1215.
- Tamamizu S., Guzman G. R., Santiago J., Rojas L. V., McNamee M. G. and Lasalde-Dominicci J. A. (2000) Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the alpha M4 transmembrane domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 39, 4666-4673.
- Tansey M. G., Baloh R. H., Milbrandt J. and Johnson E. M., Jr. (2000) GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 25, 611-623.
- Tong J., Briggs M. M., Mlaver D., Vidal A. and McIntosh T. J. (2009) Sorting of lens aquaporins and connexins into raft and nonraft bilayers: role of protein homo-oligomerization. *Biophys. J.* 97, 2493-2502.
- Unwin N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J. Mol. Biol.* 346, 967-989.
- van Meer G. and Simons K. (1988) Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J. Cell Biochem.* 36, 51-58.
- Veatch S. L. and Keller S. L. (2003) Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.* 85, 3074-3083.
- Veatch S. L. and Keller S. L. (2005a) Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys. Rev. Lett.* 94, 148101.
- Veatch S. L. and Keller S. L. (2005b) Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 172-185.
- Vereb G., Szollosi J., Matko J., Nagy P., Farkas T., Vigh L., Matyus L., Waldmann T. A. and Damjanovich S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8053-8058.
- Vidal A. and McIntosh T. J. (2005) Transbilayer peptide sorting between raft and nonraft bilayers: comparisons of detergent extraction and confocal microscopy. *Biophys. J.* 89, 1102-1108.
- Weber G. (1960) Fluorescence-polarization spectrum and electronic-energy transfer in proteins. *Biochem. J.* 75, 345-352.
- Wessel D. and Flugge U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141-143.

- Wiesner A. and Fuhrer C. (2006) Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: same players, different roles. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 2818-2828.
- Williamson P. T., Zandomenighi G., Barrantes F. J., Watts A. and Meier B. H. (2005) Structural and dynamic studies of the gamma-M4 trans-membrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Membr. Biol.* 22, 485-496.
- Willmann R., Pun S., Stallmach L., Sadasivam G., Santos A. F., Caroni P. and Fuhrer C. (2006) Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *Embo Journal* 25, 4050-4060.
- Wulfram Gerstner and Werner M. Kistler (2002) *Spiking neuron models. Single Neurons, Populations, Plasticity*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Xu Y., Barrantes F. J., Luo X., Chen K., Shen J. and Jiang H. (2005) Conformational dynamics of the nicotinic acetylcholine receptor channel: a 35-ns molecular dynamics simulation study. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 1291-1299.
- Zech T., Ejsing C. S., Gaus K., de W. B., Shevchenko A., Simons K. and Harder T. (2009) Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *EMBO J.* 28, 466-476.
- Zhu D., Xiong W. C. and Mei L. (2006) Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* 26, 4841-4851.

Publicaciones y comunicaciones a congresos

originadas en esta tesis

Publicaciones

“Boundary Lipids In The Nicotinic Acetylcholine Receptor Microenvironment”.

Barrantes FJ, Bermudez V, Borroni MV, Antollini SS, Pediconi MF, Baier JC, Bonini I, Gallegos C, Roccamo AM, Valles AS, Ayala V, Kamerbeek C.

J Mol Neurosci. 2010 Jan;40(1-2):87-90.

“Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstitution”

Bermúdez V, Antollini SS, Fernández Nievas GA, Aveldaño MI, Barrantes FJ.

J Lipid Res. 2010 Sep; 51(9):2629-41.

Presentaciones a Congresos

Nicotinic Acetylcholine receptor distribution in lipid microdomains of CHO-K1/A5 and CHO-K1/GM2 cells. Bermúdez, V., Picardi, V. ;Bonini, I.; Barrantes, F.J. Congreso conjunto de Sociedades Biomédicas, 16-20 de Noviembre 2004, Mar del Plata, Argentina. Medicina 64, Supl. 2, 359.

Localization of nicotinic acetylcholine receptor in lipid microdomains in CHO-K1/A5 y CHO-K1/GM2 cells. Bonini, I; Bermúdez, V., Roccamo, A.; Barrantes F.J. III Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas, INIBIBB, UNS-CONICET, Bahía Blanca, Argentina, 17-19 de Agosto de 2005.

Interactions between nicotinic acetylcholine receptor and lipid rafts. **V.Bermúdez**, SS Antollini, GA. Fernández Nievas, MI.Aveldaño and FJ.Barrantes. XLII Reunión

anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 12-15 de Noviembre 2006, Rosario, Argentina.

