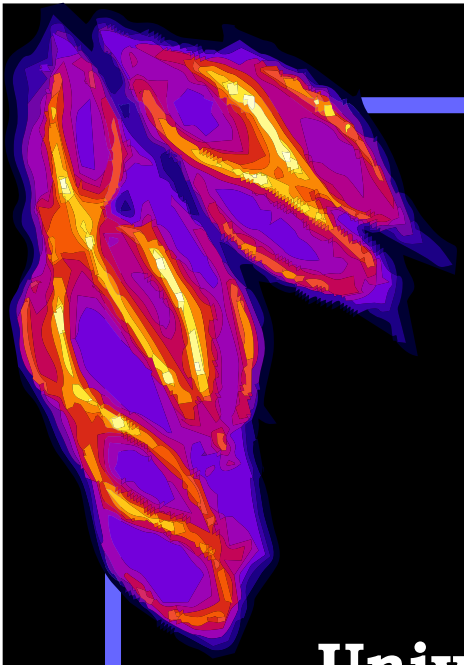
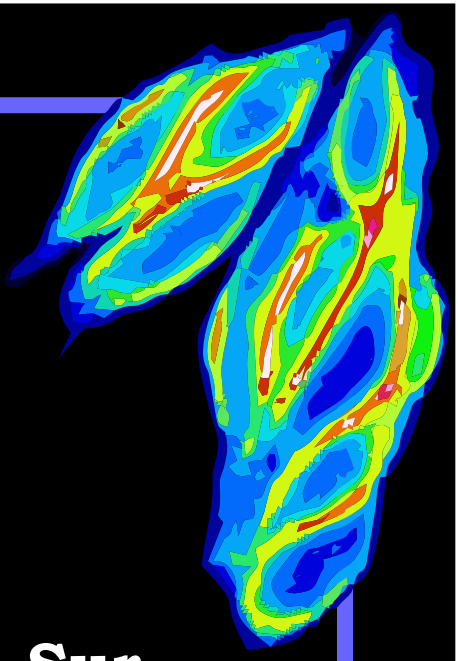




Universidad Nacional del Sur

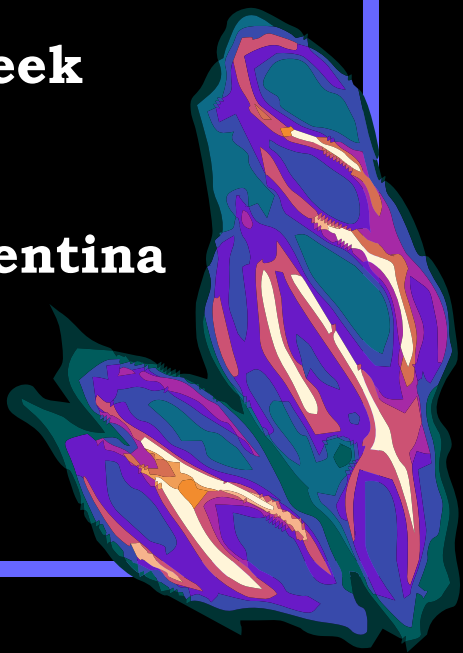
Tesis
Doctor en Bioquímica

“Estudio de la interacción de los diacilgliceroles y los dominios lipídicos con el receptor de acetilcolina nicotínico”

Constanza Belén Kamerbeek

Bahía Blanca **Argentina**

2014



Director de tesis: Francisco José Barrantes

Supervisora Local: María Virginia Borroni

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 (UNS) y del Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 17 de noviembre de 2009 y el 19 de junio de 2014, bajo la dirección del Dr. Francisco J. Barrantes y la supervisión local de la Dra. María Virginia Borroni".

Constanza Belén Kamerbeek

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el apoyo económico brindado para la concreción de este trabajo de Tesis. A la Universidad Nacional del Sur, que gracias a la educación pública y gratuita, me permitió desarrollar el doctorado en Bioquímica. Al Instituto Nacional de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), por permitirme desarrollar las tareas de investigación presentadas en esta Tesis.

A mi director, el Dr. Francisco Barrantes, por darme la oportunidad de desarrollar esta Tesis bajo su guía.

A mi ex co-directora, la Dra María Pediconi, por dirigirme hasta casi el final de mi Tesis, acompañándome codo a codo en los experimentos de radiactividad.

A mi supervisora local, la Dra Virginia Borroni, por incentivarme a cada momento, por ayudarme desde el primer día que empecé el doctorado, por confiar en mi, por ser una excelente amiga.

A IACA Laboratorios de Bahía Blanca, en especial a la Dra. Patricia Fernández, por gentilmente realizar sin cargo las determinaciones de los niveles de radiactividad de los experimentos realizados en esta Tesis.

A “La Canastita” y a “La ronda de mate de la mañana”, por brindarme su hermosa amistad, por los mejores momentos compartidos en estos cinco años, por ser el motivo de mi alegría en el trabajo del día a día.

A todos mis compañeros del INIBIBB, por su ayuda constante y los gratos momentos compartidos a diario.

A mis papás, mis hermanos, mi abuela y a toda mi familia, por el apoyo que me brindaron todos estos años y su cariño constante.

A mis amigas de la UNI, por escucharme y acompañarme incondicionalmente.

A Fran, por su amor y paciencia, por estar a mi lado siempre.

"HOY ES SIEMPRE TODAVIA,

TODA LA VIDA ES AHORA,

Y AHORA, AHORA ES EL MOMENTO

DE CUMPLIR LAS PROMESAS QUE NOS HICIMOS.

PORQUE AYER NO LO HICIMOS.

PORQUE MAÑANA ES TARDE.

AHORA."

Antonio Machado

A Fran,

"El mundo duele menos si te miro"

Ismael Serrano

RESUMEN 1
ABSTRACT 4
ABREVIATURAS 7
INTRODUCCIÓN GENERAL 12
LA COMUNICACIÓN CELULAR 13
La sinapsis 15
La unión neuromuscular 17
EL AChR 19
Los receptores *Cys-loop* 19
Historia del AChR 20
Estructura y función 21
Las subunidades 21
Los dominios 23
Los sitios de unión de ligandos 24
El canal iónico 26
Síntesis, ensamble y degradación 28
Localización, función y patologías relacionadas 29
MATERIALES Y MÉTODOS 32
MATERIALES 33
MÉTODOS 34
CULTIVO CELULAR 34
Células CHO-K1/A5 34
Neuronas de hipocampo 34
MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA 35
Microscopios 36
Microscopía de campo ancho 36
Microscopía Confocal 37
Fijación y permeabilización de células 37
Sondas fluorescentes y sus protocolos de incubación 38
Sondas específicas del Capítulo I 38
Sondas específicas del Capítulo II 39
Análisis cuantitativo de imágenes 40
Intensidad de fluorescencia promedio 40
Análisis específicos del Capítulo I: 40
• Transferencia de energía resonante de Förster (FRET) de las Daglas Dpm1 y Dem1 40
• Evaluación del porcentaje AChR desensamblado 43
Análisis específicos del Capítulo II: 43
• La polarización generalizada (GP) de di-4-ANEPPDHQ 43
MÉTODOS: CAPÍTULO I 45
Transfección de las células CHO-K1/A5 45
Ensayos de unión de radioligando 45
Obtención de [I^{125}]α-bungarotoxina 45
Determinación de la unión de [I^{125}]-BTX en células en cultivo 47
• Unión en superficie: 47
• Unión total de [I^{125}]-BTX en células permeabilizadas 48
Determinación de proteínas 49
Ensayos de *Western Blot* 49
Incubación de membranas de PVDP con anticuerpos 50
Registros de patch-clamp 50
MÉTODOS: CAPÍTULO II 51

Preparación de las GUV 51
Fluorímetro 51
PROTOCOLOS DE INCUBACIÓN 52
CAPÍTULO 1 52
Tratamientos a tiempos cortos y largos de incubación 52
• Agregado exógeno de DAG y análogos 52
• Incremento o disminución de la cantidad de DAG endógenos 53
• Aumento de los niveles de calcio (Ca^{2+}) 54
• Inhibición de Proteínas Quinasas 54
CAPÍTULO 2 54
Variaciones de los niveles celulares de colesterol: depleción y enriquecimiento 54
Disrupción y estabilización del citoesqueleto de actina 55
Internalización del AChR mediada por la unión de BTX 55
Tratamientos con agonistas del AChR 55
ANALISIS ESTADÍSTICO 55
DISEÑO DE IMÁGENES 56

CAPITULO I: EL AChR Y LOS DAG 57
INTRODUCCIÓN 58
LOS DIACILGLICEROLES 59
EL METABOLISMO 59
LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 61
Las proteínas quinasas C y D 63
• Las PKC 63
• Las PKD 67
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS 70
ANTECEDENTES 71
OBJETIVOS 72
RESULTADOS 73
INCUBACIÓN CON DAG Y ANÁLOGOS 74
Palmitoiloleilglicerol 74
Dioctanoilglicerol 75
Incubación con DOG durante tiempos *cortos* 75
Efectos del DOG a tiempos *largos* de incubación 78
Cuantificación del DOG post-incubaciones 79
Ésteres de forbol 83
Efectos de la incubación durante tiempos cortos con EF y EF- 83
Tratamiento con EF durante 18 hs 85
MODIFICACIÓN DEL NIVEL DE DAG ENDÓGENO 86
Diacilglicerol quinasas: inhibición y sobre-expresión 86
R59949: un inhibidor de las DGK 87
Sobre-expresión de la DGKζ 91
Modulación de la síntesis de fosfatidilcolina 94
Geranilgeraniol: inhibidor de la colina fosfotransferasa 94
Bloqueo de la expresión de la proteína Nir2 96
LOS DAG Y LOS AChR: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INVOLUCRADOS 103
Las PKC clásicas y los DAG 103
Incremento del calcio intracelular 103
Tratamiento con un ionóforo de Ca^{2+}: A23187 103
• A23187, 3 hs de incubación 104
• A23187, 18 hs de incubación 106

Exposición de las células a Thapsigargina 110
• Thapsi, 3 hs de incubación 112
• Thapsi, 18 hs de incubación 114
Inhibición de las PKC clásicas: Gö 6976 116
• Gö 6976, 3 y 18 hs de incubación 117
• Gö 6976 y DOG, 3 y 18 hs de incubación 120
• Gö 6976, A23187 y Thapsi, 18 hs de incubación 121
Cuantificación de las PKCc por WB 123
Las PKC noveles y los DAG 127
Inhibición de la PKCδ: Rottlerina 127
Los DAG y la PKCη 131
La PKD y los DAG 132
El incremento del Ca^{2+} y el AChR 134
• KN-62 y A23187 136
• KN-62 y Thapsi 137
LOS DAG Y EL AChR NEURONAL 137
DISCUSIÓN 142
LOS DAG Y EL AChR 143
Tiempos cortos de incubación 144
Tiempos largos de incubación 146
LOS DAG Y LAS PROTEÍNAS QUINASAS 148
Tiempos cortos de incubación 149
Tiempos largos de incubación 151
EL Ca^{2+} Y EL AChR 155
CONCLUSIÓN GENERAL 157

CAPITULO II: EL AChR Y LOS DOMINIOS LIPÍDICOS 158
INTRODUCCIÓN 159
LA MEMBRANA PLASMÁTICA 160
Composición 160
Modelo de membrana: ¿mosaico fluido o *raft*? 161
Los modelos de membranas 163
Cómo medir el orden de membrana: Laurdan y di-4-ANEPPDHQ 165
EL AChR Y LAS MEMBRANAS LIPÍDICAS 168
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS 172
ANTECEDENTES 173
OBJETIVOS 174
RESULTADOS 175
LA POLARIZACIÓN GENERALIZADA DE DI-4-ANEPPDHQ 176
Di-4-ANEPPDHQ y las GUV: Lo y Ld 177
Di-4-ANEPPDHQ y las células CHO-K1/A5 177
EL AChR Y LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA 186
La BTX vs el mAb 210 186
El AChR y el Col 189
El AChR y el citoesqueleto de actina 190
El AChR: la interacción con antagonistas y agonistas 195
LA ENDOCITOSIS DEL AChR Y LOS DOMINIOS LIPÍDICOS 199
DISCUSIÓN 205

REFERENCIAS 213

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Mecanismos de comunicación celular ***14***
2. Tipos de transmisión sináptica ***16***
3. La UNM ***18***
4. Estructura de cada subunidad del AChR ***22***
5. AChR musculares y neuronales ***23***
6. Los dominios del AChR de *Torpedo*, en su configuración cerrada ***25***
7. Localización de los sitios de unión de ligandos en las distintas clases de AChR ***26***
8. Síntesis, ensamble y degradación del AChR ***30***

MATERIALES Y MÉTODOS

9. Esquema del *Dual-viewer* ***37***
10. Módulo especial del software SlideBook para evaluar co-localización ***41***
11. Daglas, un indicador fluorescente de los DAG ***42***
12. Obtención de [I^{125}]-BTX ***46***
13. Curva de saturación de BTX radiactiva en CHO-K1/A5 ***47***
14. Curva de saturación de BTX radiactiva en neuronas de hipocampo ***48***

CAPÍTULO I

Introducción

1-1. El metabolismo del DAG ***60***
1-2. Los dominios C1 y la transducción de señales mediada por el DAG ***62***
1-3. Las PKC ***66***
1-4. La PKD ***68***

Antecedentes y Objetivos

1-5. Síntesis de SM por la enzima SMS ***71***

Resultados

1-6. Estructura química del POG ***74***
1-7. Efecto de la incubación de células CHO-K1/A5 con POG durante 3 hs a 37 °C. ***74***
1-8. Estructura química del DOG ***75***
1-9. Efectos sobre el AChR luego del tratamiento con DOG durante 30 min. ***76***
1-10. Microscopía de células CHO-K1/A5 luego del tratamiento durante 30 min con DOG ***77***
1-11. Cambios en la cinética del AChR mediados por DOG incubado durante 30 min ***77***
1-12. Expresión del AChR luego de períodos cortos de incubación con DOG ***78***
1-13. Tratamiento con DOG 300 µM durante 18 hs ***79***
1-14. Células CHO-K1/A5: 24, 48 y 72 hs de exposición a DOG ***80***
1-15. La proteína Dem1 como sensor de DAG en endomembranas ***81***
1-16. Distribución de gotas lipídicas luego de la incubación durante 4 y 18 hs con DOG. ***82***
1-17. Estructura química de los EF utilizados ***83***
1-18. Incubación durante 3 hs con EF y EF- a 37 °C ***84***
1-19. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1/A5 incubadas con EF durante 3 hs a 37 °C ***85***
1-20. Estudio de la afinidad del AChR por la BTX luego de la incubación con EF durante 3 hs. ***85***
1-21. Exposición a EF durante 18 hs ***86***
1-22. Mecanismo de acción del R59949 ***87***
1-23. La inhibición de las DGK por el R59949 afecta a la distribución del AChR. ***87***
1-24. Efectos sobre la expresión del AChR mediados por el R59949 y el DOG ***88***
1-25. Cuantificación de los DAG en la membrana plasmática ***90***
1-26. La localización de la VSVG-GFP se modificó por el aumento de DAG o EF. ***91***
1-27. Disminución del DAG endógeno por sobre-expresión de la DGKζ-EGFP ***91***

1-28. Expresión de EGFP y DGKζ-EGFP en células CHO-K1/A5 ***92***
1-29. Expresión transiente de DGKζ-EGFP en células CHO-K1/A5. ***93***
1-30. Inhibición de la síntesis de PC por el GGOH ***95***
1-31. Ensayos de unión de [I^{125}]-BTX luego de la exposición a GGOH ***95***
1-32. La exposición prolongada a GGOH no altera los niveles de AChR ***96***
1-33. La proteína Nir2 controla la producción de PC en el complejo de Golgi ***97***
1-34. La depleción de Nir2 afecta al AChR ***98***
1-35. Determinación del AChR total por WB ***99***
1-36. Determinación de la PKD por WB en células transfectadas con ARNi-Nir2 ***100***
1-37. Determinación de la cantidad de proteínas y células luego de la transfección con el ARNi Nir2 ***101***
1-38. El ARNi de Nir2 y la disminución de los DAG en Golgi ***102***
1-39. El A23187: un ionóforo de Ca^{2+} ***104***
1-40. Ensayos de unión de radioligando en células CHO-K1/A5 luego de 3 hs de exposición al A23187 ***105***
1-41. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1/A5 tras la incubación con A23187 durante 3 hs ***106***
1-42. Ensayos de unión de radioligando a tiempos cortos luego de la co-incubación con A23187 y DOG ***107***
1-43. Incubación con A23187 durante 18 hs ***107***
1-44. Células CHO-K1/A5 teñidas con BTX fluorescentes luego del tratamiento prolongado con A23187 ***108***
1-45. La incubación durante 18 hs con A23187 disminuye el ensamblado del AChR ***109***
1-46. Co-incubación de A23187 y DOG de células CHO-K1/A5 durante 18 hs. ***110***
1-47. Acción inhibitoria de la Thapsi sobre las SERCA ***111***
1-48. Células CHO-K1/A5 incubadas a distintos tiempos con Thapsi ***112***
1-49. Células CHO-K1/A5 incubadas con Thapsi durante 3 hs ***113***
1-50. Unión de BTX fluorescentes luego del tratamiento con Thapsi por 3 hs ***113***
1-51. 3 hs de incubación con Thapsi junto a DOG ***114***
1-52. Células CHO-K1/A5 expuestas a Thapsi durante 18 hs ***115***
1-53. Determinación de la unión de BTX fluorescentes tras el agregado de Thapsi durante 18 hs ***115***
1-54. Las 18 hs de incubación con Thapsi afectan al ensamblado del AChR ***116***
1-55. Co-tratamiento de Thapsi con DOG durante 18 hs ***117***
1-56. Mecanismo de activación de las PKCc y su inhibición por Gö 6976 ***118***
1-57. Ensayos de unión de [I^{125}]-BTX luego del tratamiento con Gö 6976 ***119***
1-58. Visualización de los filamentos de actina luego del tratamiento con Gö 6976 durante 3 y 18 hs ***120***
1-59. El tratamiento con Gö 6976 durante 18 hs no modifica al ensamblado del AChR ***121***
1-60. Co-incubación con Gö 6976 y DOG a tiempos cortos y largos. ***122***
1-61. Co-incubación durante 18 hs con Gö 6976 y A23187 o Thapsi ***123***
1-62. Unión de BTX fluorescentes en células CHO-K1/A5 tras la incubación con Gö 6976 solo o en presencia de A23187 o Thapsi ***124***
1-63. Las PKCc tras 3 hs de incubación con Gö6976, DOG, A23187 y Thapsi ***125***
1-64. Las PKCc frente a la exposición durante 18 hs con Gö6976, DOG, A23187 y Thapsi ***126***
1-65. La ROT durante 18 hs y las células CHO-K1/A5 ***128***
1-66. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1/A5 tratadas con ROT y DOG durante 18 hs ***129***
1-67. PKCδ: expresión y fosforilación en células CHO-K1/A5 tratadas 18 hs con ROT y DOG ***129***
1-68. La PKCδ en células CHO-K1/A5 expuestas a DOG y ROT durante 4 hs ***130***
1-69. La ROT y el AChR, luego de 4 hs de tratamiento ***131***

1-70. El DOG y las PKCη ***131***
1-71. Mecanismo de activación de PKD y su inhibición por CID755673 ***133***
1-72. Expresión y fosforilación de la PKD en células CHO-K1/A5 tratadas con CID755673 ***133***
1-73. El CID755673 y las células CHO-K1/A5 ***134***
1-74. El DOG y la PKD ***135***
1-75. Mecanismo de acción del KN-62 sobre la CaMKII ***136***
1-76. Incubación de las células CHO-K1/A5 con KN-62 y A23187 ***137***
1-77. Ensayos de unión de [I^{125}]-BTX luego del tratamiento con KN-62 y Thapsi ***138***
1-78. Imágenes de neuronas de Hipocampo en cultivo ***139***
1-79. Neuronas de Hipocampo expuestas a diferentes drogas durante 3 o 4 hs ***140***
1-80. 18 hs de tratamiento de neuronas de Hipocampo con diversos compuestos ***141***

Discusión

1-81. El DAG modula de manera diferencial al AChR dependiendo del tiempo de incubación ***147***
1-82. Mecanismos de transducción de señales gatillados por la incubación con DOG a tiempos cortos ***152***
1-83. El DOG a tiempos largos de incubación y los mecanismos de señalización involucrados. ***155***

CAPÍTULO II

Introducción

2-1. Distribución de los fosfolípidos en una membrana plasmática eucariota ***161***
2-2. Clasificación jerárquica de los dominios de membrana mesoescala ***163***
2-3. Simulación computacional de una membrana modelo de mezcla ternaria ***165***
2-4. Laurdan y di-4-ANEPPDHQ ***167***
2-5. El AChR y el anillo lipídico ***169***
2-6. Sitios posibles de unión del Col al AChR determinados por modelado molecular ***171***

Resultados

2-7. La emisión de di-4-ANEPPDHQ en membranas modelos ***178***
2-8. La GP de di-4-ANEPPDHQ en células CHO-K1/A5 vivas ***179***
2-9. Espectros de excitación y de emisión de di-4-ANEPPDHQ en las células CHO-K1/A5 ***180***
2-10. La CDx y la extracción del Col de membranas lipídicas ***182***
2-11. La visualización de la depleción de Col tras el tratamiento con diferentes concentraciones de CDx ***183***
2-12. Cambios en los valores de la GP de di-4-ANEPPDHQ inducidos por la depleción de Col ***184***
2-13. El tratamiento con CDx-Col no afecta a la GP de di-4-ANEPPDHQ ***181***
2-14. Ausencia de sangrado entre los canales de emisión de $Alexa^{647}$-BTX y de di-4-ANEPPDHQ ***187***
2-15. $Alexa^{647}$-BTX y di-4-ANEPPDHQ ***188***
2-16. Los valores de la GP en regiones de la membrana con o sin presencia de AChR ***188***
2-17. Disminución de la intensidad de fluorescencia en los clústeres de AChR por el tratamiento con CDx ***190***
2-18. La distribución de los clústeres de AChR en la membrana se modifica por la depleción de Col ***191***
2-19. La internalización del AChR ***192***
2-20. La polimerización de actina ***193***
2-21. Cambios en la morfología celular debidos a la disrupción del citoesqueleto de actina. ***194***
2-22. La integridad del citoesqueleto de actina afecta la distribución del AChR

en regiones de la membrana con diferentes valores de la GP ***196***
2-23. La distribución del AChR en dominios de membrana con menor o mayor GP no se modifica por la unión de antagonista o agonistas ***198***
2-24. La internalización de di-4-ANEPPDHQ y fPEG-Chol en células CHO-K1/A5 ***200***
2-25. Distribución de las sondas Alexa^{647}-BTX y di-4-ANEPPDHQ post-internalización. ***202***
2-26. La internalización de fPEG-Chol y Alexa^{647}-BTX en células CHO-K1/A5 ***203***
2-27. La CDx cambia el patrón de internalización de Alexa^{647}-BTX y de fPEG-Chol ***204***
Discusión
2-28. Cambios en la distribución de los clústeres de AChR mediados por la depleción del Col o la disrupción del citoesqueleto, en las células CHO-K1/A5. ***212***

Resumen

El receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) es un canal iónico activado por ligandos, presente en el sistema nervioso central y en la unión neuromuscular. Su estabilidad en la membrana celular es de suma importancia, ya que determina el nivel de respuesta colinérgica, que puede ser alterada ante diversas situaciones fisiológicas y patológicas. En esta Tesis utilizamos como modelo experimental a las células CHO-K1/A5, una línea celular que expresa de forma estable al AChR muscular adulto.

En el primer capítulo nos centramos en el estudio de la posible acción de los diacilgliceroles (DAG) sobre la expresión/distribución del AChR. Realizamos los experimentos con el dioctanoilglicerol (DOG), y definimos dos tiempos de tratamiento, a los que denominamos tiempos cortos (3-4 hs) y largos (18 hs) de incubación. A tiempos cortos, el DOG aumenta los niveles de AChR presentes en la superficie celular, mientras que a tiempos largos los disminuye con el concomitante aumento de los AChR intracelulares. A su vez, el incremento de los DAG endógenos como consecuencia de la alteración de diversas vías metabólicas, afecta de igual manera al AChR a tiempos cortos.

Como el tratamiento con un éster de forbol, molécula análoga al DAG por su capacidad de interaccionar con los dominios C1 de diversas proteínas, resultó en los mismos cambios sobre la distribución del AChR, concluimos que los efectos del DOG eran debidos a su papel como segundo mensajero lipídico. Mediante el empleo de inhibidores enzimáticos y de anticuerpos específicos para las proteínas quinasas C (PKC) clásicas, las PKC noveles y las PKD, determinamos que los DAG a tiempos cortos de incubación favorecerían la inhibición de las PKCc al favorecer su desfosforilación, y esto disminuiría la internalización del AChR. Por otra parte, el estímulo con DOG a tiempos largos de las distintas PKC estudiadas, provocaría el efecto opuesto.

El segundo capítulo se centró en el estudio de la distribución de los clústeres de AChR, generados por la unión de anticuerpos, en dominios lipídicos con diferentes valores de polarización generalizada (GP). Esta medición se realizó gracias a la tinción de las células con di-4-ANEPPDHQ, una sonda fluorescente capaz de poner en evidencia los cambios en la polaridad de la membrana, relacionados a un orden de membrana determinado.

La depleción del colesterol (Col) disminuye los valores promedio de la GP de la membrana, aumentando en consecuencia la asociación de los clústeres de AChR a dominios de membrana más desordenados. Por otra

parte, la despolimerización del citoesqueleto de actina con Latrunculina A, produce el efecto contrario al aumentar la asociación de los acúmulos de AChR con dominios de membrana más ordenados. Estos resultados indican que la distribución del AChR en la superficie celular depende del contenido de Col y de la integridad del citoesqueleto de actina.

Por otra parte, el AChR se internaliza en pequeñas vesículas con valores bajos de la GP y bajo contenido de Col, situación que se mantiene frente a la depleción del Col producida por el tratamiento con metil-β-ciclodextrina, demostrando entonces que la endocitosis del AChR requiere de la disociación previa del receptor con dominios ricos en Col presentes en la membrana.

Abstract

The nicotinic acetylcholine receptor (AChR) is a ligand-gated ion channel, present at the neuromuscular junction and central nervous synapses. Its stability at the cell membrane is important in determining cholinergic responses and can be altered under physiological and pathological conditions. In this thesis, we used CHO-K1/A5 cells, a cell line that expresses the adult muscle AChR in a stable manner.

In the first chapter, we focus on the study of the possible effects of diacylglycerols (DAGs) on expression/distribution of AChR. We performed experiments with dioctanoylglycerol (DOG), and define two treatment times, which we name short (3-4 h) and long (18 h) incubation times. DOG increases AChR levels on the cell surface at short incubation times. At long treatment times however, surface AChRs decrease with the concomitant increase of intracellular AChRs. Besides, endogenous DAGs increase due to the alteration of various metabolic pathways, equally affecting AChR at short times.

Since treatment with a phorbol ester, a DAG analogous because of its ability to interact with the C1 domain of different proteins, resulted in similar changes on AChR distribution, we conclude that DOG effects were due to its role as a lipid second messenger. By using specific enzyme inhibitors and antibodies to classical and novel protein kinases C (PKC) and PKD, we determined that DAGs inhibit PKCc by promoting its dephosphorylation at shorter incubation times, and thus the internalization of AChR decreases. Moreover, DOG stimulation of different PKCs at long treatment times, causes the opposite effect.

The second chapter is focused on the study of AChR clusters distribution, generated by antibody binding, at lipid domains with different generalized polarization (GP) values. This measurement was performed by staining cells with di-4-ANEPPDHQ, a fluorescent probe that senses changes in the polarity of the membrane, related to membrane order.

Cholesterol depletion diminishes the mean cell membrane di-4-ANEPPDHQ GP and concomitantly the number of AChR clusters associated with more disordered membrane domains increases. Depolymerization of the filamentous actin cytoskeleton by Latrunculin A has the opposite effect, with more AChR clusters associated with more ordered domains. In conclusion, the distribution of AChR submicron-sized clusters at the cell membrane depends on cholesterol content and cytoskeleton integrity.

AChR internalizes via small vesicles having lower GP and lower cholesterol content than cell surface. This also occurs upon cholesterol depletion by methyl-β-cyclodextrin. Thus, AChR endocytosis is primed by receptor dissociation from Chol-rich plasmalemma domains.

Abreviaturas

2-D	Dos dimensiones, bi-dimensional
A.N.	Apertura numérica
A23187	Ionóforo de calcio: Ácido 5-(Metilamino)-2-[[2*R*,3*R*,6*S*,8*S*,9*R*,11*R*) -3,9,11-trimetil-8-[(1*S*)-1-metil-2-oxo-2-(1*H*-pirrol-2-il)-etil]-1,7-dioxaspiro[5.5]undec-2-il]metil]-4-benzoxazolecarboxílico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChR	Receptor/es de acetilcolina nicotínico/s
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
BTX	α-bungarotoxina/s
C	Condición control
C1/CRD	Dominio rico en cisteína
CaMK	Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina
CaMKII	Proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} y calmodulina
Carb	Carbamilcolina, carbamoilcolina
CCD	Dispositivo de cargas interconectadas
CCT	Fosfocolina citidiltransferasa
CDx	Metil-β-ciclodextrina
CEPT	Colina/etanolamina fosfotransferasa
CFP	Proteína fluorescente ciano
Ci	Curie
CID755673	Inhibidor de las PKD: 2,3,4,5-Tetrahidro-7-hidroxi-1H-benzofuro[2,3-c]azepin-1-ona
Cito D	Citocalasina D
CK	Colina quinasa
Col	Colesterol
col.	Colaboradores
CPT	Colina fosfotransferasa
DAG	Diacilglicerol/es
DAG lipasa	Diacilglicerol lipasa
Dem1	Proteína fluorescente Daglas de endomembranas
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DGK	Diacilglicerol quinasa
DGKζ-EGFP	DGKζ conjugada con EGFP
di-4-ANEPPDHQ	1-[2-Hidroxi-3-(N,N-di-metil-N-hidroxietil)amoniopropil]-4-[β-[2-(di-n-butilamino)-6-naftil]vinil]piridinio dibromuro
DMSO	Dimetilsulfóxido

DOG	Dioctanoilglicerol
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
dpm	Desintegraciones por minuto
Dpm1	Proteína fluorescente Daglas de membrana plasmática
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
EF	Éster/es de forbol
EF-	Éster/es de forbol inactivo
Ex	Longitud de onda de excitación
Em	Longitud de onda de emisión
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
fPEG-Col	Éster de fluoresceína de colesterol derivatizado con polietilenglicol
FRET	Transferencia de energía resonante de Förster
g	Gramo
GFP	Proteína fluorescente verde
GGOH	Geranilgeraniol
Gö 6976	Inhibidor de las PKCc: 12-(2-Cianoetil)-6,7,12,13-tetrahidro-13-metil-5-oxo-5H-indolo[2,3-a]pirrolo[3,4-c]carbazol
GP	Polarización generalizada
GUV	Vesículas unilaminares gigantes
h	Hora
hs	Horas
Hz	Hertz
I	Intensidad de fluorescencia
$I^{125}Na$	Radionucleído ioduro^{125} de sodio
$[I^{125}]$-BTX	$[I^{125}]$α-bungarotoxina
IC_{50}	Concentración inhibitoria 50
Intra	Intracelular
Jas	Jasplakinolida
K_D	Constante de disociación en el equilibrio
KN-62	Inhibidor de la CaMKII: 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4 fenilpiperazina
L	Litros
Lat A	Latrunculina A
Ld	Liquído desordenada/o
LGIC	Canales iónicos activados por ligando
Lo	Líquido ordenada/o
M	Molar
m1	Medio 1
mA	Miliamper
mAb 210	Anticuerpo monoclonal de ratón contra la subunidad α del AChR

mAb 35	Anticuerpo monoclonal de ratón contra la subunidad α del AChR
MAG	Monoacilglicerol/es
MBq	Megabequerel
mCi	Milicurie
min	Minutos
MIR	Región inmunogénica principal
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milimetros
Munc 13	Proteína de mamíferos unc13
N	Normal
NaN	Valor no numérico
Nic	Nicotina
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
nmoles	Nanomoles
p	Grados de significancia estadística
p (pPKC,pPKD)	Forma fosforilada de la proteína
PA	Ácido fosfatídico
PAP	PA fosfohidrolasa
PC	Fosfatidilcolina/s
PDK-1	Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido
PE	Fofsfatidiletanolamina
pH	-log[H^+]
PKC	Proteína/s quinasa C
PKCa	PKC atípica/s
PKCc	PKC clásica/s
PKCn	PKC novel/es
PKD	Proteína/s quinasa D
PLC	Fosfolipasa/s C
PLD	Fosfolipasa/s D
POG	Palmitoiloleilglicerol
PS	Fosfatidilserina
PVDF	Polivinilidenofluoruro
R	Cociente de imágenes
R59949	Inhibidor de las DGK: 3-[2-(4-[bis-(4-fluorofenil)metilen-1-piperidinil)etil]-2, 3-dihidro-2-tioxo-4(1H)quinazolinona
RasGRP	Proteínas liberadoras de guanina de Ras
RE	Retículo endoplasmático
ROI	Región/es de interés

ROT	Rottlerina, inhibidor de la PKCδ
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Ser	Serina
SERCA	ATPasa/s de retículo sarco- y endoplasmático
SM	Esfingomielina /s
SMS	Esfingomielina sintasa
Sup	Superficie
TAG	Triacilglicerol/es
TGN	Red trans Golgi
Thapsi	Thapsigargina, inhibidor de las SERCA
Thr	Treonina
UNM	Unión neuromuscular
V	Voltios
VSVG-GFP	Proteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular conjugada con la GFP
YFP	Proteína fluorescente amarilla
µCi	Microcurie
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar

Del inglés:

buffer	Solución tampón
Cys-loop	Lazo de cisteína
ERS	*Spin label electron paramagnetic resonance*
mTORC2	*mammalian target of rapamycin complex 2*
PH	*Pleckstrin homology domain*
raft	Balsas, plataformas
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
WB	*Western Blot*

Introducción general

LA COMUNICACIÓN CELULAR

La evolución ha utilizado tres propiedades para asegurar la transmisión de señales hacia regiones muy alejadas de un mismo organismo: la organización de una red celular funcional y jerárquica, la presencia de secuencias pre-codificadas en regiones que pueden gobernar la transición conformacional en las proteínas, e interacciones estrechas entre proteínas para favorecer la propagación de la señal entre ellas, a través de cambios conformacionales (Nussinov R., 2012).

La comunicación intercelular existe desde la simple existencia de organismos unicelulares en la faz de la Tierra. Con la aparición de organismos multicelulares complejos, los mecanismos de señalización se hicieron más sofisticados. Las moléculas encargadas de transmitir el mensaje son de lo más diversas: proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, derivados de ácidos grasos y hasta gases disueltos (Alberts B. y col., 2008).

Existen cinco mecanismos básicos de señalización entre células dentro de un organismo (Figura 1):

- **Dependiente del contacto:** Ambos tipos celulares interaccionar a partir de una molécula señal, presente en la membrana plasmática de una célula, que es detectada por un receptor presente en otro tipo celular (Figura 1A).
- **Parácrino:** Una célula libera moléculas al espacio extracelular, y estas interaccionan con especies celulares diferentes, que se encuentran en cercanías de la célula secretora (Figura 1B).
- **Autócrino:** Sucede cuando una célula libera moléculas señal al espacio extracelular, y estas interaccionan con sus propios receptores de superficie (Figura 1C).
- **Endócrino:** Tiene lugar cuando la comunicación entre la célula que libera la molécula señal y las que interaccionan con ella se realiza través del torrente sanguíneo (Figura 1D).
- **Sináptico:** El proceso de transmisión sináptica más común en los diversos organismos es el mediado por compuestos químicos. Ocurre cuando las neuronas transmiten un impulso eléctrico a lo largo de sus axones, liberando neurotransmisores en el contacto con otras células, sean o no neuronas, generalmente ubicadas a gran distancia del cuerpo neuronal (Figura 1E) (Alberts B. y col., 2008).

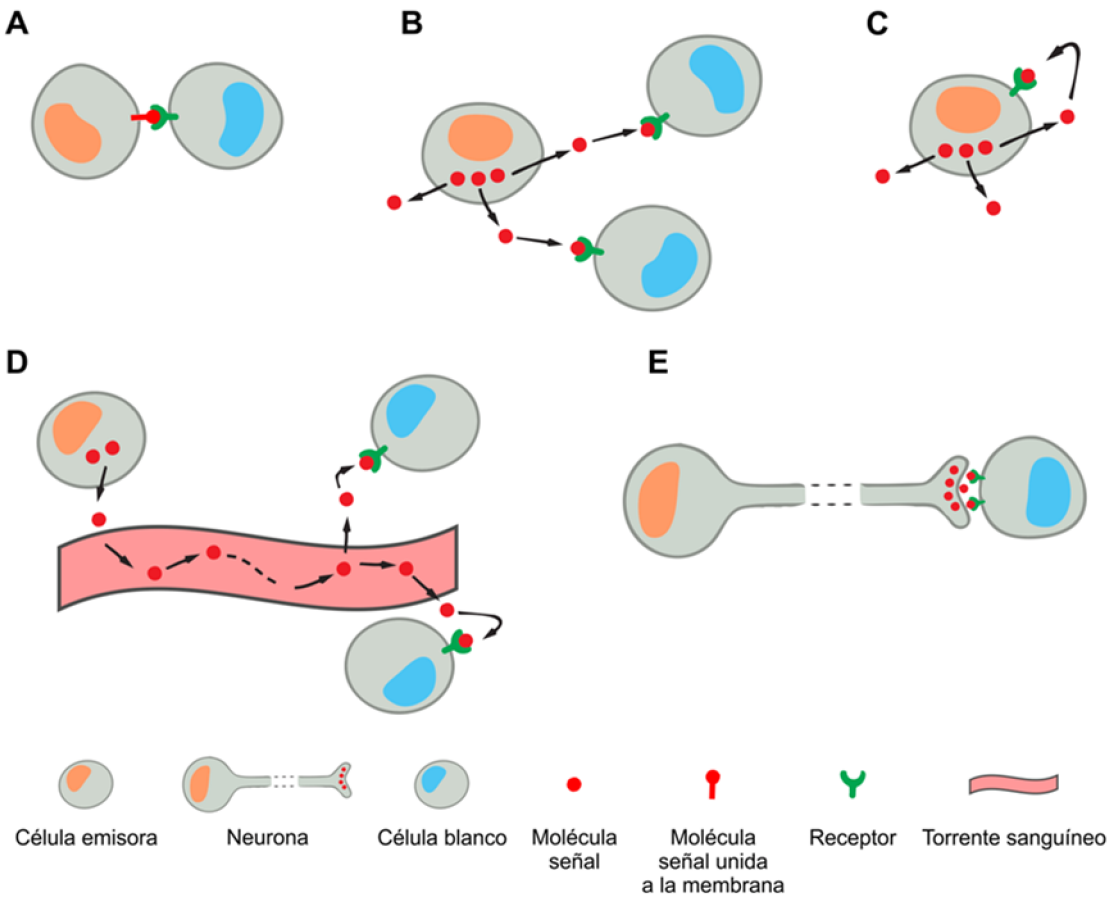


Figura 1. Mecanismos de comunicación celular: A) dependiente del contacto; **B)** parácrino; **C)** autócrino; **D)** endócrino; **E)** sináptico.

La escala de tiempo en la que se logra la transmisión de una señal es muy variable. La expresión de genes demora horas o días, los efectos mediados por proteínas quinasas activadas por lípidos o proteínas pueden tardar minutos, siendo el flujo de iones a través de canales transmembranales, que sucede dentro del orden de los milisegundos, uno de los procesos más rápidos en la comunicación celular (Nussinov R., 2012), solo superado por fenómenos de cambios conformacionales (10^{-5}-10^{-6} s) y vibracionales (10^{-9} s) en proteínas.

Un mecanismo clásico de inicio de una cascada de señalización se observa cuando una molécula-ligando interacciona con un receptor en la membrana de la célula. La unión produce cambios conformacionales que se propagan desde el dominio extracelular del receptor, a través de su segmento transmembranal al interior celular, gatillando diferentes eventos de señalización. Este proceso también puede iniciarse por moléculas que tienen

la capacidad de ingresar a la célula, y comenzar allí la transducción de señales (Alberts B. y col., 2008; Nussinov R., 2012).

Los procesos de señalización celular se ven favorecidos por la compartimentación, no solo temporal, sino espacial de los constituyentes proteicos y lipídicos intervinientes. En este contexto, se destacan las plataformas lipídicas o dominios segregados lateralmente (*rafts*) y los acúmulos o agregados macromoleculares de proteínas, segregados generalmente en compartimientos bidimensionales en el plano de la membrana celular, o clústeres. Ambos constituyen estructuras dinámicas de suma importancia en los mecanismos de señalización. Los clústeres proteicos, así como las plataformas lipídicas, presentan cambios continuos en su composición y localización, lo que indicaría las modificaciones en la señalización con el correr del tiempo. Por lo que, en la transmisión de información a lo largo de un organismo también son muy relevantes las interacciones intermoleculares dentro y entre clústeres (Nussinov R., 2013).

Una forma de entender los procesos de señalización es considerarlos como una propagación alostérica de la señal, donde la información transmitida es capaz de ser amplificada en cada paso de la cascada de señalización (Nussinov R., 2012).

La sinapsis

Los mecanismos de transmisión sináptica pueden encontrarse en organismos vertebrados e invertebrados, desarrollando funciones determinantes para su comportamiento (Ryan T. y Grant S., 2009).

La sinapsis puede definirse como una unión especializada que permite la comunicación de una célula, generalmente una neurona, con una célula blanco, que puede ser el soma, dendrita o axón de otra neurona, así también como membranas plasmáticas de células musculares o secretorias. La función de esta interacción es la transmisión de información proveniente de los circuitos neuronales (Pereda A. y col., 2013; Bennett M., 2000).

Existes dos mecanismos principales de transmisión sináptica: eléctrica o química (Figura 2):

- **Sinapsis eléctrica:** Se basa en la comunicación interneuronal a través de uniones comunicantes, compuestas por canales hidrofílicos intercelulares.

Estos canales se forman por la conexión de dos canales iónicos, uno de cada célula, permitiendo el pasaje directo y bidireccional de moléculas de señalización (Figura 2A). Por lo tanto, las células conectadas por una sinapsis eléctrica comparten las variaciones del potencial de membrana que ocurren en cualquiera de ellas individualmente (Pereda A. y col., 2013). Las sinapsis eléctricas pueden ser de tipo excitatorio o inhibitorio, dependiendo el signo del potencial eléctrico de este proceso de las características de la señal presináptica en condiciones fisiológicas. Se ha demostrado que dependiendo del contexto, se pueden producir efectos contrapuestos (Pereda A. y col., 2013). La transmisión eléctrica no es la más común en el sistema nervioso (Bennett M., 2000). El primer ejemplo de su existencia fue descubierto en la retina (Pereda A. y col., 2013).

- **Sinapsis química:** En esta comunicación intercelular, el botón presináptico libera neurotransmisores al espacio sináptico, los que interaccionan con receptores específicos ubicados en la membrana postsináptica (Figura 2B). La acción sobre dichos receptores involucra ya sea la activación de canales iónicos y/o sistemas de segundos mensajeros (Bennett M., 2000).

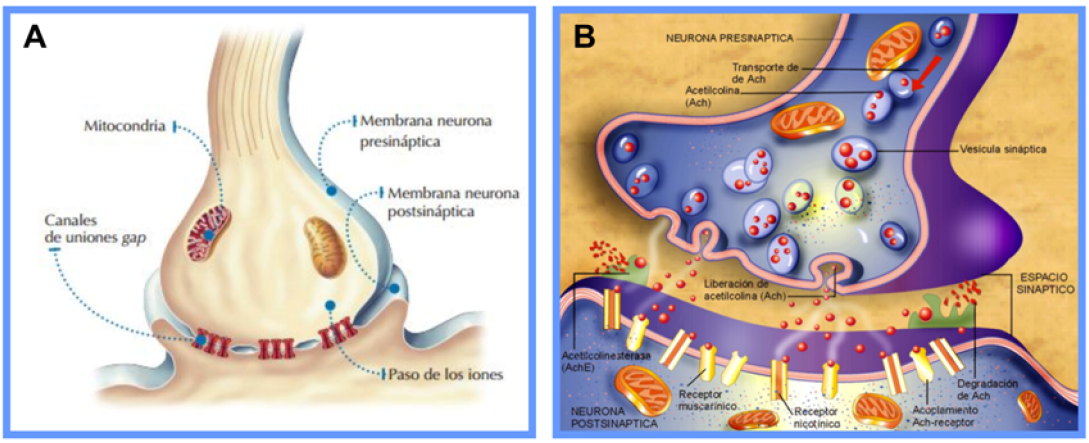


Figura 2. Tipos de transmisión sináptica. A) Sinapsis eléctrica (Tomado de http://www.taringa.net/posts/ciencia-educacion/16405574/MegaPost-Guia-sobre-el-Sistema-Nervioso-Vol-II.html). **B) Sinapsis química** (Tomado de http://neuronas-roxana.blogspot.com.ar/2012/01/proceso-sinaptico-y-tipos.html).

De aquí en adelante, cada vez que mencionemos a la sinapsis, nos estaremos refiriendo exclusivamente a aquella que opera mediante transmisión química.

Hasta finales de la década del 1990, se consideraba a la sinapsis como un sistema estable, en el cual solo los neurotransmisores, iones y dominios proteicos eran los encargados de contribuir a la transmisión sináptica, mientras que los niveles de receptores en las membranas postsinápticas se creían constantes durante el tiempo de vida de las proteínas (Choquet D. y Triller A., 2013).

Con el correr de los años, el descubrimiento de nuevas metodologías de estudio llevó al modelo de membrana plasmática compartimentada en subdominios, diferente al clásico modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson (Singer S. y Nicolson G., 1972). Desde entonces, se propuso que la clave de la transmisión sináptica y su plasticidad se basaba en el movimiento dinámico y constante de sus componentes. El movimiento de los receptores en la membrana plasmática es considerado el principal mecanismo de organización dinámica de la membrana sináptica en dominios de nanoescala (Choquet D. y Triller A., 2013).

En la actualidad, se postula que las membranas celulares son estructuras jerárquicamente organizadas con tres niveles de dominios (2-300 nm), en los cuales las proteínas y los lípidos están atrapados reversiblemente por períodos de tiempo variables (Choquet D. y Triller A., 2013). Estos dominios pueden ser inducidos por el citoesqueleto de actina (40-300 nm), dominios *raft* (balsas o plataformas) (2-20 nm) o dominios de complejos proteicos (3-10 nm) (Kusumi A. y col, 2011). La composición proteica de estos dominios en el terminal postsináptico es muy diversa, ya que se pueden encontrar proteínas quinasas, fosfatasas, de andamiaje, del citoesqueleto, de la adhesión celular, receptores y canales iónicos, entre otras (Collins, M. y col., 2006; Bayes, A. y Grant, S., 2009).

La unión neuromuscular

La unión neuromuscular (UNM) es la resultante de la interacción sináptica de una neurona motora y el músculo esquelético (Figura 3A). Cada motoneurona nace en el asta ventral de la médula espinal y recorre el trayecto de forma ininterrumpida hacia el músculo esquelético, siendo su axón de tipo mielinizado. Cuando este axón en su porción terminal se encuentra en cercanías del tejido muscular, pierde su cubierta de mielina y se divide en varias ramas nerviosas que entran en contacto con el músculo, donde son cubiertas por las células de Schwann (Figura 3A). La separación entre ambos

tejidos se denomina espacio o hendidura sináptica, y allí el músculo esquelético presenta invaginaciones profundas (Figura 3B) (Martyn J. y col., 2009; Gómez A. y col., 2010).

La comunicación neuromuscular se logra por la liberación moléculas de acetilcolina (ACh) desde las terminaciones nerviosas, que interaccionan con los receptores de acetilcolina nicotínicos (AChR), presentes en las membranas postsinápticas (Figura 3C). La apertura de los canales iónicos de los AChR produce la entrada de sodio al terminal postsináptico, desencadenando eventos que culminan con la contracción muscular (Martyn J. y col., 2009).

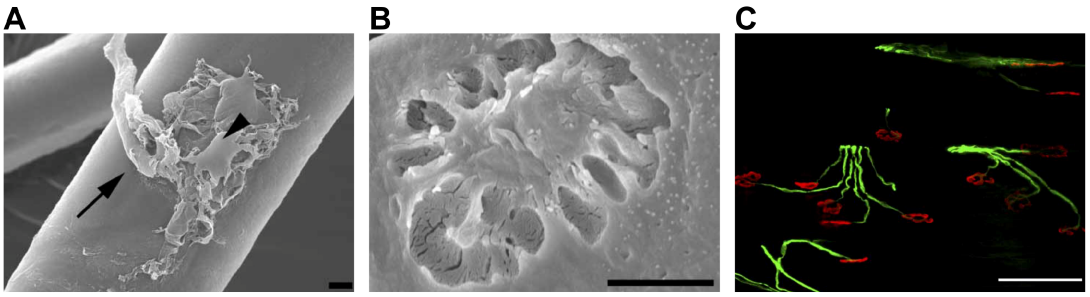


Figura 3. La UNM. A) Micrografía electrónica de barrido de una UNM de rata, donde la flecha muestra al axón mielinizado de una motoneurona, mientras que la punta de flecha pone en evidencia una célula de Schwann. **B)** Tras la remoción químico-mecánica de las estructuras presinápticas de (A), se logran apreciar las ondulaciones del músculo esquelético en el sitio de la UNM. **C)** Inmunohistoquímica de músculo esquelético de rata, donde en verde se pone en evidencia el tejido nervioso marcado con anticuerpo anti-neurofilamento y en rojo los AChR presentes en la UNM, teñidos con Alexa^{594}-BTX. Escala: 5 µm (A y B) y 100 µm (C). Imágenes tomadas de Gómez A. y col., 2010.

La síntesis de acetilcolina (ACh) tiene lugar en el terminal del nervio motor, donde es almacenada en vesículas pequeñas, listas para liberarse en la hendidura sináptica, frente a la llegada de un potencial de acción al botón presináptico. Dicho potencial conduce a la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la terminación nerviosa, incrementando abruptamente la concentración del catión. En consecuencia, se desencadena una serie de eventos intracelulares que favorece el desplazamiento de las vesículas conteniendo ACh a la superficie de la terminal nerviosa, su fusión y posterior liberación en la hendidura sináptica (Cohen-Cory S., 2002).

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) es la encargada de la degradación de la ACh liberada al espacio sináptico, donde aquellas moléculas que no interaccionan inmediatamente con los AChR, o aquellas que fueron liberadas de estos receptores tras cumplir su función de activación, son hidrolizadas por

la enzima en colina y acetato. La colina resultante es recaptada por el terminal nervioso para la síntesis de nuevas moléculas de ACh. La forma principal de la AChE se encuentra en el espacio sináptico unida a la membrana basal por finas fibras de colágeno, tras ser secretada por el músculo (Cohen-Cory S., 2002).

Los receptores ubicados en la membrana postsináptica tienen una ubicación diferencial. Sobre las cimas de los pliegues del tejido muscular se ubican los AChR en alta densidad (aproximadamente 1-5 millones por UNM, dependiendo de la especie), mientras que los canales de sodio activados por voltaje se localizan en la profundidad de dichas ondulaciones. La zona cercana a la cima de los pliegues contiene ambas clases de canales iónicos, y por tal motivo es muy importante en la transmisión neuromuscular, ya que la despolarización producida por los AChR se propaga a través de la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje, resultando finalmente en la contracción muscular (Martyn J. y col., 2009).

Unas de las propiedades funcionales más importantes de la UNM es la capacidad de vencer al umbral de activación de la membrana postsináptica muscular, manteniendo dicha activación gatillada por potenciales de acción breves, para asegurar el éxito de la transmisión nerviosa y la contracción muscular resultante, acciones que logra mediante la liberación del neurotransmisor en exceso (Meriney S. y Dittrich M., 2013).

EL AChR

Los receptores *Cys-loop*

Los canales iónicos activados por ligando (LGIC) que componen la familia de receptores *Cys-loop* (lazo de cisteína) se caracterizan por estar formados por cinco subunidades, idénticas o diferentes, que originan un pentámero alrededor de un eje central donde se ubica el canal iónico (Kalamida D. y col., 2007; Gotti C. y col., 2009; Tsetlin V. y Hucho F., 2009; Changeux JP., 2010). Los AChR, los receptores de glicina, los receptores $GABA_A$, los receptores de serotonina 5-HT_3 y algunas proteínas de procariotas integran esta familia (Tsetlin V. y col., 2011). Que se hayan encontrado receptores del tipo *Cys-loop* en células procariotas (Tasneem A. y col., 2004;

Bocquet N. y col., 2007), replanteó el origen evolutivo de esta superfamilia a billones de años atrás (Corringer P. y col., 2012).

La región característica de estos receptores, el *Cys-loop*, se localiza en el sitio de unión de ligandos, donde este fragmento altamente conservado consta de 13 aminoácidos ubicados entre dos residuos de cisteína unidos por un puente disulfuro en el extremo N-terminal (Tsetlin V. y col., 2011).

Los receptores *Cys-loop* promueven el flujo transmembranal del orden de 10^5 aniones o cationes por milisegundo. La activación de estos canales iónicos por ligandos específicos permite el pasaje pasivo de iones a favor de un gradiente electroquímico, cambiando de esta forma el potencial de membrana (Sine S. y Wang H., 2010).

Historia del AChR

Noventa años atrás, Dale distinguió los efectos diferenciales producidos por la nicotina y la muscarina (Dale H., 1914). Sus experimentos culminaron con el descubrimiento de las dos familias de receptores activadas por el neurotransmisor ACh, cuyo nombre se basó en la afinidad específica por estos ligandos naturales. Con el correr de los años, el AChR se convirtió en uno de los receptores más estudiados.

Dentro de los aspectos importantes a destacar del AChR:

- Fue el primer LGIC identificado (Changeux JP., 2012).
- Es el padre fundador de la familia de los receptores *Cys-loop* (Changeux JP., 2012).
- El descubrimiento de la presencia de AChR en los órganos eléctricos, favoreció su estudio exhaustivo (Nachmansohn D., 1959). En 1970 se logró el primer aislamiento del AChR, a partir del órgano eléctrico de gymnotidae *Electrophorus electricus* (Changeux JP. y col., 1970). Los años posteriores se repitieron los protocolos, utilizando los órganos eléctricos de este pez de agua dulce (Changeux JP. y col., 1971; Hucho F. y Changeux JP., 1973) y de los peces eléctricos marinos *Torpedo californica o marmorata* (Miledi R. y col., 1971; Cohen J. y col., 1972; Raftery M., 1973).
- Fue la primera proteína de la que se obtuvieron registros electrofisiológicos por la técnica de patch-clamp (Neher E. y Sakmann B., 1976).
- Fue el primer canal iónico capaz de mantener su funcionalidad cuando se reinsertaba en membranas lipídicas modelo (Nelson N. y col., 1980).

- La secuenciación completa de sus cuatro cadenas polipeptídicas utilizando métodos recombinantes se logró antes de que estos protocolos sean ampliamente difundidos (Noda M. y col., 1983).
- Con el aislamiento de la α-bungarotoxina (BTX) del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus* (Chang C. y Lee C., 1963), se logró obtener la primera toxina que interaccionaba con los AChR, la cual empezó a utilizarse como herramienta experimental para ponerlo en evidencia (Fiszer de Plazas S. y De Robertis E., 1972; De Robertis E. y Barrantes F., 1972; Vogel Z. y col., 1972).
- En 1986 se descubrieron los AChR neuronales (Boulter J. y col., 1986).

Estructura y función

El AChR es una glicoproteína de 290 kDa compuesta por subunidades homólogas ensambladas delimitando un poro central. Gracias al estudio preliminar del AChR purificado de *E. electricus*, se pudo inferir su composición pentamérica (Hucho F. y Changeux JP., 1973). Los AChR se localizan en la unión neuromuscular, en el sistema nervioso y en células no neuronales, como linfocitos, células epiteliales, macrófagos, y muchas otras células de estirpe no neural (Unwin N., 2005; Zouridakis M. y col., 2009).

Las subunidades

La organización de cada subunidad del AChR presenta un patrón similar, ya que cada cadena polipeptídica consta de: un fragmento N-terminal extracelular de aproximadamente 200 aminoácidos que contiene el *Cys-loop*; cuatro fragmentos transmembranales (M1-M4); un bucle citoplasmático de 100 o más aminoácidos que conecta los fragmentos M3 y M4; y finalmente, el fragmento C-terminal, que también es extracelular (Figura 4) (Tsetlin V. y col., 2011). Dichas subunidades no solo tienen un tamaño similar sino que también comparten su plegado tridimensional (Unwin N., 2005).

Existe una gran variedad de AChR, distintos farmacológicamente dependiendo de las combinaciones pentaméricas de las 17 subunidades conocidas en vertebrados (α1-α10, β1-β4, δ, γ y ε) (Zouridakis M. y col., 2009; Unwin N., 2013).

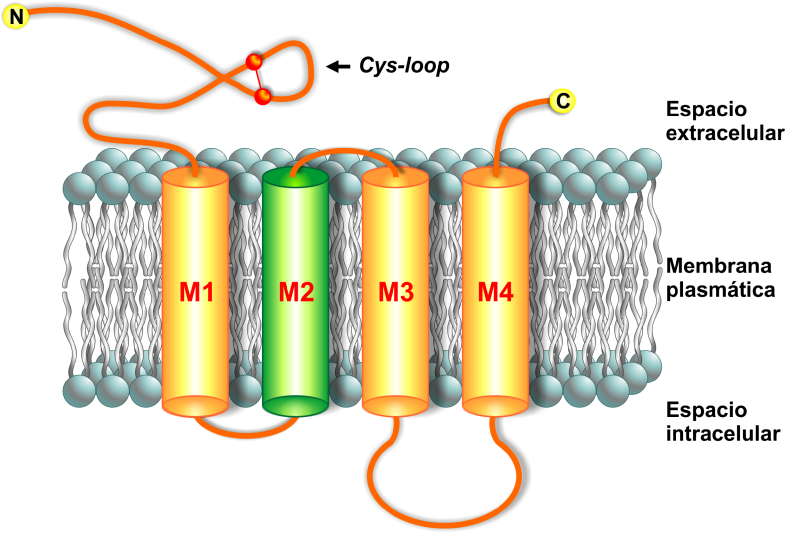


Figura 4. Estructura de cada subunidad del AChR. En el dibujo se observan las α-hélices transmembranales M1-M4, donde M2 se colorea diferente al resto ya que no se encuentra en contacto directo con los lípidos de la membrana.

El AChR muscular humano es un heteropentámero formado por las subunidades $\alpha 1_2\beta 1\gamma\delta$ en el embrión, mientras que el adulto reemplaza la subunidad γ por ε ($\alpha 1_2\beta 1\varepsilon\delta$) (Figura 5). La inervación del músculo esquelético gatilla este cambio de subunidades, donde la estructura del AChR maduro se mantiene a lo largo de la vida (Zouridakis M. y col., 2009; Unwin N., 2013). La conversión de las subunidades de todos los receptores presentes en la UNM comienza antes del nacimiento, y continúa en el tiempo. Este proceso requiere de dos semanas en roedores (Sanes J. y Lichtman J., 2001), mientras que en la especie humana requiere de más tiempo (Martyn J. y col., 2009). La aparición postnatal del AChR inmaduro en la UNM se observa frente a situaciones patológicas que afecten directa o indirectamente al músculo esquelético, como lo son la injuria de las motoneuronas, las quemaduras o la septicemia (Martyn J. y col., 2009), así también como las enfermedades genéticas como los síndromes miasténicos (Barrantes F., 2007).

Por la similitud estructural (homología del 55-80 %) del AChR fetal con el receptor de *Torpedo* ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) (Figura 5), ambos son considerados AChR de tipo muscular (Unwin N., 2005; Zouridakis M. y col., 2009; Unwin N., 2013).

Por otra parte, los AChR neuronales pueden ser homopentámeros de subunidades α (α7-α10) o heterómeros combinados de α (α2-α6) y β (β2-β4) (Figura 5). Según las subunidades y su relación estequiométrica, los AChR neuronales varían su localización y sus propiedades farmacológicas, biofísicas y funcionales (Zouridakis M. y col., 2009; Tsetlin V. y col., 2011).

Una clasificación de los AChR neuronales se basa en la afinidad de los receptores por la BTX. Los receptores homo o heteroméricos formados por las subunidades α7-α10 presentan alta afinidad por la toxina, mientras que los

AChR heteroméricos resultantes de la combinación de las restantes subunidades α y β no interaccionan con la BTX (Tsetlin V. y col., 2009; Colombo S. y col., 2013).

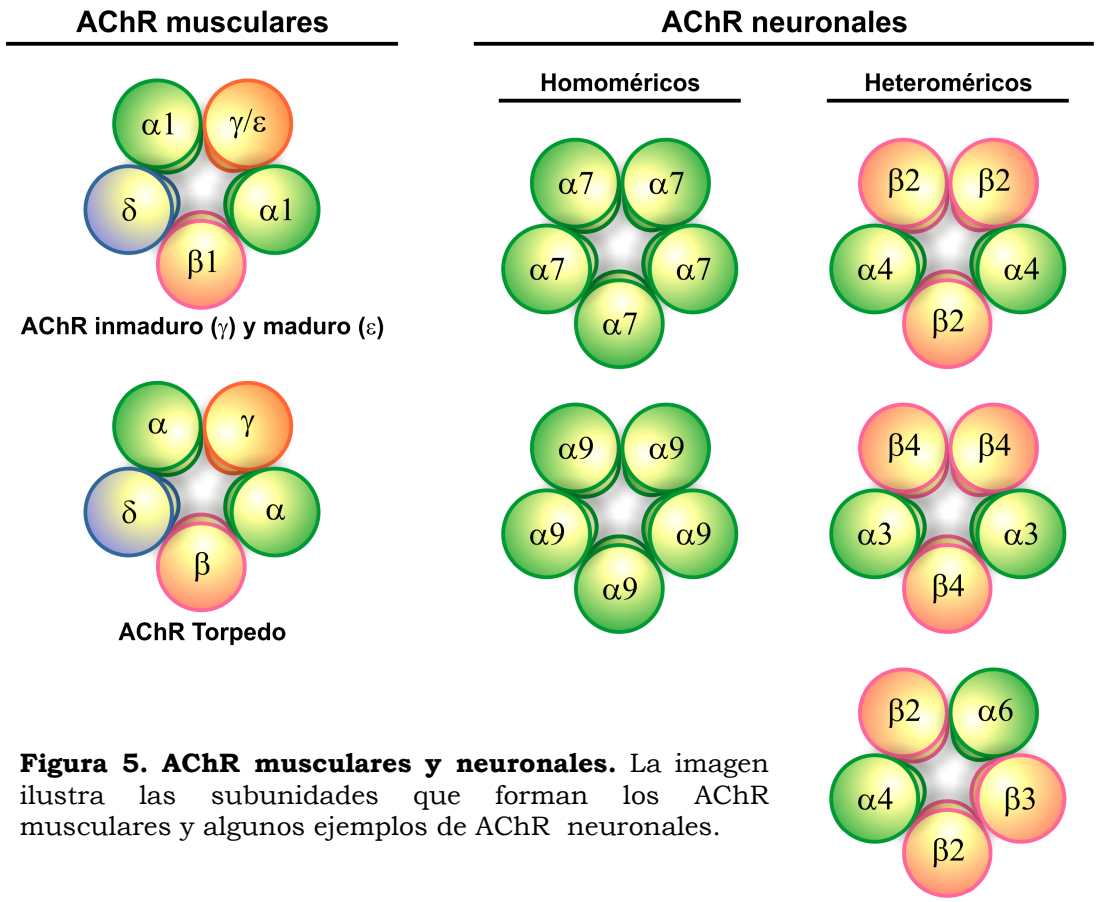


Figura 5. AChR musculares y neuronales. La imagen ilustra las subunidades que forman los AChR musculares y algunos ejemplos de AChR neuronales.

Los dominios

Hasta el presente, el estudio estructural de mayor resolución del AChR fue alcanzado mediante microscopía electrónica de membranas tubulares de *Torpedo* congeladas en un medio que semejaba las condiciones fisiológicas del entorno del AChR, alcanzándose a discernir las cadenas polipeptídicas de la proteína con 4 Å de resolución (Unwin N., 2005). En combinación con datos de la fisiología y la bioquímica de este receptor, fue posible obtener una definición integral de la estructura (Figura 6, A, B y C) (Unwin N., 2013). Existen estudios estructurales de mayor resolución obtenidos mediante difracción de rayos X, pero solo abarcan la porción extracelular del AChR (Dellisanti C. y col., 2007).

Del ensamble natural de las 5 subunidades que forman el AChR, se pueden visualizar tres dominios. Estos dominios son: extracelular,

transmembranal y citoplasmático (Figura 6, A y D), los cuales contribuyen a la unión de los ligandos, contienen la compuerta del canal iónico y permiten la interacción con proteínas que favorecen la clusterización del AChR, respectivamente (Unwin N., 2013).

El dominio extracelular (Figura 6, A, B y D) es el más grande de los dominios del AChR, y presenta los sitios de unión de ligandos, que gatillan la apertura del canal iónico.

Cada subunidad tiene 4 fragmentos transmembranales, M1-M4 (Figura 4). Los fragmentos M2 tienen como función formar el poro del canal, mientras que los fragmentos M4 son los más externos y están en contacto con los lípidos de la membrana en la que está inserto el AChR. Los restantes, M1 y M3, se ubican entre los fragmentos mencionados (Figura 6, A, C y D) (Tsetlin V. y col., 2011; Barrantes F., 2004).

Finalmente, el dominio citoplasmático se forma por la contribución de los bucles presentes en el interior celular entre los fragmentos transmembranales M3 y M4 de todas las subunidades (Figura 6, A y D; Figura 5) (Tsetlin V. y col., 2011; Unwin N., 2013). Este dominio es vital para la clusterización del AChR en la unión neuromuscular. Este proceso es dependiente del estado de fosforilación de dicho dominio y de su interacción con la proteína intracelular rapsina (Borges L. y col., 2008).

Los sitios de unión de ligandos

Los sitios de unión de ligandos del AChR se encuentran en el espacio extracelular, apartados de la membrana plasmática por aproximadamente 40 Å y ubicados del lado opuesto al poro del canal (Unwin N., 2005). Se demostró que la afinidad de los ligandos por el AChR no solo se encuentra influenciada por las subunidades que lo conforman sino también por su relación estequiométrica (Moroni M. y Bermudez I., 2006).

Estos sitios son bolsillos hidrofóbicos ubicados en la interfase de dos subunidades adyacentes y están formados por dos componentes, uno primario (+) y otro complementario (-). La subunidad α siempre forma el "polo" positivo, mientras que las demás subunidades pueden formar el polo negativo de cada complemento (Figura 7) (Millar N. y Gotti C., 2009; Albuquerque E. y col., 2009; Colombo S. y col., 2013).

En estudios ya clásicos sobre el AChR muscular, la unión de BTX tritiada al AChR purificado de *Torpedo marmorata* resultó en la marcación

radiactiva no solo a las subunidades α, sino que también a las δ y γ, infiriéndose que la unión de la toxina se encontraba en las interfases de las subunidades α-δ y α-γ (Figura 7) (Oswald R. y Changeux JP., 1982). La misma localización se observa en los restantes AChR musculares, ya sean inmaduros (α1-δ y α1-γ) o maduros (α1-δ y α1-ε) (Figura 7) (Hogg R. y col., 2003; Tsetlin V. y Hucho F., 2009; Tsetlin V. y col., 2011).

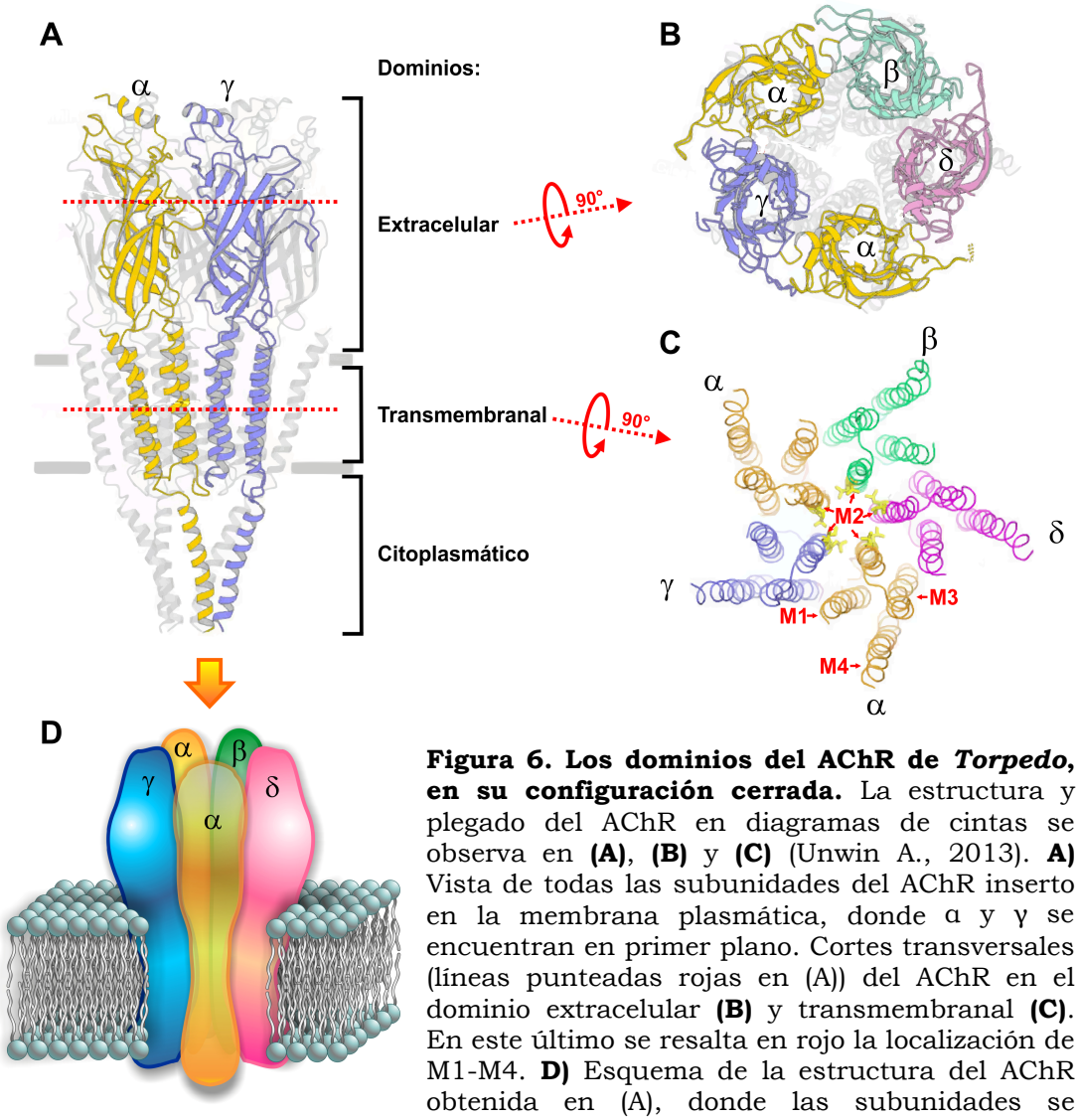


Figura 6. Los dominios del AChR de *Torpedo*, en su configuración cerrada. La estructura y plegado del AChR en diagramas de cintas se observa en **(A)**, **(B)** y **(C)** (Unwin A., 2013). **A)** Vista de todas las subunidades del AChR inserto en la membrana plasmática, donde α y γ se encuentran en primer plano. Cortes transversales (líneas punteadas rojas en (A)) del AChR en el dominio extracelular **(B)** y transmembranal **(C)**. En este último se resalta en rojo la localización de M1-M4. **D)** Esquema de la estructura del AChR obtenida en (A), donde las subunidades se grafican como pseudo-cilindros.

En los AChR neuronales, los sitios de unión de ligandos se encuentran en las interfases de las subunidades α en los receptores homoméricos, dando lugar a un total de cinco sitios (Figura 7), mientras que los heteropentámericos presentan dos sitios de unión localizados entre las subunidades α y las β (Figura 7), salvo los casos de α5 y β3, que no participan en la formación de

dicho sitio, pero podrían estar involucradas en la localización de estos receptores (Zouridakis M. y col., 2009; Taly A. y col., 2009; Colombo S. y col., 2013).

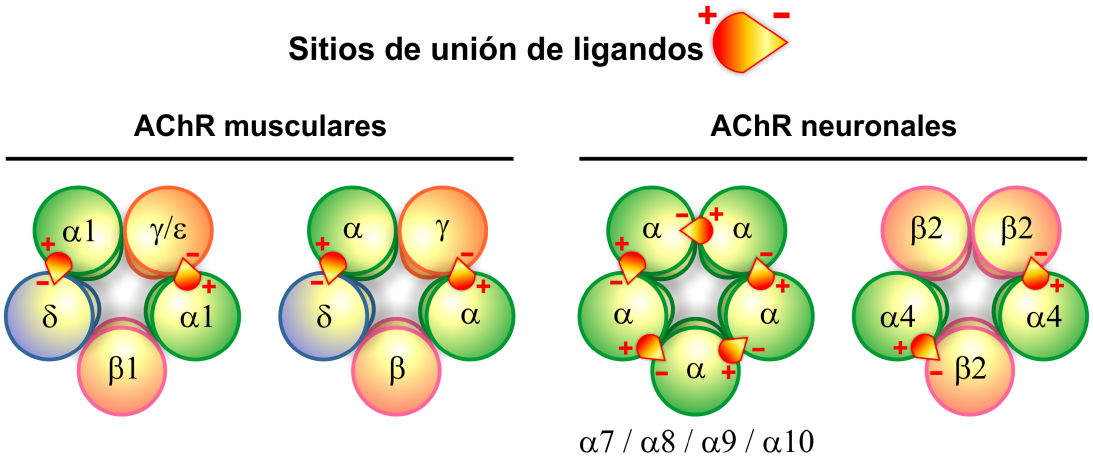


Figura 7. Localización de los sitios de unión de ligandos en las distintas clases de AChR. Los sitios se esquematizan en forma de gotas rojas. Presentan dos componentes: uno primario (+) y otro complementario (-).

Para lograr la activación estable de los AChR heteroméricos se necesita la unión de la ACh a sus dos sitios de unión, mientras que los receptores homoméricos necesitan de la unión de este neurotransmisor en al menos uno de sus cinco sitios (Andersen N. y col., 2013; Colombo S. y col., 2013).

Los estudios realizados en el AChR de *Torpedo* en su estado cerrado demostraron que la afinidad de la ACh por el sitio de unión α-γ era aproximadamente 100 veces menor que por α-δ, situación que se igualaba cuando el canal se encontraba abierto (Andreeva I. y col., 2006; Sine S. y col., 1990; Jackson M., 1988). Jackson M. (1988) postuló que esta diferencia podría deberse a que la baja afinidad (α-γ) favorece la finalización de la respuesta postsináptica, mientras que el sitio de mayor afinidad (α-δ) acelera el proceso de activación del canal iónico.

El canal iónico

El AChR descripto a una resolución de 4 Å, permitió que la apariencia del poro del canal dejara de ser hipotética (Unwin N., 2005). El poro es una estructura estrecha a través de la membrana con agua en su interior. Contiene la compuerta del AChR, la que ubicada en cercanías de la mitad de los segmentos M2, se encarga de permitir el paso de cationes al interior celular

cuando la ACh u otro agonista ocupa los dos sitios de unión de ligando en el AChR muscular (Unwin N., 2005; Unwin N., 2013).

La selectividad del AChR está basada principalmente en una discriminación por tamaño de los cationes (Na^+, K^+ y Ca^{2+}) y en el tapiz de residuos aniónicos en los vestíbulos del poro del canal (Sine S. y Wang H., 2010; Unwin N., 2013).

La unión de ligandos específicos del AChR, como la ACh, gatilla la apertura reversible de la compuerta del poro de canal para permitir el pasaje de Na^+ y K^+, y específicamente de Ca^{2+} en el caso del AChR-α7 (Fucile S., 2004). La entrada de estos cationes despolariza la membrana celular donde se ubica el receptor y en consecuencia se modula la actividad celular o se produce la contracción muscular (Zouridakis M. y col., 2009). El flujo de cationes, principalmente de Na^+ en el receptor muscular, a favor del gradiente de concentración ocurre a gran velocidad, aproximadamente 20.000 iones/ms (Unwin N., 2013).

Los procesos de apertura y cierre de este canal iónico ocurren con extrema rapidez, permitiendo que tanto el inicio (μs) como la finalización de la respuesta postsináptica ocurran inmediatamente (Unwin N., 2013; Chakrapani S. y Auerbach A., 2005; Maconochie D. y col., 1995). Debido a la presencia de dos o más sitios de unión del neurotransmisor en los distintos tipos de AChR, solamente se logra la apertura del canal cuando la concentración de ACh es muy alta (Unwin N., 2013; Dilger J. y Brett R., 1990).

Los AChR son proteínas alostéricas (Changeux JP., 1989; Changeux JP. y Edelstein S., 2005; Auerbach A., 2012) con al menos tres estados conformacionales: un estado de reposo o cerrado, donde no permea iones y tiene baja afinidad por agonistas; un estado abierto, en el cual permite el pasaje de cationes y su afinidad por agonistas es alta; y un estado desensibilizado, donde no permite el pasaje de iones a través de la membrana aunque tiene alta afinidad por sus agonistas (Zouridakis M. y col., 2009). Las subunidades α (ubicada entre γ y β), β y δ están principalmente involucradas en los cambios conformacionales que llevan a la apertura de canal (Unwin N., 2013).

Si bien cuando la compuerta se encuentra cerrada, el poro del canal presenta un diámetro mucho mayor que el del Na^+, lo que haría posible su paso, el tapizado de cadenas hidrofóbicas del vestíbulo del poro constituye una

barrera adicional que impide el pasaje de iones. Cuando el poro se abre frente al estímulo, se hace más amplio y polar en la zona de la compuerta, lo que favorece la entrada de cationes a las células (Unwin N., 2013).

Síntesis, ensamble y degradación

La síntesis y el ensamble del AChR son procesos que ocurren en el retículo endoplasmático (RE) rugoso, siendo ambos procesos notablemente lentos en el caso de esta proteína (Merlie J. y Lindstrom J., 1983; Green W. y Claudio T., 1993). Cada subunidad del AChR es sintetizada en los ribosomas ubicados en dicha organela, para luego insertarse en su membrana (Figura 8) a través de un traslocón (Alder N. y Johnson A., 2004). Estos péptidos sufren procesos de maduración mediante la escisión de secuencias de señalización, oxidación de puentes disulfuro y N-glicosilación en regiones específicas (Colombo S. y col., 2013). El correcto plegado de cada subunidad, previo al ensamblado, es necesario para que los aminoácidos que permiten la interacción entre ellas (segmentos N-terminal y M1) queden expuestos (Keller S. y Taylor P., 1999). El tiempo de latencia entre la síntesis de las subunidades hasta la conformación del pentámero ronda las dos horas (Merlie J. y Lindstrom J., 1983).

Existen dos modelos que explican el ensamblado del AChR muscular, llamados: secuencial y heteromérico. El modelo secuencial postula que las subunidades α1, β y γ se ensamblan para dar un trímero, al que a continuación se le unen las subunidades α1 y δ (Figura 8, RE: flecha verde) (Green W. y Claudio T., 1993). En cambio, el modelo heteromérico considera que el ensamble del AChR se logra por la formación de dos dímeros independientes, δ-α1 y γ-α1, que concluyen en un pentámero al unirse con la subunidad β (Figura 8, RE: flecha azul) (Blount P. y col., 1990).

El proceso de ensamblado de los AChR es crítico, ya que solamente el 30 % de las subunidades sintetizadas son capaces de formar receptores funcionales, tras lograr la correcta topología en la membrana y las modificaciones post-traduccionales (Christianson J. y Green W., 2004; Millar N. y Harkness P., 2008; Wanamaker C. y col., 2003; Colombo S. y col., 2013). En el RE, las proteínas que no alcanzan la conformación o ensamblado correcto no pueden salir de la organela para alcanzar su destino final, sino que son degradadas dentro de proteosomas. La translocación fuera del RE se logra por la formación de enlaces covalentes entre las subunidades

defectuosas y uno o más monómeros de ubiquitina, proceso denominado ubiquitinización (Figura 8) (Colombo S. y col., 2013).

Tras el ensamblado del pentámero, los receptores aptos para insertarse en la membrana celular son transportados en vesículas COPII hasta al aparato de Golgi (Figura 8). La superficie celular es finalmente alcanzada por los AChR que viajaron por los diferentes compartimentos del complejo de Golgi (cis, medio, trans y la red trans Golgi, TGN) y fueron expulsados en vesículas secretorias rumbo a la membrana plasmática (Figura 8) (Colombo S. y col., 2013).

Existen proteínas llamadas chaperonas, que contribuyen a la conformación y maduración apropiada de las subunidades, mediante la estabilización por interacción durante el ensamblado, regulando de esta forma los niveles de AChR ensamblado en el RE (Wanamaker C. y col., 2003).

Que la resultante del ensamble sea una proteína funcional depende de múltiples factores que aún no se han llegado a dilucidar. En el caso particular de las células del músculo esquelético, la estequiometría y las subunidades que componen al AChR son elementos muy importantes, ya que de las 208 combinaciones posibles para el receptor muscular, solo una es funcional (Colombo S. y col., 2013).

En el equilibrio constante de biosíntesis-degradación del AChR, los receptores ya insertos en la membrana celular pueden ser internalizados en compartimentos endosomales tempranos, luego tardíos y finalmente lisosomas, donde son degradados (Figura 8) (Kumari S. y col, 2008; Colombo S. y col., 2013).

Localización, función y patologías relacionadas

Como ya se mencionara, los AChR musculares se localizan en la postsinapsis de la UNM, donde convierten la señal química transmitida por las motoneuronas en corriente eléctrica, mediada por el ingreso de Na^+ al músculo esquelético.

Por otra parte, la localización de los AChR neuronales es extensa y no uniforme. En el sistema nervioso, puede ser pre o postsináptica. La expresión en membranas presinápticas, media la transmisión modulando la liberación de numerosos neurotransmisores (ACh, dopamina, noradrenalina, glutamato y GABA).

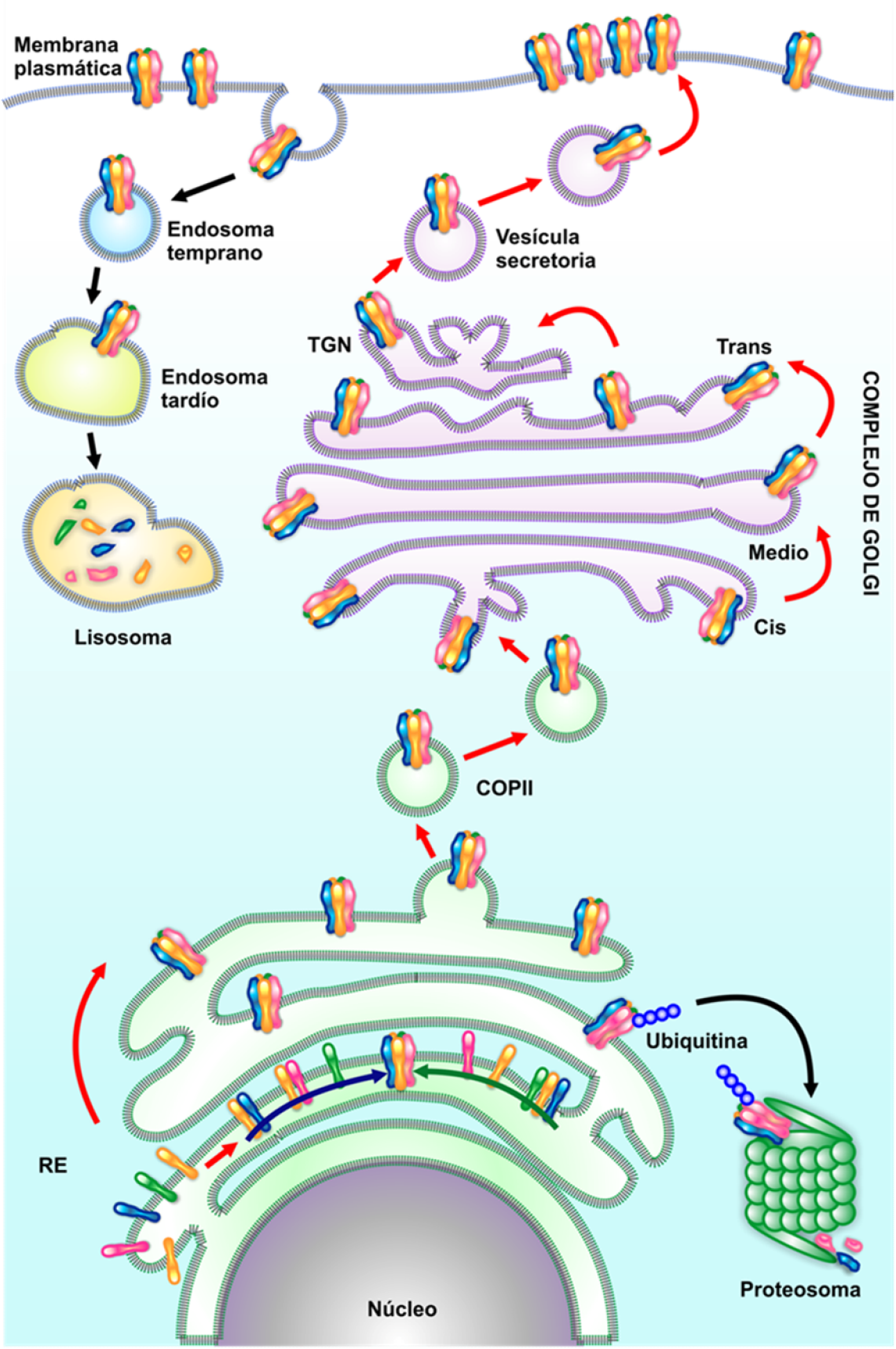


Figura 8. Síntesis, ensamble y degradación del AChR. Las flechas rojas indican el camino de síntesis y tráfico del receptor hasta la membrana plasmática. Los mecanismos de degradación durante el ensamblado (proteosomas) y tras la internalización del AChR (endosomas-lisosomas) se detallan con flechas negras. Los modelos de ensamble secuencial y heteromérico se esquematizan con flechas verdes y azules, respectivamente. El dibujo del AChR y sus colores por subunidad corresponden a la figura 6.

La presencia postsináptica de los AChR neuronales se relaciona con mecanismos de señalización celular (que culmina en algunos casos en la expresión de genes), así como con procesos de excitabilidad, diferenciación y supervivencia neuronal (Zouridakis M. y col., 2009; Hurst R. y col., 2013). Estos receptores se encuentran además en células endócrinas, endoteliales, epiteliales y del sistema inmune (Gahring L. y Rogers S., 2005; Steinlein O. y Bertrand D., 2008), tanto en vertebrados como en invertebrados (Raymond-Delpech V. y col., 2005).

Los receptores neuronales formados solamente por las subunidades α4β2 constituyen el 90 % del los AChR en el cerebro de mamíferos, donde predominan los AChR heteroméricos, mientras que de los receptores homoméricos, el AChR-α7 es el más expresado en el sistema nervioso central (Albuquerque E. y col., 2009; Colombo S. y col., 2013).

Los AChR se encuentran implicados en procesos fisiológicos y patológicos, relacionados a la contracción muscular, el aprendizaje y la memoria, el control motriz, la excitación y la analgesia, por lo que son ampliamente estudiados como blanco terapéutico en la búsqueda de nuevas drogas y posibles tratamientos (Zouridakis M. y col., 2009).

El AChR muscular está involucrado en la enfermedad autoinmune miastenia gravis, donde la mayoría de los pacientes (85 %) presentan auto-anticuerpos contra los AChR presentes en el músculo esquelético (Silvestri N. y Wolfe G., 2012; Wondolowski J. y Dickman D., 2013). Estos anticuerpos reconocen, en su mayoría, la región inmunogénica principal (MIR) ubicada en el dominio extracelular del AChR (Tzartos S. y Lindstrom J., 1980; Beroukhim R. y Unwin N.,1995; Tzartos S. y col., 1998). Además afectan la funcionalidad normal del receptor al bloquear el sitio de unión de la ACh, acelerar su internalización y/o favorecer su degradación por procesos dependientes del complemento (Silvestri N. y Wolfe G., 2012; Wondolowski J. y Dickman D., 2013). En los pacientes, la miastenia gravis se manifiesta con cuadros de debilidad muscular y fatiga (Silvestri N. y Wolfe G., 2012).

La alteración de los niveles de los subtipos restantes de AChR se encuentran asociados a enfermedades como Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, autismo, síndrome de Tourette, déficit de atención, depresión, y trastornos de ansiedad (Gotti C. y Clementi F., 2004; Zouridakis M. y col., 2009), así como también a la dependencia producida por la nicotina y el hábito de fumar (Brody A., 2006).

Materiales y Métodos

MATERIALES

Los reactivos químicos utilizados en este trabajo de Tesis son de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.), excepto los que se mencionan a continuación. Se compró en Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.) la lipofectamina 2000 y la α-bungarotoxina (BTX), proveniente de *Bungarus multicinctus*. El radionucleído Iodo^{125} ($I^{125}Na$) de 2mCi (74MBq) se obtuvo de Perkin Elmer (Wellesley, MA, EE.UU.). Los compuestos Rojo Nilo, Alexa fluor-BTX, Faloidina-Rodamina y los anticuerpos secundarios marcados con Alexas fluorescentes se compraron en Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.) o en Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). La Jasplakinolida (Jas) es de Calbiochem (San Diego, CA, EE.UU.) y el CID755673 es de TOCRIS Bioscience (Bristol, Reino Unido). El ARN de interferencia (ARNi) de la proteína Nir2 se compró en Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.).

Los plásmidos que codifican para las proteínas fluorescentes Daglas de membrana plasmática (Dpm1) y de endomembranas (Dem1) los proveyó el Dr. Yoshio Umezawa, del Departamento de Química de la Escuela de Ciencia, Universidad de Tokio, Tokio, Japón. El anticuerpo mAb 210 fue una donación del Dr. J. Lindstrom, de la Universidad de Pensilvania (EE.UU.). El fPEG-Chol (de inglés: *fluorescein ester of polyethylene glycol-derivatized cholesterol,* éster de fluoresceína de colesterol derivatizado con polietilenglicol) lo donó el Dr. T. Kobayashi, de la Escuela de Postgrado de Ciencias, Universidad de Kyoto, Kyoto, Japón. El di-4-ANEPPDHQ fue un obsequio del Prof. L. Loew, de la Universidad de Connecticut, del Centro de Salud para el Análisis y modelado celular (Farmington, CT, EE.UU.). El plásmido que codifica para la Proteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular conjugada con la Proteína Fluorescente Verde (VSVG-GFP) fue amablemente cedido por el Dr. Alfonso Gonzalez, de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Chile). El Dr. Eunjoon Kim, del Departamento de Ciencias Biológicas, Instituto Avanzado de Ciencia y Tecnología de Corea (KAIST, República de Corea) nos cedió generosamente los plásmidos que codifican para la proteína fluorescente verde (EGFP: *enhanced green fluorescent protein*) sola o adosada a la enzima diacilglicerol quinasa ζ (DGKζ-EGPF).

Los anticuerpos policlonales de conejo anti-PKD, anti-pPKD (Ser^{916}), anti-pPKCα/βII ($Thr^{638/641}$) y anti-pPKCδ/θ ($Ser^{643/676}$) se compraron en Cell Signaling (Beverly, MA, EE.UU.). Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-

PKCβ, anti-PKCη y anti-PKCδ se adquirieron en BD Biosciences (San Jose, CA, EE.UU.). Se compró en Life technologies (Grand Island, NY, EE.UU.) el anticuerpo policlonal de conejo anti-pPKCη (Thr^{655}). Se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EE.UU.) los anticuerpos secundarios policlonales de cabra anti-conejo y anti-ratón conjugados con una peroxidasa (HRP: del inglés *horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante).

MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

Los cultivos se realizaron en un incubador SANYO modelo MCO-18AC a 37 °C y 5 % de CO_2.

Células CHO-K1/A5

El sistema modelo que principalmente se utilizó en este trabajo de Tesis fue la línea celular CHO-K1/A5, desarrollada en nuestro laboratorio (Roccamo A. y col., 1999) a partir de las células CHO-K1 (CHO: *chinese hamster ovary cells*, células de ovario de hamster chino). Esta línea celular, que expresa en forma heteróloga y estable el AChR muscular murino adulto ($\alpha 1_2\beta 1\delta\varepsilon$), se cultivó en placas de 35 mm de diámetro, con medio Ham's F12 con suero fetal bovino al 12 %, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina y 40 µg/mL de G418 como antibiótico de selección.

Neuronas de hipocampo

El cultivo primario de neuronas de hipocampo de embriones de rata se realizó según Kaech S. y Banker G. (2006) y Brocco M. y col. (2003). Se aparearon ratas de la cepa Wistar-INIBIBB, utilizándose hembras a partir de los 2 meses y medio de vida. Se controló el día de apareamiento con la pérdida del tapón vaginal. El día 18 post-apareamiento se sacrificó a la hembra en una cámara de CO_2 y se le extrajeron los embriones (10-15 en promedio/rata). Los hipocampos de embriones de 18 días se obtuvieron por disección de sus cerebros. Durante el procedimiento, tanto los cerebros como los hipocampos

se conservaron en medio de Hank (KCl 0,4 g/L; K_2HPO_4 0,06 g/L; NaCl 8 g/L; NaH_2PO_4 0,05 g/L; glucosa 1 g/L; $NaHCO_3$ 0,35 g/L; pH 7,4). Luego se disgregó el tejido hipocampal para obtener las neuronas usando tripsina 1x en medio Neurobasal (Invitrogen) durante 15 min a 37 °C. Se extrajo el medio con tripsina y las neuronas se resuspendieron en medio Neurobasal con suero (glutamina 2 mM; glucosa 0,35 %; penicilina 100 U/mL; estreptomicina 100 µg/mL; suero de caballo 10 %). Las células se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron 50.000 neuronas/pocillo en multiplacas de 24 pocillos. Para favorecer la adherencia de las neuronas, las placas fueron pre-tratadas con hidrobromuro de poli-L-lisina 0,1 mg/mL a temperatura ambiente durante la noche previa a la disección. Luego las placas se lavaron con agua ultrapura estéril y se guardaron en el incubador con 500 µL de medio con suero/pocillo a la espera de la siembra de las neuronas.

Transcurridas 3 hs de la siembra, se cambió el medio de las multiplacas por medio Neurobasal definido (glutamina 2 mM; glucosa 0,35 %; penicilina 100 U/mL; estreptomicina 100 µg/mL, ovoalbúmina 1 g/L; suplementos B27 y N2 1X, de Invitrogen). Las neuronas se mantuvieron en cultivo en medio definido a 37 °C hasta el día 14, en el cual se realizaron los experimentos.

MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Las células CHO-K1/A5 crecieron en placas con cubreobjetos de vidrio de 20-25 mm de diámetro en medio Ham's F12 a 37 °C. Luego de las incubaciones con los fluoróforos correspondientes a cada experimento, las células se lavaron tres veces con medio 1 (m1: NaCl 150 mM; $CaCl_2$ 1 mM; $MgCl_2$ 1 mM; KCl 5 mM; HEPES 20 mM; pH 7,4) frio y se montaron sobre un portaobjeto para ser examinadas en el microscopio.

La visualización de las vesículas unilaminares gigantes (GUV) se realizó colocando una gota de 10 µL de la suspensión que las contenía entre un porta- y un cubre-objeto.

Microscopios

Microscopía de campo ancho

Los objetivos de inmersión utilizados fueron de 40x (1.0 A.N.), 60x (1.4 A.N.) y 100x (1.49 A.N.). Los filtros de excitación, de emisión y dicroicos fueron los apropiados para cada fluoróforo. Se obtuvieron imágenes de 16 bits que se exportaron para su posterior análisis en formato tiff.

Se utilizaron dos microscopios Nikon (Chiyoda, Tokio, Japón):

- **Microscopio Nikon Eclipse E-600:**

Acoplado con una cámara digital CCD (del inglés *Charge-Coupled Device*, dispositivo de cargas interconectadas) SBIG modelo ST-7 (765×510 píxeles, Santa Bárbara, CA, USA) operada con el software CCDOPS (SBIG Astronomical Instruments, versión 5.02).

- **Microscopio Nikon Eclipse TE-300:**

La particularidad de este equipo es que tiene adosado entre la cámara y el microscopio un *Dual-Viewer* (Figura 9), construido en el Departamento de Nanobiofotónica del Instituto Max Planck para la Química Biofísica (Göttingen, Alemania). Este dispositivo divide la fluorescencia de emisión en dos haces, usando un segundo filtro dicroico antes de la llegada de dichos haces a la cámara (Figura 9, D2). Cada haz de emisión se separó espectralmente por los filtros de emisión específicos y se captó por una mitad de la cámara CCD Hamamatsu ORCA-ER C4742-95-12ERG (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) refrigerada termostáticamente. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con el programa SlideBook (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO, EE.UU.).

Este microscopio se utilizó para la visualización de imágenes de cultivos celulares marcados con di-4-ANEPPDHQ (En la figura 9: F1: 488/10 nm; D1: 488 nm; D2: 610 nm; F2: 680/50 nm; F3: 575/50 nm; Chroma Technol. Corp., Rockingham, VT, EE.UU.) y para evaluar la expresión de las proteínas Dpm1 y Dem1 (En la figura 9: F1: 438/24 nm; D1: 458 nm; D2: 495 nm; F2: 542/27 nm; F3: 483/32 nm; Semrock, New York, EE.UU.).

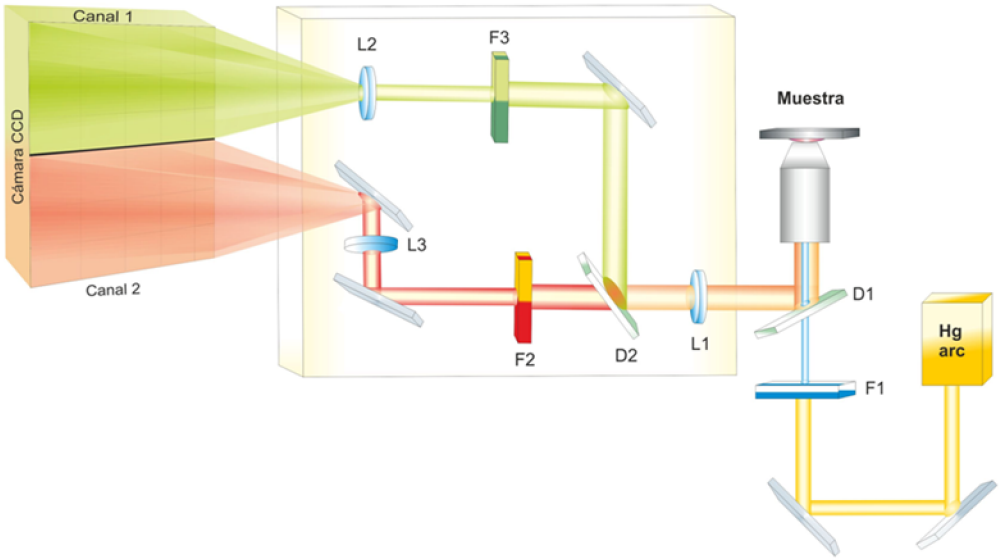


Figura 9. Esquema del *Dual-Viewer*. La longitud de onda de excitación se selecciona por un filtro de excitación (F1). La fluorescencia de emisión de la muestra se separa de la de excitación por una lente dicroica (D1). Dicha emisión se separa una vez dentro del *Dual-Viewer* por una segunda lente dicroica (D2). Cada haz de emisión obtenido es filtrado por el filtro de emisión correspondiente (F2 y F3) y finalmente llega a la cámara CCD para lograr la visualización de cada imagen en una mitad de la cámara. L1, L2 y L3 son lentes que direccionan los haces de emisión.

Microscopía Confocal

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS-SP2 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Alemania) equipado con un divisor de haz de emisión óptico. Este microscopio se utilizó para la visualización de las GUV, con un objetivo de inmersión de 63x (1,2 A.N.).

Fijación y permeabilización de células

La fijación de las células CHO-K1/A5 se realizó utilizando paraformaldehido al 2 % en m1 durante 40 min a temperatura ambiente. Luego de lavar 3 veces con m1 frio, las células se permeabilizaron con 0,1 % de Tritón X-100 en m1 por 15 minutos a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados con m1 y se tiñeron las células con las sondas correspondientes. Tanto la fijación como la permeabilización pueden alterar la forma de marcación de las células, es por eso que solamente se emplearon cuando el objetivo fue marcar algún componente del interior celular y la sonda utilizada no atravesaba la membrana plasmática.

Sondas fluorescentes y sus protocolos de incubación

Antes y después de la tinción de células CHO-K1/A5 con los diferentes fluoróforos, las placas se lavaron tres veces con m1 frio. En los casos que se co-incubaron con fluoróforos para teñir un mismo compartimento celular (ej.: la membrana plasmática), siempre se realizó primero la tinción que demoraba más tiempo.

Alexa^{488}-, Alexa^{594}- y Alexa^{647}-BTX

Estos derivados fluorescentes de la BTX se utilizaron para poner en evidencia a los AChR presentes tanto en la superficie como en los compartimentos intracelulares. En todos los casos la concentración final de estas sondas fue de 500 nM en m1 y se las incubó durante 1 h a 4 °C para el AChR de superficie o a 1 h a temperatura ambiente si el objetivo era el de marcar al AChR intracelular.

En el caso de la tinción de superficie, si la misma placa se utilizaba para marcar los AChR intracelulares, la tinción de superficie se realizó antes de fijar y permeabilizar las células.

Las longitudes de onda de excitación y de emisión de Alexa^{488}-, Alexa^{594}- y Alexa^{647}-BTX son: 499 nm y 520 nm; 589 nm y 618 nm; 652 nm y 667 nm, respectivamente.

Sondas específicas del Capítulo I:

- **Rojo Nilo:**

La función de este fluoróforo es poner en evidencia a las gotas lipídicas presentes en el interior celular (Greenspan P. y col., 1985). La tinción se realizó con Rojo Nilo 1,5 µg/mL en m1 durante 10 min a temperatura ambiente en células previamente fijadas y permeabilizadas. Las longitudes de onda de excitación y de emisión son de 510 nm y 585 nm, respectivamente. Se cuantificó la cantidad de gotas lipídicas por célula para cada condición experimental.

- **Faloidina-Rodamina:**

La Faloidina es un péptido bicíclico aislado del hongo mortal *Amanita phalloides*. La conjugación de dicho péptido con el fluoróforo Rodamina,

permite la visualización de los filamentos de actina. Esta sonda se excita a una longitud de onda de 540 nm, emitiendo a 565 nm.

Tras los tratamiento con las drogas correspondientes, las células CHO-K1/A5, se fijaron y permeabilizaron, para luego ser incubadas con una dilución de Faloidina-Rodamina 1/500 durante 30 min a temperatura ambiente.

Sondas específicas del Capítulo II:

- **mAb 210 y anticuerpo secundario-Alexa^{647}:**

La marcación del AChR de superficie también se realizó utilizando el anticuerpo mAb 210, el cual reconoce un epitope extracelular de la subunidad α1 del AChR. Las células se incubaron con mAb 210 y subsecuentemente con el anticuerpo conjugado con Alexa^{647}. Ambos tratamientos se realizaron durante 1 h a 4 °C utilizando una dilución de cada anticuerpo de 1/250 en m1 con BSA (albúmina sérica bovina) al 2 %. Este tratamiento permite la formación de clústeres de AChR en la membrana celular, lo que no ocurre con la marcación con la BTX fluorescente donde la tinción en la membrana es difusa.

- **fPEG-Chol:**

La marcación del colesterol (Col) presente en la superficie celular se realizó con 1 µM de fPEG-Chol en m1 durante 15 min a 4 °C. En los experimentos donde se evaluó la internalización de esta sonda junto con Alexa^{647}-BTX, las células se incubaron 30 min o 2 hs a 37 °C luego de la marcación y lavado con m1.

- **di-4-ANEPPDHQ:**

Las células CHO-K1/A5 se incubaron con di-4-ANEPPDHQ 20 µM en m1 durante 15 min a 4 °C para lograr la marcación de la membrana plasmática.

La incubación de las GUV se realizó a la misma concentración, en el medio en el cual se obtuvieron dichas vesículas. Inmediatamente después de agregar la sonda, se montaron en un portaobjeto y las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal.

Al igual que con el fPEG-Chol, para evaluar la internalización del

fluoróforo junto con Alexa^{647}-BTX, las placas con las células CHO-K1/A5 se incubaron a 37 °C durante las 2 hs posteriores a la tinción.

Análisis cuantitativo de imágenes

Intensidad de fluorescencia promedio

Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.). Se definió manualmente como región de interés (ROI) el perímetro de cada célula o de una región particular de la misma, según correspondiera, y se cuantificó la intensidad fluorescencia promedio. Por cada condición experimental se tomaron imágenes de al menos diez campos distintos elegidos al azar. Las mediciones se realizaron sobre todas las células de la imagen que tuvieran su morfología normal, evaluada mediante la imagen de contraste de fase. A cada valor de intensidad de fluorescencia así obtenido se le sustrajo un valor de fondo local, determinado por el promedio de la intensidad de fluorescencia de tres regiones del campo libres de células de cada preparado.

Las imágenes obtenidas en simultáneo con el *Dual-Viewer* requirieron de un procesamiento previo al análisis con el ImageJ. Las mismas se alinearon con rutinas del SlideBook para tal fin, las que aplican los algoritmos de Pearson (Manders E. y col., 1992), Manders (Manders E. y col., 1993) y Costes (Costes S. y col., 2004) para la optimización de la alineación 2-D (Figura 10). Estos algoritmos cuantifican el grado de co-localización de todos los pixeles presentes en las dos imágenes divididas en la cámara CCD.

Análisis específicos del Capítulo I:

- **Transferencia de energía resonante de Förster (FRET) de las Daglas Dpm1 y Dem1:**

La FRET es un proceso que involucra la absorción de luz, en el cual un fluoróforo dador en su estado excitado le transfiere energía a un fluoróforo aceptor, por un mecanismo del tipo interacción dipolo-dipolo inducido (Förster T., 2012). Este proceso no radiativo solo sucede cuando ambos fluoróforos se encuentran a una distancia de rango nanométrico (< 10 nm), y existe una superposición entre el espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor. Además, para la eficiencia de la FRET es muy importante el rendimiento cuántico y la vida media de fluorescencia del dador, así también

como la orientación relativa (≠ 90°) entre los fluoróforos dador y aceptor (Padilla-Parra S. y Tramier M., 2012).

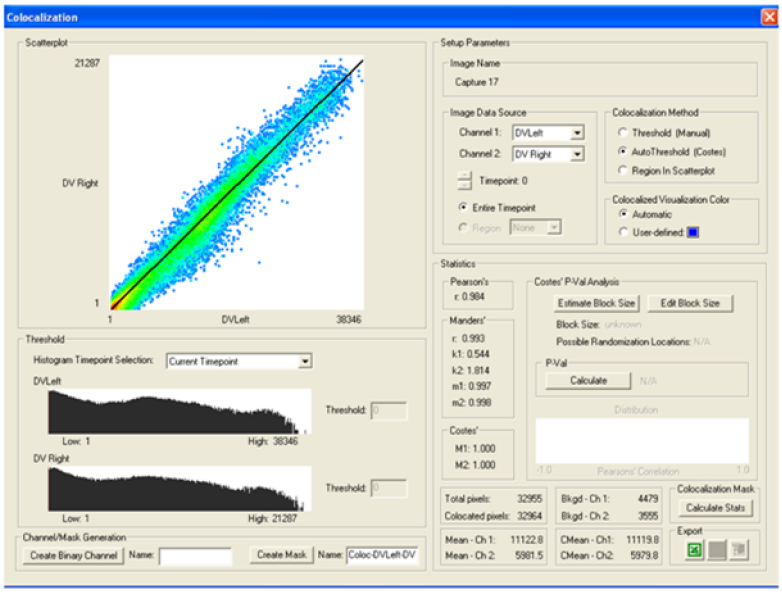


Figura 10. Módulo especial de SlideBook para evaluar co-localización. Aplicación de los algoritmos de Pearson, Manders y Costes a las imágenes de Dpm1, de Dem1 o de di-4-ANEPPDHQ, con el objetivo de cuantificar el grado de co-localización de todos los pixeles que componen los dos canales de emisión recolectados.

Las proteínas quiméricas Daglas se sintetizaron en el laboratorio del Dr. Yoshio Umezawa (Sato M. y col., 2006). Su composición consta de un sitio de reconocimiento específico de diacilgliceroles (DAG) (CRD: dominio rico en cisteína, de la proteína quinasa Cβ) fusionado con las proteínas fluorescentes ciano (CFP, dador) y amarilla (YFP, aceptor) a través de α-hélices rígidas conectoras (Figura 11). A uno de estos conectores se le agregó un par de glicinas, que funcionan como bisagra. Cuando una molécula de DAG se une al CRD, se produce un cambio conformacional en la proteína quimérica que acerca a los fluoróforos y permite que la FRET se produzca. Por lo tanto en ausencia de DAG, al excitar la CFP solo se recolecta la emisión de dicha proteína fluorescente, mientras que en presencia de este lípido, ambos fluoróforos emiten siendo iluminados por la longitud de onda de excitación del dador (CFP) (Figura 11).

Utilizamos dos tipos de Daglas, Dpm1 (pm: membrana plasmática) y Dem1 (em: endomembranas, tanto del aparato de Golgi como del retículo endoplasmático (RE)) que se crearon al fusionar el complejo CFP-CRD-YFP con

secuencias de localización específica para las membranas mencionadas (Sato M. y col 2006).

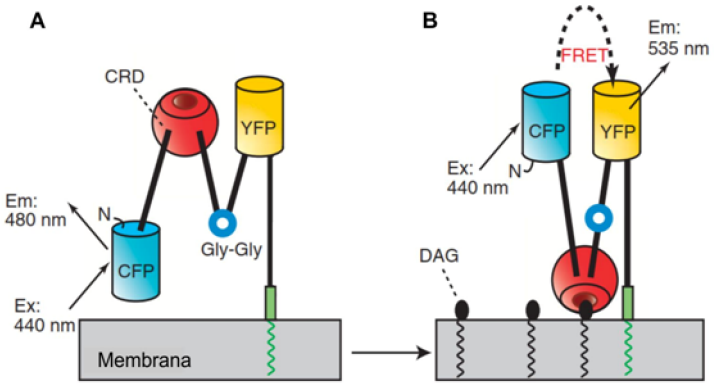


Figura 11. Daglas, un indicador fluorescente de los DAG. Estas proteínas quiméricas están compuestas por las proteínas fluorescentes YFP y CFP junto al dominio CRD de la PKCβ. En ausencia de DAG, al excitar (Ex) la CFP, se produce solamente la emisión (Em) de dicha proteína **(A)**. En cambio, cuando el dominio CRD se une a DAG, permite el acercamiento de los fluoróforos y da lugar a la FRET **(B)**, por lo tanto se va a observar emisión en el canal YFP al excitar con la longitud de onda de CFP. Tomado y modificado de Sato M. y col. (2006).

La visualización de estas proteínas se realizó con el *Dual-Viewer* acoplado al microscopio Nikon TE-300, obteniendo ambas imágenes en simultáneo luego de excitar a la CFP con la longitud de onda apropiada. El método utilizado para analizar la FRET fue el del cociente de imágenes (*R*, *Ratio imaging*, Ecuación 1) (Padilla-Parra S. y Tramier M., 2012). Dicho cociente se calcula al dividir las intensidades de fluorescencia (*I*) de la imagen FRET (YFP) y del dador (CFP), como lo expresa la siguiente ecuación:

$$R = \frac{I_{FRET}}{I_D} \qquad \text{(Ecuación 1)}$$

La condición necesaria para aplicación del cociente de imágenes es que ambas proteínas fluorescentes se encuentren en una estequiometría fija en cada píxel. Esto sucede en las Daglas, ya que cada proteína quimérica contiene una sola proteína fluorescente de cada color (CFP e YFP).

Previo a la realización del cociente de imágenes con ImageJ, las imágenes obtenidas de 16 bits se transformaron en imágenes de 32 bits, y se les sustrajo el fondo matemáticamente al restarle a toda la imagen el valor promedio de dicho fondo. Sobre estas imágenes de intensidad de fluorescencia de cada canal se aplicó una máscara, en la cual al fondo remanente se le asignó un valor no numérico (*Not a number*, NaN, ImageJ) y la señal de fluorescencia de las células no se modifico. Luego de este procesamiento, se

obtuvo el cociente de imágenes *R*. Los valores de este cociente son proporcionales a la eficiencia de FRET que ocurre por pixel.

- **Evaluación del porcentaje AChR desensamblado:**

El método de fluorescencia empleado para determinar la cantidad de AChR desensamblado se basa en la afinidad de distintos ligandos por el AChR ensamblado o por sus subunidades (Baier C. y Barrantes F., 2007). La BTX tiene la propiedad de unirse con alta afinidad a la subunidad α1 antes de formar parte del pentámero en el proceso post-traduccional de plegado y ensamblado, mientras que la Carbamilcolina (Carb) solo se une al receptor completo. Por lo tanto, se puede diferenciar entre ambos tipos de conformaciones y determinar entonces la magnitud de receptores ensamblados/desensamblados en el sistema celular de expresión heteróloga.

Para poderlos determinar, se utilizaron cultivos celulares de CHO-K1/A5 realizados sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 35 mm. Con el fin de saturar los sitios específicos de unión de los receptores de superficie, las placas se incubaron con BTX 500 nM en m1 durante 1 h a 4 °C. Luego de tres lavados con m1 frío, las células se fijaron y permeabilizaron (aplicando los protocolos ya descriptos). Para cada condición experimental, el AChR intracelular se puso en evidencia incubando con Alexa^{488}-BTX, en presencia de m1 o Carb 10 mM en m1. El total de los AChR intracelulares corresponde a la marcación del preparado sin Carb (receptores ensamblados + desensamblados), mientras que en las placas con Carb, la BTX fluorescente solo evidencia los receptores intracelulares desensamblados. Por lo tanto, se midió la intensidad de fluorescencia y se calculó el porcentaje de AChR desensamblado por comparación con la señal fluorescente en ausencia de Carb.