Detergent-partition profile of nicotinic acetylcholine receptor in reconstituted "raft" model membranes. Bermúdez, V.; Antollini, S.S.; Fernández Nievas, G.A.; Aveldaño, M.I.; Barrantes, F.J. ICBP-2007 6th International Conference of Biological Physics and 5th Southern Cone Biophysics Congress, 27-31 Agosto 2007, Montevideo, Uruguay.

Partition of nicotinic acetylcholine receptor in model membranes. Bermúdez, V.; Antollini, S.S.; Fernández Nievas, G.A.; Aveldaño, M.I.; Barrantes, F.J. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 8-11 de Noviembre 2008, Villa Carlos Paz, Argentina. Biocell, Vol. 32, Supplement , NS-P01, Noviembre 2008, Mendoza, Argentina.

Nicotinic acetylcholine receptor and lipid domains in reconstituted model membranes. Vicente Bermúdez, Silvia S. Antollini, Marta I. Aveldaño and Francisco J. Barrantes. XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 10-13 de Noviembre de 2009, Tucumán, Argentina

Reference List

Ahmed S. N., Brown D. A. and London E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* **36**, 10944-10953.

Allen J. A., Halverson-Tamboli R. A. and Rasenick M. M. (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 128-140.

Anderson R. G. and Jacobson K. (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**, 1821-1825.

Antollini S. S. and Barrantes F. J. (1998) Disclosure of discrete sites for phospholipid and sterols at the protein-lipid interface in native acetylcholine receptor-rich membrane. *Biochemistry* **37**, 16653-16662.

Antollini S. S. 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 S. S. and Barrantes F. J. (2007) Laurdan studies of membrane lipid-nicotinic acetylcholine receptor protein interactions. *Methods Mol. Biol.* **400**, 531-542.

Antollini S. S., Soto M. A., Bonini d. R., I, Gutierrez-Merino C., Sotomayor P. and Barrantes F. J. (1996) Physical state of bulk and protein-associated lipid in nicotinic acetylcholine receptor-rich membrane studied by laurdan generalized polarization and fluorescence energy transfer. *Biophys. J.* **70**, 1275-1284.

Antollini S. S., Xu Y., Jiang H. and Barrantes F. J. (2005) Fluorescence and molecular dynamics studies of the acetylcholine receptor gammaM4 transmembrane peptide in reconstituted systems. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 471-483.

Apel E. D., Glass D. J., Moscoso L. M., Yancopoulos G. D. and Sanes J. R. (1997) Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* **18**, 623-635.

Arias H. R., Sankaram M. B., Marsh D. and Barrantes F. J. (1990) Effect of local anaesthetics on steroid-nicotinic acetylcholine receptor interactions in native membranes of *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochim. Biophys. Acta* **1027**, 287-294.

Ayuyan A. G. and Cohen F. S. (2008) Raft composition at physiological temperature and pH in the absence of detergents. *Biophys. J.* **94**, 2654-2666.

Babiychuk E. B. and Draeger A. (2006) Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem. J.* **397**, 407-416.

Bacia K., Schuette C. G., Kahya N., Jahn R. and Schwille P. (2004) SNAREs prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *J. Biol. Chem.* **279**, 37951-37955.

Bagatolli L. A., Parasassi T., Fidelio G. D. and Gratton E. (1999) A model for the interaction of 6-lauroyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with lipid environments: implications for spectral properties. *Photochem. Photobiol.* **70**, 557-564.

Baier C. J. and Barrantes F. J. (2007) Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J. Neurochem.* **101**, 1072-1084.

Baird B., Sheets E. D. and Holowka D. (1999) How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys. Chem.* **82**, 109-119.

Barrantes F. J. (1982) Oligomeric forms of the membrane-bound acetylcholine receptor disclosed upon extraction of the Mr 43,000 nonreceptor peptide. *J. Cell Biol.* **92**, 60-68.

Barrantes F. J. (1989) The lipid environment of the nicotinic acetylcholine receptor in native and reconstituted membranes. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**, 437-478.

Barrantes F. J. (2003) Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **6**, 620-632.

Barrantes F. J. (2004) Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **47**, 71-95.

Barrantes F. J. (2007) Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *J. Neurochem.* **103 Suppl 1**, 72-80.