Análisis específicos del Capítulo II:

- **La polarización generalizada (GP) de di-4-ANEPPDHQ:**

El grado de orden presente en una membrana puede ser calculado luego de incubar a las células con sondas sensibles a la polaridad de las membranas, como di-4-ANEPPDHQ. Dicho orden se expresa como la GP, un cociente de intensidad normalizado, obtenido de dos canales de emisión diferentes para una misma sonda, a una misma longitud de onda de

excitación (Ecuación 2). Sus valores dependen de las propiedades de emisión del fluoróforo en el entorno lipídico en el que se encuentre (Miguel L. y col., 2011). Ya que los valores de la GP son cocientes de intensidad de fluorescencia, esto los hace independiente de la concentración local de la sonda y del área superficial evaluada (Gauss K. y col., 2006).

Las longitudes de onda recolectadas en cada imagen del *Dual-Viewer* fueron las correspondientes al canal azul (575/50 nm) y al canal rojo (680/50 nm) de emisión de di-4-ANEPPDHQ, relacionadas con dominios líquido ordenado (Lo) y líquido desordenado (Ld) de membranas modelo, respectivamente. Se obtuvieron los valores de la GP, a partir del cociente de las intensidades de fluorescencia (*I*) de cada canal, basándonos en la siguiente ecuación:

$$GP = \frac{I_{550–600} - I_{655–705}}{I_{550–600} + I_{655–705}} \qquad \text{(Ecuación 2)}$$

Dichas operaciones se realizaron con las imágenes obtenidas para cada canal utilizando el programa ImageJ. Los valores del fondo local se transformaron en cero al multiplicar a la imagen de la GP por la imagen denominador ($I_{550-600}$+$I_{655-705}$) convertida en una imagen binaria (fondo = 0; señal específica = 1), como lo describen Gauss K. y col. (2006). Las imágenes de la GP se expresaron con una escala de 16 colores (Gauss K. y col., 2006; Miguel L. y col., 2011; Toro C. y col., 2009; Sánchez S. y col., 2010; Owen D. y col., 2010).

Con el propósito de medir la relación espacial entre los clústeres de AChR (consecuencia de la unión del anticuerpo y ulterior formación del complejo receptor-anticuerpo) y la GP de di-4-ANEPPDHQ, se delinearon las ROI manualmente sobre la imagen de fluorescencia correspondientes al AChR y midiéndose la GP en la imagen final de GP del di-4-ANEPPDHQ (Ecuación 2). Dichas ROI correspondían a zonas de la membrana plasmática con tinción positiva (o no) del anticuerpo mAb 210-anticuerpo secundario Alexa^{647}. De cada clúster de AChR se obtuvo su valor de la GP y se lo comparó con el valor de la GP promedio de la membrana plasmática, clasificándolos en tres grupos: ROI con valores de la GP al menos 0,001 mayor, menor o igual que la GP promedio de la membrana donde estaban inmersos. El número de clústeres/condición se normalizó considerando que el número total de clústeres en la condición estudiada era igual a 100. Los histogramas se realizaron promediando los valores de cada grupo de clústeres de diferentes

experimentos, reflejando de esta forma la preferencia de los clústeres de AChR por un rango de valores de GP en comparación a la GP de la membrana.

MÉTODOS: CAPÍTULO I

Transfección de las células CHO-K1/A5

Las células en cultivo se transfectaron con el fin de favorecer la incorporación de una molecula de ADN o ARNi que lleve a la sobreexpresión de una proteína o silencie su expresión, respectivamente. El reactivo de elección fue la lipofectamina 2000, compuesta por lípidos catiónicos que acomplejan el ADN plasmídico o el ARNi favoreciendo su ingreso al interior celular.

Las células se transfectaron uno o dos días después de repicadas (40-50 % de confluencia) y los experimentos se realizaron a las 24, 48 o 72 hs post-transfección, según cada caso particular, con el fin de obtener una máxima eficiencia de transfección y mínima citotoxidad. La cantidad de ADN/ARNi y el tiempo de incubación usados con la lipofectamina 2000 se ajustaron a los protocolos sugeridos por el fabricante (Invitrogen). La concentración final de ADN utilizada fue de 1 µg / placa.

Ensayos de unión de radioligando

Obtención de [I^{125}]α-bungarotoxina

La derivatización de la [I^{125}]α-bungarotoxina ([I^{125}]-BTX) fue realizada tomando como referencia el método de Hunter W. y Greenwood F. (1962). Se disolvieron 10 nmoles de BTX (80 µL de BTX 125 µM en agua ultrapura), en 80 µL de *buffer* fosfato 200 mM (pH 7,4), a los que se le agregaron 0,7 mCi de I^{125} (I^{125}Na, actividad específica 17 Ci/g). La reacción de oxidación que permitió la unión del iodo radiactivo a la BTX se realizó a temperatura ambiente con el agregado de 2 µL Cloramina T (20 mg/mL). Dos min después, se frenó la reacción con 2 µL de metabisulfito de sodio (20 mg/mL). A continuación, el producto obtenido se sembró en una columna de exclusión de Sephadex G-25 equilibrada con *buffer* fosfato 100 mM (pH 7,4), mantenida a 4 °C y conectada a un colector de fracciones. Dicho equipo recogió 0,8 mL de la elución/tubo. Se tomaron 10 µL de cada tubo para determinar el nivel de radiactividad en un

contador gamma con una eficiencia del 80 %, gracias a la gentileza de Patricia Fernández, Lic. en Bioquímica de IACA Laboratorios. Con este procedimiento se logró separar la BTX iodinada del iodo libre (Figura 12).

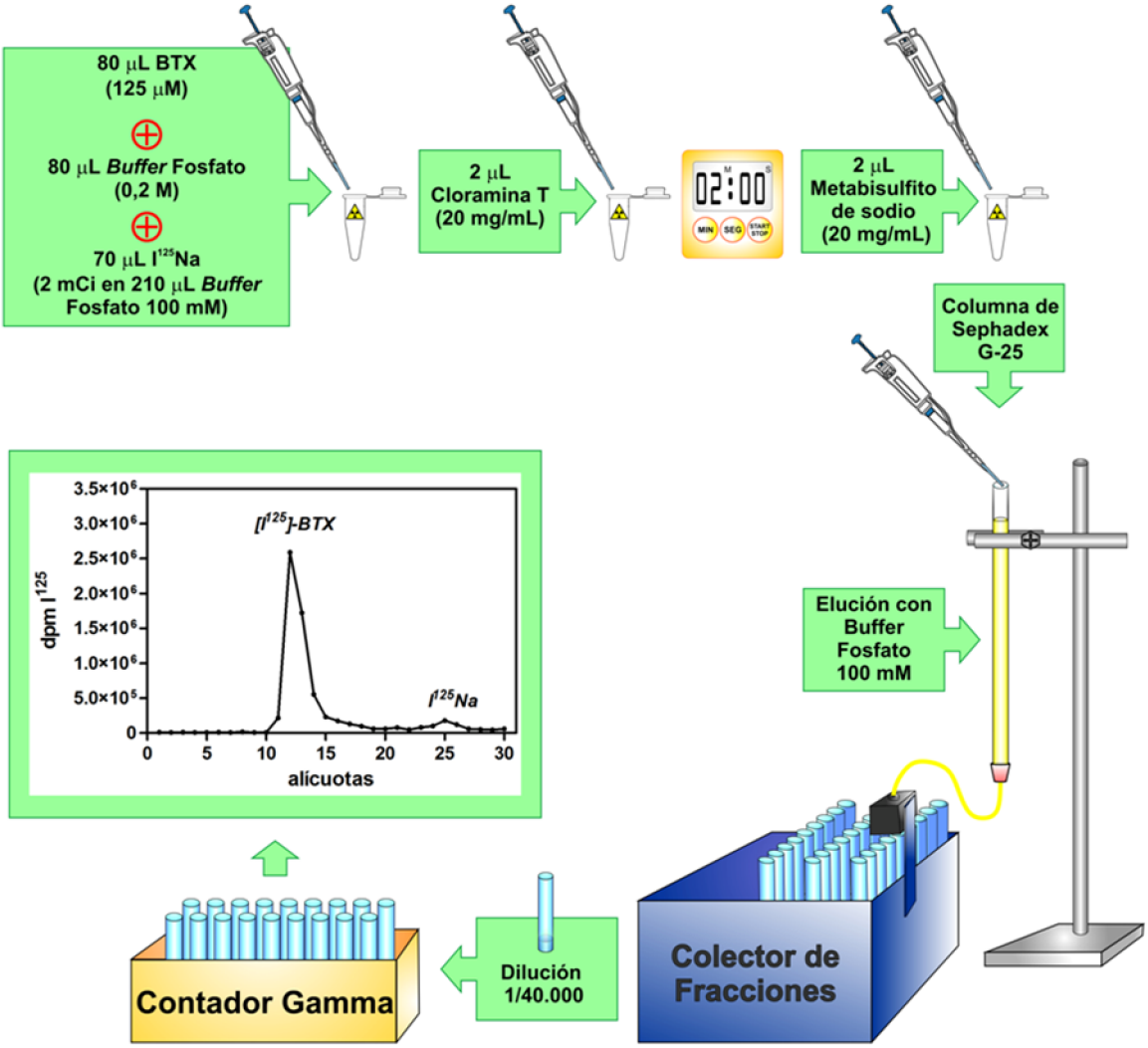


Figura 12. Obtención de [I^{125}]-BTX. Esquema del protocolo de obtención de la toxina iodinada. En el perfil de elución, las fracciones correspondientes al primer pico contienen [I^{125}]-BTX, mientras que el segundo pico, obtenido hacia el final de la elución, corresponde al iodo libre (I^{125}Na).

Como lo indican Hunter W. y Greenwood F. (1962), se calculó la actividad específica, la cual fue de alrededor de 50 µCi/nmol de BTX, en todas las derivatizaciones realizadas en el laboratorio. Las fracciones correspondientes a la toxina radiactiva se alicuotaron y se guardaron a -20 °C durante un período no mayor a dos meses, tiempo durante el cual se realizaron los experimentos, ya que la vida media de este isótopo radiactivo es de 60 días aproximadamente.

Determinación de la unión de [I^{125}]-BTX en células en cultivo

- **Unión en superficie:**

La cantidad de AChR presente en la superficie celular se determinó por la unión de [I^{125}]-BTX. Las células CHO-K1/A5 se cultivaron durante 2-3 días en placas de 35 mm hasta alcanzar una confluencia del 70-80 %. Luego de realizar los tratamientos correspondientes a cada experimento, las células se incubaron durante 50 min a temperatura ambiente, con concentraciones entre 0-100 nM de [I^{125}]-BTX en medio de cultivo completo. Cumplido dicho tiempo, se realizaron dos lavados con *buffer* fosfato 50 mM (pH 7,4), se levantaron las células de las placas con 1,5 mL de NaOH 0,1 N y se contó la radiactividad total en el contador gamma. La unión inespecífica de la toxina se determinó por preincubación de muestras controles con 50 mM de Carb a 37 °C durante los 50 min previos al tratamiento con diferentes concentraciones de [I^{125}]-BTX. La radiactividad correspondiente a la unión específica de cada concentración de toxina utilizada, se obtuvo por diferencia entre la radiactividad medida para la unión total e inespecífica.

Como se observa en la figura 13, la saturación de los sitios específicos del AChR se alcanza en las células CHO-K1/A5 a una concentración de 60 nM de [I^{125}]-BTX (50 min a temperatura ambiente). Por tal motivo, en la mayoría de los experimentos realizados, se utilizó esta concentración de toxina radiactiva.

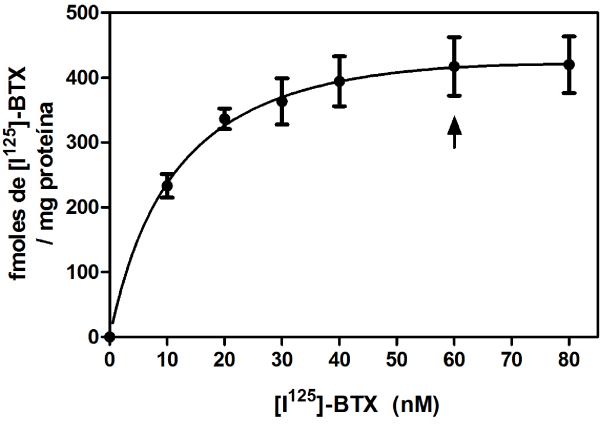


Figura 13. Curva de saturación de BTX radiactiva en células CHO-K1/A5. El equilibrio de unión de la toxina a sitios específicos (flecha) se alcanzó luego de incubar las células con una concentración de 60 nM de [I^{125}]-BTX.

Los ensayos de desplazamiento se realizaron agregando concentraciones crecientes de Carb (0, 1.10^{-8}, 1.10^{-7}, 1.10^{-6}, 1.10^{-5}, 1.10^{-4}, 1.10^{-3}, 1.10^{-2} M), a las diferentes placas tratadas con las drogas a estudiar, 30 min antes de que culmine el tratamiento. El objetivo experimental consistía en evaluar el

desplazamiento de la unión de BTX por la Carb, ya que ambas compiten por el mismo sitio de unión al AChR. Pasados los 30 min, se incubaron las células con una misma concentración de [I^{125}]-BTX (20 nM) durante 50 min a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron dos veces con *buffer* fosfato 50 mM, se solubilizaron con 1,5 mL de NaOH 0,1N y se midió la radiactividad.

Para determinar la cantidad de AChR presente en la superficie de neuronas de hipocampo, las mismas se cultivaron en multiplacas de 24 pocillos durante 14 días (como ya mencionamos en esta sección). La unión inespecífica de la toxina radiactiva se determinó incubando las neuronas con Carb 200 mM, 1 h antes de que culmine el tratamiento correspondiente. Al realizar los ensayos de saturación con [I^{125}]-BTX, observamos que se lograron ocupar los sitios específicos del AChR al utilizar 60 nM de toxina radiactiva, motivo por el cual todos los experimentos posteriores se realizaron a esa concentración (Figura 14).

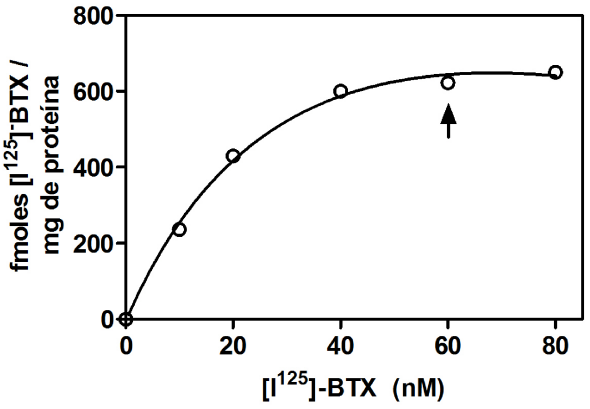


Figura 14. Curva de saturación de BTX radiactiva en neuronas de hipocampo. Como se puede observar, al incubar con 60 nM de [I^{125}]-BTX se llegó al equilibrio de unión de la toxina a sitios específicos del AChR (flecha).

Luego de tratar durante 50 min a temperatura ambiente con [I^{125}]-BTX, se realizaron dos lavados con PBS (NaCl 150 mM; Na_2HPO_4 10 mM; NaH_2PO_4 10 mM; pH 7,5), se solubilizaron las células con 600 µL NaOH 0,1 N y se midió la radiactividad en un contador gamma.

- **Unión total de [I^{125}]-BTX en células permeabilizadas:**

Con el objetivo de determinar el total de receptores expresados en células CHO-K1/A5 y cuantificar de esta manera los receptores intracelulares, se realizó el ensayo de unión con toxina radiactiva en células permeabilizadas. Para lograrlo se quitó el medio de cultivo de cada placa, se agregó 0,5 mL de *buffer* saponina 1 % (preparada en *buffer* fosfato 10 mM, pH 7,4 con el

agregado de EDTA 30 mM y BSA 0,1 %). Se retiró la saponina inmediatamente y se dejaron las placas semi-secas durante 5 min. Las células se lavaron dos veces con *buffer* fosfato 50 mM y se trataron como se describió para la determinación de receptores en superficie. De esta manera, el número de receptores intracelulares se obtuvo como la diferencia entre la radiactividad específica del total de AChR y la de los receptores de superficie.

Determinación de proteínas

La cuantificación de las proteínas presentes en cada muestra, ya sea de cultivos de células CHO-K1/A5 o de cultivos neuronales, se realizó aplicando el método colorimétrico de Lowry O. y col. (1951). Las muestras se disolvieron en NaOH 0,1 N y se utilizó una solución de BSA 1 mg/mL como estándar, de la cual se tomaron alícuotas de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 80 µL para realizar la curva de calibrado. A partir de dicha curva se calculó el contenido proteico de cada muestra. Los volúmenes de muestra sobre los que se cuantificaron proteínas fueron de 200 y 10 µL para los ensayos de unión de radioligando y de *Western Blot*, respectivamente. La curva estándar de esta última técnica se realizó con el agregado de 10 µL de *buffer* de lisis, para restar interferencias del mismo en la determinación colorimétrica.

Ensayos de *Western Blot*

La inmunodetección de proteínas se realizó por ensayos de *Western Blot* (WB). Al finalizar los tratamientos correspondientes a cada experimento, se colocaron las placas sobre una base de hielo, se les retiró el medio de cultivo y se les agregó *buffer* de lisis (HEPES 20 mM; EGTA 10 mM; β-glicerolfosfato 5 mM, Nonidet P-40 1 %; $MgCl_2$ 2,5 mM) con inhibidores de proteasas (DTT 1 mM; leupeptina 2 µg/mL; aprotinina1 µg/mL; pepstatina 1 µg/mL; PMSF 0,1 mM). Los volúmenes de *buffer* añadidos fueron de 80 y 50 µL para las placas de 35 mm y los pocillos de las multiplacas, respectivamente. Las células en dicho *buffer* se levantaron de la placa raspando con una espátula, se colectaron en microtubos, y se homogeneizaron utilizando jeringas con agujas 25G. Después de 1 h en hielo, se centrifugaron a 13.200 rpm durante 20 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante de cada tubo, se midieron las proteínas por el método de Lowry O. y col. (1951), se les agregó un volumen adecuado de

buffer Laemmli 5x (Trizma Base 0,30 M; dodecilsulfato de sodio, SDS, 10 %; glicerol 50 %; 2-mercaptoetanol 25 %; pH 6,8) y se hirvieron durante 5 min.

Las proteínas se resolvieron por *SDS-PAGE* (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS) (Laemmli U., 1970) en un gel de poliacrilamida al 10 %. Las corridas se realizaron con dos geles en simultáneo, a voltaje variable y amperaje constante de 20 mA durante aproximadamente 2 hs. A continuación, los geles se transfirieron a membranas de polivinilidenofluoruro (PVDF, *Immobilon-P Transfer Membrane*, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) utilizando un *Mini Trans-Blot cell electroblotter* (BIO-RAD Life Science Group, California, EE.UU.). La transferencia duró 1,45 hs y se realizó a 350 mA y voltaje variable. La cantidad de proteínas sembrada por calle fue de 40-50 µg.

Con el objetivo de bloquear las membranas de PVDP, se las incubó con BSA al 10% en *buffer* T-TBS (Trizma base 3 g/L pH 7,5; NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L; Tween-20 0,1 %) durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego del tratamiento con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes a cada experimento, las inmuno-reacciones se detectaron realizando un ensayo de quimioluminiscencia con el reactivo *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* y posterior revelado con placas autorradiográficas, ambos productos de GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido).

Incubación de membranas de PVDP con anticuerpos

Tras el bloqueo con BSA al 10% en T-TBS, todos los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo de Tesis estuvieron en contacto con las membranas de PVDP mediante agitación constante durante 18 hs a 4 °C. Seguidamente, se incubaron los anticuerpos secundarios con agitación constante por 2 hs a temperatura ambiente. Las diluciones utilizadas de los anticuerpos primarios y secundarios fueron de 1/1000 y 1/2000, respectivamente.

Registros de patch-clamp

Esta serie de experimentos fueron efectuados por la Dra. Ana Sofía Vallés. Esta metodología electrofisiológica permite estudiar el funcionamiento de cada molécula individualmente, como así también del total de los canales expresados en la célula (Hamill O. y col., 1981). Los registros de canal unitario se obtuvieron en la configuración célula adherida.

Se utilizó un microscopio invertido Nikon con un objetivo 20x montado sobre una mesa anti-vibratoria neumática con el fin de obtener sellos estables. El ruido eléctrico se eliminó colocando al microscopio dentro de una jaula de Faraday. La pipeta se coloca en un soporte de plástico con roscas de teflón, que contiene un electrodo de platino que se conecta con un amplificador por el otro extremo. El soporte se encuentra montado sobre un micromanipulador que permite el desplazamiento adecuado de la pipeta con respecto a la célula. Dentro del baño de la cápsula que contiene a las células se encuentra un electrodo de referencia conectado también al amplificador por el extremo opuesto. Las corrientes generadas por los AChR se registraron usando un amplificador de corriente AXOPatch 200B (Axon Instruments, Burlingame, CA, EE.UU.). Los datos se digitalizaron con una interfase ITC-16 (Instrutech Corporation, Long Island, NY, EE.UU.). El programa de adquisición continua utilizado fue Acquire (Bruxton Corporation, Seattle, WA, EE.UU.).

MÉTODOS: CAPÍTULO II

Preparación de las GUV

La formación de las GUV permite obtener membranas lipídicas de composición específica. En este trabajo se realizaron con el fin de obtener membranas modelo Lo y Ld, compuestas por dipalmitoilfosfatidilcolina: colesterol (7DPPC:3Col) y dioleilfosfatidilcolina (DOPC), respectivamente. Ambas soluciones lipídicas se prepararon en etanol a una concentración de 1 mg/mL como lo indican Jin L. y col. (2006). En cada caso, se secó una película de lípidos de 20 µL sobre los portaobjetos cubiertos con óxido de indio y estaño del equipo de preparación de las GUV *Vesicle Prep-Pro* (Nanion, Munich, Alemania). Rápidamente se les agregó 200 µL de una solución de sacarosa 0,5 M y se sometió por 4,3 hs a un voltaje de 1,3 V y una frecuencia de 500 Hz a 45 °C para lograr la formación de dichas vesículas.

Fluorímetro

Todas las medidas fluorimétricas se realizaron en un fluorímetro SLM modelo 4800 (SLM Instruments, Urbana, IL, EE.UU.) utilizando un rayo de luz

polarizada verticalmente de una lámpara de arco de mercurio/xenón obtenido con un polarizador Glan-Thompson (hendiduras de excitación y emisión de 4 nm).

PROTOCOLOS DE INCUBACIÓN

Capítulo 1

Tratamientos a tiempos cortos y largos de incubación

Las células se incubaron a 37 °C principalmente durante dos tiempos de incubación que denominamos cortos (30 min, 3 o 4 hs) y largos (18 hs). Se utilizaron células crecidas en placas de 35 mm de diámetro para las células CHO-K1/A5 y multiplacas de 24 pocillos para las neuronas de hipocampo. Dichas células en cultivo se utilizaron a los 2-3 y 14 días posteriores al sembrado, respectivamente.

Todas las drogas empleadas para los tratamientos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) de forma tal que la concentración final en las placas fuera siempre menor al 0,5 % DMSO (v/v). Tanto las condiciones controles como las experimentales se incubaron siempre con el mismo volumen final de DMSO.

En el caso de utilizarse un inhibidor enzimático en presencia de otra droga, se agregó dicho inhibidor 10 min antes de la incubación con el otro componente.

A continuación se detallan las drogas empleadas:

- **Agregado exógeno de DAG y análogos:**

Se utilizaron dos tipos de DAG, compuestos por ácidos grasos de cadena larga y corta. El palmitoiloleilglicerol (POG, 300 µM) es un DAG de cadena larga de tipo natural y estructuralmente relacionado con fosfatidilcolina (PC), mientras que el dioctanoilglicerol (DOG, 300 µM) es un lípido no sintetizado por las células eucariotas, con mayor solubilidad en medio acuoso y menor velocidad de metabolización en comparación con los DAG de cadena larga (Henneberry A. y col., 2001).

Se estudiaron también los efectos mediados por un análogo no metabolizable de los DAG, un éster de forbol (EF) activo (forbol 12,13-dibutirato, 20 μM). Para estudiar la especificidad de la acción de los DAG en los efectos observados, se utilizó también un éster de forbol inactivo (EF-, 4α-forbol 12-miristato 13-acetato, 20 μM).

- **Incremento o disminución de la cantidad de DAG endógenos**

Se utilizaron dos inhibidores enzimáticos para aumentar los niveles de DAG: R59949 y Geranilgeraniol (GGOH). El R59949 (300 nM) (Jiang Y. y col., 2000) produce la inhibición de las DGK, enzimas encargadas de fosforilar al DAG para convertirlo en ácido fosfatídico (PA). La acción de esta familia de enzimas es considerada la principal ruta de metabolización del DAG a nivel intracelular (Luo B. y col., 2004), por lo tanto al inhibirlas se incrementa la cantidad de DAG endógeno.

Por otra parte, el GGOH (80 μM) es un compuesto de tipo isoprenoide que inhibe competitivamente a la colina fosfotransferasa (CPT), última enzima de la vía de Kennedy de biosíntesis de PC a partir de colina y DAG (Miquel K. y col., 1998). Inhibiendo esta reacción se promueve también un aumento del DAG endógeno.

La disminución de la cantidad del DAG endógeno se realizó a través de transfecciones transientes con DGKζ-EGPF y con el ARNi de la proteína Nir2.

Logrando la sobre-expresión de la enzima DGKζ-EGPF, se buscó aumentar el metabolismo del DAG hacia PA, disminuyendo de esta forma la cantidad de este lípido neutro.

La proteína Nir2 está involucrada en la regulación de los niveles de DAG mediante la inhibición de la síntesis de PC mediada por CDP-colina, por lo que la disminución en la cantidad de Nir2 intracelular desencadena el descenso de los niveles de DAG presentes en el complejo de Golgi (Litvak V. y col., 2005). Se silenció la expresión de Nir2 al transfectar a las células con el ARNi para impedir la traducción de esta proteína. Se esperó 72 hs post-transfección para asegurar el silenciamiento de la expresión de esta proteína, como en Litvak V. y col. (2005).

El ARNi utilizado es una quimera entre ADN y ARNi. Las ventajas sobre los ARNi convencionales son que se necesita menos concentración para lograr el silenciamiento proteico y su gran estabilidad minimiza la aparición de reacciones adversas. Estos compuestos actúan promoviendo la destrucción de

los ARN mensajeros (ARNm), sin afectar los genes que codifican para otras proteínas.

- **Aumento de los niveles de calcio (Ca^{2+})**

Se recurrió a dos mecanismos diferentes con el fin de incrementar la cantidad de Ca^{2+} presente en el interior celular. En primer término, las células se incubaron con un ionóforo de Ca^{2+}, A23187 (10 μM), el cual permite el pasaje de iones Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de células intactas, normalmente impermeables a estos iones. En otra serie de experimentos, las células se trataron con Thapsigargina (Thapsi, 5 μM), droga que inhibe las enzimas Ca^{2+}-ATPasas del RE, impidiendo que dicho ion se acumule en la organela. Esto también desencadena el aumento del de Ca^{2+} en el espacio intracelular.

- **Inhibición de Proteínas Quinasas**

Para evaluar si los efectos mediados por Ca^{2+} estaban relacionados a la activación de la proteína quinasa de tipo II dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII), usamos el inhibidor de estas proteínas, KN-62 (10 μM).

Se utilizaron además inhibidores específicos de las proteínas quinasas C (PKC) clásicas α y β1 (Gö 6976, 1 μM), y de la PKCδ (Rottlerina, ROT, 3 μM) perteneciente a la familia de las PKC noveles (PKCn).

La inhibición selectiva de proteínas quinasas D (PKD1, PKD2 y PKD3) se realizó incubando las células con 7 y 25 μM de CID755673.

Capítulo 2

Variaciones de los niveles celulares de colesterol: depleción y enriquecimiento

Las células CHO-K1/A5 se incubaron con diferentes concentraciones de metil-β-ciclodextrina (CDx; 5, 10 y 15 mM) preparada en m1, a 37 °C durante 30 min. Con este tratamiento se logra depletar de forma aguda el contenido de Col de las células, como se demostró previamente en nuestro laboratorio (Borroni V. y col., 2007; Borroni V. y Barrantes F., 2011). La concentración de CDx elegida para los experimentos posteriores fue de 15 mM.

Para los experimentos de enriquecimiento de Col, se prepararon complejos de CDx-Col siguiendo el protocolo utilizado por Christian A. y col.

(1997). Las células se incubaron en presencia de los complejos de CDx-Chol (6:1) a 37 °C por 30 min.

Disrupción y estabilización del citoesqueleto de actina

Se utilizaron Citocalasina D (Cito D; 2,5 µM) y Latrunculina A (Lat A; 4 µM) como agentes despolimerizantes de los filamentos de actina. El agente estabilizador de los filamentos de actina empleado fue Jasplakinolida (Jas; 1 µM). La efectividad de estos tratamientos se corroboró observando los cambios producidos en la morfología celular mediante microscopia de contraste de fase y de fluorescencia.

Estas drogas se disolvieron en DMSO y las soluciones de trabajo se realizaron en m1. Por lo tanto en las condiciones controles para cada tratamiento se incubaron con el máximo volumen de DMSO utilizado, siempre por debajo del 0,5 % de DMSO en m1 (v/v).

Internalización del AChR mediada por la unión de BTX

La unión de BTX o anticuerpo sobre el AChR gatilla la internalización de dicho receptor, como se describió previamente en el trabajo de Kumari S. y col. (2008). Con tal fin, las células se incubaron con 500 nM de BTX en m1 durante 1 h a 4 °C. Al finalizarse este tratamiento, se lavaron 3 veces con m1 frio y en este mismo medio fueron trasladadas a un incubador a 37 °C por 2 hs.

Tratamientos con agonistas del AChR

Las células CHO-K1/A5 se incubaron con nicotina (Nic; 100 µM) y Carb (500 µM) a 37 °C durante 30 y 50 min, respectivamente. Ambas drogas se prepararon en m1. Debido a que la unión de estos agonistas al AChR es un proceso reversible, los lavados se realizaron con m1 frio que contenía la misma concentración de agonista.

ANALISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de los datos obtenidos se analizó utilizando el test *t* de Student a dos puntas o ANOVA de un factor con el posterior test de Tukey, según correspondiera. Dichos análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism 5.0 Graph Pad (San Diego, CA, EE.UU).

Los grados de significancia (p) menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Cada experimento se repitió un mínimo de tres veces, donde cada condición evaluada en los ensayos de unión de radioligando se realizó por triplicado en cada experimento, mientras que se adquirieron un mínimo de 10 imágenes en los experimentos de microscopía.

En todos los experimentos analizados, se consideró que (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$. En los histogramas mostrados en este trabajo de Tesis, los asteriscos representan diferencias significativas entre la condición control y la experimental. Por otra parte, las líneas con asteriscos corresponden a cambios con significancia estadística, entre las condiciones tratadas con diferentes drogas.

DISEÑO DE IMÁGENES

Para el armado de las figuras con las imágenes obtenidas con todos los microscopios empleados, se utilizó el programa Corel Draw 15. Este programa también lo usamos para el diseño de los esquemas presentados en este trabajo de Tesis.

Los gráficos se realizaron con el programa Prism 5.0 Graph Pad, donde se ven expresado por condición el promedio de un mínimo de tres experimentos independientes con su correspondiente desvío estándar.

En aquellos casos en que se mencionan explícitamente, los cambios visualizados en las imágenes son expresados como porcentajes, correspondiendo al porcentaje (X) de cambio (aumento o disminución) ± su correspondiente desvío estándar (DE): X ± DE %.

Capítulo I:

EL AChR Y LOS DAG

Introducción

Capítulo I

LOS DIACILGLICEROLES

Los diacilgliceroles (DAG) son lípidos neutros formados por dos ácidos grasos unidos a molécula de glicerol en las posiciones 1 y 2, tal como se esquematiza en la figura 1-1. Si bien los DAG son moléculas pequeñas y de composición relativamente sencilla, son indispensables en la síntesis de otros lípidos más complejos, en la composición de membranas biológicas y como segundos mensajeros (Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010).

EL METABOLISMO

Existen dos mecanismos principales de síntesis *de novo* de DAG en mamíferos y en levaduras: uno de ellos, partiendo de dihidroxiacetona-3-fosfato, y el otro, partiendo de glicerol-3-fosfato (Athenstaedt K. y Daum G., 1999). Estas dos especies moleculares deben convertirse previamente en ácido fosfatídico (PA) para lograr el producto final, a través de la enzima PA fosfohidrolasa (PAP) (Nanjundan M. y Possmayer F., 2003) (Figura 1-1).

A su vez, existen tres vías adicionales de obtención de DAG, a partir de precursores lipídicos. Dos de los mecanismos se basan en la hidrólisis de los fosfolípidos de las membranas por acción de las fosfolipasas C (PLC) y D (PLD) (Figura 1-1). Ambas vías dependen de la activación de las enzimas por estímulos extracelulares, y en ambos casos los DAG producidos actúan como segundos mensajeros y no se utilizan con fines metabólicos (Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010).

El tercer mecanismo se basa en la síntesis de esfingomielina (SM) a partir de fosfatidilcolina (PC) por la enzima esfingomielina sintasa (SMS), siendo el DAG el co-producto obtenido de esta reacción enzimática, cuando el grupo glicerol de la PC es reemplazado por una ceramida (Figura 1-1). Se han encontrado dos isoformas de la SMS, llamadas SMS1 y SMS2. Estas enzimas se localizan en el complejo de Golgi (SMS1 y SMS2) y en la membrana plasmática (SMS2). Las dos isoformas funcionan como colina fosfotransferasas bidireccionales, capaces de convertir PC y ceramida en SM y DAG, y viceversa (Figura 1-1), regulando de esta forma los niveles de estos lípidos en las membranas según los requerimientos celulares (Lev S., 2006; Holthuis J. y Luberto C., 2010; Carrasco S. y Mérida I., 2007). A diferencia del PA, el DAG tiene mayor vida media y existen niveles constantes de este lípido en el

complejo de Golgi, donde es principalmente obtenido a través de la acción de la SMS (Lev S., 2006). A su vez los DAG pueden ser utilizados como precursores en la síntesis de fosfolípidos, monoacilgliceroles (MAG) y triacilgliceroles (TAG).

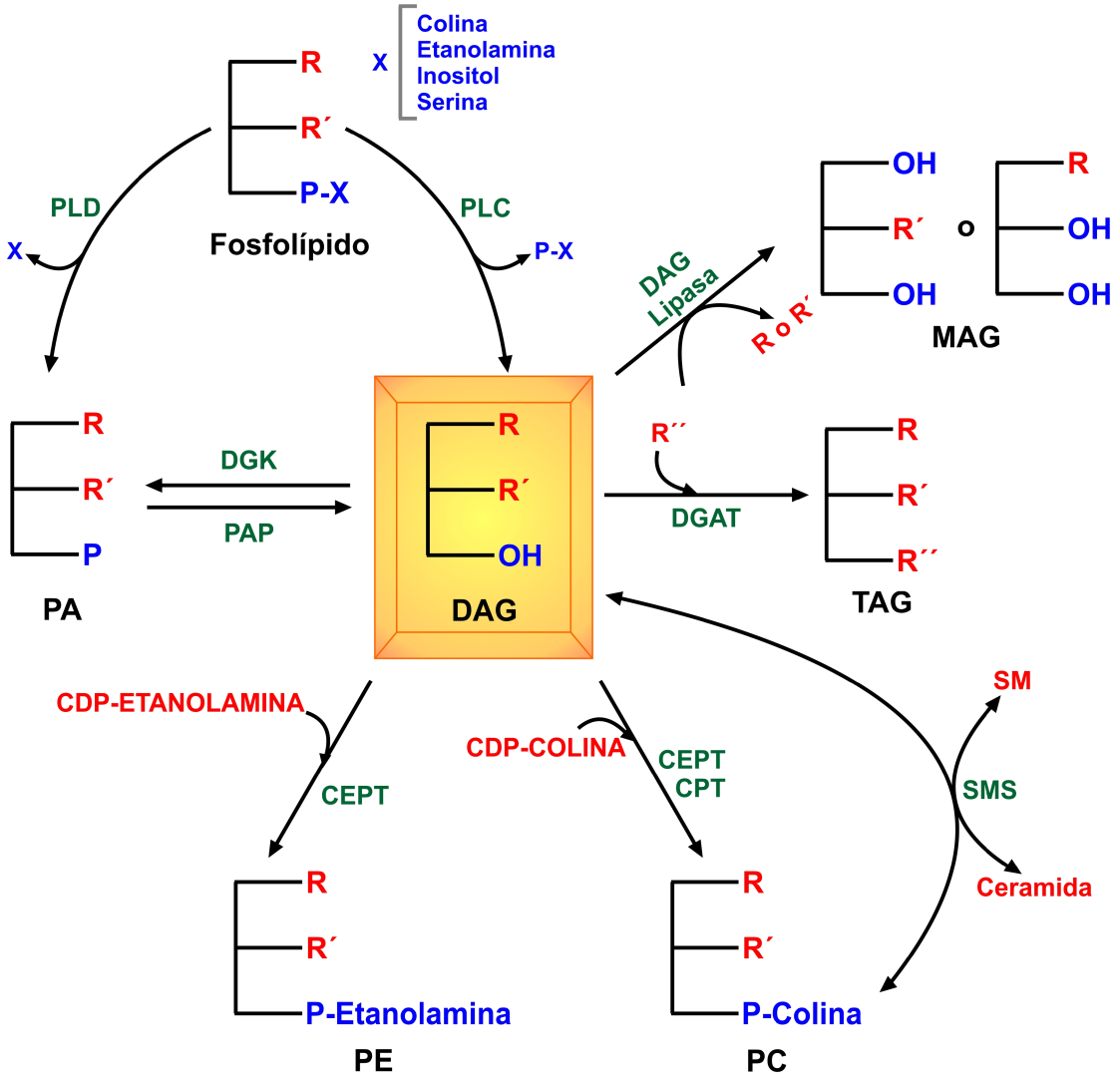


Figura 1-1. El metabolismo del DAG. El esquema ilustra los mecanismos enzimáticos de producción o de utilización del DAG, donde las enzimas involucradas están coloreadas en verde (abreviaturas detalladas en el texto).
(OH: grupo oxhidrilo; R y R´: ácidos grasos; P: grupo fosfato; el esqueleto del glicerol se esquematiza con líneas negras).

La PC es el fosfolípido mayoritario presente en las membranas de las células eucariotas. Puede ser sintetizada a partir del DAG por acción de las enzimas colina (CPT) y la colina/etanolamina (CEPT) fosfotransferasas, en el complejo de Golgi y el RE, respectivamente (Lagace T. y Ridgway N., 2013; Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010) (Figura 1-1). Dichas proteínas median el último paso de la vía de Kennedy de síntesis de PC a

partir de colina. La CEPT también lleva a la producción de fosfatidiletanolamina (PE) (Figura 1-1).

La diacilglicerol quinasa (DGK) fosforila al DAG y lo convierte en PA (Figura 1-1), intermediario en la síntesis de la cardiolipina y del fosfatidilinositol (Holthuis J. y Luberto C., 2010; Lagace T. y Ridgway N., 2013; Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010). La acción de la DGK es considerada uno de los principales mecanismos de metabolización de los DAG involucrados en vías de señalización (Luo B. y col., 2004).

De la esterificación del DAG por la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), tanto en la membrana plasmática como en el RE, se obtiene TAG (Figura 1-1). En cambio, si los DAG son alcanzados por las enzima diacilglicerol lipasa (DAG lipasa), son hidrolizados a MAG al perder un ácido graso en la posición uno o dos del glicerol (Figura 1-1) (Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010).

LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Un bolsillo hidrofóbico formado por una secuencia conservada de 50 aminoácidos rica en cisteína es la clave de la acción de los DAG sobre determinadas proteínas. El renombrado dominio C1 (también llamado CRD: dominio rico en cisteína) está presente en las proteínas que se unen a los DAG, generándose una respuesta tras la unión del lípido a este dominio (Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010). En un principio, se postuló que la acción de los DAG solamente se basaba en la translocación de las proteínas hacia las membranas donde este lípido se acumulaba (Johnson J. y col., 1998). Sin embargo, con el correr de los años se comprobó que los dominios C1 gatillaban la localización de las proteínas en dominios de membrana ricos en DAG y fosfolípidos cargados negativamente, modulando de esta forma su activación (Hall C. y col., 2005).

Los primeros ligandos descubiertos con afinidad por los dominios C1 fueron los ésteres de forbol (EF). No obstante, luego se comprobó que los DAG y otros compuestos relacionados también se unían a dichos dominios (Kazanietz M. y col., 2000).

Existen dos tipos de dominios C1, los típicos y los atípicos. Las proteínas que llevan en su estructura uno o dos dominios típicos, son las que son sensibles a la modulación por DAG. Entre ellas se encuentran las

proteínas quinasas C (PKC) clásicas y noveles, las proteínas quinasas D (PKD), las quimerinas, las isoformas β y γ de la DGK, las unc13 de mamíferos (Munc 13) y las proteínas liberadoras de guanina de Ras (RasGRP) (Figura 1-2) (Luo B. y col., 2004; Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010).

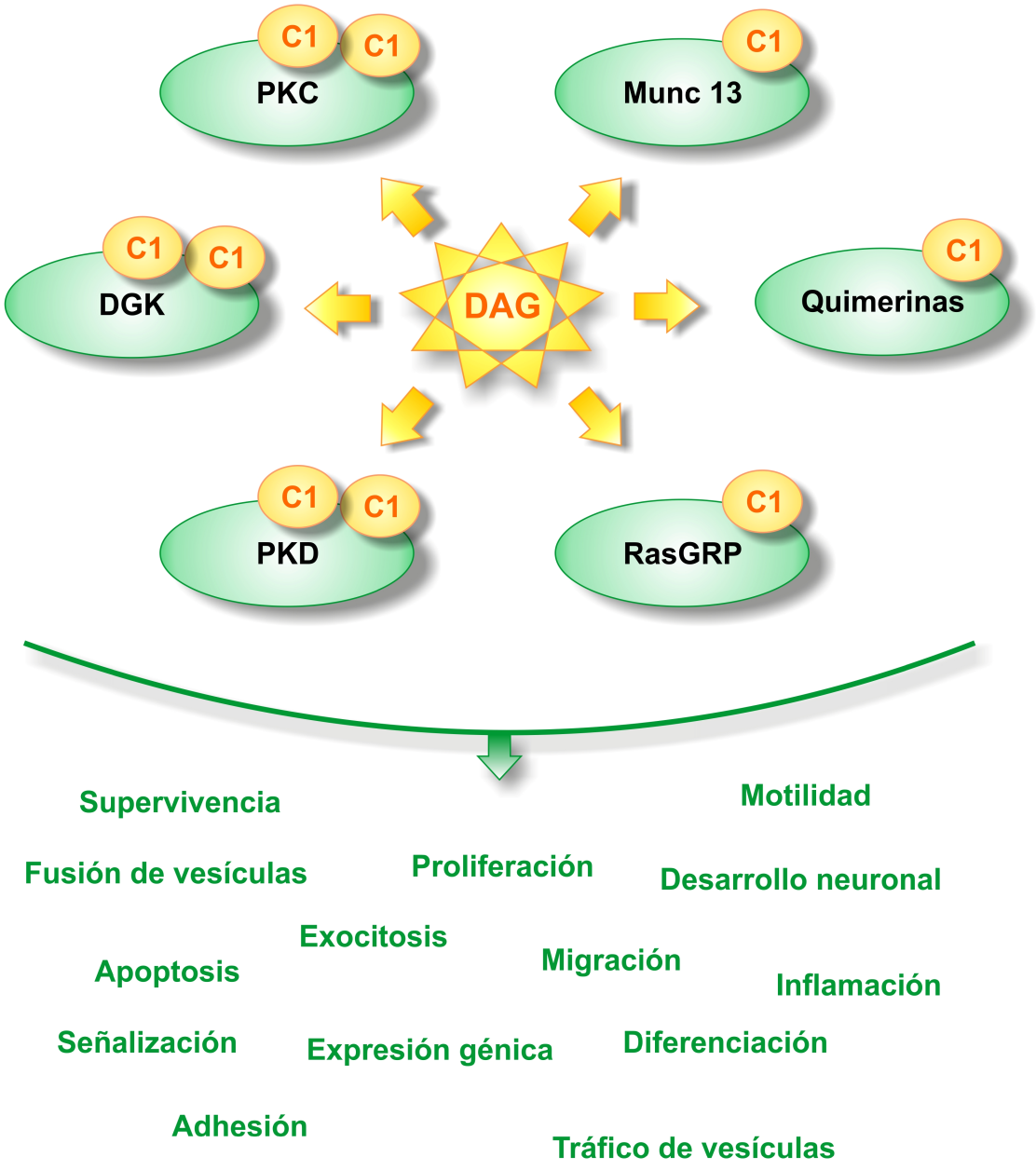


Figura 1-2. Los dominios C1 y la transducción de señales mediada por el DAG. En el esquema se observa la presencia de uno o dos dominios C1 típicos en las proteínas y los efectos que desencadenan tras la unión del DAG a los mismos.

La especificidad por distintas especies moleculares de DAG de los dominios C1 típicos, determina que las proteínas que los contienen ejerzan su actividad en localizaciones subcelulares específicas. Así por ejemplo, los

dominios C1 de la PKD, tienen mayor afinidad por DAG con ácidos grasos saturados, lo que hace que esta enzima se active en el complejo de Golgi, donde predomina esta especie lipídica (Carrasco S. y Mérida I., 2007).

Por otra parte, la función de los dominios C1 atípicos, presentes principalmente en la familia de las DGK, no se encuentra completamente dilucidada, pero se postula que estaría relacionada a la interacción con subdominios de membrana (Colón-González F. y Kazanietz, M., 2006).

En conclusión, los dominios C1 funcionan como transmisores del mensaje codificado en los módulos reguladores dependientes de DAG, que controlan la activación de proteínas y determinan su sitio especifico de interacción (Carrasco S. y Mérida I., 2007).

Dado que en este trabajo de Tesis nos centramos principalmente en el estudio de los mecanismos de transducción de señales de los DAG que involucran a las enzimas PKC y PKD, a continuación describiremos la acción de estas enzimas.

Las proteínas quinasas C y D

El mecanismo principal de señalización celular tras un estímulo externo está mediado por la fosforilación y desfosforilación de proteínas intracelulares, donde la fosforilación involucra la acción de proteínas quinasas. Estas proteínas fosforilan a sus sustratos en residuos serina, treonina o tirosina, y de esta forma los estabilizan en un estado conformacional que altera su función biológica (Zeng L. y col., 2012).

- **Las PKC:**

Estas proteínas pertenecen a la familia de las serina/treonina quinasas y fueron unas de las primeras quinasas en ser descubiertas (Inoue M. y col., 1977). Según el requerimiento de co-factores para lograr su activación (DAG, Ca^{2+}, fosfatidilserina: PS; Figura 1-3A), las diez diferentes isoformas de PKC se dividen en tres grupos: convencionales o clásicas (PKCc: α, βI, βII y γ), noveles (PKCn: δ, ε, η y θ) y atípicas (PKCa: ζ y λ, denominada ι en células murinas) (Figura 1-3A) (Zeng L. y col., 2012).

Todas las PKC se caracterizan por tener en su estructura un sitio quinasa altamente conservado y un pseudosustrato autoinhibitorio, en sus extremos C- y N-terminal, respectivamente. Las diferencias radican en los

restantes componentes del sitio regulatorio (Figura 1-3A) (Antal C. y Newton A., 2013).

En relación a la presencia del dominio C1, las PKCc y PKCn presentan dos dominios sensibles a DAG, C1A y C1B, mientras que las PKCa tienen un solo dominio C1, el C1 atípico, que no interacciona con estos lípidos (Figura 1-3A) (Zeng L. y col., 2012; Antal C. y Newton A., 2013). La simple diferencia de un aminoácido en el dominio C1B es la responsable de que las PKCc tengan menor afinidad por el DAG que las PKCn (Gallegos L. y Newton A., 2008).

La interacción con el Ca^{2+} con las PKCc se logra a través del dominio C2, gracias a la presencia de residuos de aspartato (Figura 1-3). Esta unión, que es crucial para la activación de las PKCc, no ocurre en las PKCn, ya que carecen de estos aminoácidos en su dominio C2, denominado C2 novel (Figura 1-3A). Esto implica que la activación de las PKCn no es dependiente de Ca^{2+}, situación que estaría compensada por tener el doble de afinidad por los DAG que las PKCc (Figura 1-3A) (Zeng L. y col., 2012; Giorgione J. y col., 2006; Newton A., 1995).

Los dominios C1 de todas las isoformas de las PKC interaccionan con la PS presente en las membranas (Figura 1-3A) (Zeng L. y col., 2012; Antal C. y Newton A., 2013), donde el dominio C1B sería el principal involucrado en las PKCc y PKCn (Johnson J. y col., 2000). Además, los dominios C2 de las PKCc interaccionan con fosfolípidos aniónicos, incluyendo PS, de forma dependiente (Figura 1-3B) o independiente de la unión del Ca^{2+}, debido a la existencia de un parche básico distante al sitio de unión dependiente de Ca^{2+} (Corbalan-García S. y col., 2003; Evans J. y col., 2006).

Las PKCa no unen DAG ni Ca^{2+}, por lo que su regulación está basada en la interacción con otras proteínas a través del dominio PB-1 (Lamark T. y col., 2003), ausente en las demás PKC (Figura 1-3A) (Zeng L. y col., 2012; Antal C. y Newton A., 2013).

El dominio catalítico de las PKC (Figura 1-3A) presenta tres sitios de fosforilación/autofosforilación críticos para la maduración de las enzimas: el sitio de activación y los dominios de giro e hidrofóbico (Gallegos L. y Newton A., 2008). La fosforilación en todos estos sitios es crucial para el proceso de maduración de las PKC, necesario para lograr una enzima competente aunque inactiva (Figura 1-3B). Tras su síntesis, las PKC son rápidamente fosforiladas en estos tres sitios en ausencia de estímulo de activación (Freeley M. y col., 2011). En el caso particular de la PKCα, la fosforilación se logra luego de 5-10

min de ser sintetizada (Antal C. y Newton A., 2013). Si la enzima no se encuentra fosforilada en alguno de estos sitios, su activación se encuentra comprometida (Freeley M. y col., 2011).

El proceso de maduración de las PKC comienza con la fosforilación en el sitio de activación por la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido (PDK-1). Esta acción gatilla rápidamente dos fosforilaciones, en los dominios de giro e hidrofóbico, donde participarían el complejo proteico mTORC2 (del inglés: *mammalian target of rapamycin complex 2*) y la misma PKC, con procesos de autofosforilación (Figura 1-3B).

Las PKC recién sintetizadas tienen libre el sitio de unión al sustrato. El proceso de maduración por fosforilación localiza al pseudosustrato autoinhibitorio en este sitio, logrando de esta forma una enzima catalíticamente competente, aunque aún inmadura. En el caso particular de las PKCc (Figura 1-3B), la unión de Ca^{2+} seguida de la interacción con PS y DAG, presentes en la membrana plasmática, como consecuencia de un estímulo extracelular, llevan a la obtención de una enzima madura y activa. Esto se debe a la interacción del dominio C1 con el DAG, que favorece la salida del pseudosustrato del sitio de unión de sustrato y permite la señalización por fosforilación corriente abajo de PKC (Figura 1-3B) (Antal C. y Newton A., 2013).

El fin del proceso de señalización mediado por la PKC ocurre por desfosforilación de la enzima. La desfosforilación depende del estado conformacional en el que se encuentren las PKC. En su conformación madura pero inactiva (Figura 1-3B) son resistentes a la desfosforilación. Sin embargo, la conformación abierta que adoptan las PKC activadas (Figura 1-3B), las convierte en un blanco fácil de las fosfatasas (Gao T. y Newton A., 2005; Gao T. y col., 2008; Newton A., 2009).

La enzima fosfatasa PHLPP (del inglés: *PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) es la responsable de la primera desfosforilación (Figura 1-3B), en el sitio hidrofóbico del extremo C-terminal de las PKCc y PKCn (Gao T. y Newton A., 2005; Gao T. y col., 2008; Newton A., 2009). Este proceso gatilla la localización citoplasmática de las PKC (Figura 1-3B), donde son además desfosforiladas en el dominios de giro y en su sitio de activación por otras fosfatasas (Gao T. y col. 2008; Newton A., 2010).

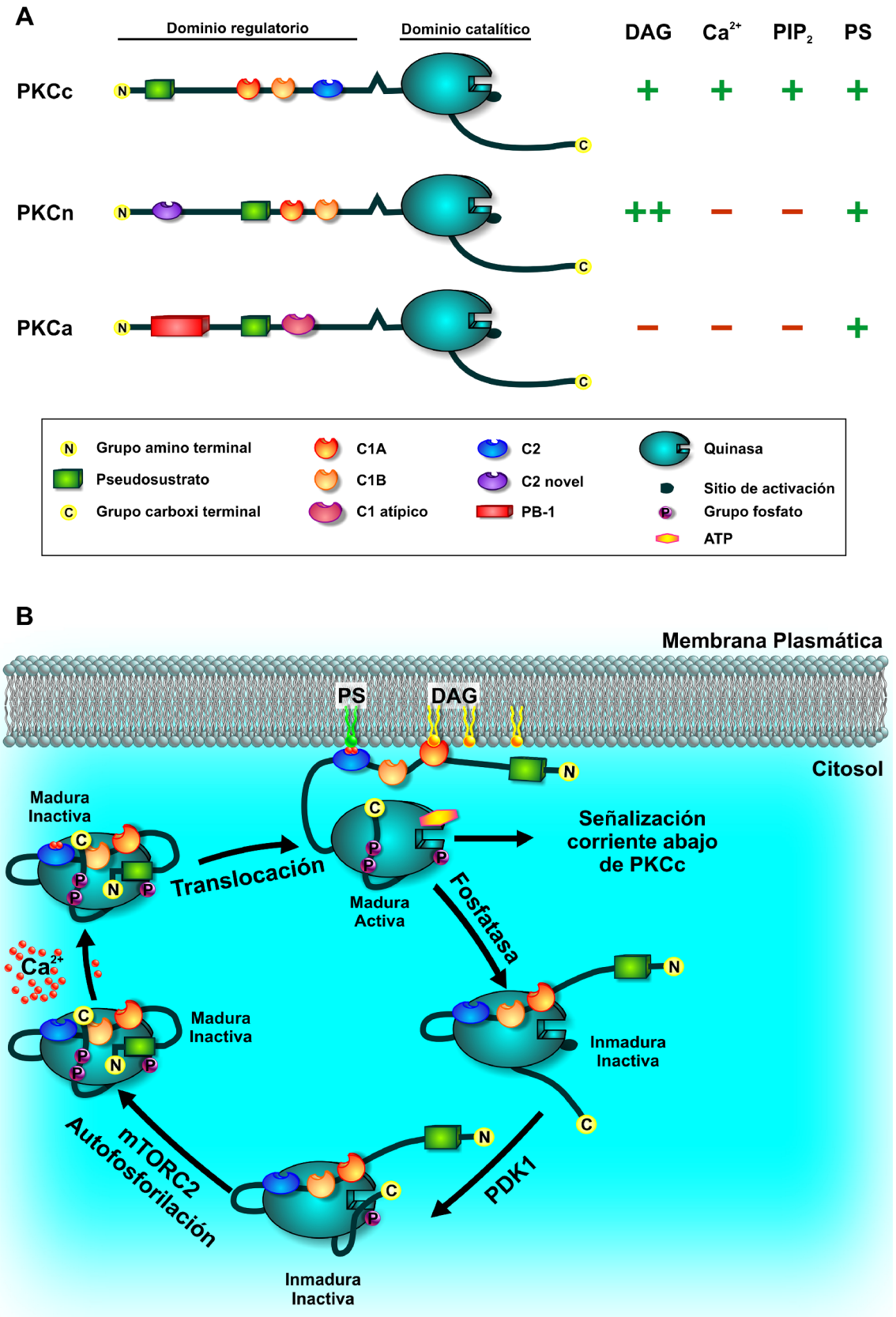


Figura 1-3. Las PKC. A) Estructura primaria de las tres familias de PKC. **B)** Mecanismo de activación de las PKCc.

En ausencia de estímulo crónico, una misma PKC permanece durante días en las células en cultivo (Newton A., 2009). Sin embargo, el estímulo prolongado con los EF disminuye los niveles de las PKCc y las PKCn en el orden de horas, dependiendo del tejido evaluado (Newton A., 2009; Gould C. y col., 2008; Santiskulvong C. y Rozengurt E., 2007; Rucci N. y col. 2005; Leontieva O. y Black J., 2004; Junoy B. y col., 2002; Liu W. y Heckman C., 1998; Parker P. y col., 1995). El aumento de la desfosforilación en dos órdenes de magnitud como consecuencia del estímulo sostenido con EF, resulta en una PKC inestable que es rápidamente derivada hacia procesos de degradación, por mecanismos dependientes de ubiquitina y proteosomas (Hansra G. y col., 1999; Newton A., 2009). Sin embargo, pueden ser rescatadas del proceso de proteólisis por una chaperona, la Hsp70, cuya unión al sitio de giro de la PKC promovería su refosforilación, aumentando así la vida media de esta proteína (Gao T. y Newton A., 2006; Newton A., 2010).

La localización de las distintas isoformas de PKC depende del tipo de célula y tejido. En general, las PKCα, PKCδ y PKCζ se encuentran en la mayoría de las células, mientras que otras PKC se expresan específicamente en determinados tejidos, como es el caso de la PKCγ (sistema nervioso central) y la PKCθ (linfocitos T y UNM) (Zeng L. y col., 2012).

En este trabajo de Tesis nos centramos en el estudio de las PKCc y las PKCn y su posible relevancia en mecanismos que involucren al AChR. La dinámica de estas proteínas se encuentra específicamente controlada por su unión a lípidos de membrana a través sus dominios C1 y C2. Las variables afinidad y selectividad de estos dominios controlan la velocidad, magnitud, duración y localización de la señalización mediada por las diferentes isoformas de las PKC. Las PKCc suelen responder rápidamente al incremento de DAG en la membrana plasmática, pero esta señalización es breve, como consecuencia del rápido recambio de los DAG intervinientes. En cambio, las PKCn dirigidas por la unión de su dominio C1 a membranas del complejo de Golgi ricas en DAG, actúan de forma más lenta. La acción de estas enzimas es sostenida en el tiempo, ya que la acumulación de DAG en el aparato de Golgi es más duradera (Gallegos L. y Newton A., 2008).

- **Las PKD:**

A comienzos de 1994, se descubrió una nueva isoforma de PKC en humanos, la PKCμ, y se la incluyó dentro de la familia de las PKCa (Johannes

F. y col., 1994). Ese mismo año, se identificó en ratón una nueva proteína, denominada PKD (Valverde A. y col., 1994). Por la similitud estructural entre la PKD y la PKCμ, se las nombró finalmente como PKD.

Esta proteína comparte con la familia de las PKC la presencia de dos dominios C1 de alta afinidad hacia DAG, en su extremo N-terminal. Sin embargo, las PKD poseen en su estructura un dominio PH (del inglés: *pleckstrin homology domain*), lo que las diferencia de las PKC (Figura 1-4A) (Rozengurt E., 2010).

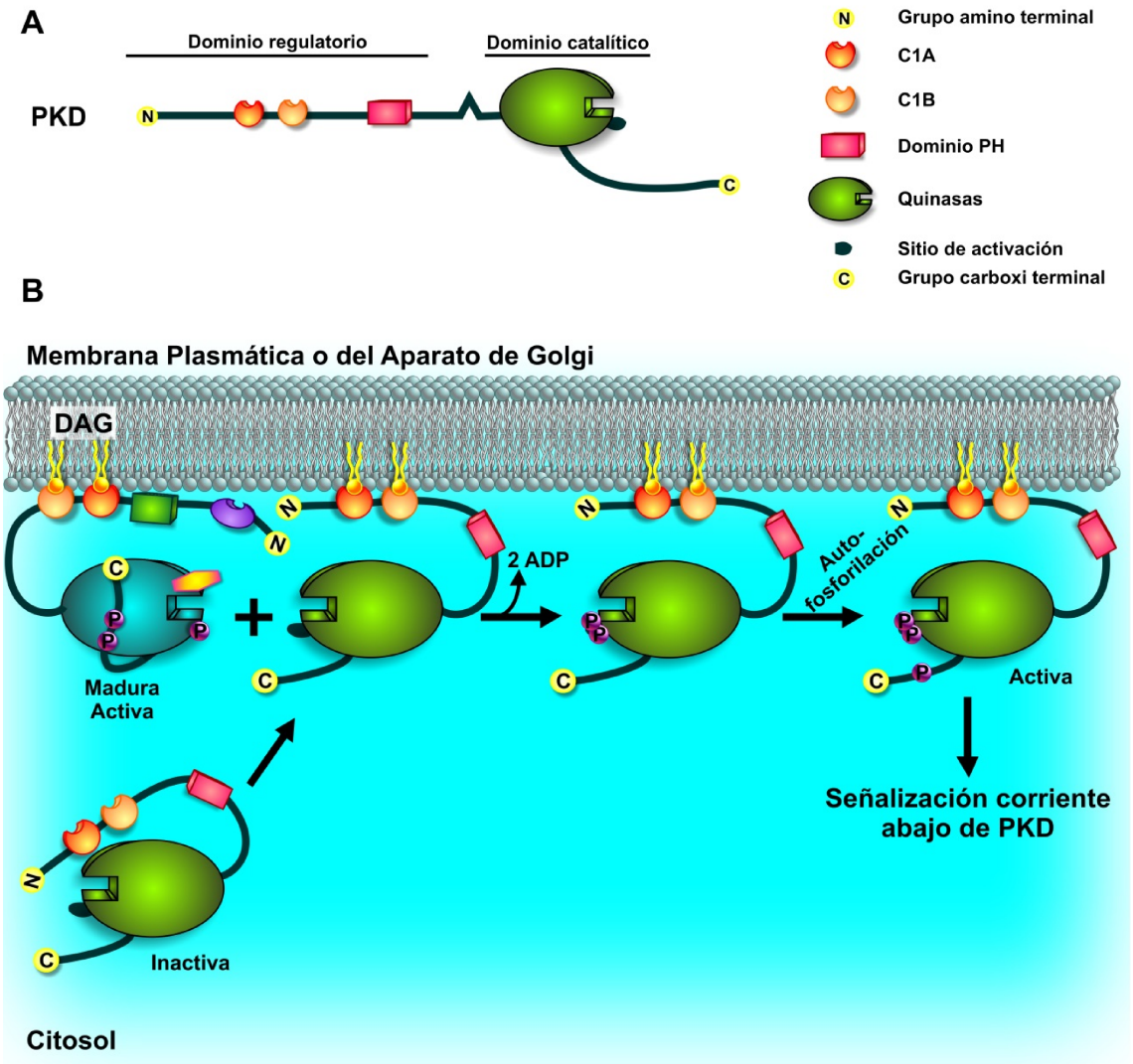


Figura 1-4. La PKD. A) Estructura primaria de la PKD. **B)** Mecanismo de activación de las PKD. La fosforilación de PKD la lleva a cabo una PKCn (dominio quinasa en azul), cuya estructura se encuentra detallada en la figura 1-3A.

Del estudio exhaustivo de las tres isoformas de PKD (PKD1, PKD2 y PKD3), se determinó que la PKD pertenecía al grupo de las quinasas

dependientes de Ca^{2+} y calmodulina (CaMK), al considerar de mayor importancia la homología en la secuencia del dominio catalítico, en la relación evolutiva de las quinasas (Hanks S., 2003; Rozengurt E., 2010).

La localización de estas proteínas es principalmente citosólica cuando se encuentran en su forma inactiva, siendo translocadas a la cercanía de diferentes compartimentos subcelulares cuando son activadas (Figura 1-4) (Rozengurt E., 2010).

En cuanto al mecanismo de activación de las PKD, se sabe que su localización en las membranas intracelulares está determinada por la presencia de DAG (Figura 1-4B). Tras la interacción con los DAG de membrana, la PKD es doblemente fosforilada por una PKCn en el sitio de activación, gatillando así su rápida auto-fosforilación en el extremo C-terminal (Figura 1-4B). Una vez fosforilada, la enzima queda activada (Young S. y col., 2012; Rozengurt E., 2010; Sinnett-Smith J. y col., 2009; Sinnett-Smith J. y col., 2011; Matthews S. y col., 1999).

Del estudio de las PKD de diversos tipos de tejidos y células, se ha podido concluir que las mismas presentan una actividad catalítica casi nula en ausencia de DAG (Van Lint J. y col., 1995; Rozengurt E., 2010), lo que convierte a estos lípidos en esenciales para su activación.

Antecedentes y Objetivos

Capítulo I

ANTECEDENTES

El AChR es una proteína transmembranal con una parte de su estructura en contacto directo con los lípidos de la membrana plasmática. Por lo tanto, es de suma importancia estudiar si el ambiente lipídico que rodea al AChR afecta su síntesis, ensamblado, tráfico e inserción en la membrana, así también como su funcionalidad, ya sea el gatillado del canal o su capacidad de reconocer ligandos específicos.

Estudios realizados en nuestro laboratorio sugirieron que la SM y el colesterol son importantes en los procesos de distribución y de tráfico del AChR (Roccamo A. y col., 1999; Baier C. y Barrantes F., 2007; Pediconi M. y col., 2004; Gallegos C. y col., 2008; Borroni V. y col., 2007; Borroni V. y Barrantes F., 2011; Barrantes F., 2012). Determinamos también que la ceramida modula el tráfico del AChR hacia la membrana plasmática, efecto que no solo está relacionado con la función de la ceramida como precursor de la SM (Gallegos C. y col., 2008).

La hipótesis central de este capítulo es que no solo la síntesis de SM y ceramida intervendrían en la expresión y tráfico del AChR, sino que el mantenimiento de un correcto balance entre los co-productos de la reacción y los precursores metabólicos influiría en la regulación de los niveles de este receptor en la superficie celular (Figura 1-5).

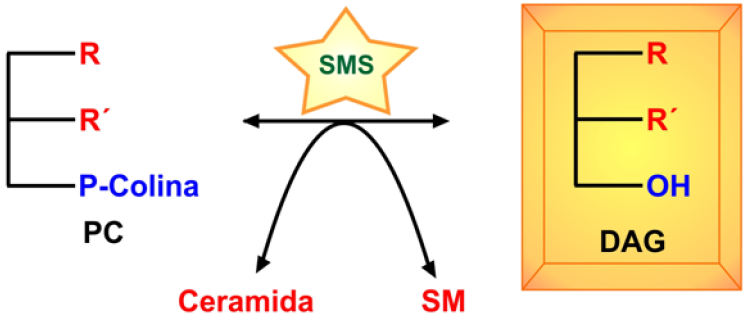


Figura 1-5. Síntesis de SM por la enzima SMS

OBJETIVOS

Vista la importancia del correcto balance lipídico en relación al AChR, en este capítulo de la Tesis nos propusimos:

★ En células clonales CHO-K1/A5, que expresan AChR muscular adulto:

- ☑ Evaluar los posibles efectos de los DAG sobre la estabilidad del AChR en la membrana plasmática y sobre los mecanismos involucrados en el ensamblado y tráfico hacia y desde la superficie celular.

- ☑ Determinar los mecanismos de señalización implicados en el accionar de los DAG.

★ En neuronas de hipocampo en cultivo:

- ☑ Estudiar los efectos de los DAG sobre el AChR-α7, y compararlos con los determinados para el AChR muscular.

Resultados

Capítulo I

INCUBACIÓN CON DAG Y ANÁLOGOS

Palmitoiloleilglicerol

Con el fin de evaluar los efectos de los DAG sobre la expresión y distribución del AChR, investigamos la posible acción mediada por un DAG de cadena larga, el palmitoiloleilglicerol (POG) (Figura 1-6). Elegimos este DAG ya que la especie molecular mayoritaria de PC presente en células de mamíferos es la que contiene los ácidos grasos constitutivos del POG (Aveldaño M. y Bazán N., 1983).

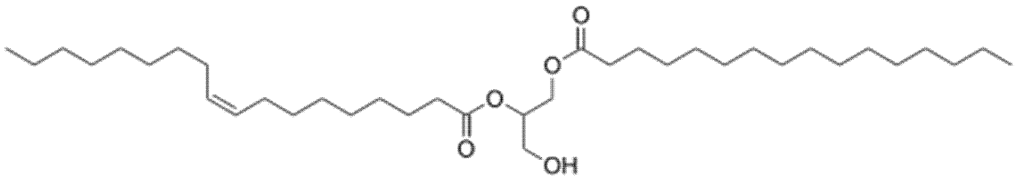


Figura 1-6. Estructura química del POG

Luego de incubar células CHO-K1/A5 con POG durante 3 hs a 37 °C, determinamos los niveles de AChR de superficie mediante la unión específica del radioligando [I^{125}]-BTX. Pudimos observar que el tratamiento con POG a distintas concentraciones (50,100, 200, 300 y 400 µM) aumenta los niveles de AChR en la superficie celular, lo que se manifiesta a partir de 100 µM (Figura 1-7A).

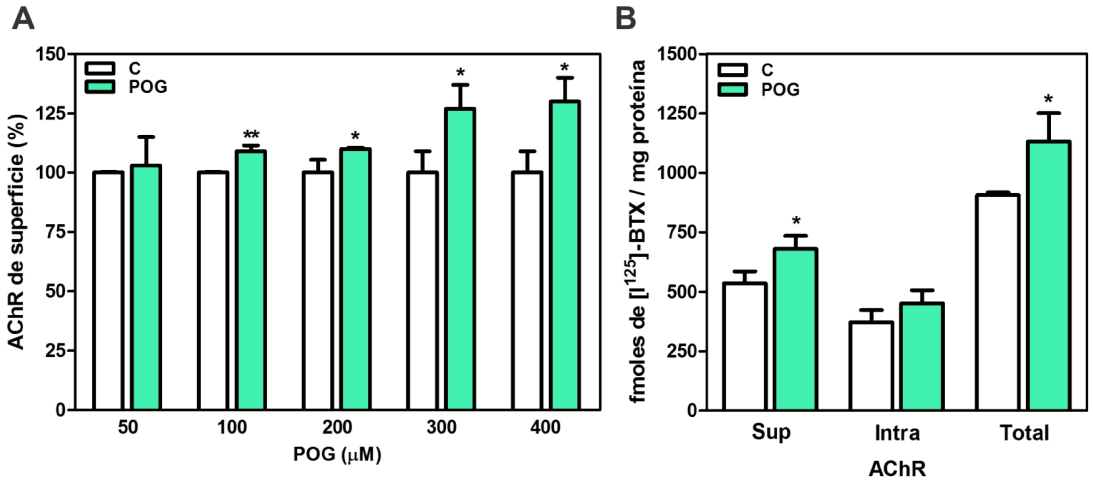


Figura 1-7. Efecto de la incubación de células CHO-K1/A5 con POG durante 3 hs a 37 °C. A) Determinación del AChR de superficie por unión de [I^{125}]-BTX a diferentes concentraciones de POG (n=3). **B)** Cuantificación de los niveles de AChR en superficie, en el compartimento intracelular y en la totalidad de la célula, luego de la incubación con POG 300 µM (n=3). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Considerando las magnitudes de los cambios observados (Figura 1-7A), elegimos la concentración de POG 300 µM para los siguientes experimentos. Determinamos entonces, la cantidad de receptor de superficie y total, obteniendo de esta diferencia la cantidad de AChR intracelular. Observamos que el aumento del AChR en superficie (27 ± 10 %) se produce paralelamente con el aumento en la cantidad del AChR total (25 ± 13 %) (Figura 1-7B).

Dioctanoilglicerol

La composición del POG, similar a la encontrada en los lípidos endógenos (Aveldaño M. y Bazán N., 1983), lo hace susceptible a la metabolización una vez que ingresa a las células (Chuang M. y Severson D., 1998), y por lo tanto los efectos observados sobre el AChR podrían ser consecuencia del POG *per se* como así también de sus metabolitos. Lo reemplazamos entonces por un DAG de cadena corta, el sn-1,2-dioctanoilglicerol (DOG) (Figura 1-8). Este DAG es un lípido sintético, que no es producido por las células eucariotas, y que posee mayor solubilidad en medio acuoso (Davis R. y col., 1985; Kearns B. y col., 1997). Cuando las células son incubadas con DOG, el lípido no es metabolizado hacia PA y tampoco afecta las vías de metabolización de los fosfolípidos. Por estos motivos, su velocidad de metabolización es menor en comparación con los DAG de cadena larga, como el POG (Henneberry A. y col., 2001).

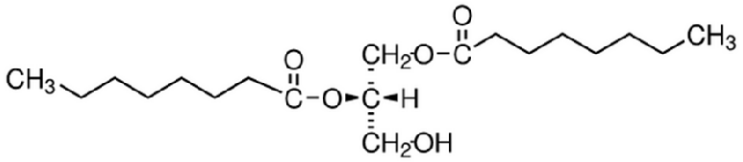


Figura 1-8. Estructura química del DOG

Realizamos los experimentos luego de incubar las células a tiempos cortos (30 min, 3 y 4 hs) y largos (18, 24, 48 y 72 hs), utilizando la concentración de lípido que previamente habíamos establecido como óptima con el POG (300 µM).

Incubación con DOG durante tiempos *cortos*

Comenzamos evaluando el efecto del tratamiento con el DOG (300 µM) durante 30 min a 37 °C, sobre la expresión del AChR de superficie en las

células CHO-K1/A5. En la figura 1-9A se muestran los niveles de [I^{125}]-BTX unida al AChR de superficie /mg de proteína para esa condición experimental. Como podemos observar, luego de la incubación con DOG, aumenta significativamente el AChR en la superficie celular (40 ± 18 %).

Para determinar la afinidad del AChR por la BTX, realizamos ensayos de saturación de la unión del radioligando, incubando las células con diferentes concentraciones de [I^{125}]-BTX (Figura 1-9B). La curva de Scatchard correspondiente a la unión de la toxina radiactiva en células controles y tratadas con DOG, pone en evidencia la disminución de la afinidad del AChR de superficie por la BTX luego del tratamiento con el lípido (K_D control: 14,01 ± 5,29 nM; K_D DOG: 47,65 ± 24,56 nM). Sin embargo, su unión máxima aumenta, tal como lo muestra también la figura 1-9A. El tratamiento con DOG no alteró la cantidad de proteínas por placa, en comparación con el control.

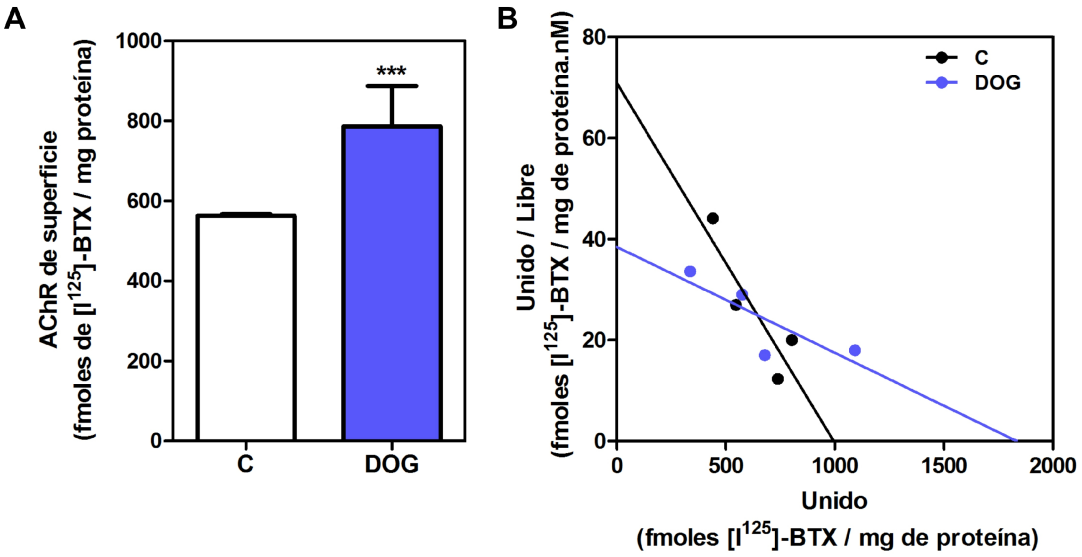


Figura 1-9. Efectos sobre el AChR luego del tratamiento con DOG durante 30 min. A) Unión de la toxina radiactiva al AChR de superficie, donde la concentración de [I^{125}]-BTX utilizada permite la saturación de todos los sitios específicos de unión (n=3). (***) $p < 0,001$. **B)** Curva de Scatchard correspondiente a la unión de diferentes concentraciones de [I^{125}]-BTX a los AChR presentes en la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 (Experimento representativo de n=3).

A continuación llevamos a cabo experimentos de microscopía de fluorescencia con el objeto de intentar mediciones independientes del cambio de la expresión del AChR de superficie. Para ello, marcamos al AChR con un derivado fluorescente de la BTX, Alexa^{488}-BTX (Figura 1-10). Como se observa en las imágenes de contraste de fase de ambas condiciones, durante el tiempo estudiado no se produjeron alteraciones en la morfología de las células (Figura

1-10). Si bien se observó una tendencia al aumento en los niveles del AChR de superficie debida al tratamiento con DOG (Figura 1-10), esta no es estadísticamente significativa como el cambio evidenciado por la unión de la toxina iodinada (Figura 1-9A).

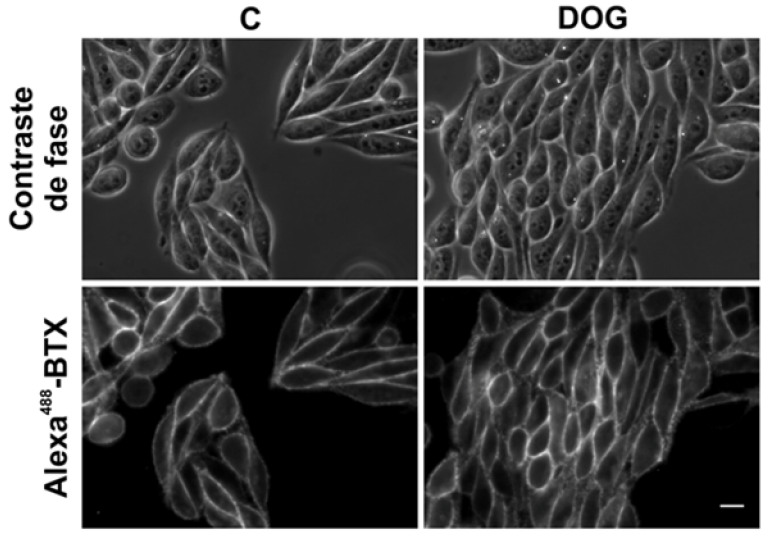


Figura 1-10. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1/A5 luego del tratamiento durante 30 min con DOG. Imágenes de contraste de fase (paneles superiores) y de fluorescencia (paneles inferiores), donde la tinción con Alexa^{488}-BTX puso en evidencia a los AChR presentes en membrana plasmática. Escala: 10 µm.

Seguidamente, evaluamos la funcionalidad del AChR a través de registros electrofisiológicos de canal unitario mediante la técnica de patch-clamp. Los registros fueron llevados a cabo por la Dra. Ana Sofía Vallés, de este Instituto, en la configuración célula adherida. Se observó que tras la exposición a DOG durante 30 min, el tiempo de estado abierto del canal, activado con ACh 1 µM, disminuye (Figura 1-11).

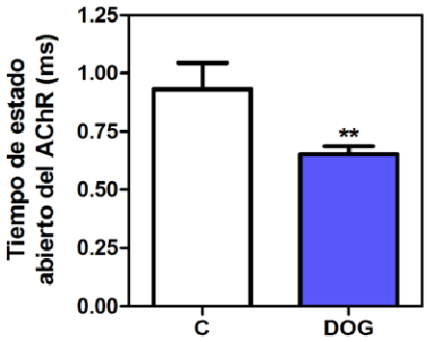


Figura 1-11. Cambios en la cinética del AChR mediados por DOG incubado durante 30 min. Registros de patch-clamp (célula adherida-canal unitario) de la actividad del AChR frente al estímulo con ACh (n=4). (**) $p < 0,01$.

Si bien se observan cambios sobre el AChR de superficie tras la incubación con DOG durante 30 min (Figura 1-9A), la dispersión de los datos obtenidos en la curva de Scatchard (Figura 1-9B), nos hizo preguntarnos qué sucedería a otro tiempo, que también denominamos tiempo corto de incubación: 4 hs. Cuantificamos entonces la expresión del AChR en los

diferentes compartimentos celulares luego de la incubación con DOG (300 µM) durante 4 hs a 37 °C. Tal como lo muestra la figura 1-12A, este tratamiento produce el mismo efecto sobre los niveles del AChR de superficie (aumento: 34 ± 8 %) que el observado luego de 30 min de incubación. Sin embargo, no se observan cambios en los niveles de AChR total en las células CHO-K1/A5 (Figura 1-12A), a diferencia de lo obtenido en los experimentos con POG durante tiempos cortos (Figura 1-7B).

Encontramos el mismo patrón de expresión del AChR frente a la incubación con DOG durante 3 hs (aumento del AChR de superficie: 40 ± 5 %, AChR intracelular y total, sin cambios) (Figura 1-12B). Tanto a 3 como a 4 hs de tratamiento, el DOG no alteró la cantidad de proteínas por placa.

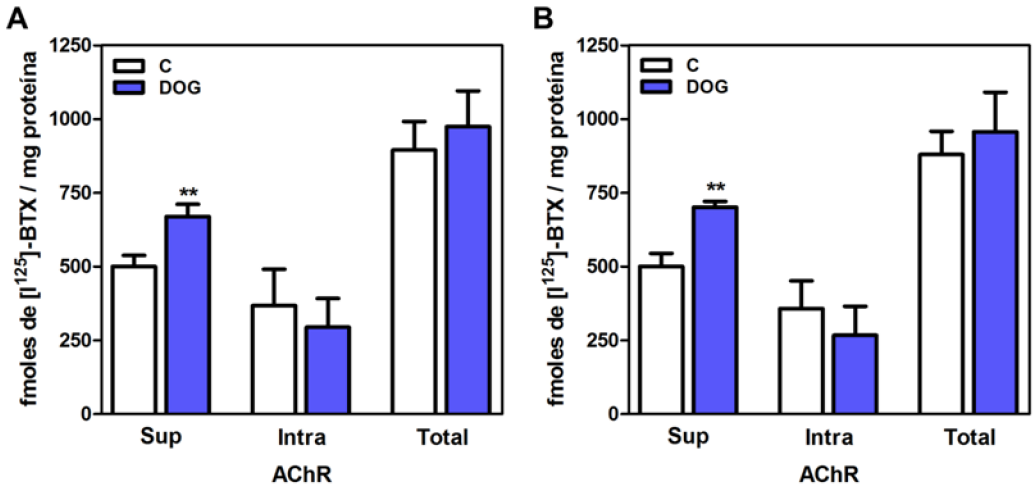


Figura 1-12. Distribución del AChR luego de períodos cortos de incubación con DOG. Ensayo de unión de BTX radiactiva luego del tratamiento con DOG 300 µM durante: **A)** 4 hs (n=4); y **B)** 3 hs (n=3). (**) $p < 0,01$.

Efectos del DOG a tiempos *largos* de incubación

Dado que luego del tratamiento con DOG durante 30 min, 3 y 4 hs aumentan los AChR presentes en la superficie celular (Figura 1-9A y 1-12), sin encontrarse alterados los niveles del receptor total (Figura 1-12), nos propusimos estudiar si la incubación con DOG durante períodos más prolongados (18, 24, 48 y 72 hs) afectaba la expresión celular del AChR.

En la figura 1-13A se muestra que luego de 18 hs de exposición con 300 µM de DOG, disminuye la cantidad de receptor de superficie (20 ± 12 %) con el concomitante aumento del AChR intracelular (43 ± 22 %), manteniéndose sin cambios los niveles de receptor total. Por microscopía se

pudo comprobar que el tratamiento realizado no produjo alteraciones morfológicas en las células (Figura 1-13B).

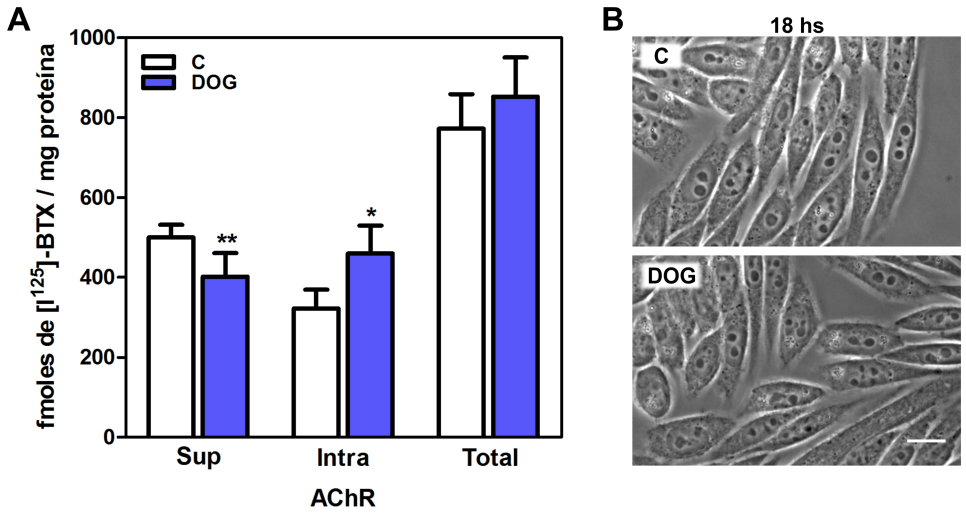


Figura 1-13. Tratamiento con DOG 300 µM durante 18 hs. A) Experimento de unión de radioligando en células CHO-K1/A5 (n=4). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. **B)** Imágenes de contraste de fase luego 18 hs de incubación.

Estos cambios sobre el AChR se mantienen hasta las 24 hs de incubación con DOG (Figura 1-14A, 24 hs). Sin embargo, exposiciones más prolongadas al lípido (48-72 hs) hacen que los niveles de AChR en la superficie e intracelular retornen a valores normales (Figura 1-14A, 48 y 72 hs). En ninguna de las condiciones experimentales estudiadas se observaron cambios en la morfología celular (Figura 1-14B), en la cantidad total de AChR sintetizada por las células, ni en los niveles de proteínas por placa.

Los resultados de los experimentos anteriores demostraron que el DOG ejerce un efecto diferencial sobre la distribución del AChR en las células CHO-K1/A5, que varía según al período de incubación estudiado. Por este motivo, definimos para los experimentos siguientes, dos condiciones: tiempos cortos (3-4 hs) y tiempos largos (18 hs) de incubación.

Cuantificación del DOG post-incubaciones

Si bien está comprobado que el DOG tiene baja tasa de metabolización en células eucariotas (Heneberry A. y col., 2001), nos propusimos evaluar que sucedía en la línea clonal CHO-K1/A5, nuestro sistema de estudio. Para ello utilizamos las proteínas quiméricas Daglas Dem1, que actúan como sensores fluorescentes de DAG en el RE y en el complejo de Golgi (Sato M. y col., 2006). Las Daglas están formadas por las proteínas fluorescentes ciano (CFP) y

amarilla (YFP), y entre ellas se ubica el dominio CRD de la PKCβ, que reconoce a los DAG. La interacción del DAG con la proteína quimérica produce el acercamiento entre la CFP y la YFP, favoreciendo la transferencia de energía de tipo Förster (FRET) (Para más información, ver la sección Materiales y Métodos: Figura 11). Un indicador de las variaciones de la FRET es el cociente *R*, resultante del cociente de las imágenes: YFP/CFP.

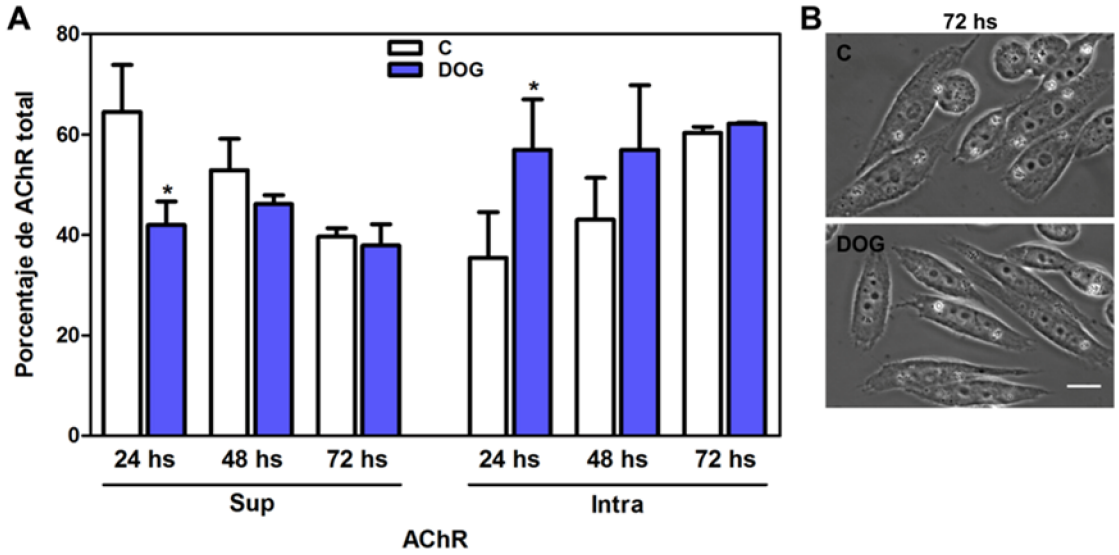


Figura 1-14. Células CHO-K1/A5: 24, 48 y 72 hs de exposición a DOG. A) Unión de radioligando luego de los tiempos evaluados, expresados como porcentaje del AChR total, ya que la cantidad total de receptor no se modificó en los tiempos estudiados (n=3). (*) $p < 0,05$. **B)** Imágenes de contraste de fase luego de 72 hs de incubación.

En nuestro sistema experimental, cuanto mayor es el nivel de DOG en las endomembranas, mayor es el *R* debido al aumento en la FRET que ocurre en las células transfectadas con la sonda Daglas Dem1. En la figura 1-15 se puede observar el incremento de la FRET debido a la incubación con DOG durante 4 hs a 37 °C, tanto en la imagen *R* (Figura 1-15A, *R*) como en su cuantificación (Figura 1-15B, 4 hs). No se observó dicho aumento cuando las células fueron incubadas con DOG durante 18 hs (Figura 1-15B, 18 hs). Esto puede deberse a que las Daglas son muy sensibles para la detección de estímulos en el orden de los minutos (Sato M. y col., 2006), pero pueden no serlo tanto en presencia de un estímulo continuo y prolongado como el del DOG durante 18 hs. Otra alternativa es que durante este período, el DOG incorporado en las células no se encuentre en cantidades suficientes en las endomembranas como para ser detectado por las Dem1.

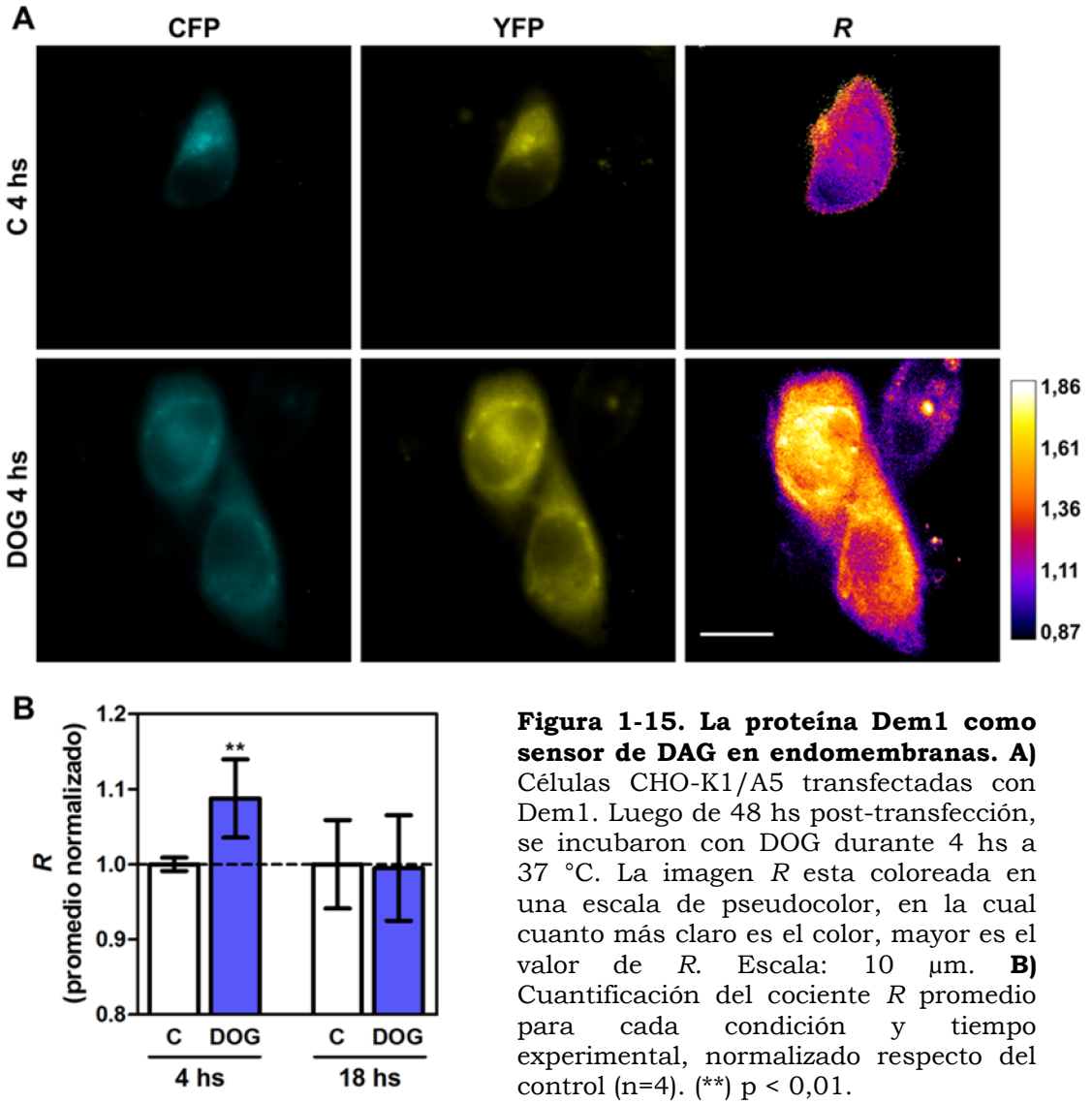


Figura 1-15. La proteína Dem1 como sensor de DAG en endomembranas. A) Células CHO-K1/A5 transfectadas con Dem1. Luego de 48 hs post-transfección, se incubaron con DOG durante 4 hs a 37 °C. La imagen *R* esta coloreada en una escala de pseudocolor, en la cual cuanto más claro es el color, mayor es el valor de *R*. Escala: 10 µm. **B)** Cuantificación del cociente *R* promedio para cada condición y tiempo experimental, normalizado respecto del control (n=4). (**) $p < 0,01$.

El depósito de lípidos en el interior celular en estructuras denominadas gotas lipídicas ocurre en distintos tipos celulares, incluyendo bacterias, levaduras, células vegetales y células animales (Murphy D., 2012). Las gotas lipídicas están formadas por un corazón de lípidos neutros: TAG y ésteres del colesterol, rodeados por una monocapa de fosfolípidos, DAG y proteínas (Thiele C. y Spandl J., 2008; Guo Y. y col., 2009). Dichas gotas permiten también el almacenamiento de compuestos xenobióticos hidrofóbicos (Thiele C. y Spandl J., 2008). Para evaluar si el DOG era acumulado/metabolizado en estas estructuras durante los períodos de incubación estudiados, utilizamos el Rojo Nilo (Figura 1-16), un fluoróforo que ingresa en el interior de las células, previamente fijadas y permeabilizadas, y pone en evidencia a las gotas lipídicas presentes en las mismas (Greenspan P., 1985).

En la figura 1-16A se muestra la imagen de fluorescencia de células teñidas con Rojo Nilo, en las cuales se pueden apreciar las gotas lipídicas coloreadas en verde, para las condiciones C y DOG luego de 4 y 18 hs de incubación. Como se observa en las imágenes, no existen diferencias entre el control y las células incubadas 4 hs con DOG (Figura 1-16A, 4 hs). Sin embargo, luego de 18 hs en presencia del DOG, las células poseen más cantidad de gotas lipídicas en su interior (Figura 1-16A, 18 hs).

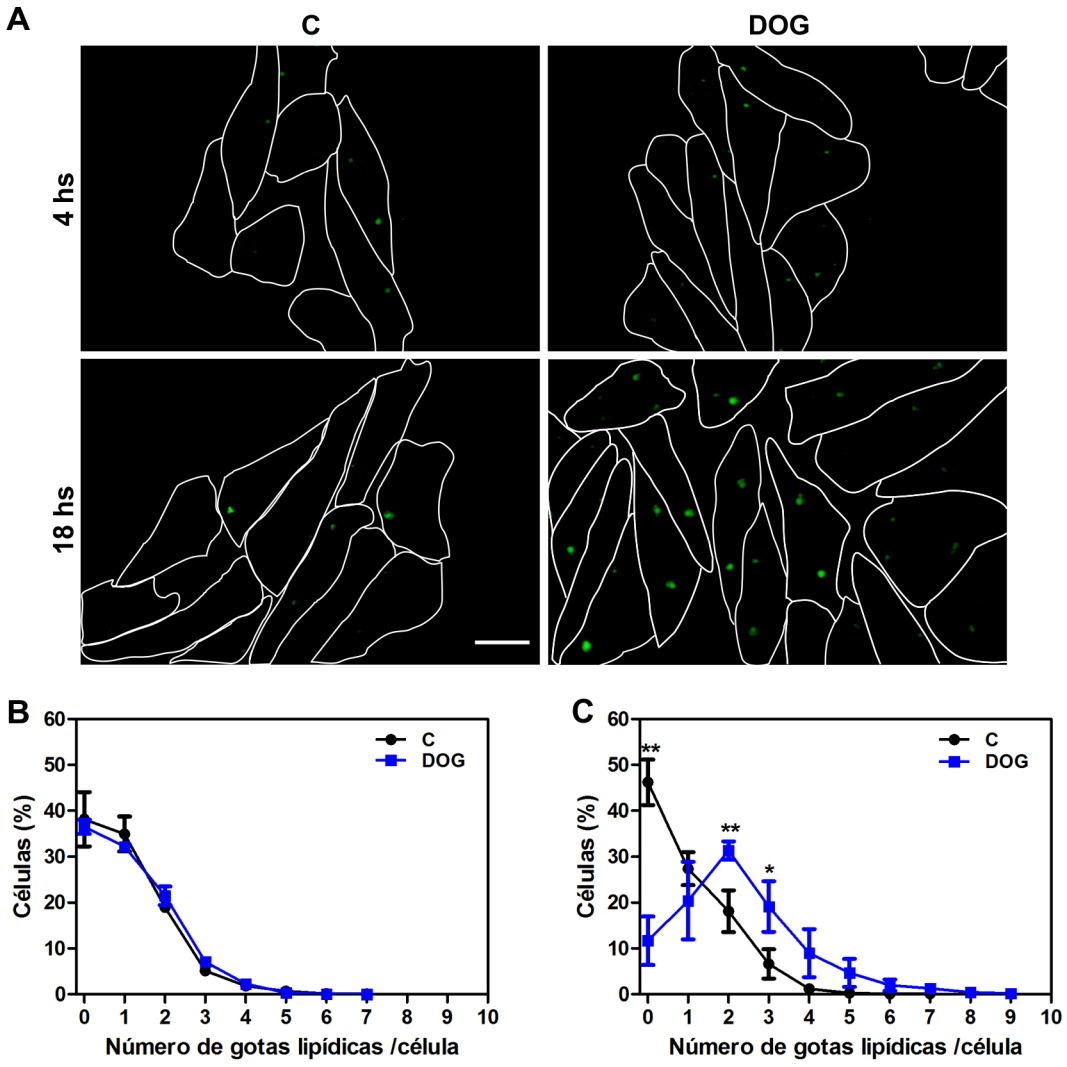


Figura 1-16. Distribución de gotas lipídicas luego de la incubación durante 4 y 18 hs con DOG. A) Imágenes de fluorescencia de células CHO-K1/A5 teñidas con Rojo Nilo para evidenciar la presencia de gotas lipídicas (coloreadas en verde). La marcación se realizó luego de los respectivos tratamientos durante 4 y 18 hs. Los bordes de las células están dibujados con líneas blancas. Escala: 10 µm. Se cuantificó la cantidad de gotas lipídicas por célula y se graficó en función del total de células normalizado (100 %) luego de 4 (**B**) y 18 hs (**C**) de tratamiento a 37 °C (n=3). C vs DOG: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Al cuantificar la distribución de la cantidad de gotas lipídicas por célula (Figura 1-16, B y C), observamos que la misma no se modifica luego de 4 hs de incubación con DOG (Figura 1-16, A, 4 hs, y B). Por el contrario, la incubación prolongada con el lípido aumenta el número de células que poseen dos o más gotas lipídicas, respecto del control (Figura 1-16, A: 18 hs y C). Debido a las características del DOG, no podemos discernir si su acumulación en gotas lipídicas es debida a la acumulación del lípido *per se* o de su metabolización hacia TAG.

Ésteres de forbol

Con el fin demostrar que los efectos observados sobre el AChR en las células CHO-K1/A5 se debían a la acción de los DAG y no a sus productos metabólicos, utilizamos dos análogos no metabolizables del DAG: los ésteres de forbol (EF), uno activo (forbol 12,13-dibutitaro) y otro inactivo (4α-forbol 12-miristato 13-acetato, EF-) (Figura 1-17).

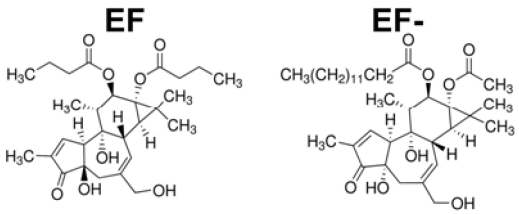


Figura 1-17. Estructura química de los EF utilizados

Efectos de la incubación durante tiempos cortos con EF y EF-

Para determinar la concentración de EF a utilizar, evaluamos la expresión del AChR de superficie luego de incubar las células con 10, 20, 200 y 300 µM de EF (Figura 1-18A). La condición EF 20 µM fue la que produjo el efecto más marcado y reproducible sobre la expresión del AChR (promedio de aumento similar al obtenido con EF 300 µM y menor desvío estándar), por lo que 20 µM fue la concentración de elección para los siguientes experimentos realizados con ambos ésteres de forbol.

La incubación de células CHO-K1/A5 durante 3 hs a 37 °C con EF aumenta la cantidad del AChR de superficie (35 ± 13 %), sin producir cambios significativos en la expresión del AChR intracelular o total (Figura 1-18B).

Estos resultados no se reproducen por el tratamiento con EF- (Figura 1-18B), que no afecta a la distribución del AChR en las células CHO-K1/A5.

Considerando que los resultados obtenidos sobre la expresión del AChR en los distintos compartimentos celulares, son similares tras la incubación con EF o con DOG, implicaría entonces que la acción de estas drogas sobre el AChR estaría relacionada con la activación de mecanismos de transducción de señales específicos.

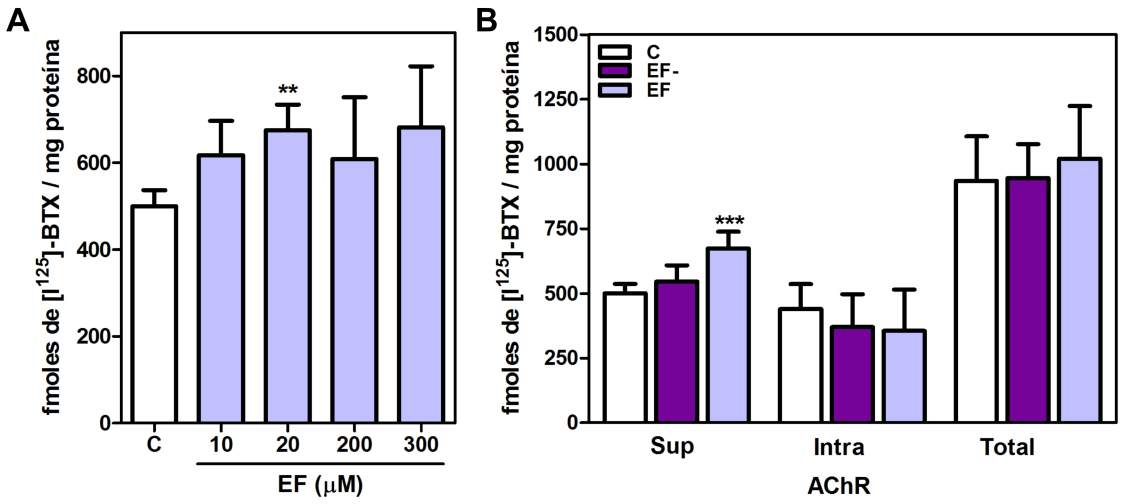


Figura 1-18. Incubación durante 3 hs con EF y EF- a 37 °C. A) Expresión del AChR en membrana plasmática luego de la incubación con diferentes concentraciones de EF (n=3). **B)** Ensayo de unión de radioligando de células CHO-K1/A5 tratadas con 20 μM de EF o de EF- (n=4). (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Seguidamente cuantificamos por microscopía de fluorescencia la expresión del AChR de superficie. Para esto, incubamos las células con EF 20 μM y marcamos los AChR presentes en la membrana plasmática con Alexa^{488}-BTX. Al igual que con el DOG, pudimos observar una tendencia al aumento en la fluorescencia asociada a la superficie celular, que sin embargo no fue estadísticamente significativa. Además, las imágenes de contraste de fase no pusieron en evidencia alteraciones morfológicas debidas a la incubación con el EF (Figura 1-19).

A continuación, evaluamos si la afinidad del AChR por la BTX se veía alterada por el tratamiento con EF durante 3 hs. Realizamos con tal fin un ensayo de unión de saturación (Figura 1-20A) y de desplazamiento (Figura 1-20B). Ambos experimentos demostraron que la incubación con el EF no afecta la afinidad del receptor de superficie por la [I^{125}]-BTX al tiempo de incubación estudiado.

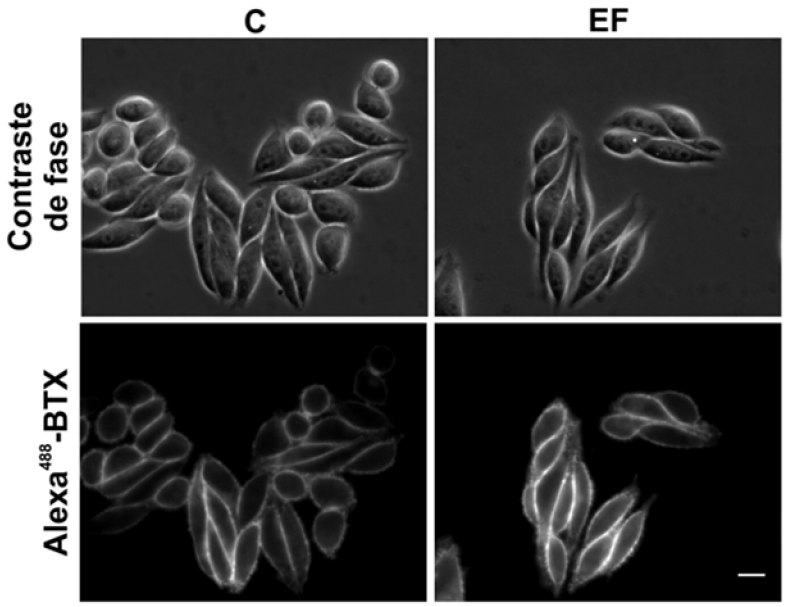


Figura 1-19. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1/A5 incubadas con EF durante 3 hs a 37 °C. La marcación del AChR de superficie se realizó con Alexa^{488}-BTX. Escala: 10 µM.

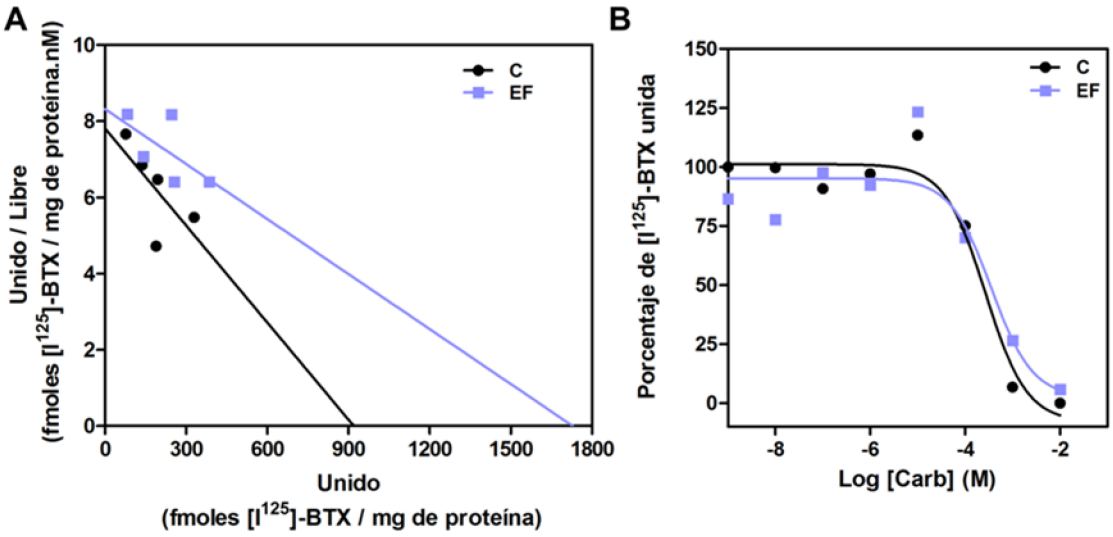


Figura 1-20. Estudio de la afinidad del AChR por la BTX luego de la incubación con EF durante 3 hs. A) Ensayo de saturación de unión de la BTX iodinada a concentraciones crecientes. **B)** Ensayo de desplazamiento de [I^{125}]-BTX por Carb. Experimentos representativos de n=3.

Tratamiento con EF durante 18 hs

El aumento del AChR de superficie debido al DOG es reproducido por el EF a tiempos cortos de incubación. Por tal razón, realizamos los experimentos correspondientes para determinar si lo mismo sucedía luego de 18 hs de incubación. Mediante el ensayo de unión de radioligando pudimos observar

que luego de la incubación a tiempos largos, el EF produce cambios en la distribución del AChR similares al DOG: disminución del AChR de superficie (22 ± 14 %) con el concomitante aumento del receptor en el compartimento intracelular (79 ± 24 %), sin cambios significativos en los niveles totales del AChR (Figura 1-21).

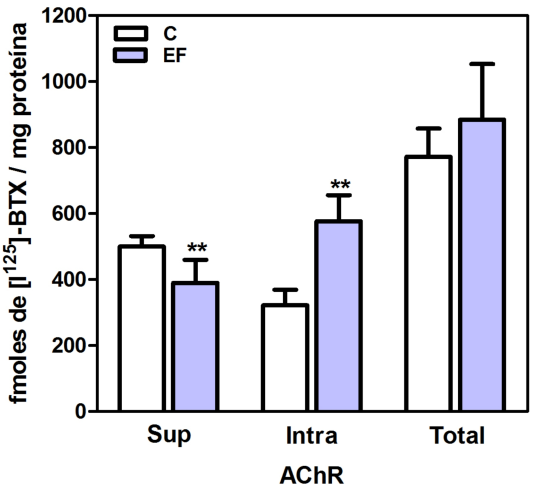


Figura 1-21. Exposición a EF durante 18 hs. Ensayo de unión de BTX radiactiva en células CHO-K1/A5 (n=4). (**) p < 0,01.

MODIFICACIÓN DEL NIVEL DE DAG ENDÓGENO

Diacilglicerol quinasas: inhibición y sobre-expresión

La enzima diacilglicerol quinasa (DGK) es la encargada de la metabolización del DAG mediante su fosforilación y transformación en PA. Se cree que este es uno de los mecanismos principales de metabolización de los DAG involucrados en vías de señalización (Luo B. y col., 2004).

Existen diez isoformas de DGK en mamíferos, divididas en 5 grupos según su similitud estructural: tipo I (α, β, γ), tipo II (δ, η, κ), tipo III (ε), tipo IV (ζ, ι), y tipo V (θ). Las isoformas más comunes y ampliamente expresadas en los distintos tejidos, generalmente en simultáneo, son la DGKα y la DGKζ (Shulga Y. y col., 2011). Con respecto a su localización, la DGKκ es constitutiva de membrana plasmática, mientras que las demás enzimas de esta familia se asocian de forma transiente con diferentes compartimentos intracelulares, incluido el núcleo, como respuesta a un estímulo relacionado a la regulación de los niveles de DAG (Wattenberg B. y col., 2006; Shulga Y. y col., 2011).

R59949: un inhibidor de las DGK

La inhibición de DGK mediada por este compuesto afecta principalmente a las DGK de tipo I (α y γ) (Jiang Y. y col., 2000; Chianale F. y col., 2007), pero también ejerce una inhibición moderada sobre las DGK de tipo II, δ y κ (Sato M. y col., 2013).

El objetivo experimental del empleo del R59949 fue el de aumentar los niveles de DAG endógenos (Figura 1-22), al inhibir su conversión a PA. De esta forma es posible comparar lo que sucede con la expresión del AChR, en relación a lo observado con el agregado de DAG exógenos.

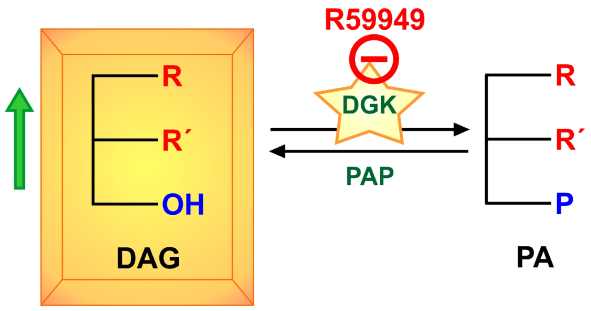


Figura 1-22. Mecanismo de acción del R59949. Este compuesto inhibe a la enzima DGK, impidiendo la conversión del DAG en PA. Esto conlleva al incremento del nivel de DAG endógeno.