Barrantes F. J., Antollini S. S., Blanton M. P. and Prieto M. (2000) Topography of nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 37333-37339.

Barrantes F. J., Bermudez V., Borroni M. V., Antollini S. S., Pediconi M. F., Baier J. C., Bonini I., Gallegos C., Roccamo A. M., Valles A. S., Ayala V. and Kamerbeek C. (2010) Boundary lipids in the nicotinic acetylcholine receptor microenvironment. *J. Mol. Neurosci.* **40**, 87-90.

Bhushan A. and McNamee M. G. (1993) Correlation of phospholipid structure with functional effects on the nicotinic acetylcholine receptor. A modulatory role for phosphatidic acid. *Biophys. J.* **64**, 716-723.

BLIGH E. G. and DYER W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* **37**, 911-917.

Bonini d. R., I, Roccamo de Fernandez A. M. and Barrantes F. J. (1987) Extraction of peripheral proteins is accompanied by selective depletion of certain glycerophospholipid classes and changes in the phosphorylation pattern of acetylcholine-receptor-rich-membrane proteins.

Biochem. J. **245**, 111-118.

Bonini I. C., Antollini S. S., Gutierrez-Merino C. and Barrantes F. J. (2002) Sphingomyelin composition and physical asymmetries in native acetylcholine receptor-rich membranes. *Eur.*

Biophys. J. **31**, 417-427.

Borges L. S. and Ferns M. (2001) Agrin-induced phosphorylation of the acetylcholine receptor regulates cytoskeletal anchoring and clustering. *J. Cell Biol.* **153**, 1-12.

Bouzat C., Roccamo A. M., Garbus I. and Barrantes F. J. (1998) Mutations at lipid-exposed residues of the acetylcholine receptor affect its gating kinetics. *Mol. Pharmacol.* **54**, 146-153.

Brannigan G., Henin J., Law R., Eckenhoff R. and Klein M. L. (2008) Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 14418-14423.

Brown A. C., Towles K. B. and Wrenn S. P. (2007a) Measuring raft size as a function of membrane composition in PC-based systems: Part 1--binary systems. *Langmuir* **23**, 11180-11187.

Brown A. C., Towles K. B. and Wrenn S. P. (2007b) Measuring raft size as a function of membrane composition in PC-based systems: Part II--ternary systems. *Langmuir* **23**, 11188-11196.

Brown D. A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals.

Physiology. (Bethesda.) **21**, 430-439.

Brown D. A. and London E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111-136.

Brown D. A. and Rose J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.

Bruses J. L., Chauvet N. and Rutishauser U. (2001) Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J. Neurosci.* **21**, 504-512.

Burger K., Gimpl G. and Fahrenholz F. (2000) Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 1577-1592.

Camilleri A. A., Willmann R., Sadasivam G., Lin S., Ruegg M. A., Gesemann M. and Fuhrer C. (2007) Tyrosine phosphatases such as SHP-2 act in a balance with Src-family kinases in stabilization of postsynaptic clusters of acetylcholine receptors. *BMC. Neurosci.* **8**, 46.

Campagna J. A. and Fallon J. (2006) Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* **138**, 123-132.

Chamberlain L. H. (2004) Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett.* **559**, 1-5.

Connolly C. N. and Wafford K. A. (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 529-534.

Corbin J., Wang H. H. and Blanton M. P. (1998) Identifying the cholesterol binding domain in the nicotinic acetylcholine receptor with [125I]azido-cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 65-74.

Criado M., Eibl H. and Barrantes F. J. (1982) Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles.

Biochemistry **21**, 3622-3629.

Criado M., 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.

Chem. **259**, 9188-9198.

daCosta C. J., Ogrel A. A., McCardy E. A., Blanton M. P. and Baenziger J. E. (2002) Lipid-protein interactions at the nicotinic acetylcholine receptor. A functional coupling between nicotinic receptors and phosphatidic acid-containing lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **277**, 201-208.

daCosta C. J., 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. *J. Biol. Chem.* **279**, 14967-14974.

Dalziel A. W., Rollins E. S. and McNamee M. G. (1980) The effect of cholesterol on agonist-induced flux in reconstituted acetylcholine receptor vesicles. *FEBS Lett.* **122**, 193-196.

De Almeida R. F., Fedorov A. and Prieto M. (2003)

Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.* **85**, 2406-2416.

De Almeida R. F., Loura L. M., Fedorov A. and Prieto M. (2005) Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J. Mol. Biol.* **346**, 1109-1120.