Para ello, incubamos a las células CHO-K1/A5 con R59949 300 nM, en ausencia y en presencia de DOG, durante 4 hs y evaluamos la expresión del AChR, tanto por ensayo de unión de radioligando (Figura 1-23) como por microscopía de fluorescencia (Figura 1-24).

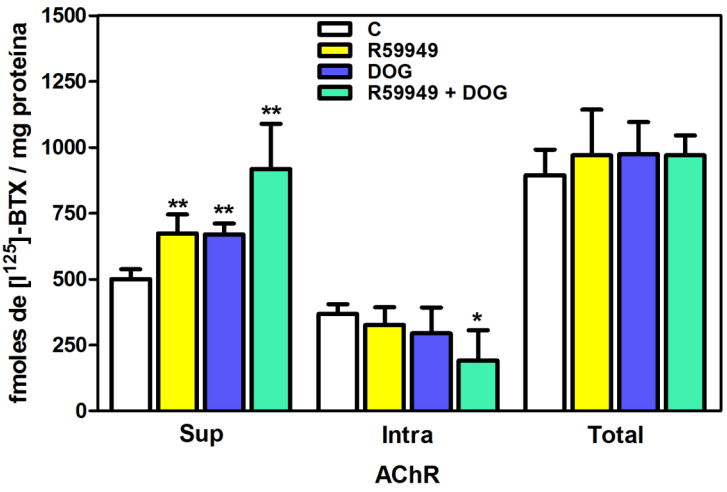


Figura 1-23. La inhibición de las DGK por el R59949 afecta a la distribución del AChR. Ensayo de unión de [I^{125}]-BTX al AChR expresado en células CHO-K1/A5 luego del tratamiento durante 4 hs en presencia del R59949 y DOG (n=4). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Como se muestra en la Figura 1-23, el aumento de DAG endógeno afecta a la distribución del receptor de forma similar a la incubación con DOG: incremento del AChR presente en la membrana plasmática (35 ± 14 %), sin cambios estadísticamente significativos en los niveles totales e intracelulares del receptor. La co-administración de DOG con R59949 produce un aumento

mayor sobre los niveles de AChR presentes en la superficie celular (84 ± 34 %), que el alcanzado con cada droga por separado. Bajo este tratamiento, la disminución del receptor en el compartimiento intracelular es estadísticamente significativa (48 ± 31 %). En ninguna de las condiciones experimentales se encuentran afectados los niveles del AChR total (Figura 1-23).

A continuación, evaluamos la expresión del AChR en superficie y en el interior de las células CHO-K1/A5 por microscopía de epifluorescencia (Figura 1-24).

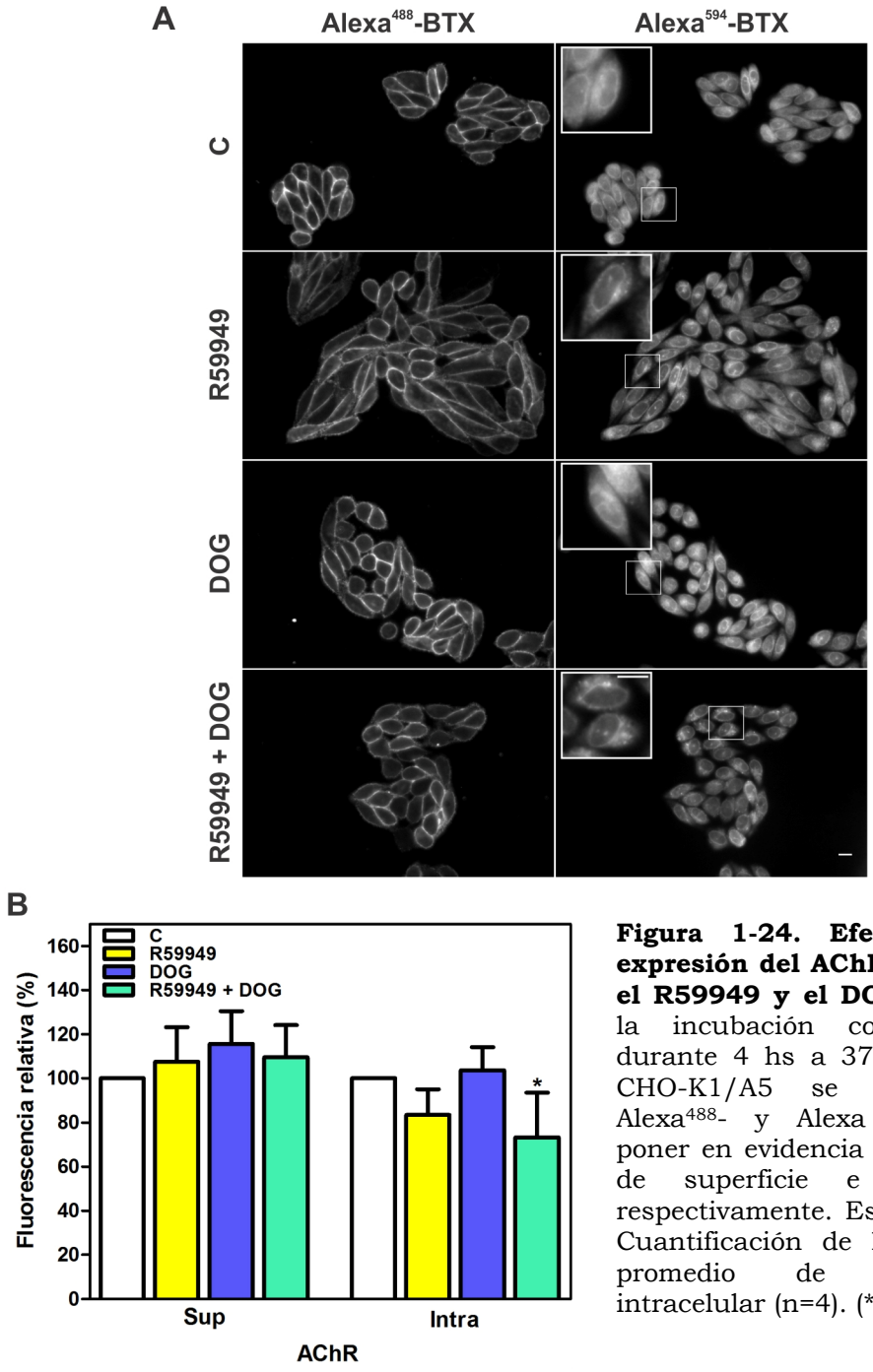


Figura 1-24. Efectos sobre la expresión del AChR mediados por el R59949 y el DOG. A) Luego de la incubación con las drogas durante 4 hs a 37 °C, las células CHO-K1/A5 se marcaron con Alexa^{488}- y Alexa ^{594}-BTX, para poner en evidencia a los receptores de superficie e intracelulares, respectivamente. Escala: 10 µm. **B)** Cuantificación de la fluorescencia promedio de superficie e intracelular (n=4). (*) $p < 0,05$.

Debido a la gran variabilidad presente en la cuantificación de la intensidad de fluorescencia, solamente los cambios en la expresión del AChR intracelular luego de la incubación por 4 hs con R59949 + DOG mostraron valores estadísticamente significativos (Figura 1-24, A y B). Además de la disminución de los niveles intracelulares del receptor, observamos cambios en su distribución, la cual deja de ser difusa (Figura 1-24A, R59949 + DOG: Alexa^{594}-BTX, recuadro magnificado), como en las demás condiciones experimentales (Figura 1-24A, C, R59949 y DOG: Alexa^{594}-BTX, recuadros magnificados).

Para cuantificar el aumento en los niveles de DAG endógenos, utilizamos el sensor fluorescente Daglas Dpm1, proteína quimérica que se localiza en la membrana plasmática (Figura 1-25A). La elección del biosensor se basó en la localización de las isoformas de DGK inhibidas por el R59949. Las DGKα y DGKκ se encuentran principalmente en la membrana celular, siendo la primera una de las proteínas ubicuas en los distintos tipos celulares de esta gran familia de quinasas (Shulga Y. y col., 2011).

Realizamos las incubaciones correspondientes con R59949 y DOG, y calculamos la imagen *R* con las imágenes de fluorescencia obtenidas de los canales CFP e YFP (Figura 1-25A). La cuantificación del *R* promedio evidenció la generación de DAG endógenos, por la inhibición de las enzimas DGK (Figura 1-25B, R59949 y R59949 + DOG). Sin embargo, la incubación con DOG durante 4 hs, no produce un aumento en los DAG de membrana plasmática (Figura 1-25B, DOG).

Considerando que el aumento del AChR en la superficie celular por el DAG podría deberse a un aumento en el tráfico del receptor desde el interior celular, estudiamos si las drogas utilizadas podían afectar también a otras proteínas. Para tal fin, transfectamos a las células CHO-K1/A5 con el plásmido que codifica para la proteína VSVG-GFP (proteína del virus de la estomatitis vesicular, VSVG, unida a la proteína fluorescente verde, GFP). Este constructo es altamente eficiente para el estudio del tráfico de las proteínas integrales de membrana a lo largo de la vía exocítica (Kuhle V. y col., 2006). Un día después de la transfección, realizamos las incubaciones correspondientes a tiempos cortos de exposición (3 o 4 hs, según la droga). Por microscopía de fluorescencia, tomamos imágenes en dos planos para cada célula fotografiada, donde el foco estuviera centrado en la membrana plasmática (Sup) o en el interior celular (Intra) (Figura 1-26A).

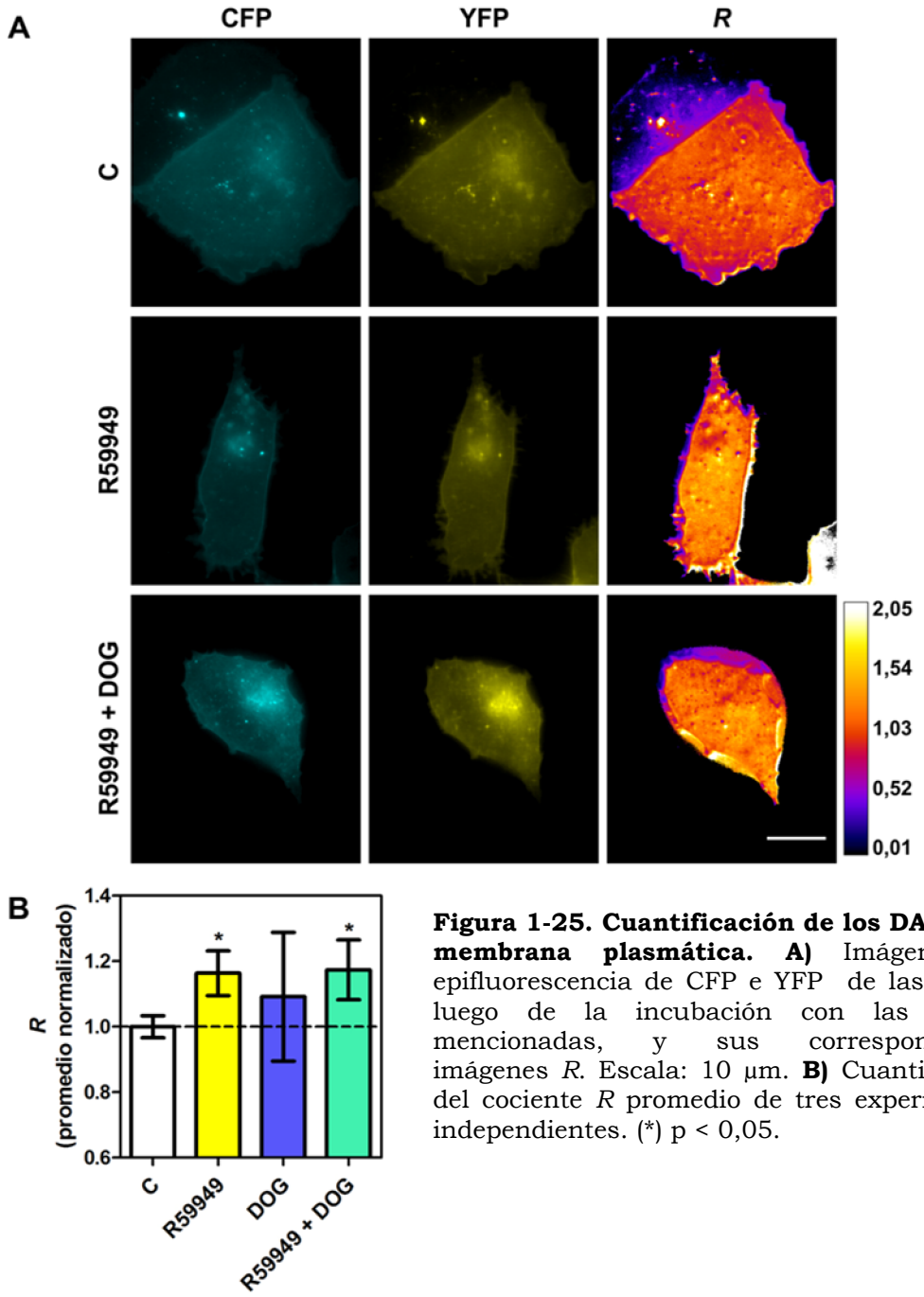


Figura 1-25. Cuantificación de los DAG en la membrana plasmática. A) Imágenes de epifluorescencia de CFP e YFP de las Dpm1, luego de la incubación con las drogas mencionadas, y sus correspondientes imágenes *R*. Escala: 10 µm. **B)** Cuantificación del cociente *R* promedio de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$.

Medimos luego la fluorescencia promedio en cada plano, y obtuvimos el cociente: sup/intra por célula (Figura 1-26B). Cuanto mayor es el cociente, mayor es la llegada de la VSVG-GFP a la superficie celular. Los tratamientos con DOG, R59949 + DOG y EF aumentaron el tráfico de la proteína fluorescente a la membrana plasmática (Figura 1-26B), por lo que podemos inferir que el efecto de estas drogas no solamente afecta el tránsito exocítico del AChR sino que también el de otras proteínas que se dirigen a la superficie celular.

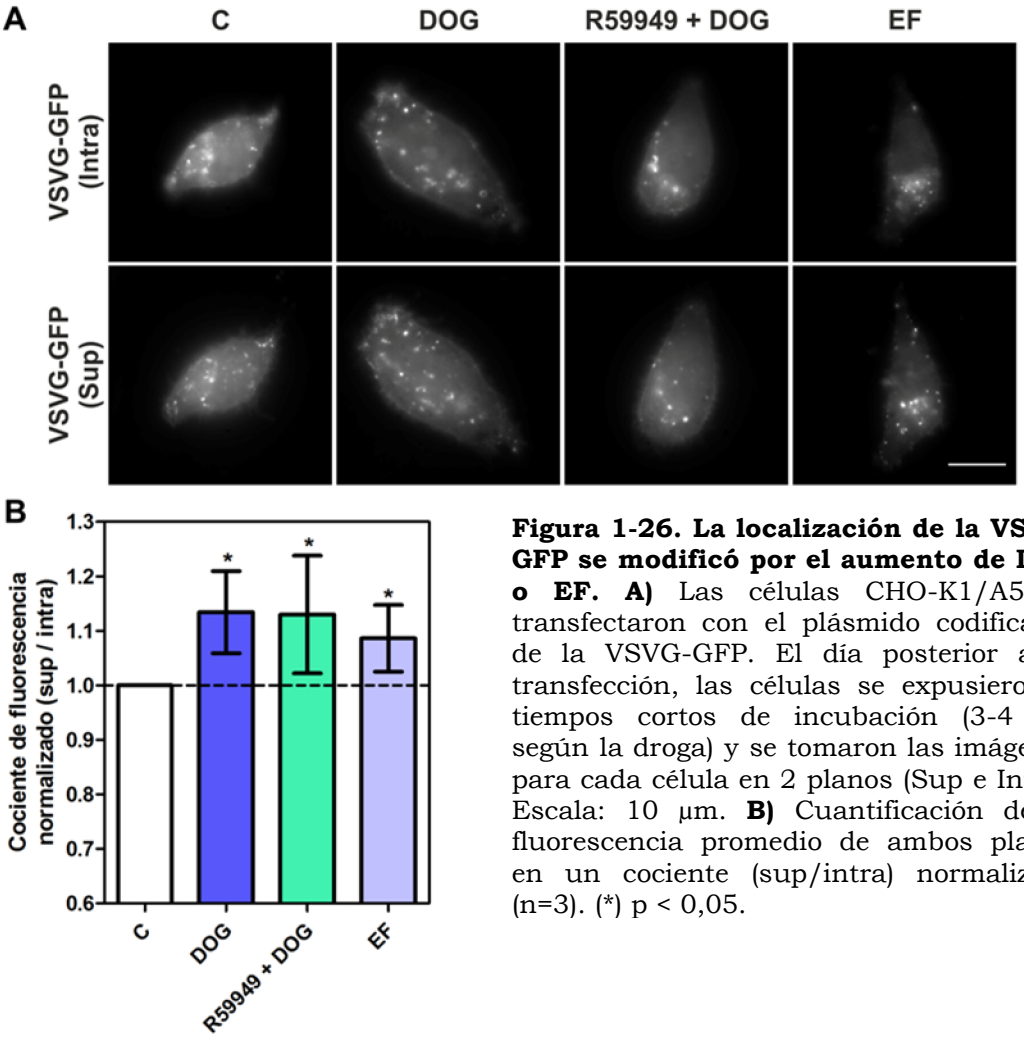


Figura 1-26. La localización de la VSVG-GFP se modificó por el aumento de DAG o EF. A) Las células CHO-K1/A5 se transfectaron con el plásmido codificante de la VSVG-GFP. El día posterior a la transfección, las células se expusieron a tiempos cortos de incubación (3-4 hs, según la droga) y se tomaron las imágenes para cada célula en 2 planos (Sup e Intra). Escala: 10 µm. **B)** Cuantificación de la fluorescencia promedio de ambos planos en un cociente (sup/intra) normalizado (n=3). (*) $p < 0,05$.

Sobre-expresión de la DGKζ

Considerando los resultados obtenidos luego de la inhibición de las DGK con el uso del R59949, nos preguntamos qué sucedería con la expresión del AChR cuando el metabolismo de DAG hacía PA estuviera exacerbado (Figura 1-27), con la consecuente disminución de DAG.

Para ello, sobre-expresamos de forma transiente la DGKζ unida a la proteína GFP en su versión mejorada (DGKζ-EGFP) (Kim K. y col., 2009), en células CHO-K1/A5 (Figura 1-28).

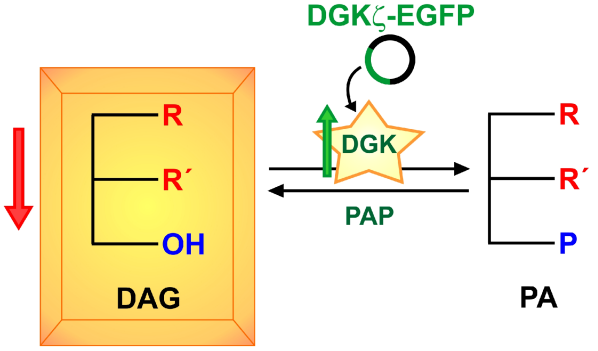


Figura 1-27. Disminución del DAG endógeno por sobre-expresión de la DGKζ-EGFP. Esta enzima, expresada de forma transiente en células CHO-K1/A5, favorece la conversión del DAG en PA

En primer lugar, evaluamos la localización de la proteína fluorescente verde cuando la enzima que metaboliza DAG estaba unida o no lo estaba. Como podemos apreciar en la figura 1-28, la EGFP tiene una localización difusa en las células CHO-K1/A5 transfectadas transientemente, que cambia hacia una ubicación más perinuclear cuando la proteína verde se encuentra unida a la enzima DGKζ. Esta localización es la descripta para la enzima conjugada con el fluoróforo (Gharbi S. y col., 2011).

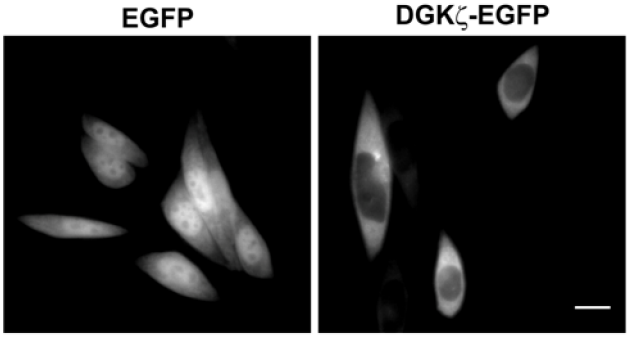


Figura 1-28. Expresión de EGFP y DGKζ-EGFP en células CHO-K1/A5. Por microscopía de epifluorescencia se evaluó la localización de ambas proteínas. Escala: 10 μm.

Seguidamente, determinamos la expresión del AChR en la superficie y en el interior celular por la unión de Alexa^{647}-BTX en células que habían sido transfectadas con el plásmido DGKζ-EGFP 48 hs antes (Figura 1-29). La marcación del AChR en los diferentes compartimentos celulares se realizó en experimentos separados, para evitar solapamientos en los espectros de excitación y/o emisión de los diferentes fluoróforos Alexa con EGFP (Figura 1-29, A y B).

Para evaluar si la expresión del AChR se afectaba al aumentar la expresión de la DGKζ, realizamos la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la sonda Alexa^{647} en células que expresaron niveles bajos (< 500 U.A.), medios (501 U.A.-1000 U.A.) y altos (> 1000 U.A.) de la enzima. Como control se utilizaron las células no transfectadas presentes en la misma placa de cultivo (Figura 1-29C).

No se observan cambios en la cantidad del AChR de superficie debidos al incremento de la DGKζ (Figura 1-29, A y C), pero es de destacar que muchas de las células que expresan esta enzima no tenían marcación alguna de Alexa^{647}-BTX (15 ± 5 %) en su superficie (Figura 1-29A, flecha). Dichas células no fueron tenidas en cuenta para el análisis de la fluorescencia promedio.

Por otra parte, la cuantificación del AChR intracelular (Figura 1-29, B y C) muestra una tendencia al incremento, siendo esta más importante en las

células con mayor sobre-expresión de la enzima (Figura 1-29C, >1000 U.A.). Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

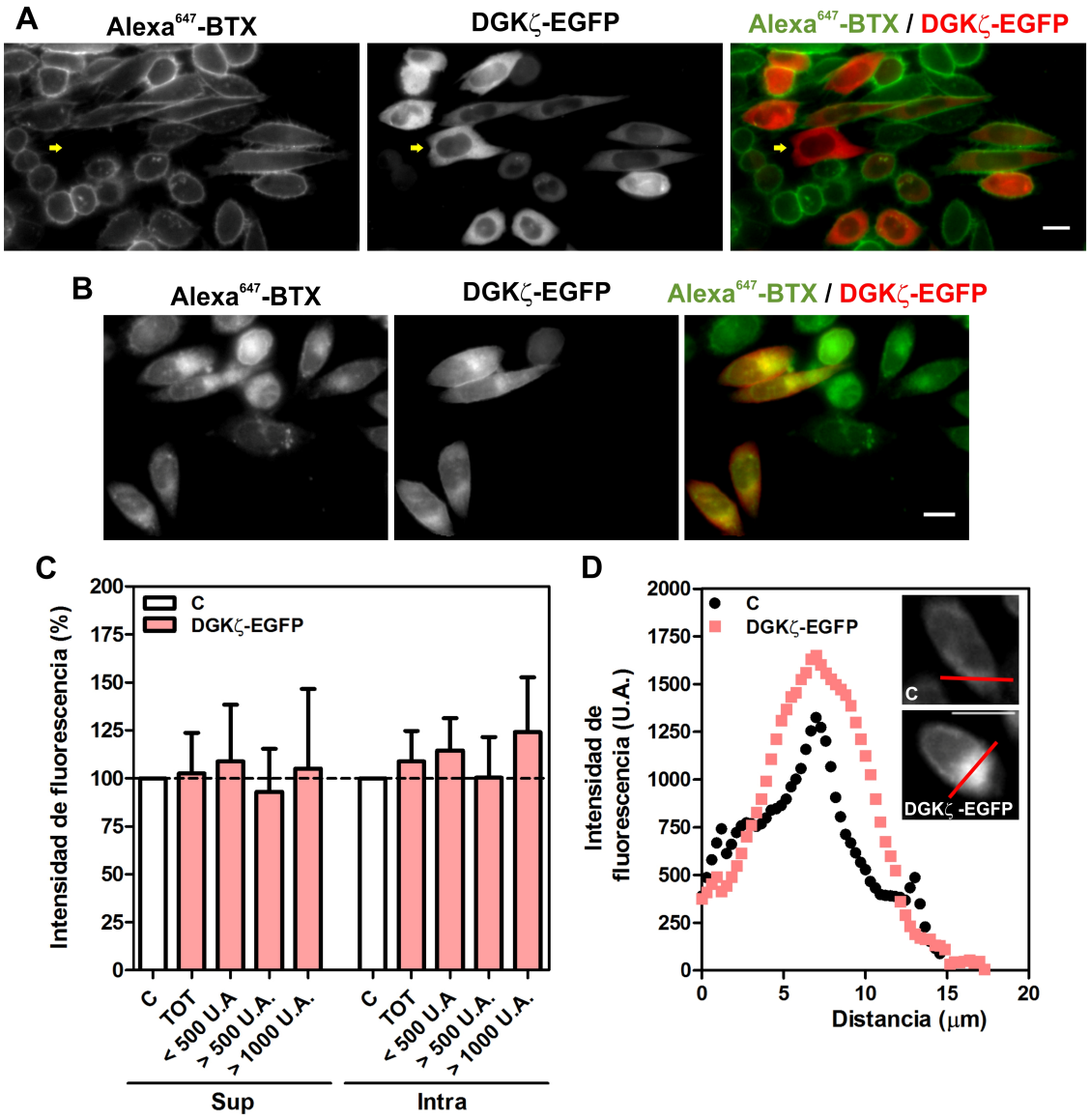


Figura 1-29. Expresión transiente de DGKζ-EGFP en células CHO-K1/A5. Imágenes de fluorescencia de células transfectadas con la enzima y teñidas con Alexa^{647}-BTX para poner de manifiesto al AChR de superficie **(A)** o intracelular **(B)**. La flecha amarilla **(A)** marca una célula que expresa DGKζ-EGFP pero no AChR. **C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio de la BTX de superficie e intracelular en células negativas (C) y positivas (DGKζ-EGFP) a la transfección. De estas últimas, se cuantificó la marcación de la BTX en todas las células transfectadas (TOT) o según la intensidad de fluorescencia de EGFP de la enzima (< 500 U.A., > 500 U.A. y >1000 U.A). **D)** Se realizó la medición de la fluorescencia emitida por Alexa^{647}-BTX en líneas trazadas a lo ancho de las células (línea roja), donde se visualizaba mayor expresión del AChR. El gráfico muestra el promedio de intensidades en función de la distancia, para ambas condiciones experimentales. En todas las imágenes de esta figura, la escala es de 10 μm.

Como muestran las figuras 1-29B y 1-29D, en las células que sobreexpresan la DGKζ, el AChR intracelular aparece más condensado en la zona perinuclear, que en las células que no expresan la enzima. Esto se evidencia trazando un perfil de intensidad de fluorescencia de Alexa^{647} que abarque esta región celular (Figura 1-29D).

La variabilidad en la cuantificación de la fluorescencia no permitió evidenciar cambios estadísticamente significativos. Sin embargo, se observa una tendencia que marcaría que la sobre-expresión de la DGKζ, con la concomitante disminución del nivel de DAG endógeno, podría afectar la llegada del AChR a la superficie celular (15 % de las células no expresan AChR de superficie, Figura 1-29A, flecha), y como consecuencia se acumularía en los compartimentos intracelulares (Figura 1-29D).

Modulación de la síntesis de fosfatidilcolina

Geranilgeraniol: inhibidor de la colina fosfotransferasa

La biosíntesis de PC en las células eucariotas depende de DAG. En la vía de Kennedy, tres son las enzimas involucradas en la síntesis de PC: la colina quinasa (CK), que fosforila la colina para dar fosfocolina; la fosfocolina citidiltransferasa (CCT), la cual produce CDP-colina a partir de fosfocolina y CTP; y colina fosfotransferasa (CPT), que produce PC por unión de CDP-colina y DAG (Figura 1-30) (Kennedy E. y Weiss S., 1956; Lev S., 2006; Gibellini F. y Smith T., 2010). El paso final de esta síntesis también puede ser realizado por la enzima colina/etanolamina fosfotransferasa (CEPT) (Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010; Lagace T. y Ridgway N., 2013). En cuanto a su localización subcelular, la CPT se encuentra en el complejo de Golgi, la CEPT en el RE, mientras que las enzimas restantes son citosólicas (Lagace T. y Ridgway N., 2013).

El objetivo que nos planteamos fue el de incrementar los niveles de DAG intracelular por inhibición de las enzimas que sintetizan PC mediante el empleo de isoprenoides. Estos compuestos son esenciales para la proliferación y diferenciación celular. Derivan del mevalonato, precursor común para la síntesis de isoprenoides esteroidales y no esteroidales. Un ejemplo de estos últimos es el geranilgeraniol (GGOH). El GGOH inhibe la CPT, último paso en la biosíntesis de PC, por competencia con el DAG por su sitio de unión a la enzima (Miquel K. y col., 1998) (Figura 1-30).

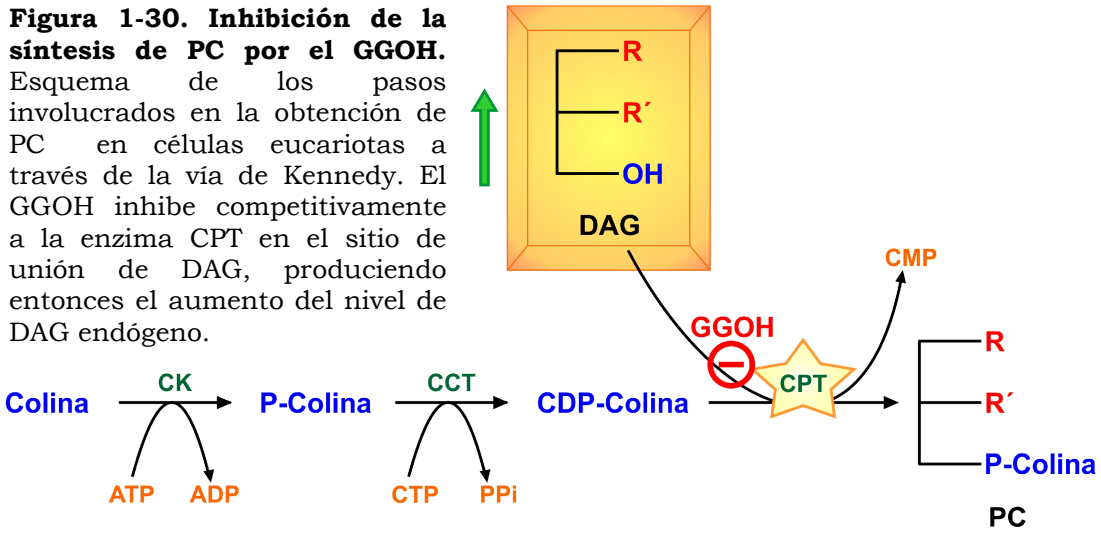


Figura 1-30. Inhibición de la síntesis de PC por el GGOH. Esquema de los pasos involucrados en la obtención de PC en células eucariotas a través de la vía de Kennedy. El GGOH inhibe competitivamente a la enzima CPT en el sitio de unión de DAG, produciendo entonces el aumento del nivel de DAG endógeno.

En primer lugar, incubamos a las células CHO-K1/A5 con GGOH 80 µM durante 3 hs y cuantificamos al AChR mediante un ensayo de unión de radioligando. Trabajos previos indican que con estas condiciones de incubación (concentración de droga y tiempo) se obtiene la máxima inhibición de la CPT (Miquel K. y col., 1998). Como muestra la figura 1-31A, el tratamiento con GGOH produce un incremento en el AChR de superficie (21 ± 4 %), sin cambiar los niveles de receptor total ni intracelular.

Una exposición al isoprenoide más prolongada (6 hs) genera un mayor efecto sobre el AChR de superficie (32 ± 3 %), sin evidenciarse cambios en el AChR presente en los demás compartimentos celulares (Figura 1-31B).

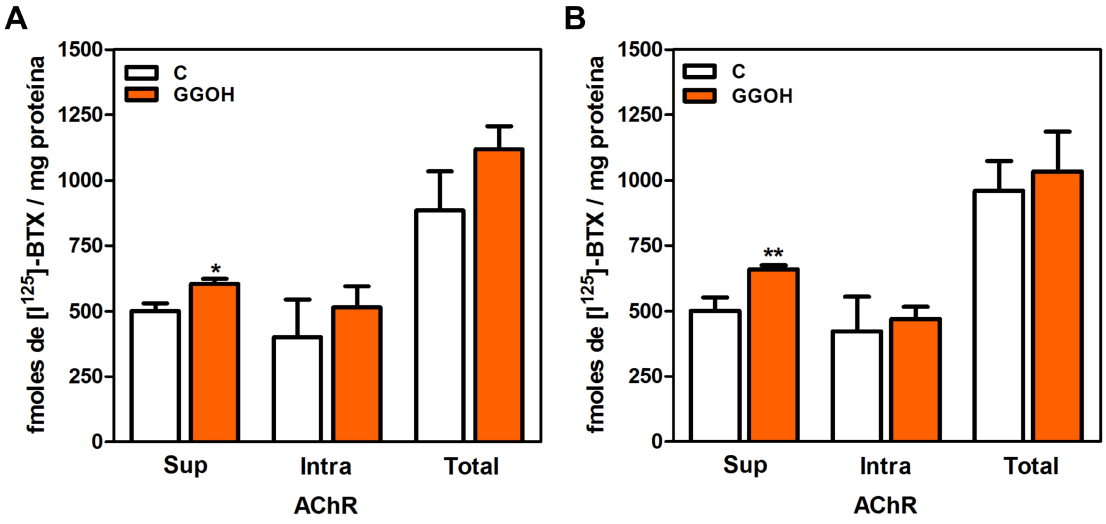


Figura 1-31. Ensayos de unión de [I^{125}]-BTX luego de la exposición a GGOH. Las células CHO-K1/A5 se incubaron con este isoprenoide durante 3 **(A)** y 6 hs **(B)** y se cuantificó el AChR en función de la unión específica de la toxina radiactiva. (A: n=4; B: n=3). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Sin embargo, luego de 18 hs de tratamiento con GGOH, no se registran cambios en la expresión del receptor (Figura 1-32).

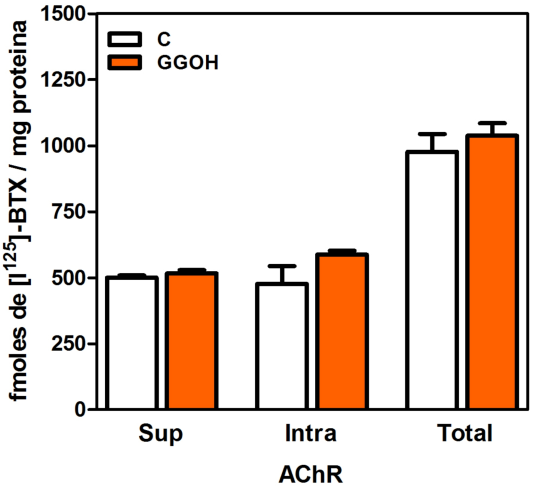


Figura 1-32. La exposición prolongada a GGOH no altera los niveles de AChR. Ensayo de unión de radioligando de células CHO-K1/A5 tratadas con el isoprenoide por 18 hs a 37 °C. (n=4).

Considerando que la exposición durante 18 hs con GGOH 80 µM no altera la distribución del AChR, realizamos la incubación con GGOH 120 µM. Con esta concentración de isoprenoide tampoco se encontraron cambios sobre el receptor (datos no mostrados). Sin embargo, al visualizar las células mediante microscopía, se observaron alteraciones en su morfología y en el grado de mitosis (datos no mostrados). La disminución de la cantidad de células se reflejó también en la disminución de la cantidad de proteínas por placa (50 ± 21,1 %), situación que no se observara al utilizar GGOH 80 µM a los distintos períodos de incubación.

En síntesis, el aumento de los niveles de DAG endógenos, por inhibición de la CPT, afecta a los AChR de superficie de igual forma que la incubación a 37 °C durante tiempos cortos con DOG, EF o la inhibición de la DGK con R59949.

Bloqueo de la expresión de la proteína Nir2

Como ya mencionamos, la CPT se encuentra en el complejo de Golgi, donde su función es regulada por los niveles de sustrato y por la actividad de la proteína Nir2. Esta proteína periférica al aparato de Golgi, con un dominio de transferencia de fosfatidilinositol (Figura 1-33, Nir2, círculo verde), es crucial para mantener la integridad estructural y funcional de la organela. A través de este dominio, la proteína Nir2 sensa los niveles de PC en la célula, y regula negativamente la producción de este fosfolípido mediada por CDP-colina, afectando por lo tanto los niveles de DAG (Figura 1-33). En síntesis, la

Nir2 no afecta a la producción de DAG a partir de ceramida o PC, pero sí a la utilización del DAG como sustrato de la síntesis de PC por la vía de Kennedy (Figura 1-33) (Litvak V. y col., 2005; Lev S., 2006).

Por otro lado, se comprobó que la disminución de la expresión de Nir2 en el compartimento intracelular inhibe el tráfico de proteínas desde la TGN hacia la membrana plasmática, además de disminuir los niveles de DAG presentes en el complejo de Golgi (Litvak V. y col., 2005).

Por tal motivo, transfectamos a las células CHO-K1/A5 de forma transitoria con el ARNi de la proteína Nir2 (Figura 1-33, ARNi Nir2). El objetivo fue el de impedir la traducción de esta proteína y evaluar entonces si las modificaciones de los niveles de DAG regulados por Nir2 afectaban a la distribución del AChR.

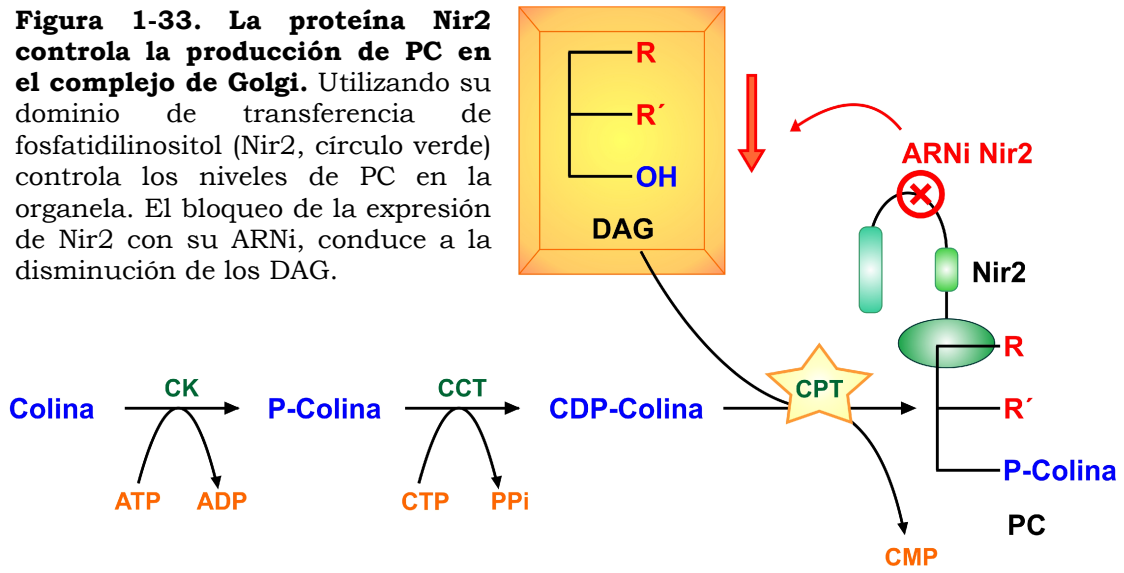


Figura 1-33. La proteína Nir2 controla la producción de PC en el complejo de Golgi. Utilizando su dominio de transferencia de fosfatidilinositol (Nir2, círculo verde) controla los niveles de PC en la organela. El bloqueo de la expresión de Nir2 con su ARNi, conduce a la disminución de los DAG.

Basándonos en el trabajo publicado por Litvak V. y col. (2005), realizamos los experimentos 72 hs post-transfección con el ARNi de Nir2, ya que a ese tiempo los autores encontraron nula expresión de la proteína.

En primer lugar, quisimos evaluar por microscopía de fluorescencia que sucedía con la expresión del AChR luego del bloqueo de la síntesis de Nir2. Pasadas las 72 hs del tratamiento, cuantificamos los receptores de superficie e intracelulares mediante su unión a Alexa^{647}- y Alexa^{594}-BTX, respectivamente (Figura 1-34). Se realizó la transfección con el ARNi de Nir2 a dos concentraciones, 5 nM (Figura 1-34, A, B y C) y 25 nM (Figura 1-34B), considerando la concentración mínima y máxima de ARNi recomendada por

los protocolos de transfección del reactivo empleado para tal fin (Lipofectamina 2000).

De la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos Alexa, observamos que al no expresarse Nir2 en las células CHO-K1/A5, aumentan los niveles de AChR en el interior celular, sin producirse cambios estadísticamente significativos sobre estos mismos receptores presentes en la membrana plasmática (Figura 1-34, A y B, ARNi Nir2 5 nM).

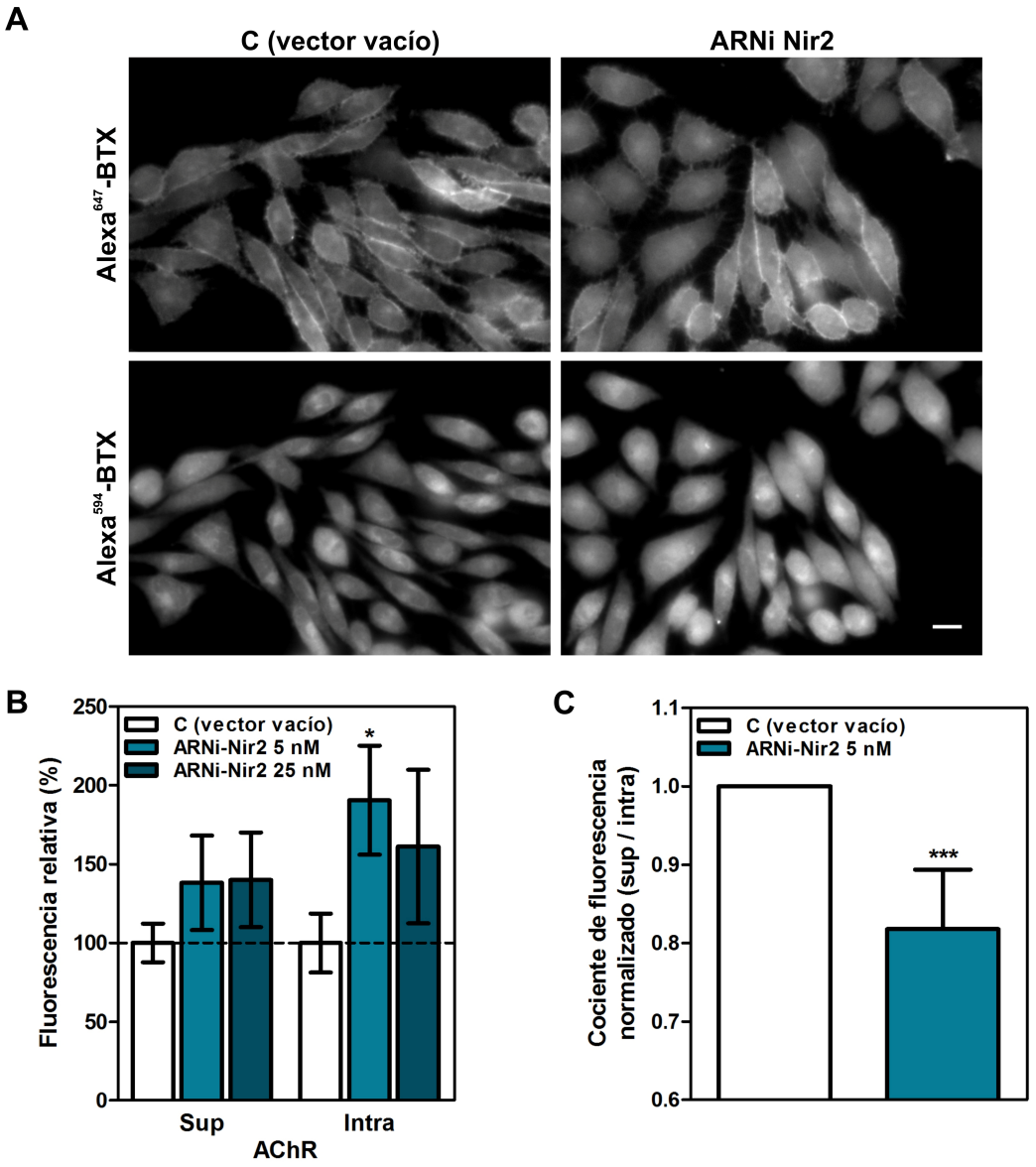


Figura 1-34. La depleción de Nir2 afecta al AChR. A) Microscopía de epifluorescencia de células CHO-K1/A5 transfectadas con el ARNi de Nir2 (5 nM). 72 hs post-transfección, las células se tiñeron con Alexa^{647}- y Alexa^{594}-BTX para evidenciar al AChR de membrana plasmática e intracelular, respectivamente. Escala: 10 µm. **B)** Cuantificación de la fluorescencia emitida en la condición C y ARNi-Nir2, 5 y 25 nM (n=4). **C)** Cociente de fluorescencia normalizado, entre el AChR de superficie (sup) y el AChR intracelular (intra), de los cuatro experimentos realizados en (B). (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$.

El aumento de los AChR en el interior celular también se ve reflejado en el menor cociente de fluorescencia, entre el AChR de superficie e intracelular, como consecuencia de la disminución de los niveles de DAG en el complejo de Golgi, al bloquearse la expresión de Nir2 (Figura 1-34C).

Para determinar la cantidad total de AChR, se estudiaron las células transfectadas mediante WB, siguiendo el mismo protocolo aplicado anteriormente. Utilizamos el anticuerpo mAb 35, que reconoce la subunidad α1 de los AChR (Figura 1-35). Como se puede observar en las figuras 1-35A y 1-35B, la cantidad total de AChR detectado por este anticuerpo, no se encuentra modificada por el bloqueo de la síntesis de Nir2.

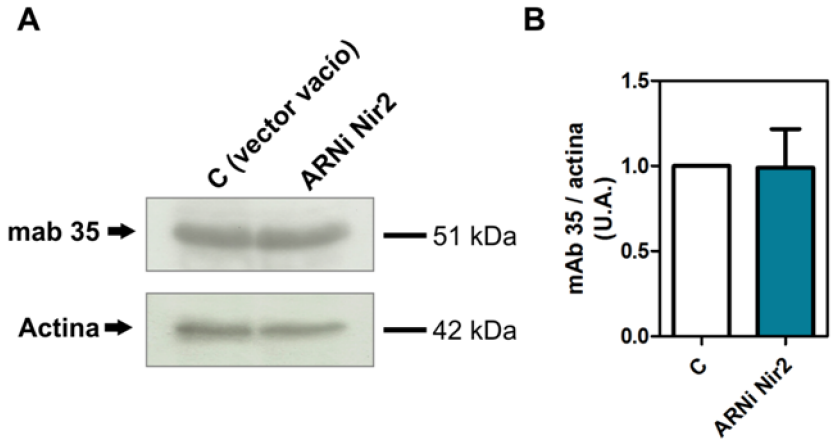


Figura 1-35. Determinación del AChR total por WB. A) La cantidad total de AChR presente en las células CHO-K1/A5 se puso en evidencia luego de un ensayo de WB, mediante el anticuerpo mAb 35. Los niveles de actina, se utilizaron como control de carga. **B)** Cuantificación del AChR total (n=3).

Los resultados obtenidos en las figuras 1-34 y 1-35 demuestran que el bloqueo de la expresión de Nir2, y en consecuencia, la disminución de la cantidad de DAG presente en el complejo de Golgi, llevaron a la acumulación del AChR en el compartimento intracelular, en las células CHO-K1/A5, sin verse afectados los niveles de AChR total.

Dado que no pudimos determinar directamente el porcentaje de células transfectadas con el ARNi, la cuantificación del AChR mostrada en las figuras 1-34 y 1-35 se realizó en la totalidad de las células, sin discriminar entre las positivas o negativas al bloqueo de expresión de Nir2. Con el fin de evaluar la transfección del ARNi-Nir2, se midió el grado de activación de la enzima PKD.

La PKD es reclutada a la TGN por unión directa con los DAG (Baron C. y Malhotra V., 2002) y allí es requerida para la regulación del brote de

vesículas secretorias desde este compartimento (Yeaman C. y col., 2004; Liljedahl M. y col., 2001; Jamora C., 1999). Por lo tanto, el bloqueo de la síntesis de Nir2, y la consecuente disminución de los DAG en el complejo de Golgi, impide la translocación de la PKD desde el citosol a dicho complejo y su posterior activación (Litvak V. y col., 2005). La activación de esta proteína es mediada por la fosforilación de las PKCn, en las Ser^{744} y Ser^{748}, en el sitio de activación de PKD, gatillando así su rápida auto-fosforilación en Ser^{916}, en el caso de la PKD1 (Figura 1-4) (Sinnett-Smith J. y col., 2009; Sinnett-Smith J. y col., 2011; Matthews S. y col., 1999). Es decir que la activación de PKD puede evidenciarse cuantificando la auto-fosforilación de PKD en Ser^{916} (pPKD) (Young S. y col., 2012). Por lo tanto, transfectamos las células con el ARNi Nir2, y luego de 72 hs, evaluamos la presencia de la PKD, total y fosforilada, mediante WB.

Tras la depleción de Nir2, las células CHO-K1/A5 presentan una disminución en los niveles totales de PKD (Figura 1-36, A y B). Esta enzima ya tiene una actividad basal muy baja en la condición control, y se hace nula en el caso de las células transfectadas con el ARNi de Nir2 (Figura 1-36, A y C). Es de destacar entonces, que la disminución de DAG debida al bloqueo de la expresión de la proteína Nir2 en las células CHO-K1/A5 no solamente afecta a la activación de la PKD, sino que también a los niveles totales de esta proteína.

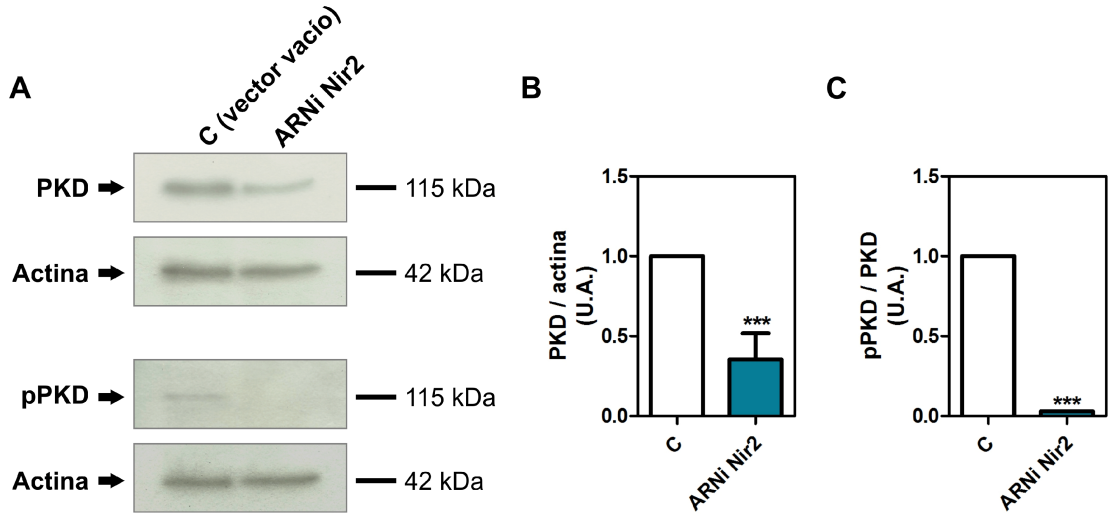


Figura 1-36. Determinación de la PKD por WB en células transfectadas con ARNi-Nir2. A) Imágenes de la detección de la expresión de PKD total (PKD) y fosforilada (pPKD) por anticuerpos específicos, siendo la actina la referencia del control de carga. Cuantificación de PKD en función de actina **(B)** y pPKD en relación a la PKD **(C)** para las condiciones C (transfectadas con el vector vacío) y ARNi de Nir2 (n=3). (***) $p < 0,001$.

Kim S. y col. (2013) demostraron que la Nir2 modula mecanismos de señalización específicos, cascada abajo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Dicho receptor regula uno de los mecanismos de señalización más importantes relacionados al crecimiento, supervivencia, proliferación y diferenciación en las células de mamíferos (Oda K. y col., 2005). Determinamos entonces la cantidad de proteínas totales y el número de células en las placas transfectadas con el ARNi de Nir2 en comparación con las transfectadas con el vector vacío. La transfección con el ARNi de Nir2 produce una disminución del 30 % en la cantidad de proteínas y de células en relación al control (Figura 1-37), lo que indicaría una detención del crecimiento de las células.

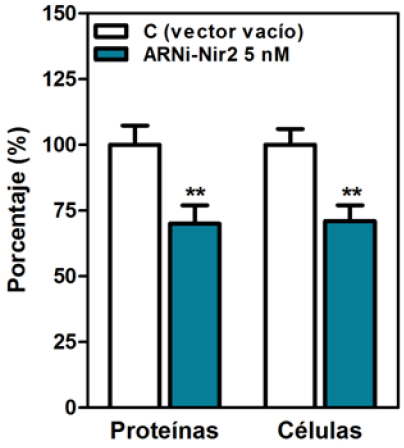


Figura 1-37. Determinación de la cantidad de proteínas y células luego de la transfección con el ARNi-Nir2. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry en placas empleadas para WB (n=3), mientras que las células se contaron en las imágenes de contraste de fase de los experimentos de microscopía (n=4). (**) $p < 0,01$.

Los resultados mostrados en las figuras 1-36 y 1-37 demuestran que la transfección de células CHO-K1/A5 con el ARNi de Nir2 luego de 72 hs, efectivamente bloquea la síntesis de la Nir2.

Para determinar de forma directa la disminución en los niveles de DAG en el aparato de Golgi como consecuencia del bloqueo de la expresión de Nir2, transfectamos a las células con el ARNi y luego de 48 hs las transfectamos con el plásmido que codifica para las Dem1. Pasadas las 24 hs de la última transfección, las células fueron examinadas mediante microscopía para la cuantificación del coeficiente *R*. Dado que era importante determinar las variaciones de los DAG en el complejo de Golgi, lugar de acción de la Nir2, decidimos calcular el coeficiente *R* en toda la célula y en la zona perinuclear, delimitada por la acumulación de las proteínas quiméricas Dem1 (Figura 1-38A, ROI: rojo para C, blanco para ARNi Nir2).

El cociente *R* perinuclear obtenido fue expresado en forma relativa al *R* de la célula entera: Diferencia de *R (%)* = *R* célula (%) – *R* perinuclear (%) (Figura 1-38B, Eje X). Se cuantificó para cada condición cuántas células presentaban dichos valores y se graficaron, como se muestra en la figura 1-38B.

Se puede apreciar entonces que las células que presentan disminuida la síntesis de Nir2, presentan una mayor diferencia de *R* como consecuencia de la disminución de los DAG en el complejo de Golgi, en comparación a las células de la condición control (Figura 1-38).