- De Almeida R. F., Loura L. M., Prieto M., Watts A., Fedorov A. and Barrantes F. J. (2004) Cholesterol modulates the organization of the gammaM4 transmembrane domain of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys. J.* **86**, 2261-2272.
- De Almeida R. F., Loura L. M., Prieto M., Watts A., Fedorov A. and Barrantes F. J. (2006) Structure and dynamics of the gammaM4 transmembrane domain of the acetylcholine receptor in lipid bilayers: insights into receptor assembly and function. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 305-315.
- Dietrich C., Bagatolli L. A., Volovyk Z. N., Thompson N. L., Levi M., Jacobson K. and Gratton E. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.* **80**, 1417-1428.
- Elgoyhen A. B., Katz E. and Fuchs P. A. (2009) The nicotinic receptor of cochlear hair cells: a possible pharmacotherapeutic target? *Biochem. Pharmacol.* **78**, 712-719.
- Ellena J. F., Blazing M. A. and McNamee M. G. (1983) Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor. *Biochemistry* **22**, 5523-5535.
- Elliott J., Blanchard S. G., Wu W., Miller J., Strader C. D., Hartig P., Moore H. P., Racs J. and Raftery M. A. (1980) Purification of Torpedo californica post-synaptic membranes and fractionation of their constituent proteins. *Biochem. J.* **185**, 667-677.
- ELLMAN G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Epstein M. and Racker E. (1978) Reconstitution of carbamylcholine-dependent sodium ion flux and desensitization of the acetylcholine receptor from Torpedo californica. *J. Biol. Chem.* **253**, 6660-6662.
- Eric C.Kandel (2000) Nerve cells and behaviour, in *Principles of neural science*, (Eric C.Kandel, James H.Schwartz and Thomas M.Jessel, eds), McGraw-Hill, New York, USA.

Fantini J. and Barrantes F. J. (2009) Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2345-2361.

Fastenberg M. E., Shogomori H., Xu X., Brown D. A. and London E. (2003) Exclusion of a transmembrane-type peptide from ordered-lipid domains (rafts) detected by fluorescence quenching: extension of quenching analysis to account for the effects of domain size and domain boundaries. *Biochemistry* **42**, 12376-12390.

Fernandez-Ballester G., Castresana J., Fernandez A. M., Arrondo J. L., Ferragut J. A. and Gonzalez-Ros J. M. (1994) A role for cholesterol as a structural effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **33**, 4065-4071.

Fertuck H. C. and Salpeter M. M. (1974) Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **71**, 1376-1378.

Fong T. M. and McNamee M. G. (1987) Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry* **26**, 3871-3880.

Förster T. (1948a) *Ann. Phys. (Leipzig)* **2**, 55-75.

Förster T. (1948b) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys. (Leipzig)* **2**, 55-75.

Frazier M. L., Wright J. R., Pokorny A. and Almeida P. F. (2007) Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. *Biophys. J.* **92**, 2422-2433.

- Friedrichson T. and Kurzchalia T. V. (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**, 802-805.
- Froehner S. C., Luetje C. W., Scotland P. B. and Patrick J. (1990) The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* **5**, 403-410.
- Gandhavadi M., Allende D., Vidal A., Simon S. A. and McIntosh T. J. (2002) Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys. J.* **82**, 1469-1482.
- Gautam M., Noakes P. G., Moscoso L., Rupp F., Scheller R. H., Merlie J. P. and Sanes J. R. (1996) Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* **85**, 525-535.
- George J. Augustine (2004) Synaptic transmission, in *Neuroscience*, (Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. Mc.Namara and S. Mark Williams, eds), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EEUU.
- Gonzalez-Ros J. M., Llanillo M., Paraschos A. and Martinez-Carrion M. (1982) Lipid environment of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* **21**, 3467-3474.
- Gu Y. and Hall Z. W. (1988) Immunological evidence for a change in subunits of the acetylcholine receptor in developing and denervated rat muscle. *Neuron* **1**, 117-125.
- Hammond A. T., Heberle F. A., Baumgart T., Holowka D., Baird B. and Feigenson G. W. (2005) Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 6320-6325.
- Hamouda A. K., Chiara D. C., Sauls D., Cohen J. B. and Blanton M. P. (2006a) Cholesterol interacts with transmembrane alpha-helices M1, M3, and M4 of the *Torpedo* nicotinic

acetylcholine receptor: photolabeling studies using [3H]Azicholesterol. *Biochemistry* **45**, 976-986.