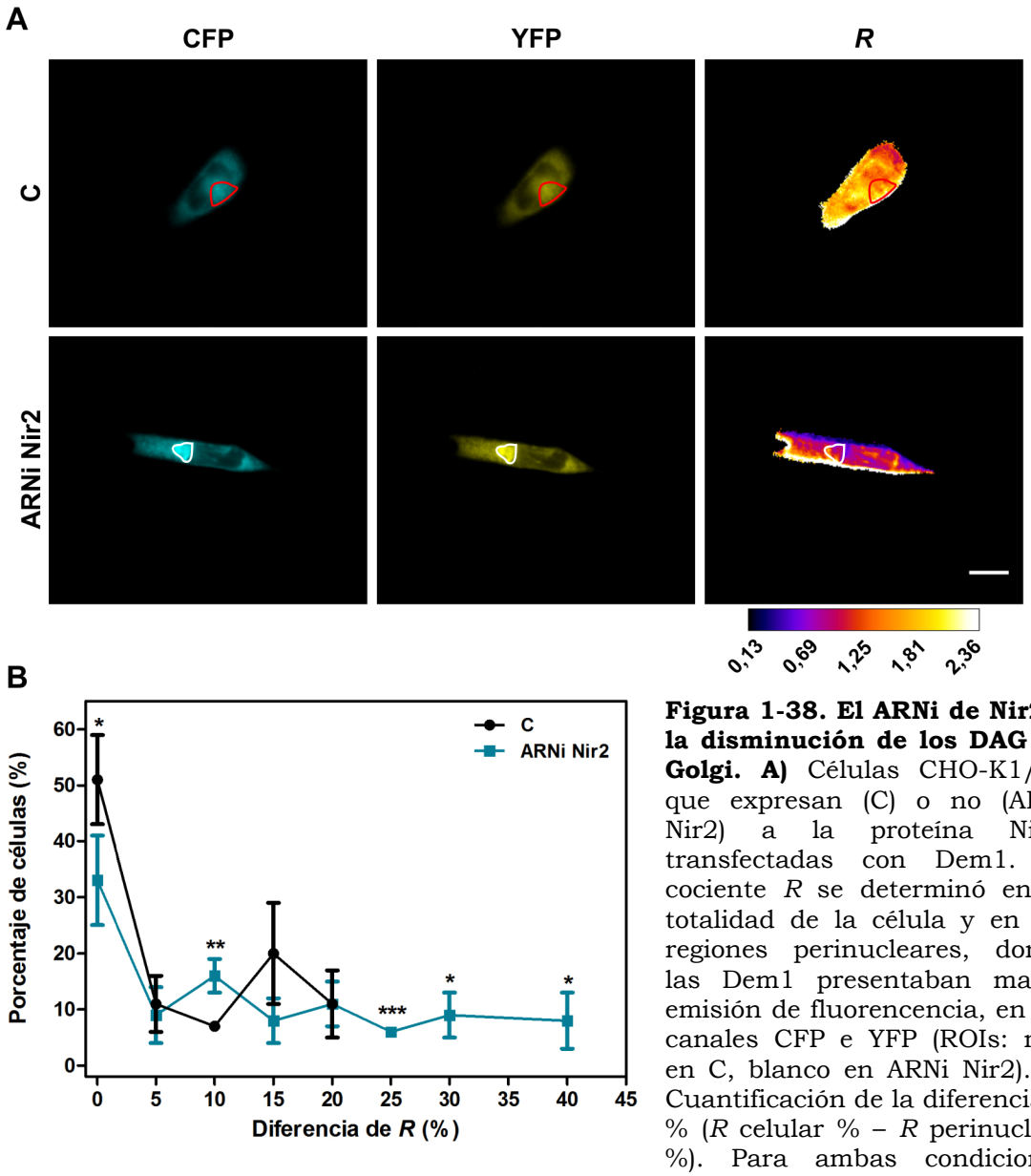


Figura 1-38. El ARNi de Nir2 y la disminución de los DAG en Golgi. A) Células CHO-K1/A5 que expresan (C) o no (ARNi Nir2) a la proteína Nir2, transfectadas con Dem1. El cociente *R* se determinó en la totalidad de la célula y en las regiones perinucleares, donde las Dem1 presentaban mayor emisión de fluorencencia, en los canales CFP e YFP (ROIs: rojo en C, blanco en ARNi Nir2). **B)** Cuantificación de la diferencia *R* % (*R* celular % – *R* perinuclear %). Para ambas condiciones experimentales se evaluó que porcentaje de las células respondían a cada diferencia. (n=3)

LOS DAG Y LOS AChR: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INVOLUCRADOS

De los experimentos hasta aquí descriptos, podemos observar que los DAG, ya sean exógenos o modificados en su expresión por diferentes mecanismos, afectan la distribución celular del AChR en las células CHO-K1/A5 en forma diferencial dependiendo del tiempo de exposición.

Nos propusimos entonces evaluar los posibles mecanismos de transducción de señales a través de los cuales estarían actuando los DAG para ejercer su efecto final sobre el AChR. Nos centramos en las PKC y las PKD, ya que muchos de los efectos celulares ejercidos por los DAG involucran la activación de estas enzimas (Antal C. y Newton A., 2013; Wu-Zhang A. y Newton A., 2013; Lipp P. y Reither G., 2011; Newton A., 2009; Gallegos L. y Newton A., 2008; Rozengurt E., 2010; Young S. y col., 2012).

Las PKC clásicas y los DAG

Incremento del calcio intracelular

Considerando que para su activación, las PKC clásicas (PKCc) requieren de la unión de Ca^{2+}, PS y DAG (Figura 1-3), la serie inicial de experimentos se dirigió a evaluar si los efectos mediados por el aumento de los DAG estaban relacionados al incremento de Ca^{2+}, y en consecuencia, a la activación de las PKCc. Para ello, incubamos las células CHO-K1/A5 con A23187 y con Thapsigargina.

Tratamiento con un ionóforo de Ca^{2+}: A23187

El ionóforo A23187, también llamado calcimicina, es un antibiótico aislado de cultivos de *Streptomyces chartreuses*. Es un poliéter hidrofóbico que tiene la habilidad de unirse selectivamente al ion Ca^{2+}, permitiéndole el ingreso al interior celular a través de las membranas lipídicas, y aumentando de esta manera la permeabilidad celular a dicho ion (Verma A. y col., 2011; Zmijewski M. y col., 1983; Chaney M. y col., 1974; Reed P. y Lardy H., 1972). El mecanismo por el cual el ionóforo ejerce su función está descripto gráficamente en la figura 1-39.

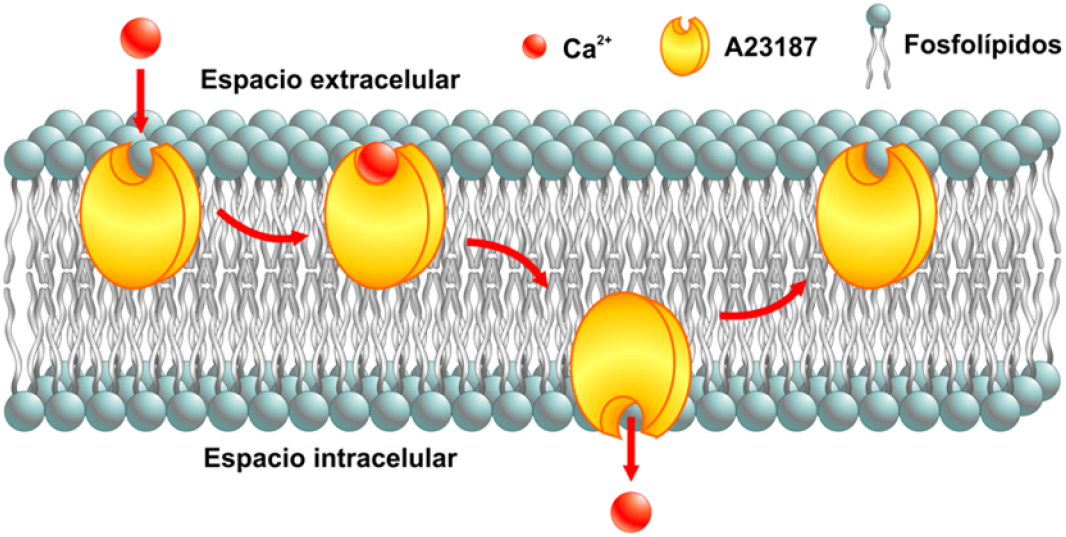


Figura 1-39. El A23187: un ionóforo de Ca^{2+}. Esquema del mecanismo a través del cual el A23187 permite incrementar la permeabilidad de las células al ion Ca^{2+}, favoreciendo su ingreso desde el espacio extracelular.

Considerando los tiempos de exposición previamente utilizados en las células CHO-K1/A5, quisimos determinar si el ionóforo afectaba al AChR cuando las células se incubaban durante tiempos cortos (3 hs) y largos (18 hs).

- **A23187, 3 hs de incubación:**

Comenzamos con la cuantificación a través de ensayos de saturación con BTX radiactiva para determinar al AChR de superficie, luego de la exposición de las células al ionóforo (Figura 1-40A). Luego de 3 hs de incubación con A23187 10 µM, la unión máxima de la toxina por el AChR disminuye, pero no cambia la afinidad del receptor por la BTX (K_D control: 11,34 ± 1, 18 nM; K_D A23187: 12,06 ± 1,25 nM).

Al evaluar la distribución del AChR en los diferentes compartimentos celulares, observamos nuevamente una disminución (13 ± 1 %) estadísticamente significativa en los AChR de superficie, mientras que los AChR intracelulares y totales no se ven afectados (Figura 1-40B). La incubación con A23187 10 µM disminuye un 12 ± 3 % la cantidad de proteínas totales (Figura 1-40C).

Luego, repetimos el protocolo de incubación del A23187 en células CHO-K1/A5, pero esta vez, cuantificamos a los AChR por la unión de las BTX fluorescentes. Como podemos observar en la figura 1-41, el tratamiento con el ionóforo provoca la disminución de los AChR de superficie (30 ± 7 %) (Figura 1-41, A, $Alexa^{488}$-BTX, y B), e intracelular (34 ± 8 %) (Figura 1-41, A, $Alexa^{647}$-

BTX; y B), tendencia que ya veíamos en los experimentos de radiactividad (Figura 1-40B, Intra).

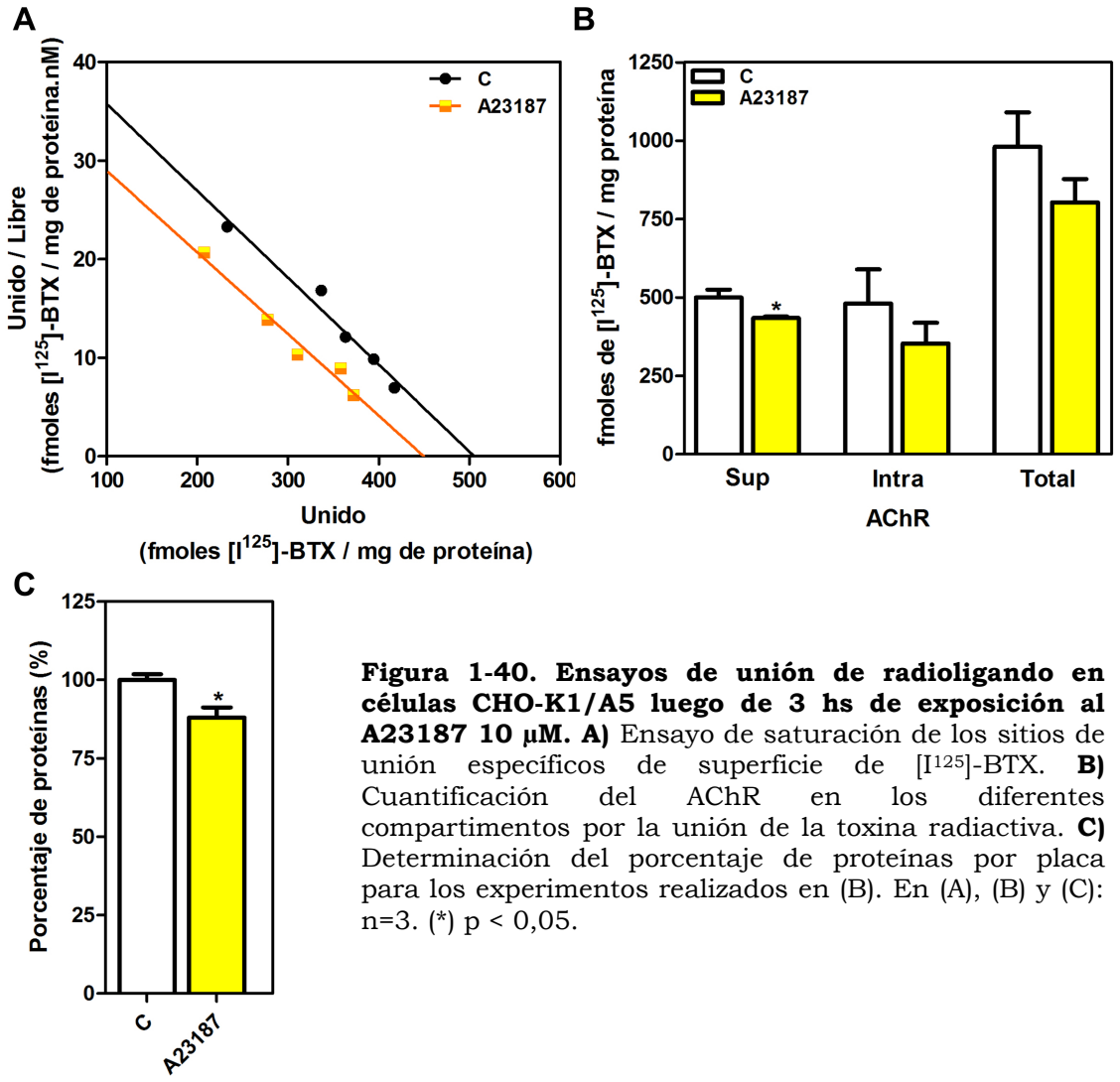


Figura 1-40. Ensayos de unión de radioligando en células CHO-K1/A5 luego de 3 hs de exposición al A23187 10 µM. A) Ensayo de saturación de los sitios de unión específicos de superficie de [I^{125}]-BTX. **B)** Cuantificación del AChR en los diferentes compartimentos por la unión de la toxina radiactiva. **C)** Determinación del porcentaje de proteínas por placa para los experimentos realizados en (B). En (A), (B) y (C): n=3. (*) $p < 0,05$.

Si bien la incubación con A23187 produce una pequeña disminución en la cantidad de proteínas totales (Figura 1-40C), la morfología de las células CHO-K1/A5 no sufrió alteraciones, tal como se muestra en la imagen de contraste de fase (Figura 1-41A).

En síntesis, de los experimentos de radiactividad y microscopía, podemos concluir que el aumento del Ca^{2+} intracelular debido al tratamiento con A23187 durante tiempos cortos, afecta al AChR pero de manera diferente a lo ocurrido luego del incremento de los DAG (Figura 1-12).

Por tal motivo evaluamos si el co-agregado de A23187 con DOG a cortos tiempos, reproducía los resultados previamente descriptos para esta última droga. Los experimentos de unión de [I^{125}]-BTX demostraron que la co-

administración del ionóforo con DOG durante 3 hs produce una sumatoria de los efectos individuales de cada droga sobre la distribución del AChR (Figura 1-42). Esto sugiere que el mecanismo por el cual actúan los DAG a tiempos cortos, no estaría relacionado al utilizado por el A23187.

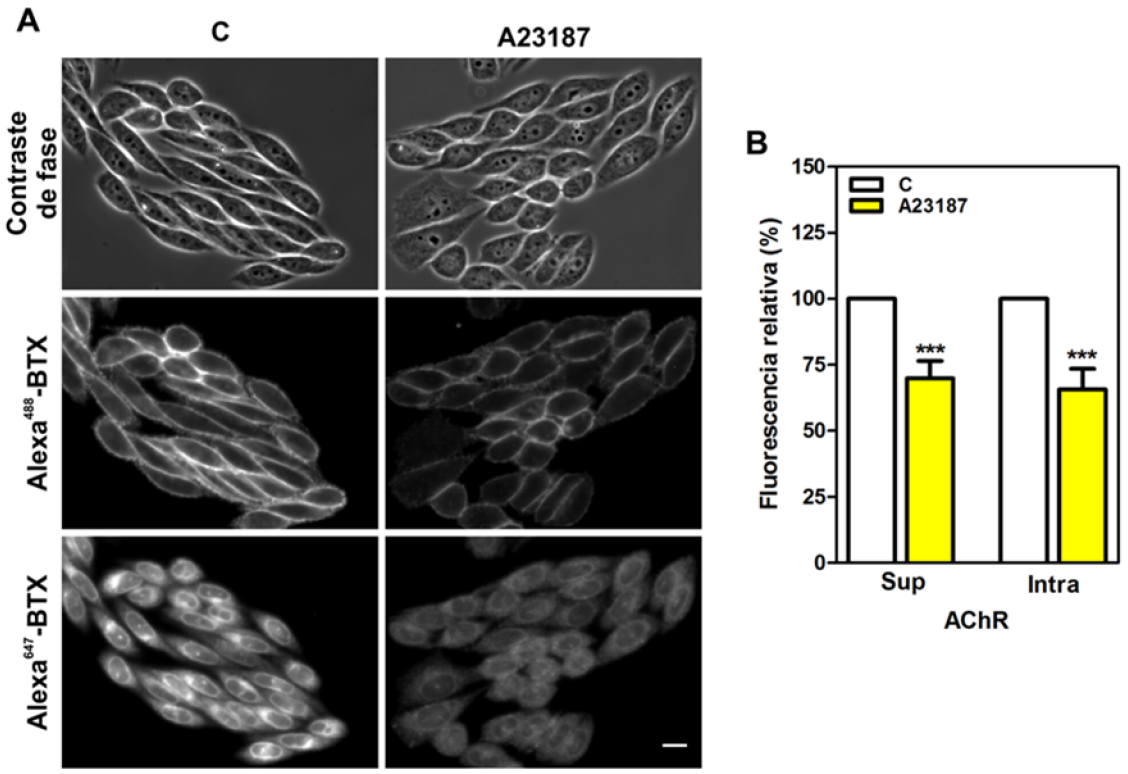


Figura 1-41. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1/A5 tras la incubación con A23187 10 µM durante 3 hs. A) Imágenes representativas de contraste de fase y epifluorescencia luego del tratamiento indicado. Los AChR de superficie e intracelulares se pusieron en evidencia mediante la tinción con Alexa^{488}- y Alexa^{647}-BTX, respectivamente. Escala: 10 µm. **B)** Cuantificación de la fluorescencia de las BTX (n=4). (***) $p < 0,001$.

- **A23187, 18 hs de incubación:**

A continuación, realizamos experimentos con el A23187 a tiempos largos de incubación (18 hs). Comenzamos determinando la distribución y expresión del AChR mediante ensayos de unión de la toxina radiactiva (Figura 1-43A). A diferencia de lo observado a tiempos cortos, la exposición prolongada con el ionóforo disminuye la cantidad de AChR total (29 ± 7 %) e intracelular (42 ± 14 %). La misma tendencia existe con los receptores presentes en la superficie celular (Figura 1-43A).

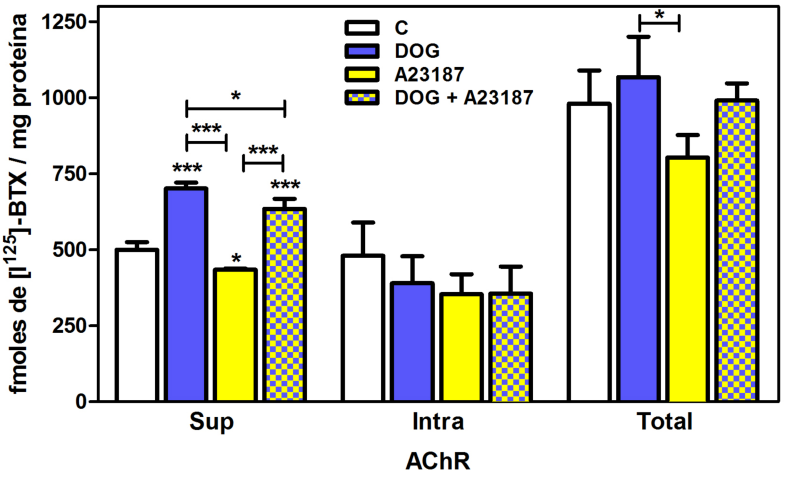


Figura 1-42. Ensayos de unión de radioligando a tiempos cortos luego de la co-incubación con A23187 y DOG. A) Comparación de la unión de BTX radiactiva en células CHO-K1/A5 en presencia de DOG, A23187 o DOG + A23187. Las barras de DOG y A23187 corresponden a las figuras 1-12B y 1-40B, respectivamente (n=4). (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$.

Asimismo, la incubación prolongada con A23187 reduce (41 ± 10 %) la cantidad de proteínas por placa y el número de células (63 ± 10 %) respecto a la condición control (Figura 1-43B). Esto podría indicar que el tratamiento prolongado con el ionóforo retarda o detiene el crecimiento celular.

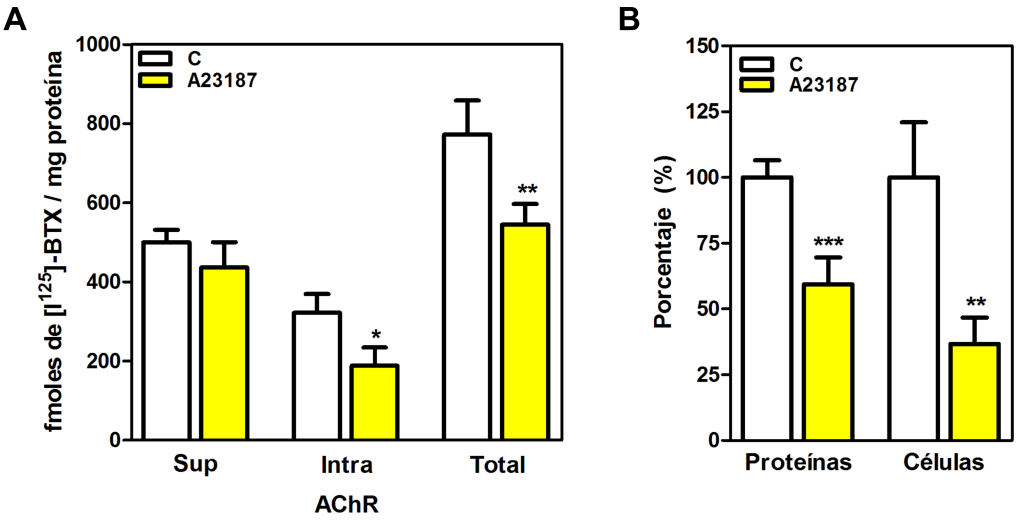


Figura 1-43. Incubación con A23187 10 µM durante 18 hs. A) Experimento de unión de toxina radiactiva luego de la incubación con el ionóforo (n=4). **B)** Cuantificación del porcentaje de proteínas (de los experimentos de (A)) y células (en cámara de Neubauer) luego del tratamiento con A23187, relativo al control (Células: n=3). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Al igual que en los ensayos con toxina radiactiva, por microscopía de fluorescencia se observa la disminución de los AChR presentes en el interior celular (50 ± 22 %) (Figura 1-44, A y B). Además la tendencia a la disminución

de los AChR presentes en la membrana plasmática (Figura 1-43A), es estadísticamente significativa por esta última técnica (48 ± 4 %) (Figura 1-44, A y B).

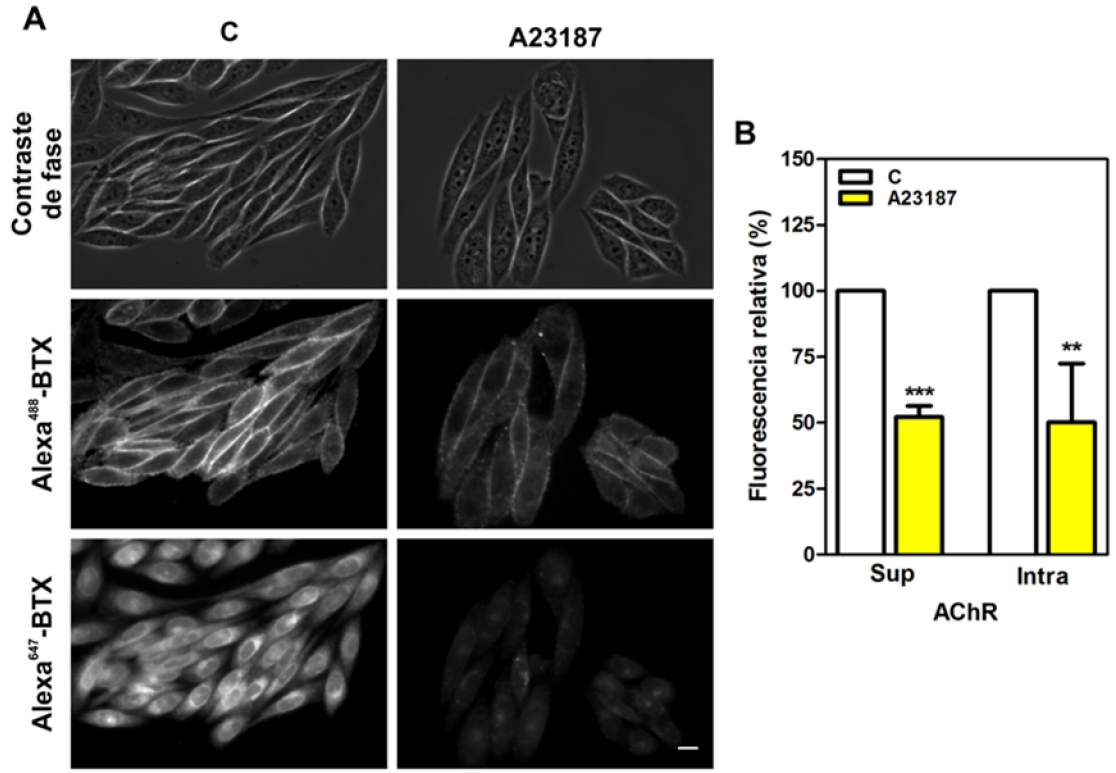


Figura 1-44. Células CHO-K1/A5 teñidas con BTX fluorescentes luego del tratamiento prolongado con A23187 10 µM. A) Imágenes de contraste de fase y fluorescencia para las condiciones C y A23187. Los AChR de superficie e intracelulares se pusieron evidencia mediante la marcación con Alexa^{488}- y Alexa^{647}-BTX, respectivamente. Escala: 10 µm. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa de los experimentos realizados en (A) (n=4). (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

El AChR es una proteína multimérica integral de membrana que se sintetiza en el RE y mientras lo hace, debe plegarse y someterse a un proceso de ensamblado (Figura 8). Solo los receptores pentaméricos, correctamente ensamblados, logran salir del RE, llegar al complejo de Golgi (Smith M. y col., 1987) y seguir su camino hacia la membrana plasmática. Las subunidades no plegadas ni ensambladas son retenidas en el RE y rápidamente degradadas (Harikumar K. y col., 2005). Por este motivo, nos propusimos evaluar si la disminución en los niveles de AChR en la membrana plasmática, producida por el tratamiento prolongado con A23187 10 µM, era debida a un ensamble ineficiente de las subunidades del AChR.

Aplicando el protocolo descripto en la sección Materiales y Métodos, cuantificamos el porcentaje del AChR presente en el interior celular total (ensamblado + desensamblado) y desensamblado, en células CHO-K1/A5. Consideramos que la cantidad total de receptores intracelulares en la condición control y experimental correspondía al 100 %, para así cuantificar si existían cambios en la proporción de receptor desensamblado a causa del tratamiento durante 18 hs con A23187 10 µM (Figura 1-45). Efectivamente, el ionóforo no solo afecta la cantidad total de AChR (Figura 1-43A) sino que también aumenta la cantidad de AChR desensamblado con respecto al control (C: 18,08 ± 1,32 %; A23187: 48,21 ± 6,96 %).

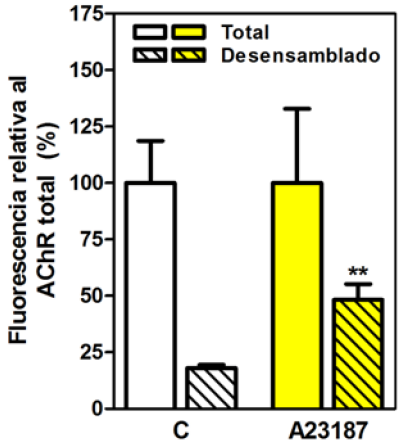


Figura 1-45. La incubación durante 18 hs con A23187 disminuye el ensamblado del AChR. Cuantificación de la fluorescencia emitida por la BTX fluorescente, marcando al AChR intracelular total o desensamblado. (**: C vs A23187, desensamblados) (n=3). (**) $p < 0,01$.

Como el receptor ensamblado es la resultante de la diferencia entre la cantidad de AChR intracelular total menos el AChR desensamblado, solamente el 52 % del receptor sintetizado en células CHO-K1/A5 expuestas 18 hs al A23187 logra ensamblarse, a diferencia del control, en el cual esta población representa el 82 % del AChR intracelular. Esta podría ser una causa por la cual se encuentra disminuido el AChR en la superficie celular (Figura 1-44, A, Alexa^{488}-BTX, y B).

Determinamos a continuación mediante ensayos de unión del radioligando [I^{125}]-BTX, cómo se afecta la expresión y distribución del AChR, frente al co-tratamiento del ionóforo con DOG a tiempos prolongados (Figura 1-46). El agregado de DOG y A23187 en simultáneo no produce cambios estadísticamente significativos sobre la distribución ni la expresión del AChR, indicando una posible compensación de efectos individuales de las dos drogas (Figura 1-46). Es decir que a tiempos largos, los efectos del DOG tampoco estarían relacionados directamente con los mediados por el ionóforo.

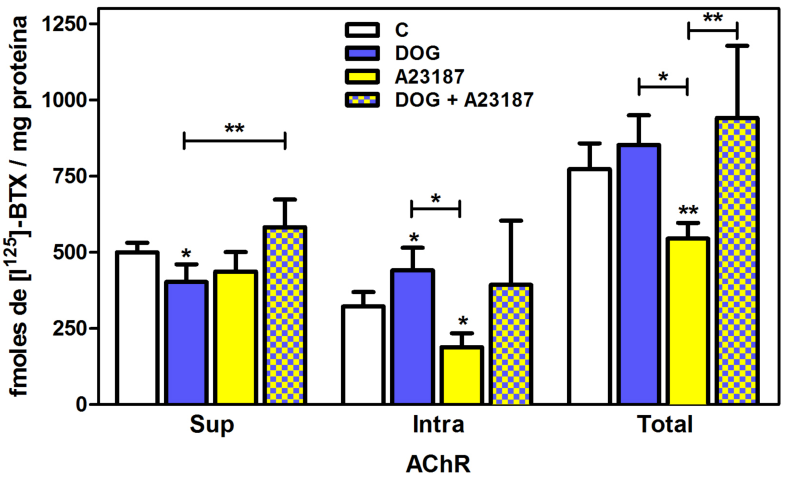


Figura 1-46. Co-incubación de A23187 y DOG en células CHO-K1/A5 durante 18 hs. Ensayo de unión de radioligando post-tratamiento con DOG, A23187 o DOG + A23187. Las barras de DOG y A23187 corresponden a las figuras 1-13A y 1-43A, respectivamente (n=4). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Exposición de las células a Thapsigargina

La ATPasa de retículo sarco- y endoplasmático (SERCA) es una enzima transmembranal encargada de transportar al Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración, utilizando ATP en dicho proceso. Su función fisiológica es la de secuestrar al Ca^{2+} citoplasmático dentro de los mencionados compartimentos intracelulares (Inesi G. y col., 2005).

El inhibidor más potente y específico utilizado contra las SERCA es la Thapsigargina (Thapsi), una lactona sesquiterpénica derivada de la planta *Thapsia garganica* (Rasmussen U. y col., 1978; Inesi G. y col., 2005; Michelangeli F. y East J., 2011). Su selectividad por las SERCA permite su uso sin afectar a otras Ca^{2+}-ATPasas, como las presentes en la membrana plasmática (PMCA) o las involucradas en mecanismos secretorios (SPCA) (Michelangeli F. y East J., 2011).

A diferencia de lo que sucede con el ionóforo A23187, la Thapsi logra el aumento del Ca^{2+} intracelular de forma indirecta. Esta droga impide el almacenamiento del ion en el RE, ya que la inhibición de las SERCA bloquea la función de estas enzimas de contrarrestar la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol y de este modo terminar los mecanismos de señalización mediados por el ion (Treiman M. y col., 1998; Bublitz M. y col., 2013) (Figura 1-47).

La Thapsi inhibe la fosforilación de la enzima y la unión del Ca^{2+}, al estabilizar a la SERCA en su estado conformacional con baja afinidad por el ion. Este cambio es prácticamente irreversible y persiste incluso luego de

quitar el exceso del inhibidor mediante el lavado de las placas (Michelangeli F. y East J., 2011; Treiman M. y col., 1998; Wictome, M. y col., 1992). Debido a su gran liposolubilidad, la Thapsi puede acceder fácilmente a su sitio de interacción con la enzima, que se encuentra dentro de la proteína (Winther A. y col., 2010) (Figura 1-47).

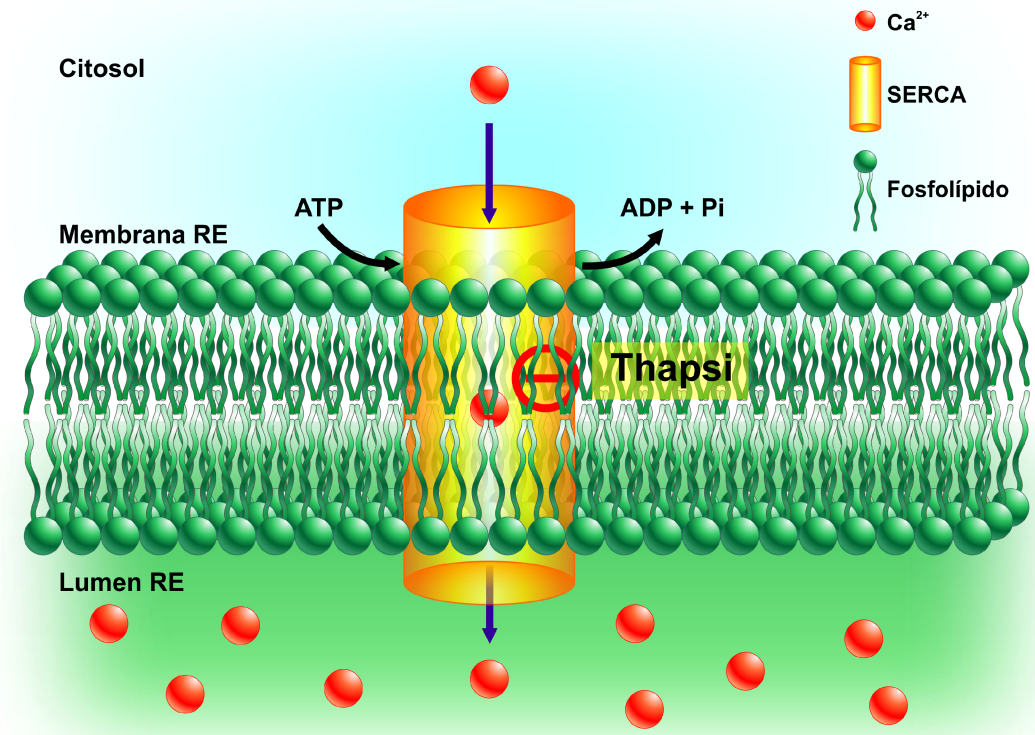


Figura 1-47. Acción inhibitoria de la Thapsi sobre las SERCA. Cuando la Thapsi accede a su sitio de interacción en el interior de la enzima, impide la recaptación de Ca^{2+} del citosol, por lo que indirectamente esta droga aumenta los niveles del ion en dicho compartimento acuoso.

Se comprobó también que el aumento de Ca^{2+} citosólico por acción de la Thapsi induce la producción de DAG en el complejo de Golgi y en la membrana plasmática en células COS-7 (Kunkel M. y Newton A., 2010; Kunkel M. y col., 2007). Por tal motivo, elegimos incubar a las células CHO-K1/A5 con esta droga para estudiar no solo como las afectaba el aumento de Ca^{2+} intracelular, y compararla con los efectos mediados por el A23187, sino que también por su posible efecto secundario de aumentar los niveles de DAG en las células.

En una serie inicial de experimentos, incubamos las células CHO-K1/A5 con Thapsi (5 µM) a distintos tiempos y evaluamos la expresión del AChR en la superficie celular. Como podemos observar en la figura 1-48,

disminuyen los niveles del receptor en la membrana plasmática a partir de una hora de incubación con la droga.

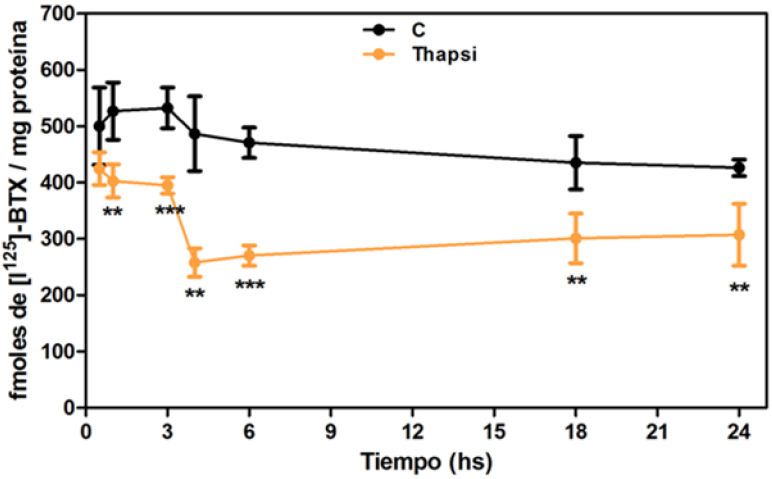


Figura 1-48. Células CHO-K1/A5 incubadas a distintos tiempos con Thapsi 5 µM. Para cada tiempo estudiado: n=3. (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

Como la Thapsi disminuye los niveles de AChR de superficie, decidimos determinar la expresión del receptor en las células CHO-K1/A5, a tiempos cortos (3 hs) y largos (18 hs).

- **Thapsi, 3 hs de incubación:**

Los ensayos de unión con toxina radiactiva tras la incubación con Thapsi demostraron que efectivamente existe una disminución en los niveles de AChR de superficie (38 ± 3 %) y que además disminuyen los AChR totales (28 ± 7 %) (Figura 1-49A). Esto fue acompañado por una pequeña disminución (11 ± 6 %) en la cantidad de proteínas por placa (Figura 1-49B).

La cuantificación del AChR en la membrana plasmática por microscopia de fluorescencia reproduce la disminución (29 ± 17 %) observada por los ensayos de unión de radioligando, pero a su vez se encuentra afectado el receptor intracelular (disminución del 25 ± 11 %) (Figura 1-50). En las imágenes de contraste de fase (Figura 1-50A) se puede observar que no existen cambios en la morfología celular.

Los experimentos realizados (Figuras 1-49 y 1-50) demuestran que los efectos sobre el AChR mediados por la Thapsi, son diferentes a los observados con DOG a tiempos cortos (Figura 1-12).

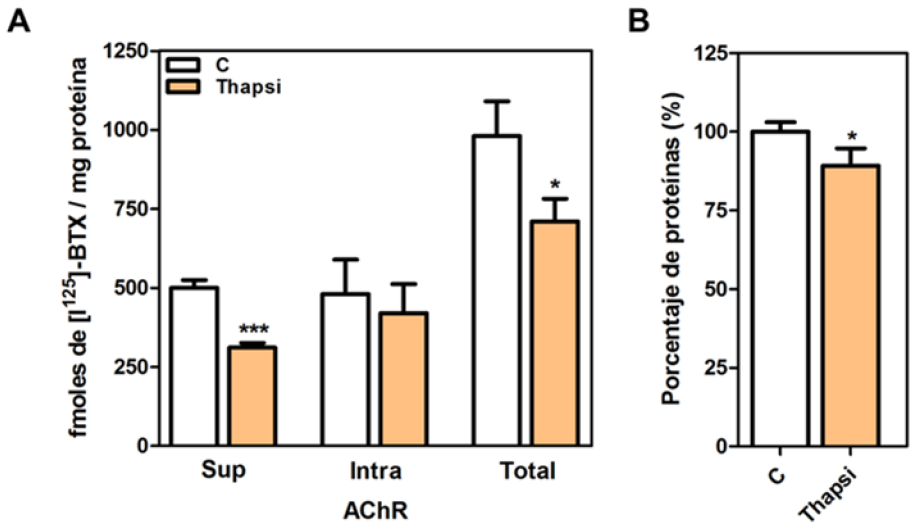


Figura 1-49. Células CHO-K1/A5 incubadas con Thapsi 5 µM durante 3 hs. A) Ensayo de unión de [I^{125}]-BTX tras el tratamiento con Thapsi (n=3) **B)** Determinación de las proteínas de los experimentos realizados en (A). (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$.

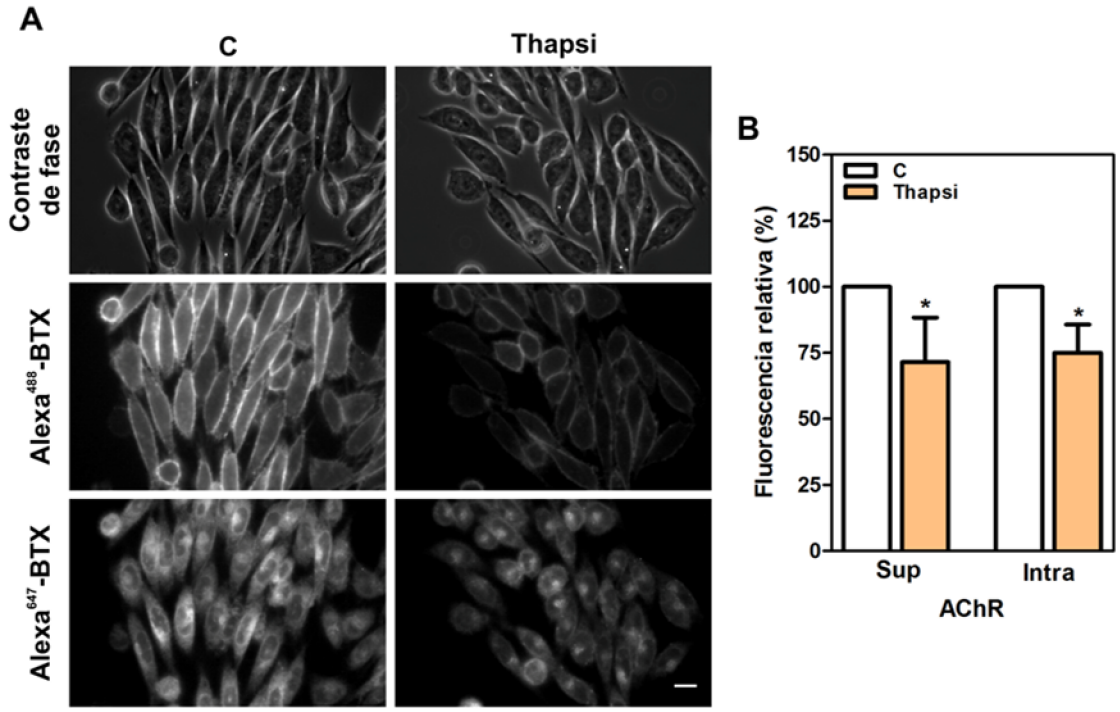


Figura 1-50. Unión de BTX fluorescentes luego del tratamiento con Thapsi por 3 hs. A) Imágenes de unión de $Alexa^{488}$- y $Alexa^{647}$-BTX marcando al AChR de superficie e intracelular, respectivamente. Escala: 10 µM. **B)** Cuantificación de la fluorescencia de los experimentos realizados en (A) (n=3). (*) $p < 0,05$.

Realizamos entonces ensayos de unión de toxina radiactiva con el fin de determinar si la co-incubación con DOG y Thapsi producía un efecto diferencial al observado con las drogas por separado (Figura 1-51). La exposición simultánea de las células CHO-K1/A5 con Thapsi y DOG no afecta

ni la expresión, ni la distribución del AChR (Figura 1-51). Esto sugeriría que existe una compensación de los efectos de ambas drogas.

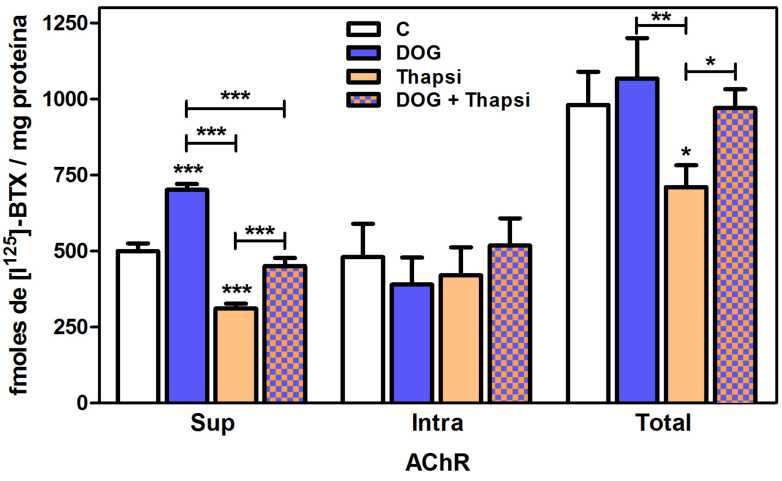


Figura 1-51. 3 hs de incubación con Thapsi junto a DOG. Ensayo de unión de BTX iodinada para la combinación de drogas (n=3). Las barras correspondientes a DOG y Thapsi provienen de los gráficos de las figuras 1-12B y 1-49A, respectivamente. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

- **Thapsi, 18 hs de incubación:**

Evaluamos a continuación los efectos de la incubación de células CHO-K1/A5 durante 18 hs con Thapsi (5 µM), sobre la expresión del AChR. Observamos un descenso en los niveles de AChR totales (52 ± 10 %), en los receptores de superficie (34 ± 5 %) e intracelulares (54 ± 7 %) (Figura 1-52A). Estos cambios son mayores a los observados cuando las células se incubaron con Thapsi durante 3 hs.

Para determinar si las 18 hs de incubación con Thapsi afectaban la proliferación celular, cuantificamos la cantidad de proteínas por placa y el número de células luego de la exposición a la droga. Como se muestra en la Figura 1-52B, las proteínas y el número de células descendieron un 47 ± 7 % y un 76 ± 14 %, respectivamente.

Los experimentos de microscopía de fluorescencia (Figura 1-53) confirmaron los resultados mostrados en la figura 1-52A. La disminución en los niveles del AChR de superficie e intracelular (Figura 1-53A) fueron del 38 ± 11 y del 37 ± 21 %, respectivamente (Figura 1-53B). A diferencia de lo que sucedía con Thapsi a tiempos cortos, la incubación durante 18 hs produce cambios en el patrón de distribución de los receptores intracelulares. Como se observa en la figura 1-53A (Alexa^{647}-BTX), las células incubadas con Thapsi no

presentan la marcación perinuclear típica del control, sino que ésta es más difusa y aparecen acúmulos puntiformes del AChR en cercanías del RE.

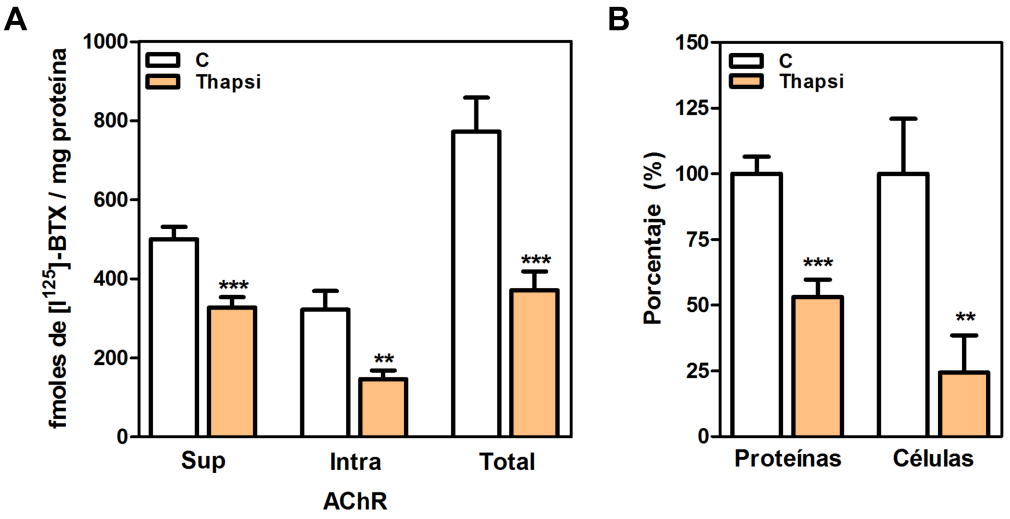


Figura 1-52. Células CHO-K1/A5 expuestas a Thapsi durante 18 hs. A) Ensayo de unión de la BTX radiactiva al AChR de superficie, intracelular y total. **B)** Cuantificación de proteínas de (A) y del número de células en cámara de Neubauer. En (A) y (B): n=3. (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

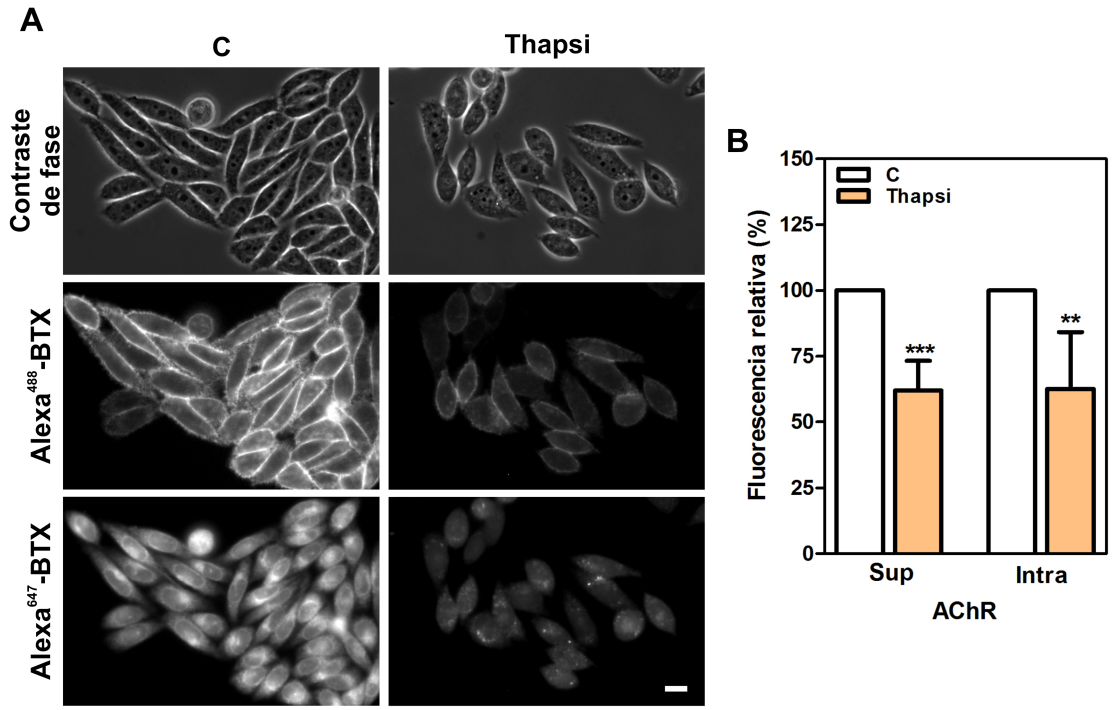


Figura 1-53. Determinación de la unión de BTX fluorescentes tras el agregado de Thapsi durante 18 hs. A) Imágenes de microscopía de fluorescencia, donde el AChR presente en la membrana celular se puso en evidencia con Alexa^{488}-BTX, y el AChR intracelular con Alexa^{647}-BTX. Escala: 10 µM. **B)** Cuantificación de (A) a partir de 4 experimentos independientes. (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

Considerando que, como se explicara anteriormente, el AChR debe estar formado por sus 5 subunidades ensambladas para llegar a la superficie celular, evaluamos el efecto de la Thapsi sobre el proceso de ensamblado en las células tratadas durante 18 hs con la droga, mediante la marcación con BTX fluorescente de los AChR intracelulares en presencia (desensamblado) o ausencia de Carb (total) (Figura 1-54).

Como se observa en la figura 1-54, podemos concluir que existe un aumento de la población de AChR desensamblados (C: 18,08 ± 1,32 % vs Thapsi: 29,57 ± 2,97 %).

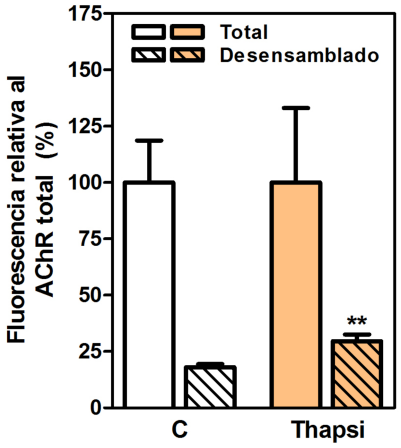


Figura 1-54. Las 18 hs de incubación con Thapsi afectan al ensamblado del AChR. Cuantificación de la fluorescencia emitida por la BTX fluorescente, marcando al AChR intracelular total o desensamblado. (**: C vs Thapsi, desensamblados) (n=3). (**) $p < 0,01$.

Es decir, la disminución de los niveles del AChR de superficie, mediada por Thapsi, podría deberse no solo a la menor expresión del AChR total a 18 hs de incubación, sino que también a la disminución del ensamblado del receptor (Figuras 1-52A; 1-53A, Alexa^{488}-BTX; 1-53B; 1-54).

Por otro lado, al realizar la co-incubación de Thapsi con DOG durante 18 hs (Figura 1-55), los resultados sobre el AChR parecen la consecuencia de la sumatoria de los efectos individuales de ambas drogas, siendo los AChR de superficie los únicos afectados por este co-tratamiento.

Inhibición de las PKC clásicas: Gö 6976

El Gö 6976 pertenece a la familia de los indolocarbazoles y es uno de los inhibidores más selectivos de las PKC clásicas (PKCc) (Martiny-Baron G. y col., 1993). Concentraciones en el rango nanomolar son suficientes para lograr la inhibición *in vitro* de las isoenzimas purificadas de las PKCc α y β1 (2,3 y 6,9 nM, respectivamente). El incremento del Gö 6976 hasta concentraciones

de 3 µM no afectan a las PKCn δ y ε, ni a las PKCa, como la PKCζ (Martiny-Baron G. y col., 1993).

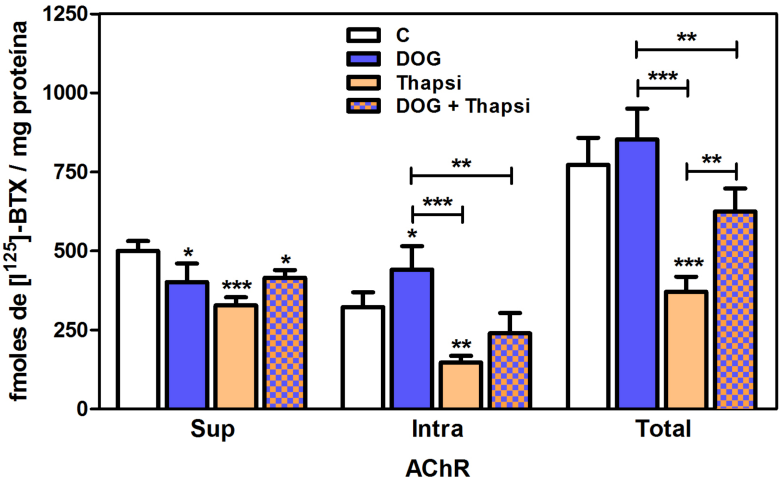


Figura 1-55. Co-tratamiento de Thapsi con DOG durante 18 hs. Experimento en células CHO-K1/A5 marcadas radiactivamente con [I^{125}]-BTX luego de los tratamientos con las drogas mencionadas en el gráfico (n=3). Los resultados correspondientes a DOG y Thapsi provienen de los gráficos de las figuras 1-13A y 1-52A, respectivamente. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Este inhibidor compite con el ATP por su sitio de unión (Figura 1-56), siendo las diferencias en estos sitios entre las isoformas de PKC la posible causa de su selectividad hacia las PKCc. A su vez, el Gö 6976 produce una inhibición no competitiva con los sustratos de la enzima (Martiny-Baron G. y col., 1993; Wu-Zhang A. y Newton A., 2013).

- **Gö 6976, 3 y 18 hs de incubación:**

Para dilucidar si la inhibición de las PKCc producía cambios en la expresión del AChR en células CHO-K1/A5, incubamos a las células con tres concentraciones distintas de Gö 6976, durante 3 y 18 hs (Figura 1-57, A y B, respectivamente).

Luego de la incubación con Gö 6976 0,01, 0,5 y 1 µM, para ambos tiempos, observamos cambios estadísticamente significativos sobre el AChR a partir de 0,5 µM (Figura 1-57, A y B). Frente a estos resultados, elegimos emplear para el resto de los experimentos Gö 6976 1 µM, ya que las variaciones sobre el AChR tienen mayor significancia estadística que en el resto de las concentraciones utilizadas. A las 3 hs se observa que aumentan (38 ± 18 %) los niveles de AChR en la superficie celular (Figura 1-57A),

mientras que a 18 hs no solo se encuentra incrementada esta población (79 ± 17 %), sino también los niveles de AChR total (52 ± 18 %) (Figura 1-57B).

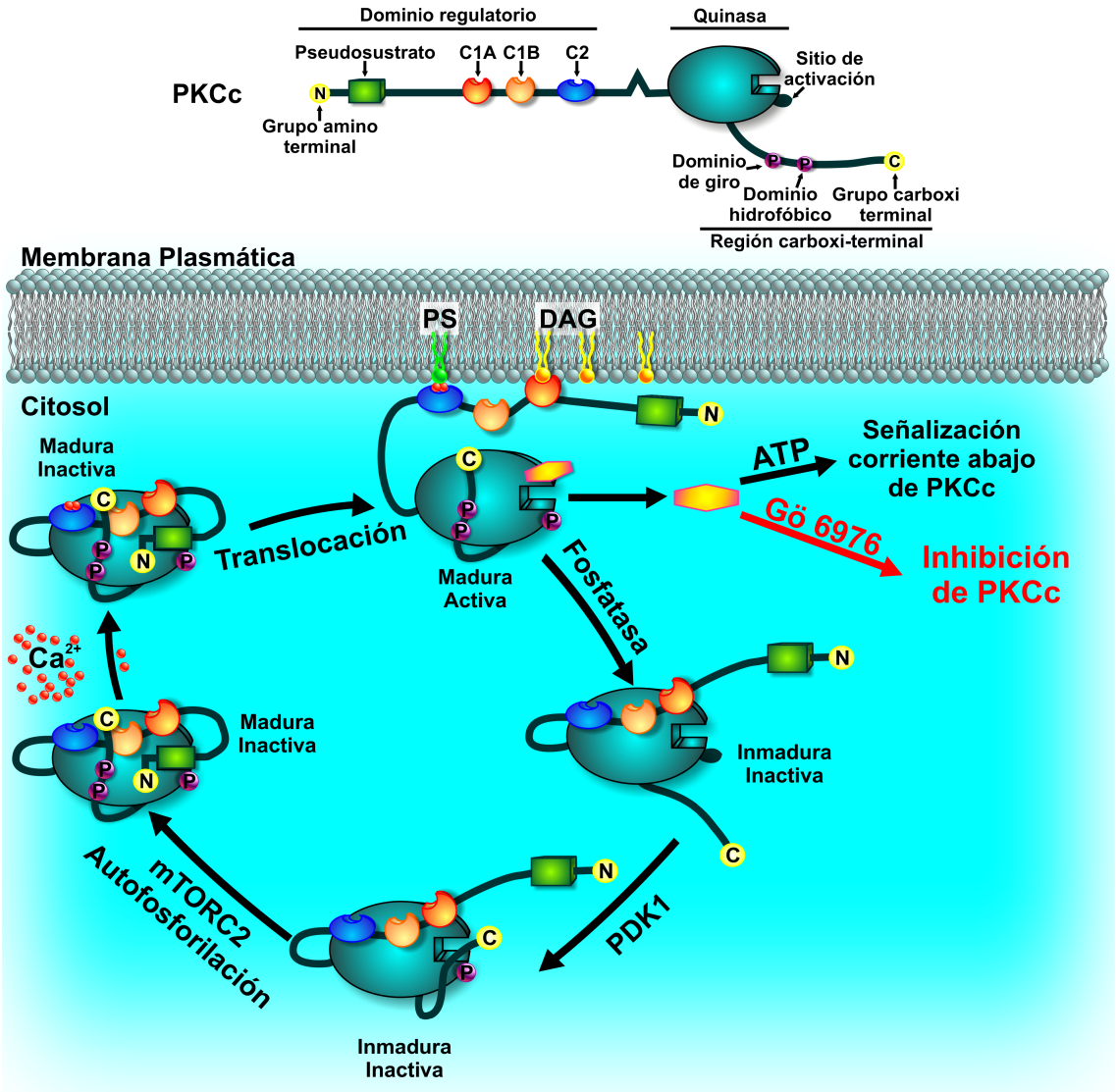


Figura 1-56. Mecanismo de activación de las PKCc y su inhibición por Gö 6976. El esquema ilustra los pasos previos a la señalización mediada por PKCc. El proceso de activación de estas enzimas no puede realizarse sin una maduración previa de las PKCc mediada por la fosforilación en su sitio de activación por PDK1, y luego por procesos de autofosforilación y/o fosforilaciones gatilladas por el complejo mTORC2. Una vez fosforilada la enzima, se encuentra madura y lista para unirse a dos iones Ca^{2+}, favoreciendo su translocación a la membrana. Allí se ancla mediante interacción con PS y DAG, logrando su conformación madura y activa. En este momento es capaz de interaccionar con un sustrato, previa unión del ATP, y llevar a la señalización corriente abajo de las PKCc. Pero si en vez de ATP se une el Gö 6976, las PKCc se inhiben.

Jung S. y col. (2013) demostraron que la incubación con Gö 6976 1 µM incrementaba la adhesión y la distribución esparcida de las células de diferentes líneas celulares en cultivo. Por lo tanto, decidimos evaluar la

morfología celular y de los filamentos de actina, como indicadores de la efectividad del tratamiento con Gö 6976 sobre las células CHO-K1/A5.

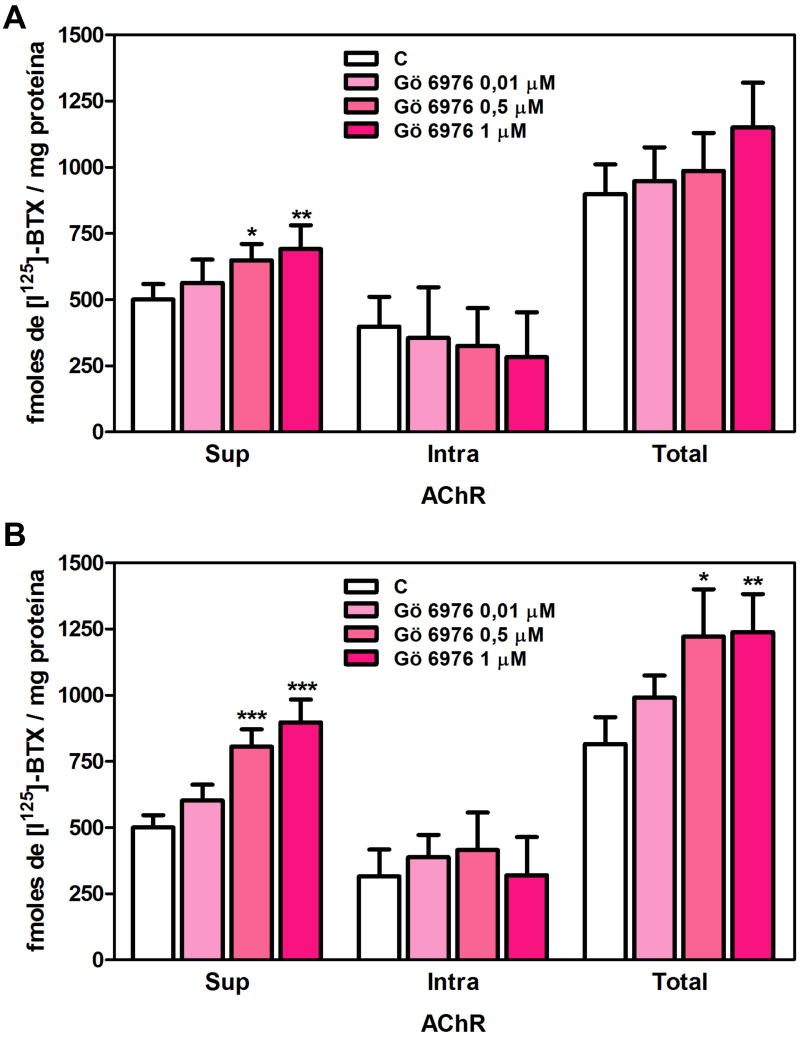


Figura 1-57. Ensayos de unión de [I^{125}]-BTX luego del tratamiento con Gö 6976. Las células CHO-K1/A5 se incubaron con tres concentraciones de Gö 6976, indicadas en los histogramas con distintas tonalidades de rosado. El gráfico **(A)** corresponde a 3 hs de tratamiento, mientras el **(B)** se obtuvo luego de 18 hs de incubación con Gö 6976. En (A): n=3; en (B): n=4. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Para ello, realizamos la observación microscópica de las células luego del tratamiento con Gö 6976, por contraste de fase y la marcación con Faloidina-Rodamina (Figura 1-58). La Faloidina es un péptido que se une fuertemente a los filamentos de actina, y dicha interacción puede observarse mediante microscopía de fluorescencia al acoplarlo al fluoróforo Rodamina. Tanto a 3 como a 18 hs, las células incubadas con el Gö 6976 parecen superponerse entre sí, sugiriendo la pérdida de la inhibición por contacto (Figura 1-58, contraste de fase). Esto se observa mejor en las imágenes de Faloidina-Rodamina, en donde las fibras de actina de cada célula se superponen sobre las fibras de las células de su alrededor, como consecuencia del solapamiento entre las células (Figura 1-58, Faloidina-Rodamina, Gö 3 y 18 hs). Este cambio es más pronunciado tras 18 hs de incubación, donde

además las células CHO-K1/A5 cambian su morfología, de ahusada a más estrellada (Figura 1-58, Faloidina-Rodamina, Gö 18 hs). Estos resultados sugieren que el tratamiento con Gö 6976 es efectivo.

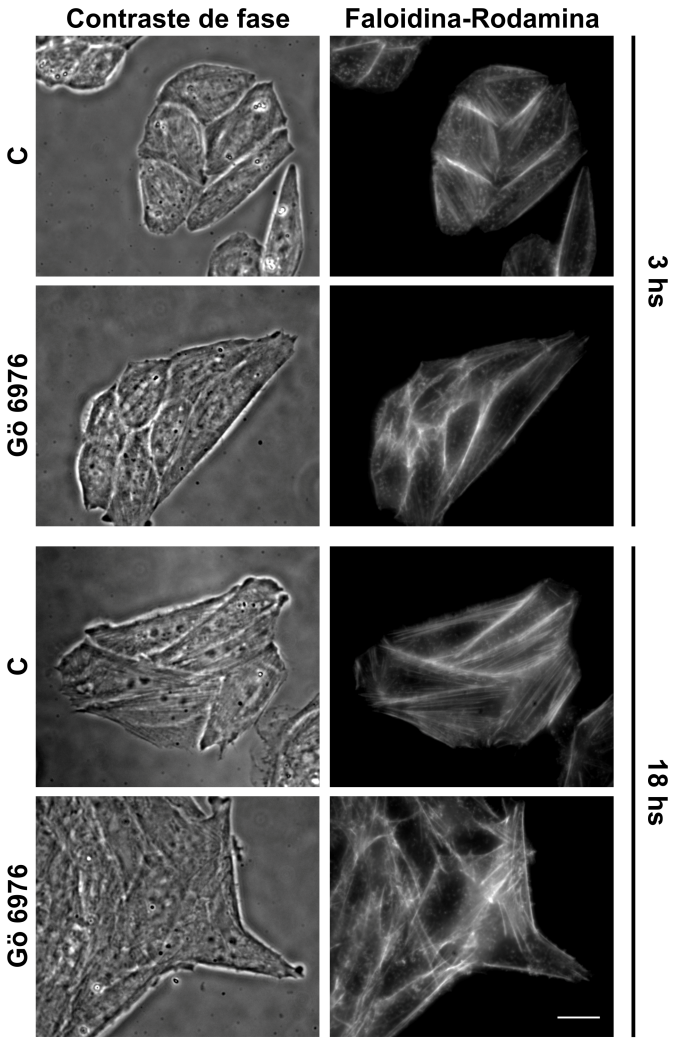


Figura 1-58. Visualización de los filamentos de actina luego del tratamiento con Gö 6976 durante 3 y 18 hs. Imágenes de contraste de fase y fluorescencia de células CHO-K1/A5 teñidas con el complejo Faloidina-Rodamina. Escala: 10 µM.

Considerando el incremento del AChR de superficie gatillado por este inhibidor, principalmente luego de 18 hs de tratamiento, nos propusimos determinar si este se debía a un mayor ensamblado del AChR (Figura 1-59). A diferencia de lo que sucedía con el A23187 y la Thapsi, la cantidad de AChR ensamblado en relación a la totalidad del AChR en el compartimento intracelular, no se encontró afectada por el Gö 6976.

- **Gö 6976 y DOG, 3 y 18 hs de incubación:**

Habiendo descripto la acción del inhibidor de PKCc en las células CHO-K1/A5, continuamos evaluando si esta droga era capaz de evitar los efectos mediados por el DOG sobre el AChR a corto y largo plazo (Figura 1-60).

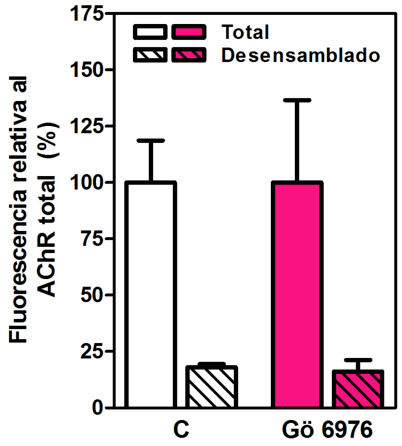


Figura 1-59. El tratamiento con Gö 6976 durante 18 hs no modifica al ensamblado del AChR. Cuantificación de la fluorescencia emitida por la BTX fluorescente, marcando al AChR intracelular: total o desensamblado (n=3).

A tiempos cortos (Figura 1-60A), tanto el DOG como el Gö 6976 agregados por separado o co-incubados, producen el mismo efecto final sobre el AChR: aumento de los niveles de receptor en la superficie celular. Por lo tanto, los efectos mediados por los DAG a tiempos cortos podrían estar relacionados con la inhibición de las PKCc.

Por otra parte, el tratamiento prolongado (18 hs) con DOG y Gö 6976 lleva a efectos opuestos entre sí (Figura 1-60B). Mientras que el DOG disminuye los niveles de AChR de superficie, el Gö 6976 los incrementa y además aumenta los niveles de AChR total (Figura 1-60B). Del co-tratamiento resulta el bloqueo de la acción del DOG. Esto podría deberse a que los efectos mediados por el DOG a largo plazo estarían ejercidos a través de la activación de PKCc, por lo que, en presencia del inhibidor, el DAG no puede gatillar su acción sobre el AChR.

- **Gö 6976, A23187 y Thapsi, 18 hs de incubación:**

Considerando que la activación de PKCc requiere de la unión de las enzimas a DAG, Ca^{2+} y PS (Figura 1-56), y que el incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular debidos al A23187 y a la Thapsi no afectan de igual manera al AChR que el DOG, decidimos evaluar si la co-administración de cada una de estas drogas con Gö 6986 a tiempos largos afectaba a los cambios sobre el AChR (Figura 1-61).

Los resultados obtenidos por los ensayos de unión de [I^{125}]-BTX muestran que los efectos de inhibición prolongada de PKCc por Gö 6976 sobre el AChR son bloqueados tanto por A23187 como por la Thapsi (Figura 1-61A). La cuantificación del porcentaje de proteínas y células tras la co-incubación con las drogas se ve afectada de igual manera que en el caso de A23187 y

Thapsi en ausencia del inhibidor de PKCc (Figuras 1-61B, 1-43B y 1-52B). En el caso de las proteínas se registró un descenso del 62 ± 4 y 51 ± 10 %, mientras que la disminución del porcentaje de células fue del 70 ± 6 y 69 ± 9 %, ambos casos para Gö 6976 + A23187 y Gö 6976 + Thapsi, respectivamente (Figura 1-61B). En la figura 1-61B también se puede apreciar que la inhibición de PKCc durante 18 hs con Gö 6976 no afecta la cantidad de proteínas ni de células.

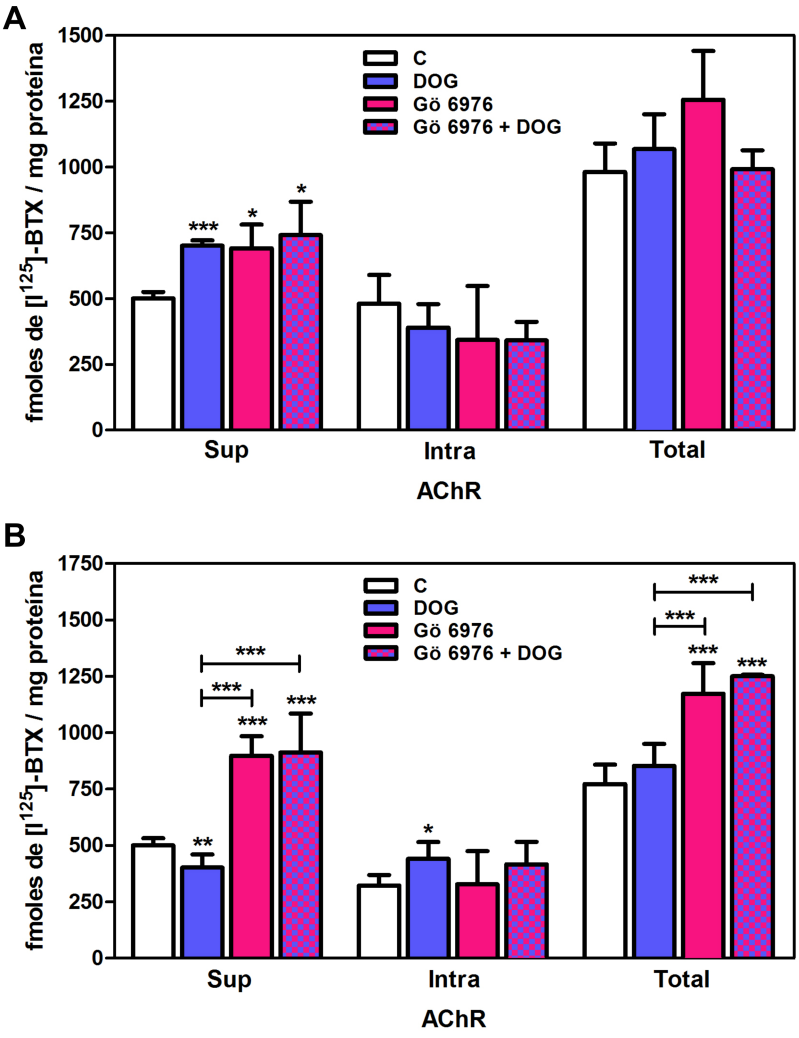


Figura 1-60. Co-incubación con Gö 6976 y DOG a tiempos cortos y largos. A) Histograma obtenido tras 3 hs de incubación con ambas drogas. Las barras de DOG y Gö 6976 solos corresponden a los gráficos de las figuras 1-12B y 1-57A, respectivamente. **B)** Unión de BTX radiactiva a los AChR luego de 18 hs del tratamiento con ambas drogas. De las figuras 1-13A y 1-57B se obtuvieron los histogramas correspondientes a DOG y Gö 6976, respectivamente. En (A) y (B): n=3. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Repetimos luego los experimentos de unión de BTX de la figura 1-61A, pero esta vez utilizando BTX fluorescentes (Figura 1-62). De las imágenes de microscopía de fluorescencia y su posterior cuantificación (Figuras 1-62, A y B, respectivamente) se puede concluir que aun en presencia del Gö 6976, sigue observándose el efecto del incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular sobre el AChR (Figuras 1-62, 1-44 y 1-53).

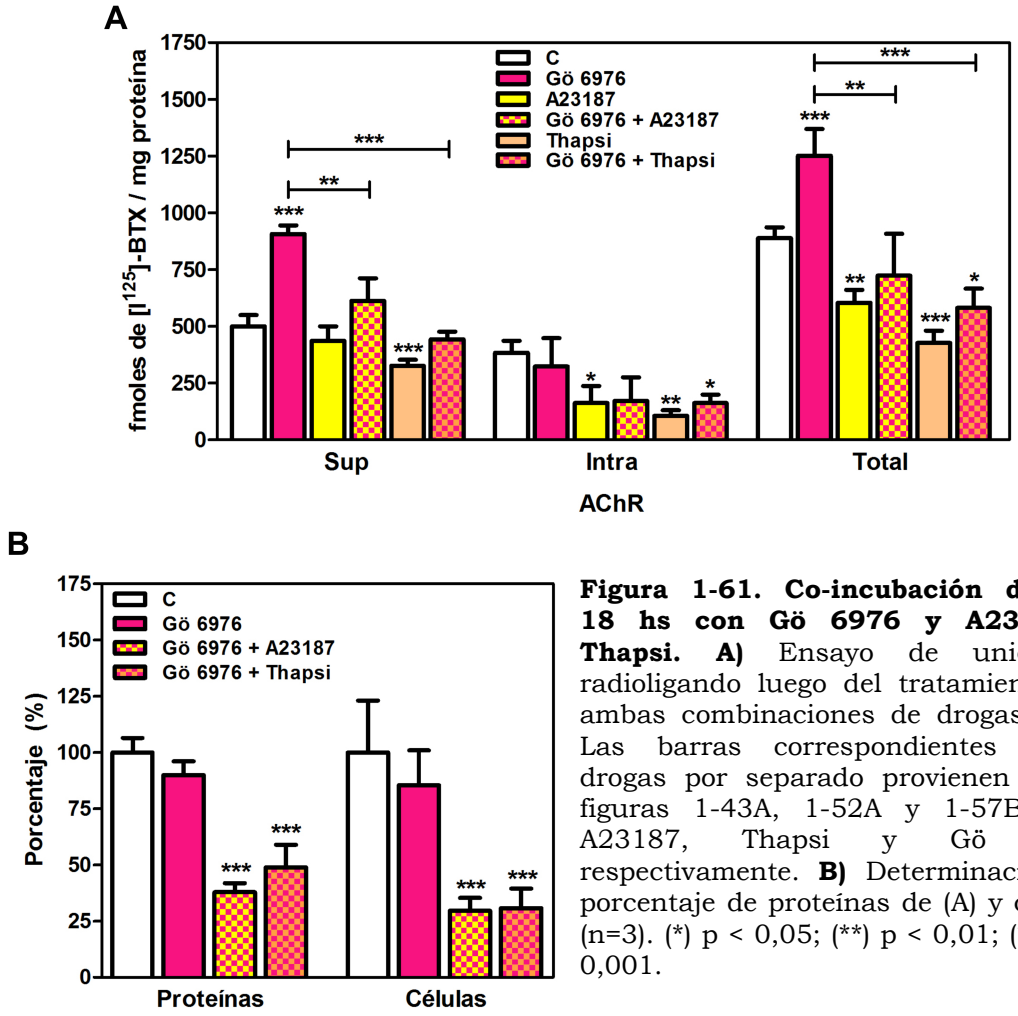


Figura 1-61. Co-incubación durante 18 hs con Gö 6976 y A23187 o Thapsi. A) Ensayo de unión de radioligando luego del tratamiento con ambas combinaciones de drogas (n=4). Las barras correspondientes a las drogas por separado provienen de las figuras 1-43A, 1-52A y 1-57B, para A23187, Thapsi y Gö 6976, respectivamente. **B)** Determinación del porcentaje de proteínas de (A) y células, (n=3). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Por lo tanto de los experimentos de las figuras 1-61 y 1-62, observamos que los efectos ejercidos por el Ca^{2+} a tiempos largos sobre el AChR no estarían mediados por la acción de las PKCc.

Cuantificación de las PKCc por WB

Los experimentos realizados con el Gö 6976 mostraron la participación de las PKCc en el mecanismo de señalización a través del cual los DAG ejercen su efecto sobre el AChR. Nos propusimos entonces, cuantificar las PKC clásicas, totales y fosforiladas, mediante ensayos de WB, con el fin de validar dicha participación.

Trabajos previos publicados sobre las PKC y su fosforilación (Antal C. y Newton A., 2013; Lipp P. y Gregor Reither G., 2011; Newton A., 2009; Griner E. y Kazanietz M., 2007) indican que una vez fosforilada en sus tres sitios, la enzima madura a una conformación catalíticamente competente pero inactiva

(Figura 1-56), logrando su activación al interaccionar con DAG, PS y Ca^{2+}, en el caso de las PKCc (Para más información, ver la introducción de este capítulo).

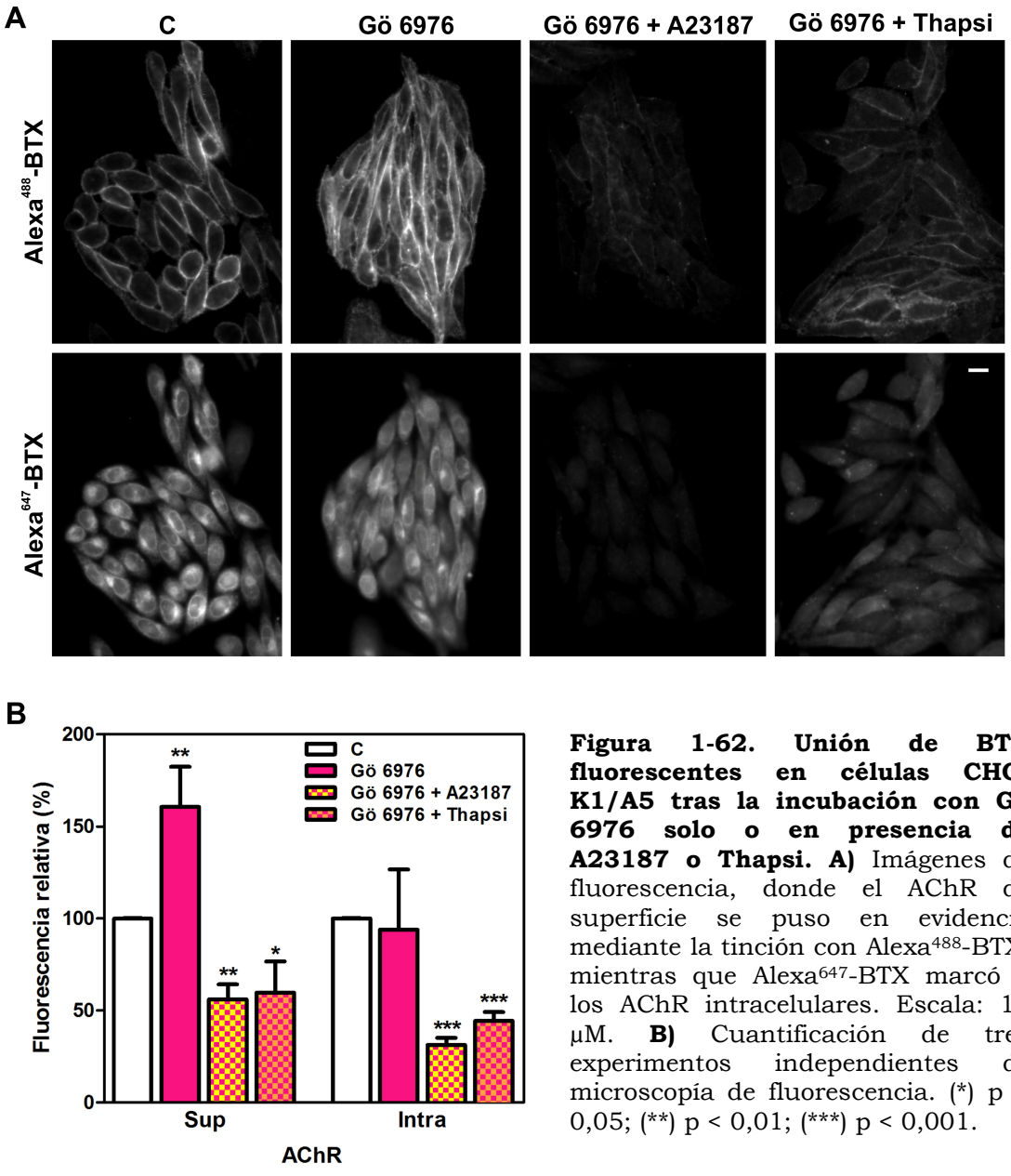


Figura 1-62. Unión de BTX fluorescentes en células CHO-K1/A5 tras la incubación con Gö 6976 solo o en presencia de A23187 o Thapsi. A) Imágenes de fluorescencia, donde el AChR de superficie se puso en evidencia mediante la tinción con Alexa^{488}-BTX, mientras que Alexa^{647}-BTX marcó a los AChR intracelulares. Escala: 10 µM. **B)** Cuantificación de tres experimentos independientes de microscopía de fluorescencia. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Para cuantificar la cantidad de enzima total y fosforilada, utilizamos los anticuerpos anti-PKCβ y anti-pPKCα/βII (se une a las Thr$^{638/641}$ ubicadas en el dominio de giro de la región carboxi-terminal, Figura 1-56).

Cuando las células CHO-K1/A5 se exponen durante 3 hs al Gö 6976, aumentan de los niveles de PKCβ (Figura 1-63, A y B), pero no se observan cambios en su fosforilación neta (Figura 1-63, A y C). Esto puede deberse a

que, como el Gö 6976 bloquea a la enzima una vez madura y activada (Figura 1-56), las células estarían respondiendo con un aumento de la síntesis o disminuyendo la degradación de las PKCβ, para compensar los niveles basales de enzima catalíticamente competente.

No se registraron cambios significativos en las PKCc, tanto en las proteínas totales como en las fosforiladas, tras la incubación con DOG (Figura 1-63). Sin embargo, el co-tratamiento del Gö 6976 con DOG, muestra una marcada reducción en los niveles de fosforilación de las enzimas (Figura 1-63, A y C), sin verse alterada su expresión (Figura 1-63, A y B). Considerando que la enzima debe estar fosforilada para activarse, estos cambios podrían indicar que la co-administración de ambas drogas durante 3 hs lleva a la inhibición neta de la enzima, confirmando entonces que las PKCc estarían involucradas en los efectos del DAG sobre el AChR (Figura 1-60A).

Por otra parte, el incremento del Ca^{2+} intracelular, ya sea por la incubación con A23187 o Thapsi durante 3 hs, gatilla el aumento de los niveles de PKCβ (Figura 1-63, A y B). Esto es coincidente con el aumento en la fosforilación de las PKCα/βII por Thapsi (Figura 1-63, A y C).

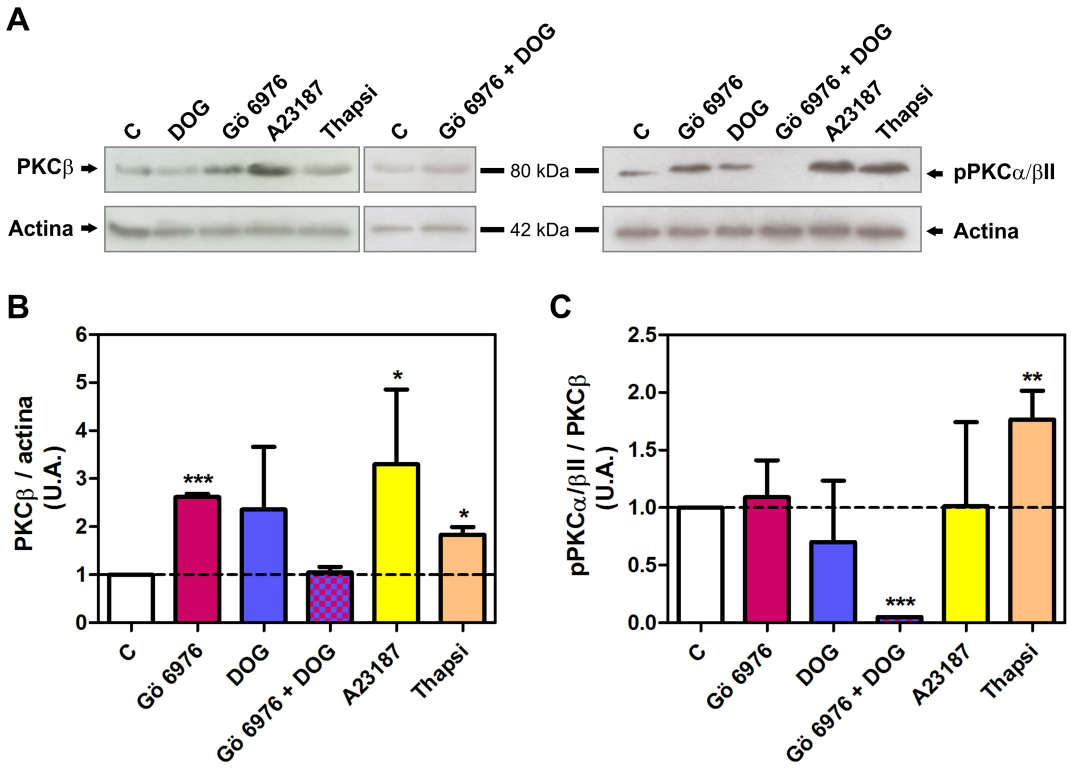


Figura 1-63. Las PKCc tras 3 hs de incubación con Gö6976, DOG, A23187 y Thapsi. A) Las imágenes son representativas de cuatro experimentos. Se muestra la cuantificación de los distintos experimentos para PKCβ **(B)** y pPKCα/βII en función de PKCβ **(C)**. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

A las 18 hs de exposición, todas las drogas testeadas presentan un patrón de expresión y fosforilación de PKCc diferente al obtenido a las 3 hs. El inhibidor Gö 6976 no altera la cantidad de la PKCβ (Figura 1-64, A y B), pero si disminuye su fosforilación. Por otra parte, el tratamiento prolongado con DOG regula negativamente los niveles de la PKCβ (Figura 1-64, A y B), como está reportado en la bibliografía para los EF (Santiskulvong C. y Rozengurt E., 2007; Rucci N. y col. 2005; Junoy B. y col., 2002; Liu W. y Heckman C., 1998). Sin embargo, las células CHO-K1/A5 incubadas con DOG aumentan la fosforilación de las PKCc (Figura 1-64, A y C). De esta forma, las células mantendrían la cantidad de PKC catalíticamente maduras, listas para ser activadas.

La co-incubación del DOG con el Gö 6978 no produce cambios significativos sobre la expresión ni la fosforilación de las PKCc (Figura 1-64). Por lo que el Gö 6978 bloquearía los efectos del DOG a tiempos largos sobre el AChR mediante la inhibición de las PKCc (Figura 1-60B).

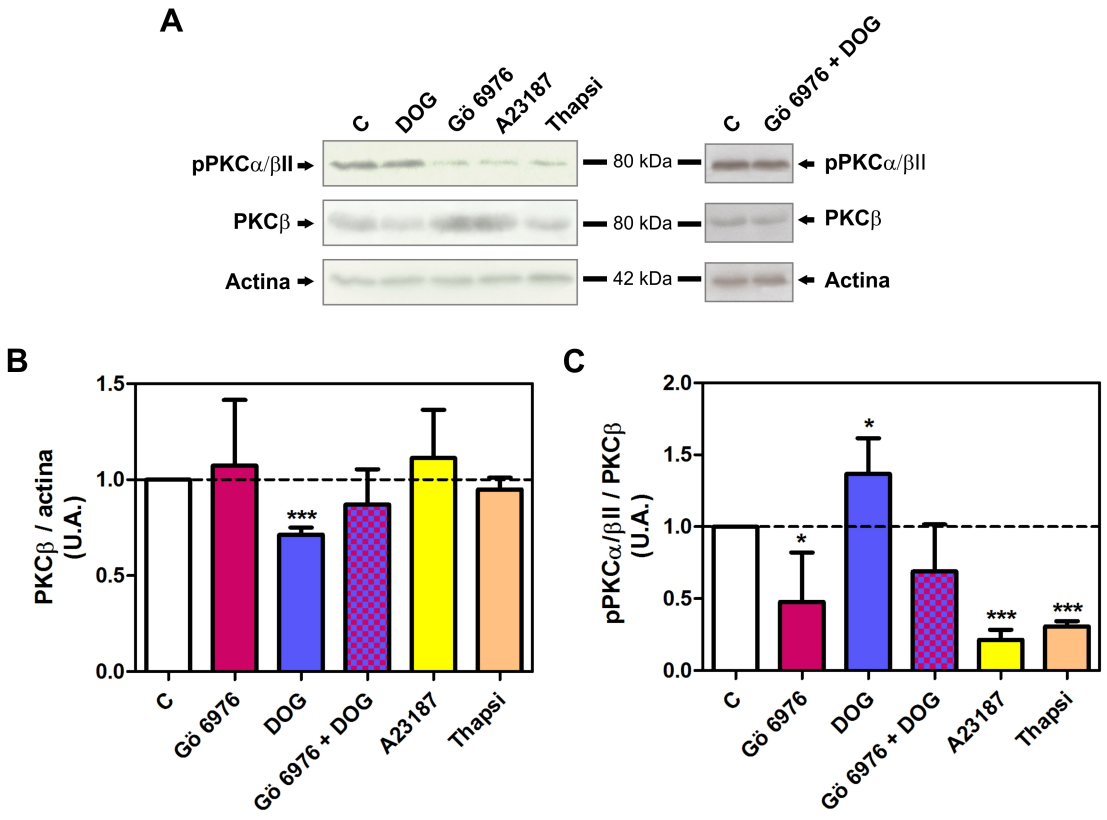


Figura 1-64. Las PKCc frente a la exposición durante 18 hs con Gö6976, DOG, A23187 y Thapsi. A) Imágenes representativas de cuatro experimentos. **B)** y **C)** corresponden a la cuantificación de los experimentos para PKCβ y pPKCα/βII en función de PKCβ, respectivamente. (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$.

El incremento del Ca^{2+} intracelular tras 18 hs de incubación con A23187 y Thapsi genera una disminución en la fosforilación de las PKCα/βII sin afectar los niveles totales de la PKCβ (Figura 1-64). Estos efectos son similares a los observados para el Gö 6976 tras 18 hs de incubación (Figura 1-64). Sin embargo, la acción de las drogas que incrementan los niveles de Ca^{2+} intracelular sobre las PKCc luego de 18 hs de incubación, no estaría directamente relacionada con sus efectos sobre el AChR, tal como lo muestran las figuras 1-61A y 1-62.

Las PKC noveles y los DAG

Inhibición de la PKCδ: Rottlerina

A continuación, nos centramos en la posible relación de los efectos mediados por el DAG y las PKC noveles (PKCn). Para ello, utilizamos un inhibidor de la PKCδ: la Rottlerina (ROT). Este compuesto fue aislado de la planta *Mallotus philippensis* (Gschwendt M. y col., 1994). Inhibe *in vitro* a la PKCδ con una IC_{50} de 3-6 μM, mientras que para lograr el mismo efecto con las demás PKC, requieren por lo menos una concentración 10 veces mayor (Gschwendt M. y col., 1994). Como se observó que los valores de la IC_{50} para la inhibición de PKCδ aumentaban tras el incremento de la concentración de ATP utilizada, se sugirió una posible competencia de la ROT con el ATP por su sitio de unión a la PKCδ (Gschwendt M. y col., 1994; Soltoff S., 2007).

Desde su descubrimiento, la ROT generó posturas contrapuestas sobre su mecanismo de acción y especificidad hacia las PKCδ. Se postuló que la ROT modula indirectamente la localización de la PKCδ, por lo que el efecto neto asemejaría a la inhibición por interacción directa de la droga con la enzima (Maioli E. y col. 2012a; Maioli E. y col. 2012b; Soltoff S., 2007). Sin embargo, en el 2013 se publicaron numerosos artículos que validan el uso de la ROT como inhibidor específico de la PKCδ (Choi Y. y col., 2013; Zhu S. y col., 2013; Kim Y. y col, 2013; Fan Y. y col., 2014; Khor E. y col., 2013).

Considerando lo anteriormente descripto, en este trabajo de tesis decidimos utilizar a la ROT como inhibidor de PKCδ a la mínima concentración (3 μM) propuesta (Gschwendt M. y col., 1994).

Del estudio de los mecanismos de activación de las distintas isoformas de PKC por DAG, se demostró que existen diferencias entre el inicio y la duración de la actividad enzimática. En general, la señalización por PKCc es un proceso de inicio y terminación rápido, generalmente localizado en la membrana plasmática. Sin embargo, las PKCn se activan principalmente tras la unión a los DAG del complejo de Golgi, donde existen niveles estables de DAG, a diferencia de la membrana plasmática. Esto hace que el proceso de activación demore más tiempo, pero que la acción de las PKCn sea más prolongada (Gallegos L. y col., 2006; Gallegos L. y Newton A., 2008; Antal C. y Newton A., 2013). Por tal motivo, evaluamos la participación de la PKCδ en los cambios sobre el AChR, provocados por la incubación de células CHO-K1/A5 con DOG y ROT durante 18 hs.

Los ensayos de unión de BTX iodinada demuestran que la ROT aumenta la proporción del receptor de superficie (75 ± 32 %), mientras que el AChR intracelular disminuye (41 ± 22 %), en comparación a la condición control (Figura 1-65A). El tratamiento prolongado con ROT disminuyó (50 ± 8 %) la cantidad de proteínas totales por placa (Figura 1-65B). Estos efectos son opuestos a los que produce el DOG tras 18 hs de incubación (Figura 1-65A). Por otro lado, la incubación con DOG en presencia de ROT, impide que el DOG ejerza su acción sobre el receptor estudiado (Figura 1-65A). La misma tendencia se observa por microscopia de fluorescencia (Figura 1-66).

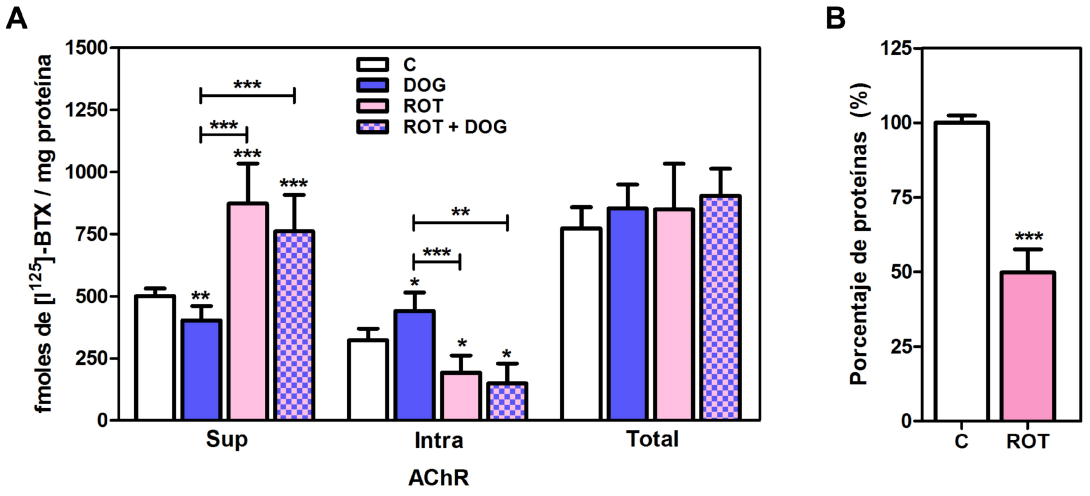


Figura 1-65. La ROT durante 18 hs y las células CHO-K1/A5. A) Ensayo de unión de BTX radiactiva luego del tratamiento con ROT y ROT + DOG. Las barras del DOG corresponden a la figura 1-13A. **B)** Determinación de las proteínas de los experimentos realizados en (A) (n=4). (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

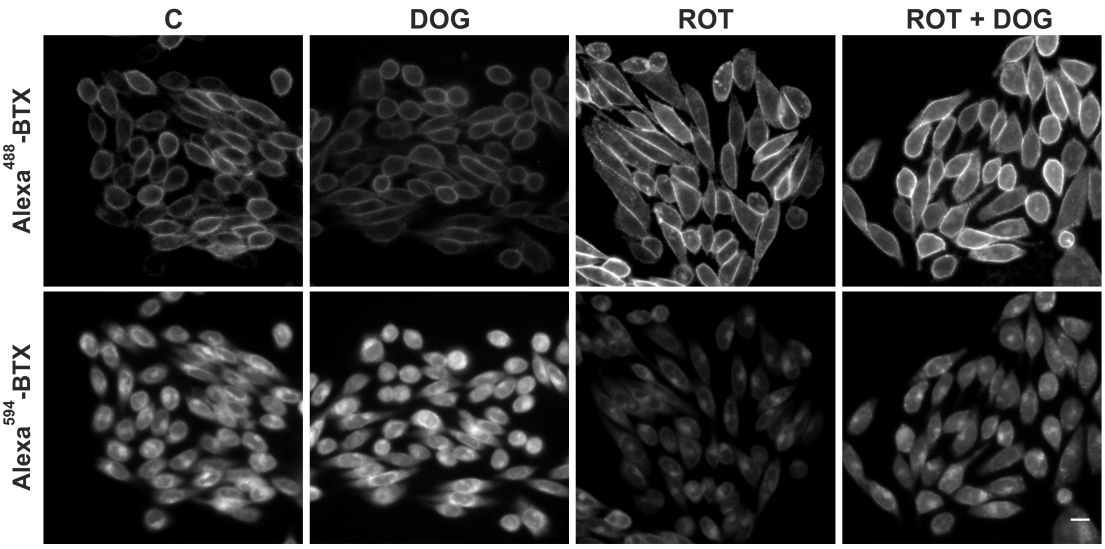


Figura 1-66. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1/A5 tratadas con ROT y DOG durante 18 hs. Se utilizaron las BTX fluorescentes, Alexa^{488}- y Alexa^{594}-BTX, para poner en evidencia a los AChR presentes en la membrana plasmática y en el interior celular, respectivamente. Escala: 10 µM.

A continuación, realizamos ensayos de WB para cuantificar la expresión de la PKCδ y su fosforilación (pPKCδ/θ), luego de los tratamientos con DOG y ROT. La incubación durante tiempos largos con ROT, DOG o ROT + DOG no afecta los niveles de la PKCδ (Figura 1-67, A y B). Sin embargo, la proporción de pPKCδ/θ en relación a la PKCδ total, disminuye significativamente, luego del tratamiento con ROT y ROT + DOG (Figura 1-67, A y C). El DOG agregado solo no ejerce cambios sobre las pPKCδ/θ tras 18 hs de incubación (Figura 1-67, A y C).

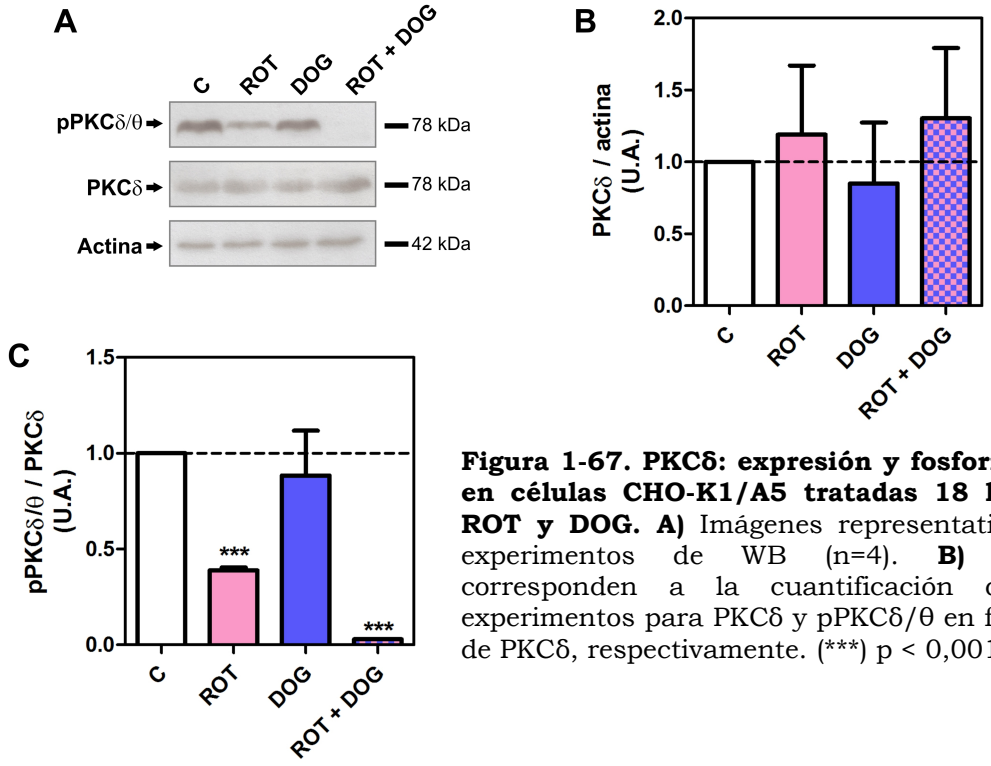


Figura 1-67. PKCδ: expresión y fosforilación en células CHO-K1/A5 tratadas 18 hs con ROT y DOG. A) Imágenes representativas de experimentos de WB (n=4). **B)** y **C)** corresponden a la cuantificación de los experimentos para PKCδ y pPKCδ/θ en función de PKCδ, respectivamente. (***) p < 0,001.

Estos experimentos (Figuras 1-65 y 1-67) indicarían que el DOG aplicado durante 18 hs podría ejercer su efecto sobre los AChR, a través de activación de la PKCδ, ya que a este tiempo esta enzima se encuentra madura, lista para ser activada por el DOG.

Seguidamente, nos preguntamos si la PKCδ estaría involucrada en la acción del DOG sobre el AChR a tiempos cortos. Determinamos entonces la presencia de la PKCδ total y fosforilada por ensayos de WB tras la incubación con DOG, ROT o ROT + DOG durante 4 hs (Figura 1-68). Ninguna de las dos formas de las PKCδ (total y fosforilada) se encuentra modificada a causa del tratamiento con ROT (Figura 1-68). Esta droga tampoco altera el patrón de expresión del AChR a tiempos cortos (Figura 1-69). La incubación con DOG o ROT + DOG no afecta la expresión de la PKCδ (Figura 1-68, A y B). Sin embargo el agregado del DOG reduce significativamente la proporción de pPKCδ/θ luego de 4 hs de incubación (Figura 1-68, A y C, DOG y ROT + DOG).

De estos resultados podemos concluir que el tratamiento durante 4 hs con DOG disminuye la proporción de PKCδ/θ listas para ser activadas frente a un estímulo (Figura 1-68, A y C). Sin embargo, los efectos de este DAG sobre el AChR a tiempos cortos no estarían relacionados con la inhibición de la PKCδ, ya que la ROT no cambia el patrón de expresión del AChR luego de 4 hs de incubación (Figura 1-69).

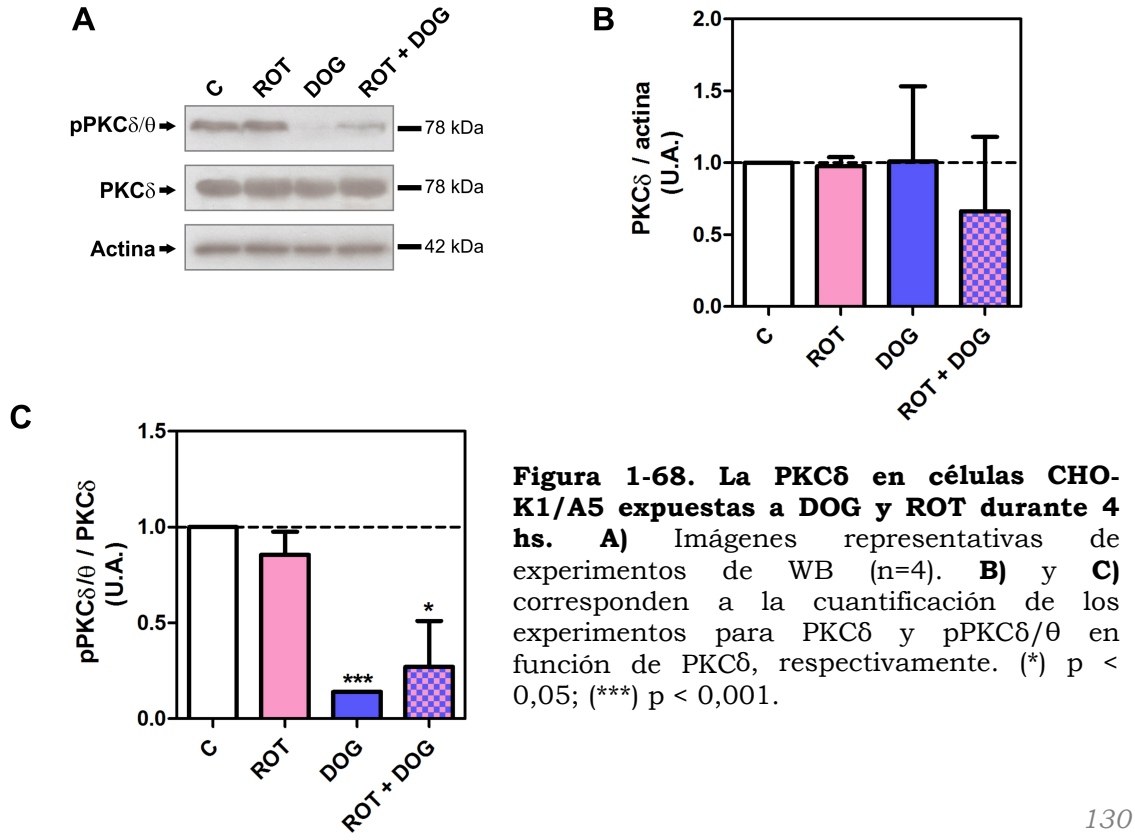


Figura 1-68. La PKCδ en células CHO-K1/A5 expuestas a DOG y ROT durante 4 hs. A) Imágenes representativas de experimentos de WB (n=4). **B)** y **C)** corresponden a la cuantificación de los experimentos para PKCδ y pPKCδ/θ en función de PKCδ, respectivamente. (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$.

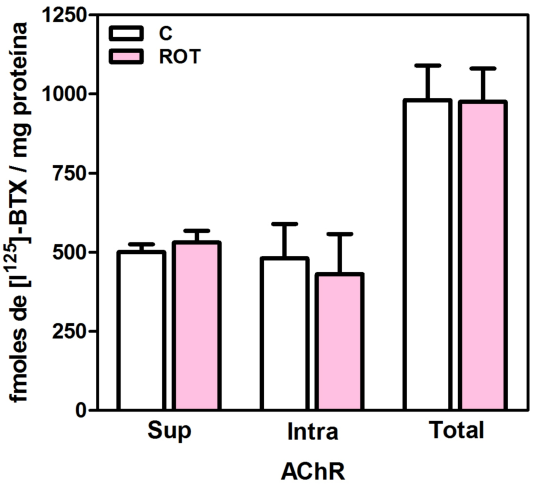


Figura 1-69. La ROT y el AChR, luego de 4 hs de tratamiento. Ensayo de unión de [I^{125}]-BTX en células CHO-K1/A5 tras la incubación con ROT (n=3).

Los DAG y la PKCη

Determinamos a continuación, por ensayos de WB la expresión y fosforilación de la PKCη, otra integrante de la familia de las PKCn. Las células CHO-K1/A5 fueron incubadas con DOG durante 4 y 18 hs, y se realizó la cuantificación de la fracción fosforilada de la PKCη en función de la expresión total de dicha proteína (Figura 1-70, A y B). Los niveles de PKCη no se encuentran alterados significativamente como consecuencia de la incubación con DOG (Figura 1-70A). La proporción de PKCη fosforilada en relación a la misma proteína total, tampoco se ve afectada por el DOG (Figura 1-70, A y B).

Al encontrarse sin cambios la proporción de la fracción de la PKCη madura pero inactiva, el DOG podría activar esta enzima a tiempos cortos y largos y gatillar de esta forma los efectos de este lípido sobre la distribución del AChR.

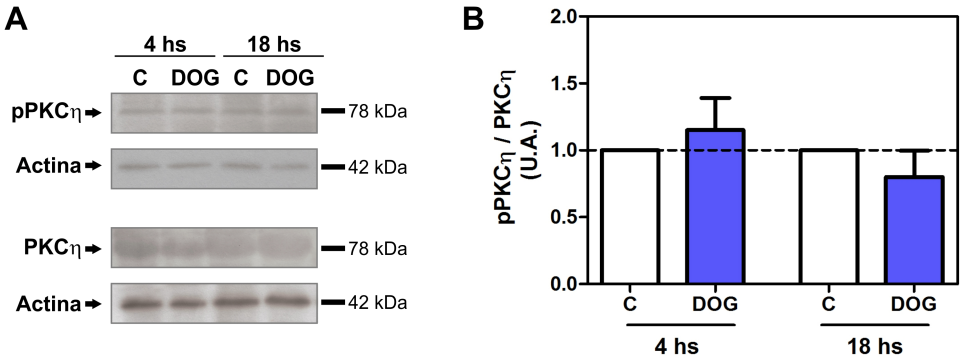


Figura 1-70. El DOG y la PKCη. A) Imágenes representativas de tres experimentos de WB. **B)** Cuantificación de la pPKCη/PKCη luego de 4 y 18 hs de incubación con DOG en las células CHO-K1/A5.

La PKD y los DAG

Desde el descubrimiento de la PKD en 1994 (Johannes F. y col., 1994; Valverde A. y col., 1994) no se reportaron inhibidores selectivos contra esta enzima hasta el 2008. Sharlow E. y col. presentaron una benzoxoloazepinolona como la primera molécula descubierta como inhibidor potente y selectivo contra todas las isoformas de PKD (PKD1, PKD2 y PKD3): el CID755673.

Los ensayos *in vitro*, realizados con las enzimas purificadas, demostraron que alrededor de 200 nM de CID755673 eran necesarios para alcanzar la IC_{50} de las tres isoformas, mientras que concentraciones en el orden de los µM demostraron inhibición de los efectos mediados por PKD en distintos tipos celulares (Sharlow E. y col., 2008).

El CID755673 ejerce su acción sobre la PKD, inhibiendo su fosforilación en los sitios de activación en Ser^{738}/Ser^{742} y su posterior autofosforilación en Ser^{916} (Figura 1-71) (Sharlow E. y col., 2008). Si bien no está claro el mecanismo de acción, se sabe que el CID755673 no compite con el ATP por su sitio de unión a la enzima ni inhibe la acción de las PKCn (Sharlow E. y col., 2008).

Realizamos entonces ensayos de WB para determinar si el tratamiento en células CHO-K1/A5 con CID755673 7 µM durante 4 y 18 hs inhibía la fosforilación de PKD. Como muestra la Figura 1-72, el tratamiento con el inhibidor durante 4 y 18 hs no altera los niveles de PKD total. Además, no se detectan cantidades significativas de PKD fosforilada (pPKD) en la condición control ni en las células tratadas con el inhibidor, indicando que no existen niveles basales de activación de esta enzima en las células CHO-K1/A5.