Hamouda A. K., Sanghvi M., Sauls D., Machu T. K. and Blanton M. P. (2006b) Assessing the lipid requirements of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **45**, 4327-4337.

Harder T., Scheiffele P., Verkade P. and Simons K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* **141**, 929-942.

Heerklotz H. (2002) Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys. J.* **83**, 2693-2701.

Holloway P. W. (1973) A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.* **53**, 304-308.

Ikonen E. (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 470-477.

Jacobson K., Sheets E. D. and Simson R. (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* **268**, 1441-1442.

Janes P. W., Ley S. C., Magee A. I. and Kabouridis P. S. (2000) The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 23-34.

Jones O. T. and McNamee M. G. (1988) Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **27**, 2364-2374.

Kalvodova L., Kahya N., Schwille P., Eehalt R., Verkade P., Drechsel D. and Simons K. (2005) Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J. Biol. Chem.* **280**, 36815-36823.

Karlin A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 102-114.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lakowicz J. R. (1999)

Principles of Fluorescence Spectroscopy.

Lakowicz J. R. (2006)

Principles of Fluorescence Spectroscopy.

LaRochelle W. J. and Froehner S. C. (1986) Determination of the tissue distributions and relative concentrations of the postsynaptic 43-kDa protein and the acetylcholine receptor in Torpedo. *J. Biol. Chem.* **261**, 5270-5274.

Le N. N., Corringer P. J. and Changeux J. P. (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.* **53**, 447-456.

Lee Y. H., Li L., Lasalde J., Rojas L., McNamee M., Ortiz-Miranda S. I. and Pappone P. (1994) Mutations in the M4 domain of Torpedo californica acetylcholine receptor dramatically alter ion channel function. *Biophys. J.* **66**, 646-653.

Leibel W. S., Firestone L. L., Legler D. C., Braswell L. M. and Miller K. W. (1987) Two pools of cholesterol in acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo. *Biochim. Biophys. Acta* **897**, 249-260.

Lester H. A., Dibas M. I., Dahan D. S., Leite J. F. and Dougherty D. A. (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci.* **27**, 329-336.

Lichtenberg D., Goni F. M. and Heerklotz H. (2005) Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 430-436.

Lin W., Burgess R. W., Dominguez B., Pfaff S. L., Sanes J. R. and Lee K. F. (2001) Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* **410**, 1057-1064.

Lindstrom J. M. (2003) Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **998**, 41-52.

Lingwood D. and Simons K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. and RANDALL R. J. (1951a) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. and RANDALL R. J. (1951b) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Ma L., Huang Y. Z., Pitcher G. M., Valtschanoff J. G., Ma Y. H., Feng L. Y., Lu B., Xiong W. C., Salter M. W., Weinberg R. J. and Mei L. (2003) Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J. Neurosci.* **23**, 3164-3175.

Madhavan R. and Peng H. B. (2005) Molecular regulation of postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *IUBMB. Life* **57**, 719-730.

Mantipragada S. B., Horvath L. I., Arias H. R., Schwarzmann G., Sandhoff K., Barrantes F. J. and Marsh D. (2003) Lipid-protein interactions and effect of local anesthetics in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry* **42**, 9167-9175.

Marchand S., villers-Thierry A., Pons S., Changeux J. P. and Cartaud J. (2002) Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J. Neurosci.* **22**, 8891-8901.

Marcheselli V., Daniotti J. L., Vidal A. C., Maccioni H., Marsh D. and Barrantes F. J. (1993) Gangliosides in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* and *Discopyge tschudii*. *Neurochem. Res.* **18**, 599-603.

Marsh D. and Barrantes F. J. (1978) Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**, 4329-4333.

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.

Maxfield F. R. and Tabas I. (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**, 612-621.

Mayor S. and Maxfield F. R. (1995) Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol. Biol. Cell* **6**, 929-944.

Mayor S. and Rao M. (2004) Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.* **5**, 231-240.

Mayor S., Rothberg K. G. and Maxfield F. R. (1994) Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* **264**, 1948-1951.

McIntosh T. J., Vidal A. and Simon S. A. (2003) Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts. *Biophys. J.* **85**, 1656-1666.

McMahan U. J. (1990) The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **55**, 407-418.

McNamee M. G., Ellena J. F. and Dalziel A. W. (1982) Lipid-protein interactions in membranes containing the acetylcholine receptor. *Biophys. J.* **37**, 103-104.

Merritt E. A., Sarfaty S., Van den A. F., L'Hoir C., Martial J. A. and Hol W. G. (1994) Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci.* **3**, 166-175.

Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C. and Sakmann B. (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* **321**, 406-411.

Mitchell J. S., Brown W. S., Woodside D. G., Vanderslice P. and McIntyre B. W. (2009) Clustering T-cell GM1 lipid rafts increases cellular resistance to shear on fibronectin through changes in integrin affinity and cytoskeletal dynamics. *Immunol. Cell Biol.* **87**, 324-336.

Mitchell J. S., Kanca O. and McIntyre B. W. (2002) Lipid microdomain clustering induces a redistribution of antigen recognition and adhesion molecules on human T lymphocytes. *J. Immunol.* **168**, 2737-2744.

Miyazawa A., Fujiyoshi Y. and Unwin N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955.

Musil L. S., Carr C., Cohen J. B. and Merlie J. P. (1988) Acetylcholine receptor-associated 43K protein contains covalently bound myristate. *J. Cell Biol.* **107**, 1113-1121.

Neubig R. R., Krodel E. K., Boyd N. D. and Cohen J. B. (1979) Acetylcholine and local anesthetic binding to Torpedo nicotinic postsynaptic membranes after removal of nonreceptor peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 690-694.

Noakes P. G., Phillips W. D., Hanley T. A., Sanes J. R. and Merlie J. P. (1993) 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev. Biol.* **155**, 275-280.

Ochoa E. L., Dalziel A. W. and McNamee M. G. (1983) Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochim. Biophys. Acta* **727**, 151-162.

Ortells M.O. (1998) Evolution of the AChR and other ligand-gated ion channels, in *The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends*, (Barrantes F. J., ed), Landes Bioscience, Austin, Texas, USA.

Parasassi T., De S. G., d'Ubaldo A. and Gratton E. (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **57**, 1179-1186.

Parasassi T., De S. G., Ravagnan G., Rusch R. M. and Gratton E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **60**, 179-189.

Pato C., Stetzkowski-Marden F., Gaus K., Recouvreux M., Cartaud A. and Cartaud J. (2008) Role of lipid rafts in agrin-elicited acetylcholine receptor clustering. *Chem. Biol. Interact.* **175**, 64-67.

Phillips W. D., Kopta C., Blount P., Gardner P. D., Steinbach J. H. and Merlie J. P. (1991) ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kildalton protein. *Science* **251**, 568-570.

Pike L. J. and Casey L. (2002) Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry* **41**, 10315-10322.

Plazas P. V., Katz E., Gomez-Casati M. E., Bouzat C. and Elgoyhen A. B. (2005) Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J. Neurosci.* **25**, 10905-10912.

Pokorny A., Yandek L. E., Elegbede A. I., Hinderliter A. and Almeida P. F. (2006) Temperature and composition dependence of the interaction of delta-lysine with ternary mixtures of sphingomyelin/cholesterol/POPC. *Biophys. J.* **91**, 2184-2197.

Qian Y. K., Chan A. W., Madhavan R. and Peng H. B. (2008) The function of shp2 tyrosine phosphatase in the dispersal of acetylcholine receptor clusters. *BMC. Neurosci.* **9**, 70.

Quinn P. J. and Wolf C. (2009) The liquid-ordered phase in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 33-46.

Rankin S. E., Addona G. H., Kloczewiak M. A., Bugge B. and Miller K. W. (1997) The cholesterol dependence of activation and fast desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys. J.* **73**, 2446-2455.

Reist N. E., Werle M. J. and McMahan U. J. (1992) Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron* **8**, 865-868.

Roccamo A. M., Pediconi M. F., Aztiria E., Zanello L., Wolstenholme A. and Barrantes F. J. (1999) Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1615-1623.

Role L. W. and Berg D. K. (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* **16**, 1077-1085.

Romanelli M. N., Gratteri P., Guandalini L., Martini E., Bonaccini C. and Gualtieri F. (2007) Central nicotinic receptors: structure, function, ligands, and therapeutic potential. *ChemMedChem*. **2**, 746-767.

Rouser G., Fkeischer S. and Yamamoto A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-496.

Sanes J. R. and Lichtman J. W. (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 791-805.

Schagger H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16-22.

Schroeder R., London E. and Brown D. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 12130-12134.

Sharma P., Varma R., Sarasij R. C., Ira, Gousset K., Krishnamoorthy G., Rao M. and Mayor S. (2004) Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* **116**, 577-589.

Silvius J. R. (2003) Fluorescence energy transfer reveals microdomain formation at physiological temperatures in lipid mixtures modeling the outer leaflet of the plasma membrane. *Biophys. J.* **85**, 1034-1045.

- Silvius J. R. (2005) Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 193-202.
- Simons K. and Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons K. and Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31-39.
- Simons K. and van M. G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-6202.
- Singer S. J. and Nicolson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Spiegel S., Kassis S., Wilchek M. and Fishman P. H. (1984) Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes. *J. Cell Biol.* **99**, 1575-1581.
- Sprong H., van der S. P. and van M. G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 504-513.
- Stetzkowski-Marden F., Gaus K., Recouvreur M., Cartaud A. and Cartaud J. (2006a) Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J. Lipid Res.* **47**, 2121-2133.
- Stetzkowski-Marden F., Recouvreur M., Camus G., Cartaud A., Marchand S. and Cartaud J. (2006b) Rafts are Required for Acetylcholine Receptor Clustering. *J. Mol. Neurosci.* **30**, 37-38.
- Suzuki S., Numakawa T., Shimazu K., Koshimizu H., Hara T., Hatanaka H., Mei L., Lu B. and Kojima M. (2004) BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J. Cell Biol.* **167**, 1205-1215.

Tamamizu S., Guzman G. R., Santiago J., Rojas L. V., McNamee M. G. and Lasalde-Dominicci J.

A. (2000) Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the alpha M4 transmembrane domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor.

Biochemistry **39**, 4666-4673.

Tansey M. G., Baloh R. H., Milbrandt J. and Johnson E. M., Jr. (2000) GFRalpha-mediated

localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* **25**, 611-623.

Tong J., Briggs M. M., Mlaver D., Vidal A. and McIntosh T. J. (2009) Sorting of lens aquaporins

and connexins into raft and nonraft bilayers: role of protein homo-oligomerization. *Biophys. J.* **97**, 2493-2502.

Unwin N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J.*

Mol. Biol. **346**, 967-989.

van M. G. and Simons K. (1988) Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J. Cell Biochem.* **36**,

51-58.

Veatch S. L. and Keller S. L. (2003) Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary

mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.* **85**, 3074-3083.

Veatch S. L. and Keller S. L. (2005a) Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing

sphingomyelin. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 148101.

Veatch S. L. and Keller S. L. (2005b) Seeing spots: complex phase behavior in simple

membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 172-185.

- Vereb G., Szollosi J., Matko J., Nagy P., Farkas T., Vigh L., Matyus L., Waldmann T. A. and Damjanovich S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 8053-8058.
- Vidal A. and McIntosh T. J. (2005) Transbilayer peptide sorting between raft and nonraft bilayers: comparisons of detergent extraction and confocal microscopy. *Biophys. J.* **89**, 1102-1108.
- WEBER G. (1960) Fluorescence-polarization spectrum and electronic-energy transfer in proteins. *Biochem. J.* **75**, 345-352.
- Wessel D. and Flugge U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143.
- Wiesner A. and Fuhrer C. (2006) Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: same players, different roles. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2818-2828.
- Williamson P. T., Zandomenighi G., Barrantes F. J., Watts A. and Meier B. H. (2005) Structural and dynamic studies of the gamma-M4 trans-membrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 485-496.
- Willmann R., Pun S., Stallmach L., Sadasivam G., Santos A. F., Caroni P. and Fuhrer C. (2006) Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *Embo Journal* **25**, 4050-4060.
- Wulfram Gerstner and Werner M. Kistler (2002) *Spiking neuron models. Single Neurons, Populations, Plasticity*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Xu Y., Barrantes F. J., Luo X., Chen K., Shen J. and Jiang H. (2005) Conformational dynamics of the nicotinic acetylcholine receptor channel: a 35-ns molecular dynamics simulation study. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1291-1299.

Zech T., Ejsing C. S., Gaus K., de W. B., Shevchenko A., Simons K. and Harder T. (2009) Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *EMBO J.* **28**, 466-476.

Zhu D., Xiong W. C. and Mei L. (2006) Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* **26**, 4841-4851.