Evaluamos la expresión del AChR por ensayos de unión de $[I^{125}]$-BTX tras la incubación de las células CHO-K1/A5 con CID755673 7 y 25 µM. Elegimos estas dos concentraciones ya que, con CID755673 7 µM no existe inhibición *in vitro* de las PKC clásicas y noveles purificadas (Sharlow E. y col., 2008), mientras que CID755673 25 µM es una concentración ampliamente utilizada en células en cultivo (LaValle C. y col., 2010; Torres-Marquez E. y col., 2010; Sharlow E. y col., 2008).

Luego de 4 y 18 hs de incubación con CID755673 (Figura 1-73, A y B, respectivamente), el AChR no presenta cambios en el patrón de expresión a ninguna de las concentraciones probadas.

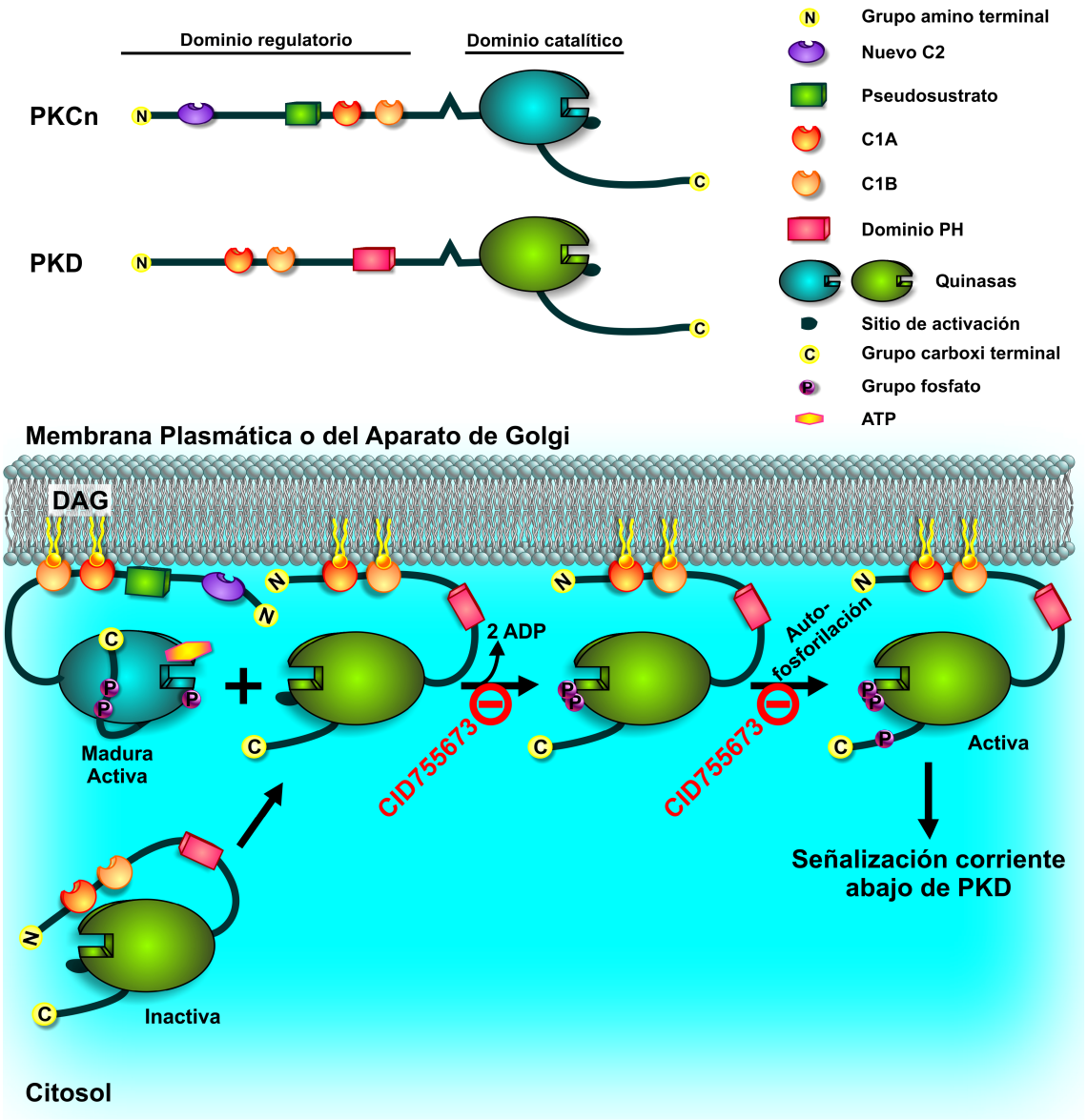


Figura 1-71. Mecanismo de activación de PKD y su inhibición por CID755673. El esquema ilustra los pasos previos a la señalización mediada por PKD. Frente a un aumento del DAG en las membranas, ya sea plasmática o de Golgi, la PKD transloca del citosol a dichas membranas. Allí, es fosforilada por las PKCn en las Ser^{738} y Ser^{742} de su sitio de activación. Estas fosforilaciones gatillan la autofosforilación de la PKD en la Ser^{916}, proceso necesario para lograr la activación de la enzima. El CID755673 bloquea los tres procesos de fosforilación de la enzima.

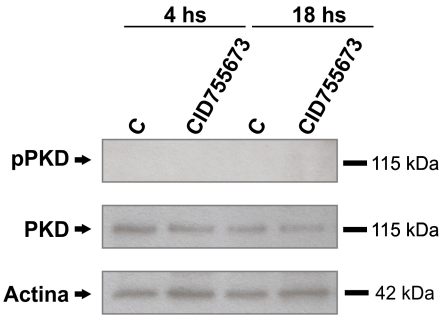


Figura 1-72. Expresión y fosforilación de la PKD en células CHO-K1/A5 tratadas con CID755673. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

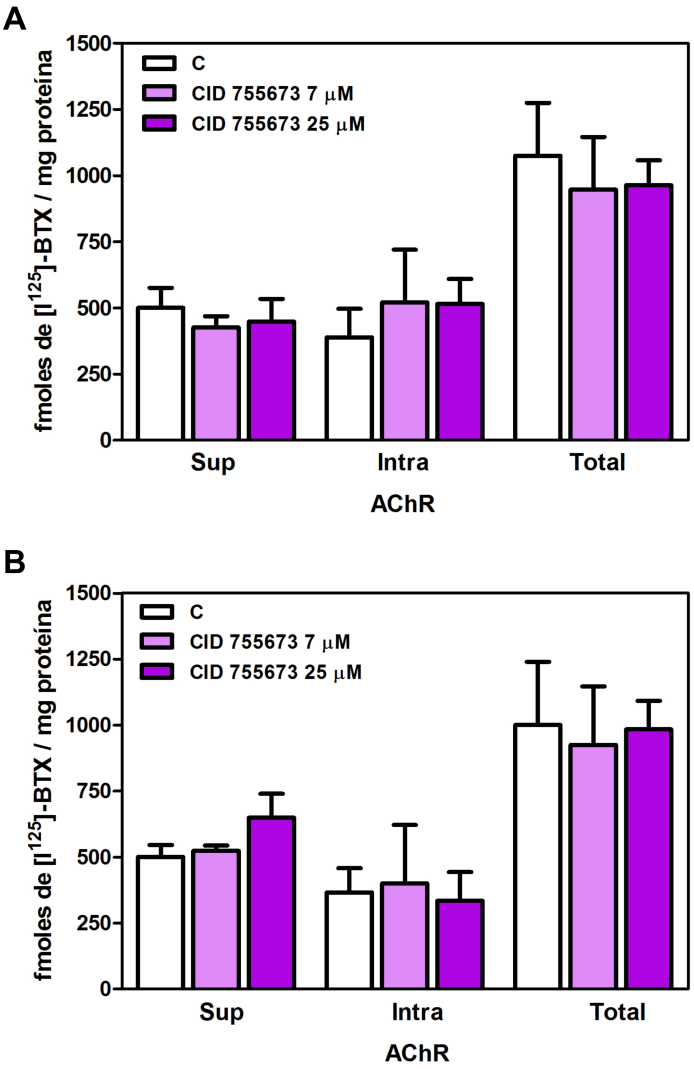


Figura 1-73. El CID755673 y las células CHO-K1/A5. Ensayos de unión de BTX radiactiva tras la incubación de las células con el inhibidor durante 4 **(A)** y 18 hs **(B)** (n=3).

Nos preguntamos a continuación si el tratamiento con DOG a tiempos cortos y largos activaría a la PKD (Figura 1-74). Como puede observarse en la figura 1-74A (PKD), si bien el tratamiento con DOG a 4 y a 18 hs no afecta los niveles totales de la enzima, la fosforilación de PKD presenta un abrupto aumento a ambos tiempos (Figura 1-74, A, pPKD, y B), indicando que el DOG estaría activando a la enzima. Esta activación es más importante luego de 4 hs de tratamiento (Figura 1-74B). Estos resultados involucrarían a la PKD en los efectos mediados por DOG sobre el AChR a los tiempos estudiados.

El incremento del Ca^{2+} y el AChR

Dado que previamente demostramos que el incremento de Ca^{2+} intracelular, mediado por A23187 y Thapsi, afecta el patrón de expresión del AChR (Figuras: 1-40B, 1-41, 1-43A, 1-44, 1-45,1-48, 1-49A, 1-50, 1-52A, 1-53

y 1-54) decidimos investigar por qué mecanismos estas drogas ejercían su acción.

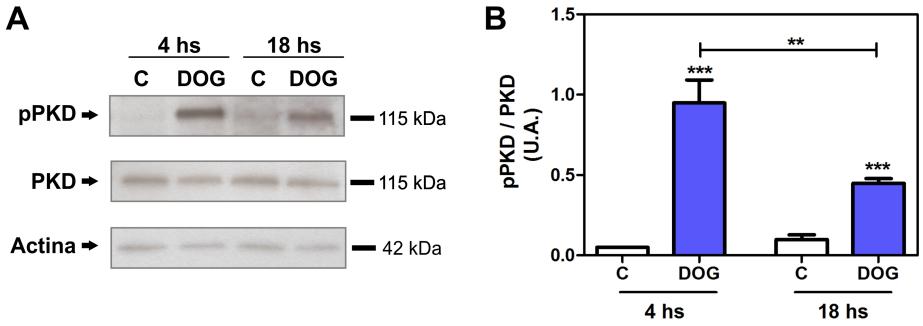


Figura 1-74. El DOG y la PKD. Las células CHO-K1/A5 se incubaron con DOG durante 4 y 18 hs. **A)** Imágenes representativas de tres experimentos de WB. **B)** Cuantificación de la pPKD en función de la expresión de PKD de (A). (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Una de las vías de señalización celular que media diversas respuestas fisiológicas, como consecuencia del incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, es la que involucra a la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) (Figura 1-75).

La CaMKII se expresa en numerosos tejidos y se activa por la unión del complejo Ca^{2+}-calmodulina y posterior autofosforilación (Figura 1-75). La unión de dicho complejo a la CaMKII rompe las interacciones autoinhibitorias entre el domino inhibitorio y el dominio catalítico de la enzima, permitiendo el acceso del ATP y de los sustratos a fosforilar (Figura 1-75) (Hudmon A. y Schulman H., 2002; Colbran R., 2004). La activación de la enzima puede realizarse por mecanismos independientes o dependientes de Ca^{2+}-calmodulina (Figura 1-75).

Para evaluar la participación de la CaMKII en los cambios mediados por el Ca^{2+} sobre el AChR, utilizamos un inhibidor de la misma, el KN-62 (Tokumitsu H. y col., 1990). Este compuesto compite con la calmodulina en su sitio de unión a la enzima (Figura 1-75) y presenta una alta selectividad a concentraciones del rango μM (Tokumitsu H. y col., 1990; Davies S. y col. 2000).

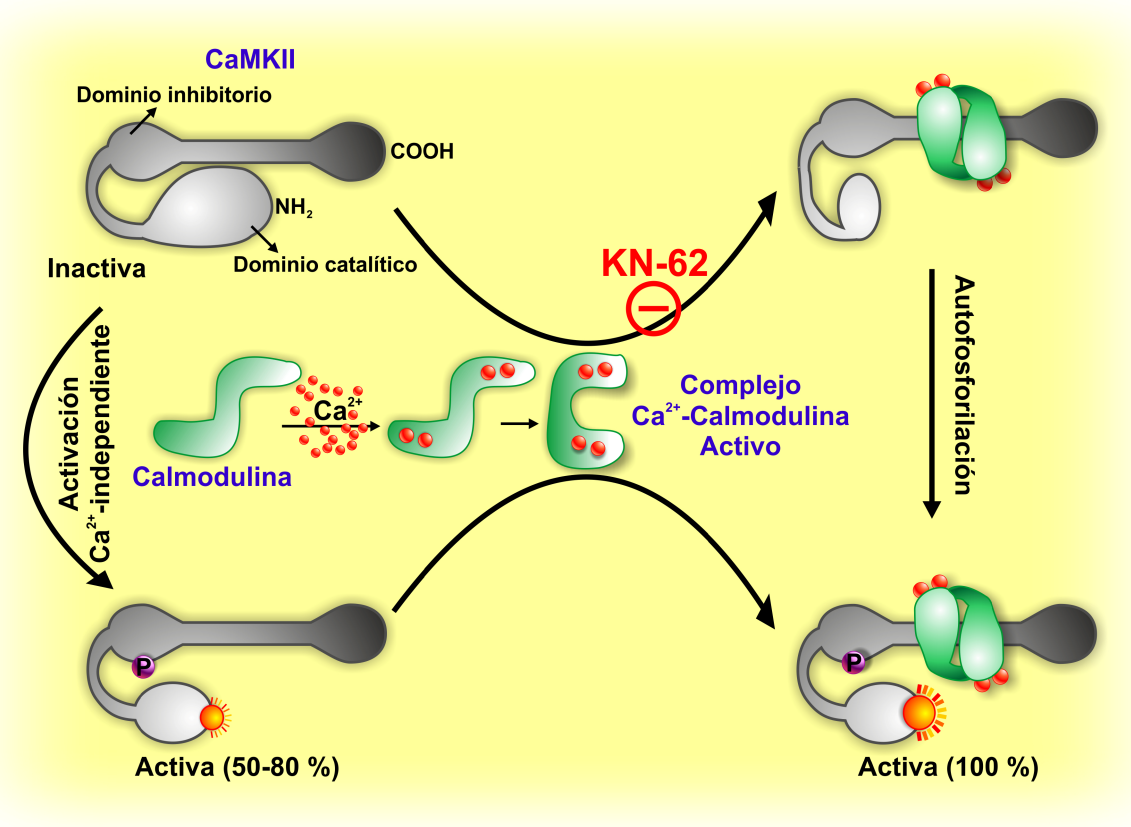


Figura 1-75. Mecanismo de acción del KN-62 sobre la CaMKII. El esquema muestra los pasos hacia la activación de la CaMKII, mediante procesos dependientes o independientes del incremento de los niveles del Ca^{2+} intracelular. Tal como se muestra en la figura, el KN-62 afecta la activación de la enzima al competir con la calmodulina por su sitio de unión.

- **KN-62 y A23187:**

Determinamos en primera instancia si el KN-62 (10 µM) afectaba la expresión del AChR, cuando las células CHO-K1/A5 se incubaban con esta droga durante 3 y 18 hs (Figura 1-76, A y B). El único cambio observado por el ensayo de unión de la BTX radiactiva es la disminución del AChR en la superficie celular tras la incubación a tiempos largos, en comparación con la condición control (Figura 1-76B).

La acción del A23187 sobre el AChR, tanto a 3 hs como a 18 hs de incubación, no se encuentra afectada por el co-tratamiento con el inhibidor de la CaMKII (Figura 1-76, A y B), ya que los efectos observados sobre la distribución del AChR serían consecuencia de la sumatoria de los efectos individuales de estas dos drogas sobre el AChR en las células CHO-K1/A5.

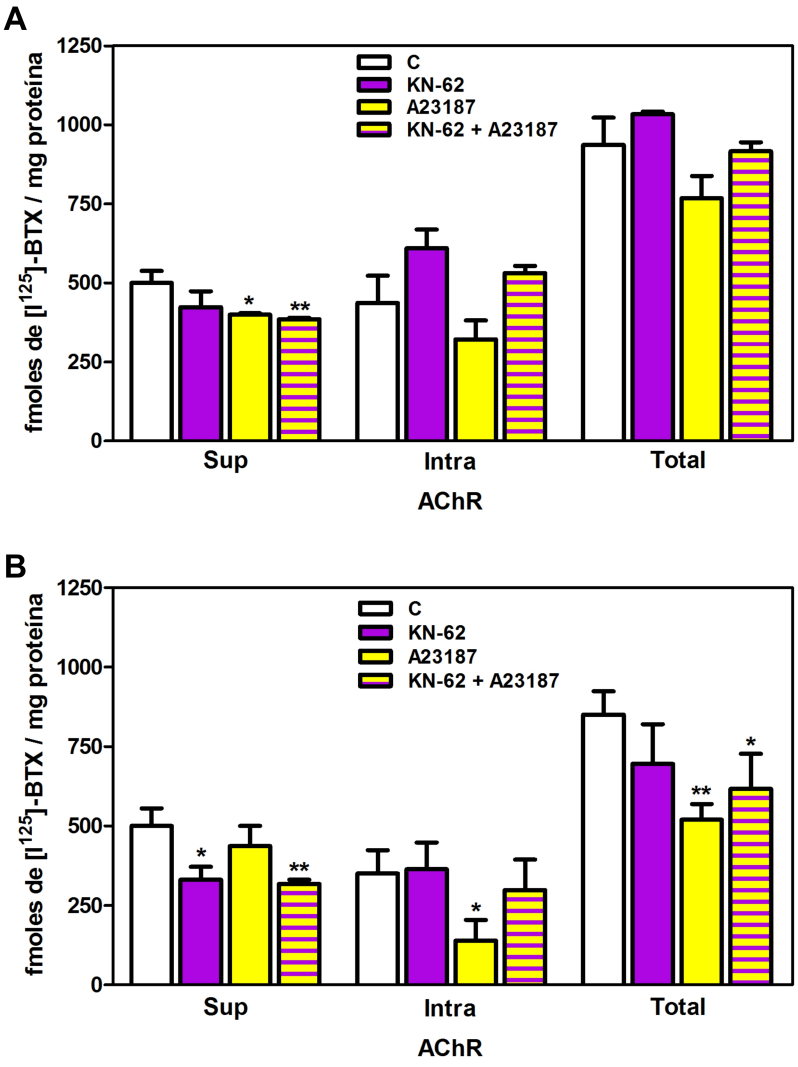


Figura 1-76. Incubación de las células CHO-K1/A5 con KN-62 y A23187. Ensayo de unión de [I^{125}]-BTX tras la incubación con las drogas durante 3 **(A)** y 18 hs **(B)** (n=3). Las barras correspondientes al agregado de A23187 solo, provienen de las figuras 1-40B y 1-43A, para 3 y 18 hs respectivamente. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

- **KN-62 y Thapsi:**

Cuando el incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular es consecuencia del tratamiento con Thapsi, la inhibición de la CaMKII por el KN-62 tampoco afectaría los efectos mediados por el inhibidor de las SERCA a tiempos cortos y largos (Figura 1-77). La resultante de la co-incubación de la drogas es una sumatoria de los efectos individuales, donde prevalece principalmente el efecto de la Thapsi sobre el AChR.

LOS DAG Y EL AChR NEURONAL

Luego del estudio exhaustivo del efecto de los DAG sobre el AChR muscular adulto, quisimos evaluar si los AChR neuronales se encontraban afectados como consecuencia de los efectos de este segundo mensajero lipídico. Para tal fin, realizamos el cultivo primario de neuronas de hipocampo,

estructura ubicada en el lóbulo temporal del cerebro, considerada de vital importancia en los procesos de formación de la memoria y aprendizaje. Estos procesos ampliamente estudiados en el hipocampo se relacionan con la participación del AChR y receptores de acetilcolina muscarínicos, que están involucrados en la modulación de la plasticidad sináptica (Drever B. y col., 2011).

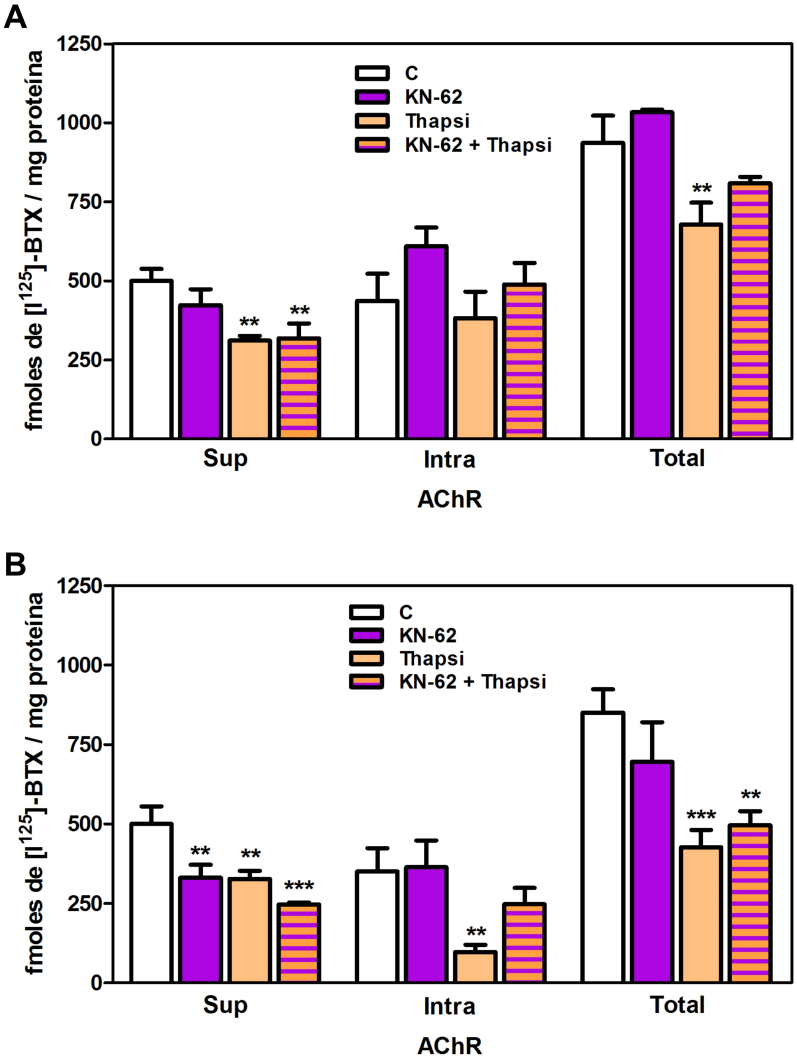


Figura 1-77. Ensayos de unión de [I^{125}]-BTX luego del tratamiento con KN-62 y Thapsi. Las células CHO-K1/A5 se incubaron con las drogas durante 3 **(A)** y 18 hs **(B)** (n=3). Las barras correspondientes al agregado de Thapsi sola, provienen de las figuras 1-49A y 1-52A para 3 y 18 hs, respectivamente. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Los AChR neuronales están compuestos por una combinación pentamérica de subunidades homólogas y genéticamente distintas (α: α2-α10; β: β2-β4). De las diferentes combinaciones de subunidades surgen los distintos AChR neuronales, cada uno con propiedades estructurales y funcionales únicas (Nai Q. y col., 2003). Si bien el AChR-α4β2 es el subtipo de receptor neuronal con mayor distribución en el tejido cerebral (Karlin A., 2002), en el hipocampo predomina el AChR-α7 (Zarei M. y col, 1999). Este

último tiene la particularidad tener la mayor permeabilidad al Ca^{2+} de los AChR (Drever B. y col., 2011), además de presentar gran afinidad de unión por la BTX, a diferencia del resto de los AChR neuronales (Nashmi R. y Lester H., 2006; Whiting P. y Lindstrom J., 1986). El AChR-α7 se encuentra en las porciones pre y postsinápticas de las neuronas piramidales e interneuronas (Drever B. y col., 2011).

Por lo expuesto, nos centramos en el estudio del posible efecto mediado por los DAG sobre el AChR-α7, expresado en forma endógena en neuronas de hipocampo en cultivo.

Comenzamos marcando a las neuronas con BTX fluorescente, para comprobar la presencia del AChR-α7 en nuestros cultivos de 14 días, tal como lo muestra la figura 1-78.

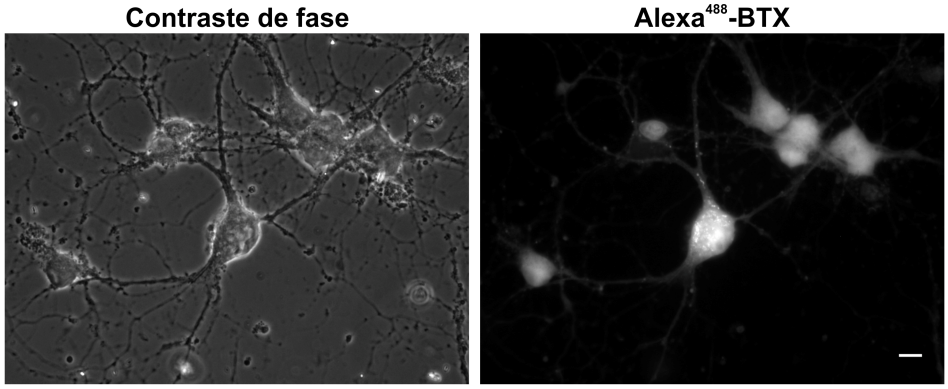


Figura 1-78. Imágenes de neuronas de Hipocampo en cultivo. Luego de 14 días de la siembra en las placas, las neuronas se fijaron con paraformaldehido y a continuación, se tiñeron con Alexa^{488}-BTX durante 3 hs a temperatura ambiente. Escala: 10 μM.

A continuación, cuantificamos el AChR presente en la superficie celular de las neuronas de hipocampo, utilizando para tal fin la [I^{125}]-BTX. Los experimentos se realizaron sobre neuronas en cultivo expuestas a DOG, EF, Thapsi, A23187, Gö 6976 y ROT a cortos y largos tiempos de incubación, reproduciendo las condiciones experimentales utilizadas con las células CHO-K1/A5. Los experimentos realizados con A23187 se descartaron, ya que esta droga afectó la viabilidad neuronal, tanto a tiempos cortos como a tiempos largos (datos no mostrados).

La cuantificación de la unión de la BTX a la superficie de las neuronas en la condición control presentó gran variabilidad entre los experimentos realizados. Su promedio de ligamen, expresado en fmoles de [I^{125}]-BTX/mg de

proteína, fue de 123,2 ± 61,3, motivo por el cual decidimos relativizar la expresión del AChR-α7 respecto del control de cada experimento (C = 100 %).

Iniciamos los estudios de unión de BTX radiactiva a los AChR-α7 de superficie, a tiempos cortos de incubación con las diferentes drogas (Figura 1-79A) y los comparamos con los resultados obtenidos con el AChR muscular en células CHO-K1/A5 (Figura 1-79B). El tratamiento con DOG durante 4 hs, aumenta los niveles del AChR-α7, como también sucede en la línea celular, pero en cambio el EF y la Thapsi no afectan a la cantidad del AChR que llegaba a las membranas plasmáticas de las neuronas. La inhibición de las PKCc con Gö 6976 y de la PKCδ con ROT aumentan los niveles de dicho receptor en la superficie, tal como sucede con la incubación con DOG (Figura 1-79A).

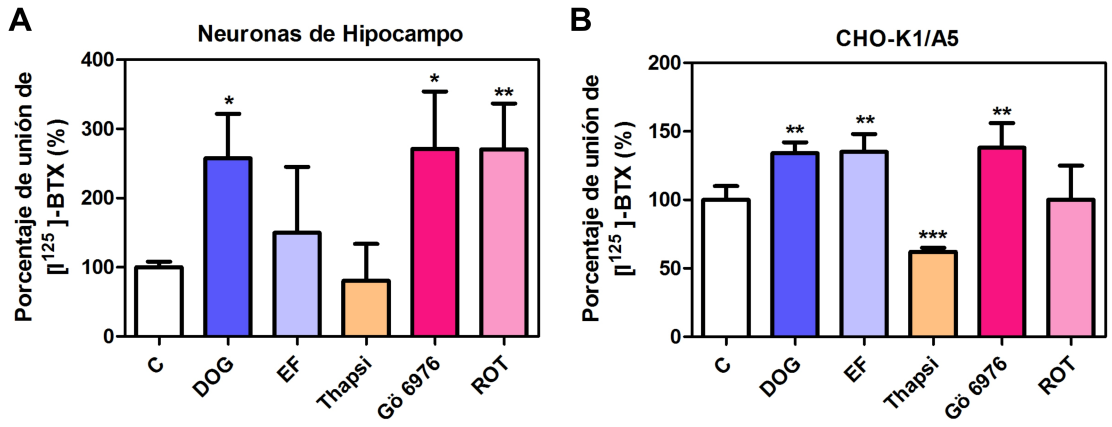


Figura 1-79. Neuronas de Hipocampo expuestas a diferentes drogas durante 3 o 4 hs. A) Ensayo de unión de [I^{125}]-BTX en neuronas de Hipocampo (n=4). **B)** Gráfico comparativo de los tratamientos con las mismas drogas, pero en células CHO-K1/A5. Los datos obtenidos previamente (Figuras 1-12A, 1-18B, 1-49A, 1-57A, y 1-69), fueron convertidos en porcentajes de unión de BTX radiactiva. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Luego realizamos los mismos experimentos, pero incubando las drogas durante 18 hs (Figura 1-80A). El tratamiento con DOG aumenta los niveles del receptor neuronal en la superficie, tal como sucede a las 4 hs de tratamiento (Figura 1-79A). El EF y el Gö 6976 no afectan al AChR-α7 tras 18 hs exposición, mientras que la incubación con Thapsi o ROT reproduce el efecto observado en el AChR muscular (Figura 1-80, A y B).

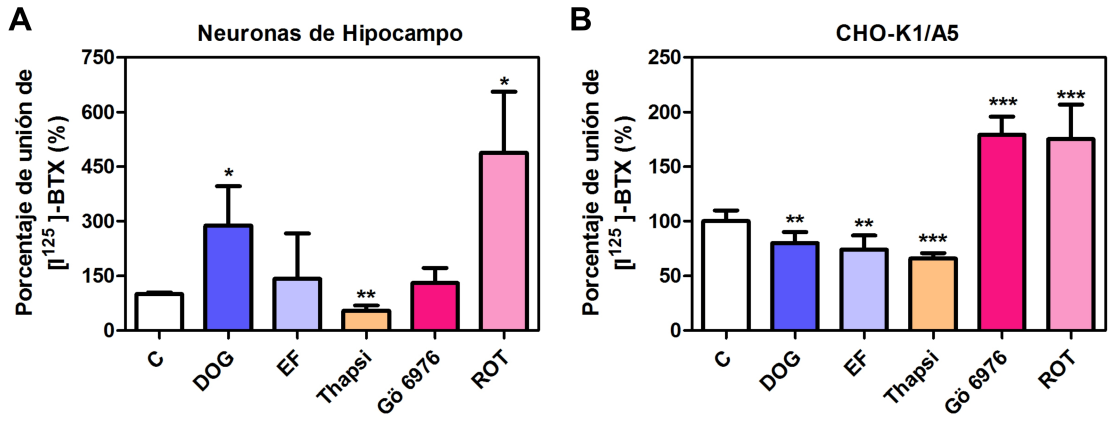


Figura 1-80. 18 hs de tratamiento de neuronas de Hipocampo con diversos compuestos. A) Experimentos de unión de BTX radiactiva en neuronas de Hipocampo luego del tratamiento con las drogas a tiempos largos (n=3). **B)** Histograma comparativo de los tratamientos con las mismas drogas, pero en células CHO-K1/A5. Los datos obtenidos previamente (Figuras 1-13A, 1-21, 1-52A, 1-57B y 1-66A), fueron convertidos en porcentajes de unión de BTX radiactiva. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Con los experimentos realizados sobre el AChR-α7 endógeno (Figuras 1-79 y 1-80), podemos ver que su expresión en la superficie neuronal en respuesta a las diferentes drogas es diferente a lo anteriormente determinado para el AChR muscular en células CHO-K1/A5. Si bien el DOG aumenta la cantidad de AChR-α7 en la membrana plasmática de las neuronas de Hipocampo tanto a 4 como a 18 hs, los mecanismos involucrados serían diferentes a los encontrados para el AChR muscular.

Discusión

Capítulo I

LOS DAG Y EL AChR

El DAG es un segundo mensajero lipídico, indispensable para la señalización intracelular. Las características estructurales de este lípido, como su forma cónica y la ausencia de grupos polares voluminosos, le permiten realizar movimientos del tipo *flip-flop* en la membrana y así favorecer procesos de brote, fusión y fisión de vesículas (Huttner W. y Zimmerberg J., 2001; Lev S., 2006). Además, su capacidad de interaccionar con proteínas que poseen al menos un dominio C1 en sus estructuras aminoacídicas, lo hace mediador de las más variadas funciones celulares (Figura 1-2) (Carrasco S. y Mérida I., 2007; Mérida I. y col., 2010).

La única organela que presenta niveles relativamente estables de este lípido, en ausencia de estímulo, es el complejo de Golgi. En la membrana plasmática, en cambio, los DAG son generados como respuesta a la activación de una cascada de señalización extracelular, y tras cumplir su función de transmisión del mensaje, son rápidamente degradados (Gallegos L. y Newton, 2008; Lev S., 2006).

Existe una amplia evidencia sobre la importancia del entorno lipídico que rodea a esta proteína transmembranal, para un correcto tráfico y funcionamiento de la misma (Roccamo A. y col., 1999; Baier C. y Barrantes F., 2007; Pediconi M. y col., 2004; Gallegos C. y col., 2008; Borroni V. y col., 2007; Borroni V. y Barrantes F., 2011). En este capítulo se estudian los efectos de los DAG sobre el AChR. Además de los potenciales efectos del DAG sobre la síntesis, el ensamble y el tráfico del AChR, ejercidos por el lípido *per se,* evaluamos también los ejercidos a través de la activación de cascadas de señalización intracelulares.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la SM y la ceramida modulan al AChR, y que un correcto balance lipídico es un requisito indispensable para que este receptor alcance su destino final, la membrana plasmática (Baier C. y Barrantes F., 2007; Gallegos C. y col., 2008; Roccamo A. y col., 1999). Considerando que la SM, la ceramida y el DAG están relacionados mediante la reacción catalizada por la enzima SMS (Figura 1-5), ubicada en el complejo de Golgi y en la membrana plasmática, postulamos que los DAG serían también importantes en los procesos necesarios para obtener niveles adecuados de AChR funcional en la superficie celular.

Nuestro modelo experimental se basó principalmente en las células CHO-K1/A5, una línea celular desarrollada por nuestro laboratorio, capaz de expresar de forma heteróloga y estable al AChR muscular adulto ($\alpha 1_2\beta 1\delta\varepsilon$) (Roccamo A. y col., 1999).

Tiempos cortos de incubación

Comenzamos nuestro trabajo con la incubación de las células con POG, un DAG de cadena larga, derivado de la especie de PC mayoritaria en células de mamíferos (Figura 1-6) (Aveldaño M. y Bazán N., 1983). Observamos que el tratamiento con este DAG durante 3 hs aumenta los niveles del AChR en la superficie celular, así como también los del receptor total (Figura 1-7B). Como el POG tiene una composición similar a la encontrada en los lípidos endógenos, es susceptible de ser metabolizado (Chuang M. y Severson D., 1998). Entonces, los resultados obtenidos podrían deberse, no solo la mayor disponibilidad de DAG, sino que también al aumento de sus metabolitos. Por tal motivo, los estudios siguientes se realizaron utilizando un DAG de cadena corta, no sintetizado y metabolizado muy lentamente en células eucariotas, el DOG (Figura 1-8) (Henneberry A. y col., 2001).

Luego de 30 min de exposición con DOG, los niveles del AChR en la membrana plasmática aumentan (Figura 1-9A). Sin embargo estos receptores presentan menor afinidad por la BTX radiactiva (Figura 1-9B). Dado que ni el tratamiento con EF, los cuales imitan la acción del DAG sobre las PKC (Kazanietz M. y col., 2000), ni la incubación con A23187, que favorecería la activación de las PKCc (Oh Y. y col., 2009; Drexler H. y col., 1990), alteran la afinidad del AChR por la BTX (Figura 1-20 y 1-40A), *la disminución de la afinidad no sería consecuencia de la acción del DOG sobre esta vía de señalización*

A su vez, los experimentos de patch-clamp revelaron una disminución del tiempo de estado abierto del canal del AChR como consecuencia del tratamiento con DOG (Figura 1-11). Estos resultados podrían explicarse, considerando que el aumento del DOG en las células CHO-K1/A5, luego de 30 min de incubación, ocurre principalmente en la membrana plasmática. Estudios con membranas modelo han demostrado que la presencia de DAG en la membrana altera sus propiedades biofísicas (Jiménez-Monrea A. y col., 1998; Heimburg T. y col., 1992; Coorssen J. y Rand R., 1990; Das S. y Rand

R., 1986). Dado que el AChR es muy sensible a la composición y al estado de su entorno lipídico (Barrantes F., 2004; Borroni V. y Barrantes F., 2011; Barrantes F., 2010; Borroni V. y col., 2007), podríamos hipotetizar que estas alteraciones disminuyen la funcionalidad del canal y su capacidad de reconocer ligandos, como la BTX. Resultados similares se encontraron en trabajos previos realizados sobre el AChR neuronal, en los cuales se demostró que la aplicación de distintos DAG, entre ellos el DOG, inhibían al canal iónico en forma independiente de la actividad de las PKC (Andoh T. y col., 2004; Andoh T. y col., 2001). Carrillo C. y col. (2012) observaron que el DAG también afectaba la funcionalidad de otros canales iónicos. La incubación con DAG conduce a la apertura de los receptores TRPC3/6, aumentando la entrada de Ca^{2+} en las células Jurkat. Los autores especulan que el DAG se ubicaría en la membrana en las cercanías del canal y modularía así su función.

Luego de 3-4 hs de incubación con DOG, persiste el aumento del AChR en superficie, sin cambios en el receptor intracelular (Figura 1-12 y 1-81). Además, no se observan cambios en los niveles de receptor total a tiempos cortos de incubación con DOG, a diferencia de lo ocurrido con el POG (Figura 1-12, 1-7B). Es decir que, el aumento en la cantidad total de AChR observado luego de la incubación con POG, podría ser causado por el aumento en alguno de los intermediarios lipídicos derivados del DAG, como por ejemplo PA (Xu Y. y col., 1996), que no se forman cuando se incuba con DOG. Entre estos metabolitos, se puede descartar a la PC, ya que ni su aumento, inducido por el bloqueo de la expresión de la proteína Nir2 (Figura 1-33 y 1-35), ni su disminución, provocada por la incubación con GOOH (Figura 1-30, 1-31 y 1-32), alteraran los niveles de AChR total.

El incremento de los DAG endógenos a tiempos cortos produjo cambios en la distribución del AChR similares a los producidos por la incubación con DOG. Tanto la inhibición de las DGK por el R59949 (impidiendo su conversión a PA, Figura 1-22) como la inhibición de la CPT por el GGOH (bloqueando su uso en la síntesis de PC, Figura 1-30), aumentaron los AChR en la superficie celular (Figura 1-23, 1-31 y 1-81). Estas drogas generan DAG a distintos niveles, dependiendo de la localización subcelular de las enzimas involucradas. Por ejemplo, la CPT se encuentra en el complejo de Golgi (Lagace T. y Ridgway N., 2013), y su inhibición incrementa los niveles de DAG en esa organela (Miquel K. y col., 1998). Dentro de las DGK afectadas por el tratamiento con el R59949, se destacan la DGKκ y la DGKα, enzima

constitutiva de la membrana plasmática o que frente a un aumento de DAG se asocian con ella, respectivamente (Shulga Y. y col., 2011). Precisamente en este caso, el aumento de DAG se observa en la membrana plasmática, como lo muestran las imágenes de Dpm1 (Figura 1-25).

Es de destacar entonces, que tanto el tratamiento con DOG por 30 min como por 3-4 hs, resulta en un aumento del AChR en la superficie de las células CHO-K1/A5. Lo mismo ocurre cuando se generan DAG endógenos en la membrana plasmática (R59949) o en el complejo de Golgi (GGOH) (Figura 1-81). En cambio, el aumento de DAG en ambas membranas simultáneamente, cómo ocurre tras la co-incubación del DOG con el R59949, lleva a un mayor incremento de los AChR de superficie, con una disminución estadísticamente significativa del receptor intracelular, sin encontrarse alterados los niveles totales de dicha proteína (Figura 1-23 y 1-24). Además, la visualización de los AChR en el interior celular, por la unión de BTX fluorescentes, demostró una marcación más puntiforme, que podría estar relacionada con un mayor tráfico del receptor hacia la superficie celular (Figuras 1-24, R59949 + DOG). Esto indicaría que *los mecanismos a través de los cuales los DAG ejercen su efecto sobre el AChR dependerían del lugar donde se produzca el incremento del lípido.*

Tiempos largos de incubación

Cuando el tratamiento con DOG se prolonga durante 18 hs, se observa una disminución de los niveles de receptor en la superficie celular con el aumento concomitante de los niveles intracelulares, sin alterarse la cantidad de AChR total (Figura 1-13A y 1-81). Si bien estos cambios se mantienen tras 24 hs de incubación, a partir de las 48 hs de tratamiento con el lípido, los niveles de AChR retornan a valores normales (Figura 1-14A). Los efectos observados a tiempos largos, serían compatibles con un aumento en la velocidad de internalización y/o una disminución en la inserción en la membrana plasmática del AChR. Es de destacar que no hay estimulación neta de la degradación, ni de la síntesis del AChR, ya que los niveles de AChR total no cambian luego de la incubación con DOG (Figura 1-13A y 1-14A).

A diferencia del tratamiento a tiempos cortos, la inhibición durante 18 hs de la CPT por el GGOH no afecta la expresión del AChR (Figura 1-32). La ausencia de efecto puede deberse a que el incremento del DAG como

consecuencia del tratamiento GGOH lleva a la producción de moléculas de DAG endógenas, capaces de ser metabolizadas por diversas vías enzimáticas, a diferencia de lo que sucede con el DOG.

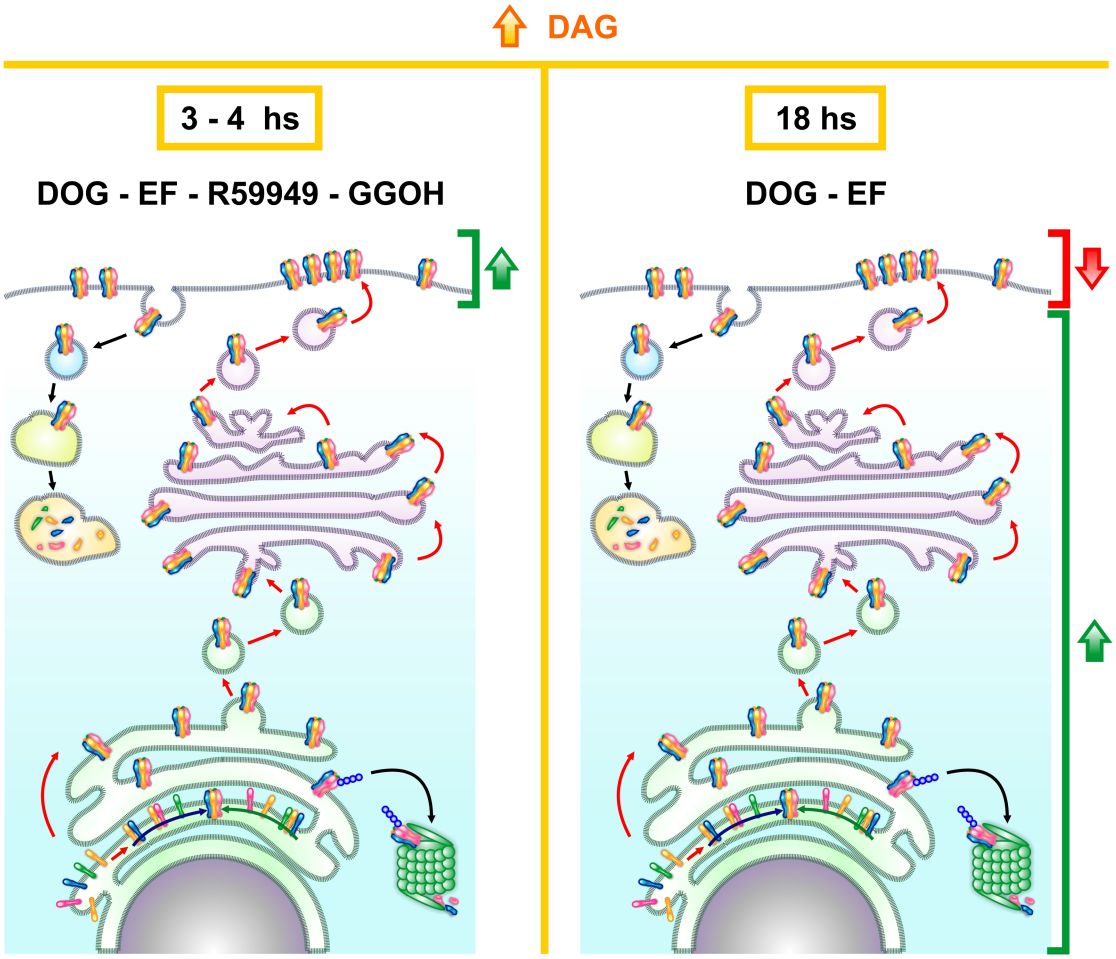


Figura 1-81. El DAG modula de manera diferencial al AChR dependiendo del tiempo de incubación. Esquema de los efectos sobre los AChR intracelulares y de membrana plasmática tras el incremento de los DAG por diferentes tratamientos. En el panel de la izquierda, se observa el aumento del AChR en superficie a tiempos cortos como consecuencia del efecto de las drogas indicadas. El panel derecho, tiempos largos, muestra el efecto opuesto: disminución del AChR de superficie, tras el tratamiento con DOG o EF, y aumento de estos receptores intracelulares. Se remite al lector a la Figura 8 para la descripción más detallada de esta figura.

Las consecuencias sobre la distribución del AChR a los distintos tiempos de tratamiento se corresponden con una localización subcelular diferencial del DOG a lo largo del tiempo, como lo demuestran las imágenes de Dem1, Dpm y gotas lipídicas (Figura 1-15, 1-25 y 1-16, respectivamente). Las Dpm1 no evidenciaron un aumento en los DAG en la membrana plasmática tras 4 hs de incubación con DOG (Figura 1-25B). Sin embargo, las Dem1 demostraron la presencia de DOG en RE y/o Golgi a tiempos cortos (4 hs),

pero no tras 18 hs de tratamiento (Figura 1-15). Por otra parte, el Rojo Nilo mostró la acumulación del DOG en gotas lipídicas, *per se* o posiblemente metabolizado hacia TAG, solamente a tiempos largos de incubación (Figura 1-16, 18 hs). Es decir que *el DOG, una vez que ingresa a las células CHO-K1/A5 a través de la membrana plasmática, se acumula en el aparato de Golgi y/o RE a las 4 hs y luego es almacenado en gotas lipídicas, en donde se encontraría a las 18 hs. Sin embargo, no podemos descartar la presencia de pequeñas cantidades de DOG en las diversas membranas celulares, capaces de gatillar mecanismos de señalización, pero no detectadas por las metodologías empleadas.*

LOS DAG Y LAS PROTEÍNAS QUINASAS

La acción del DOG sobre la distribución del AChR es reproducida tanto a 3 hs (Figura 1-18B y 1-81) como a 18 hs por el tratamiento con EF (Figura 1-21 y 1-81), un análogo del DAG por su capacidad de unirse a los dominios C1 de las proteínas que responden a este segundo mensajero lipídico (Figura 1-2). A su vez, la utilización de un análogo inactivo, incapaz de gatillar mecanismos de señalización al interaccionar con los dominios proteicos C1, EF-, no afecta la distribución del AChR (Figura 1-18B). Estos resultados indicarían que *la interacción de los DAG con el dominio C1 sería indispensable para la modulación de la distribución celular del AChR en las células CHO-K1/A5 a 3-4 hs y a 18 hs.* Es decir, que el DAG estaría actuando como segundo mensajero para producir los efectos observados sobre el AChR. Por lo tanto, para elucidar el mecanismo molecular involucrado, nos centramos en el estudio de dos familias de proteínas quinasas dependientes del DAG para su activación, las PKC (PKCc y PKCn) y las PKD (Antal C. y Newton A, 2013; Wu-Zhang A. y Newton A., 2013; Lipp P. y Reither G., 2011; Newton A., 2009; Gallegos L. y Newton A, 2008; Rozengurt E., 2010; Young S. y col., 2012; Zeng L. y col., 2012).

En la interpretación de los datos obtenidos, es de suma importancia tener presente cómo es el mecanismo de activación de cada grupo de quinasas. La determinación de los niveles de PKD fosforiladas es indicativo de su activación (Figura 1-4) (Young S. y col., 2012), situación que no ocurre para las PKC, ya sean PKCc (Figura 1-3) o PKCn (Newton A., 2009). Esto hace indispensable conocer entonces cómo es el proceso de

fosforilación/desfosforilación de las PKC (Ver más detalles en la Introducción del capítulo I; Figura 1-3).

Tiempos cortos de incubación

La inhibición de las PKCc mediante el Gö 6976, altera la distribución del AChR en las células CHO-K1/A5 a tiempos cortos de tratamiento, incrementando los niveles del receptor de superficie (Figura 1-60A). Dicho inhibidor, no afecta al ensamblado del AChR (Figura 1-59), ni a los niveles de AChR intracelular (Figura 1-60A), por lo cual *la función de las PKCc no estaría involucrada en la llegada del AChR a la membrana, pero si en su internalización*. El aumento de los AChR presentes en la membrana celular, sucede también al co-incubar el DOG con el Gö 6976 (Figura 1-60A), indicando una posible saturación del efecto de la inhibición de las PKCc sobre la localización del AChR.

Los niveles de las PKCc fosforiladas no se afectan luego del tratamiento con Gö 6976 o con DOG durante 3 hs (Figura 1-63). Sin embargo, se puede observar una tendencia a la disminución de la población fosforilada de las enzimas luego la incubación con DOG, que se hizo significativa tras la co-incubación del DOG con Gö 6976 (Figura 1-63, A y C). Estos resultados indicarían que la inhibición de las PKCc por el DOG en las células CHO-K1/A5 podría ser mediada por la intervención de este lípido en el proceso de desfosforilación de las enzimas. En su conformación activa, las PKCc se anclan a las membranas por su interacción con PS y DAG, adoptando una estructura abierta, el blanco oportuno de las fosfatasas (Figura 1-3). La desfosforilación afecta al extremo C-terminal de las PKC, primero en su sitio hidrofóbico y a continuación en su sitio de giro (detectado por los anticuerpos utilizados).

Con la evidencia experimental, podemos concluir que el *DOG a tiempos cortos inhibiría a las PKCc* (Figura 1-60A) *al favorecer su desfosforilación* (Figura 1-63)*, no pudiendo desencadenar entonces la señalización corriente abajo en presencia de los cofactores que la activan*, como el mismo DOG, y este efecto se traduciría en el *aumento del AChR en la superficie* (Figura 1-12) *de las células CHO-K1/A5* (Figura 1-82).

Estudios realizados sobre los AChR presentes en la UNM, demostraron que estos receptores se ven afectados por la inhibición de las PKC con

calfostin C. Los niveles del AChR en las membranas postsinápticas aumentaban como consecuencia de la disminución de la internalización y del aumento del reciclado de los receptores previamente internalizados (Martinez-Pena y Valenzuela I. y col., 2013). El proceso de reciclado, tanto en músculos denervados (Bruneau E. y Akaaboune M., 2006; Martinez-Pena y Valenzuela I. y col., 2010) como en células CHO-K1/A5 (Kumari S. y col., 2008), no contribuye significativamente a sostener los niveles de AChR en superficie. Dado que, la inhibición selectiva de la PKCδ durante 4 hs no afecta el patrón de expresión del AChR (Figura 1-69), como sí lo hace la inhibición de las PKCc, serían estas últimas las que regularían la internalización del AChR en las células CHO-K1/A5 a tiempos cortos de tratamiento (Figura 1-82). Por lo tanto, *el aumento del AChR en la superficie celular, estaría relacionado en parte con una disminución de la internalización del receptor, producto de la inhibición por la exposición al DOG de las PKCc.*

Las PKD no se encuentran activas en las células CHO-K1/A5 en ausencia de estímulo (Figura 1-72), y su inhibición farmacológica no afecta a la distribución ni a la cantidad del AChR, a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 1-73). Esto indicaría que *en condiciones basales, la PKD no está específicamente involucrada en la llegada de los AChR a la superficie celular en las células CHO-K1/A5.* No obstante, luego del tratamiento con DOG durante 4 hs, aumenta la cantidad de esta enzima fosforilada, indicando por lo tanto su activación (Figura 1-74, 4 hs). Además, el bloqueo de la expresión de Nir2, con la consecuente disminución de los niveles de PKD (Figura 1-36, A y B), provoca que el AChR quede retenido en el interior celular (Figura 1-34).

El reclutamiento de proteínas citosólicas es el proceso limitante de la biogénesis de vesículas transportadoras en la TGN. Estas proteínas se encargan de desencadenar cascadas de señalización para transformar las membranas de Golgi con baja curvatura, en estructuras altamente curvadas (Bankaitis V. y col., 2002). En este proceso, el DAG es esencial para el anclaje de la PKD a la TGN (Figura 1-4). La unión de la PKD a la TGN regula la fisión de vesículas transportadoras, encargadas del traslado de proteínas hacia la superficie celular (Baron C. y Malhotra V., 2002; Malhotra V. y Campelo F., 2011). En nuestro sistema, todos los tratamientos que elevan los niveles de DAG en Golgi (DOG, EF y DOG + R59949, durante 4 hs), resultaron en un incremento de la llegada de la proteína VSVG-EGFP a la membrana plasmática (Figura 1-26). Esto sugiere que *la activación de la PKD, por el*

agregado de DOG, contribuiría en forma inespecífica al incremento de los niveles de AChR en la superficie de las células CHO-K1/A5, a tiempos cortos.

La activación de las PKD no solo es dependiente de la unión al DAG, sino que requiere también de la fosforilación por una PKCn (Figura 1-4) (Young S. y col., 2012; Rozengurt E., 2010; Sinnett-Smith J. y col., 2009; Sinnett-Smith J. y col., 2011; Matthews S. y col., 1999). Está demostrado que, dentro de esta familia de enzimas, la PKCη (Díaz Añel A. y Malhotra V., 2005) y la PKCδ (Storz P. y col., 2004) son las encargadas de la fosforilación de la PKD. La inhibición de la PKD o de la PKCη, inhibe la fisión de vesículas en Golgi, pero no afecta los procesos de empaquetado proteico previos al brote vesicular (Díaz Añel A. y Malhotra V., 2005).

Luego de la incubación con DOG por 4 hs, los niveles totales de las PKCn (PKCδ y PKCη), no se modifican (Figura 1-68, A y B; 1-70). Sin embargo, mientras que el tratamiento con DOG lleva a un descenso de la fosforilación de la PKCδ (Figura Figura 1-68, A y C), la de la PKCη no se encuentra afectada (Figura 1-70). Esto indicaría que *la PKCη está disponible para ser activada en presencia del DOG, fosforilar y activar a la PKD, estimulando entonces la salida de proteínas de la TGN* (Figura 1-82).

En resumen, los resultados obtenidos en las células CHO-K1/A5 muestran que el *efecto producido por el DOG a tiempos cortos involucra tanto a las PKCc, como a la PKD* (Figura 1-82). No obstante, *los niveles de AChR intracelulares no cambian significativamente por la sola incubación con DOG, sino que requieren la presencia de un estímulo mayor* (Figura 1-23 y 1-24, R59949 + DOG). Además, *la inhibición de las PKCc por Gö 6976, desencadena el mismo efecto máximo que el tratamiento con DOG* (Figura 1-60A), *mientras la inhibición farmacológica de la PKCδ o de la PKD, no produce efecto sobre la distribución del AChR a tiempos cortos* (Figuras 1-69 y 1-73A). Por lo tanto, *la inhibición de la internalización del AChR gatillada por la inhibición de las PKCc al favorecer su desfosforilación, sería el mecanismo principal por el cual el DOG ejercería su efecto, a tiempos cortos de incubación en las células CHO-K1/A5* (Figura 1-82).

Tiempos largos de incubación

La incubación prolongada con DOG (18 hs) modifica la distribución del AChR (Figura 1-13A y 1-81), respecto a la obtenida tras el tratamiento a corto

plazo (Figura 1-12 y 1-81). Se observa una disminución del AChR en superficie, y un aumento del AChR intracelular (Figura 1-13A). Como ya mencionamos, luego de 18 hs, el DOG se encuentra principalmente en gotas lipídicas (Figura 1-16 y 1-83). Sin embargo, podrían existir pequeñas cantidades del lípido en las diferentes membranas, no detectables por las proteínas Daglas, capaces de iniciar cascadas de señalización y afectar de esta forma al AChR (Figura 1-83).

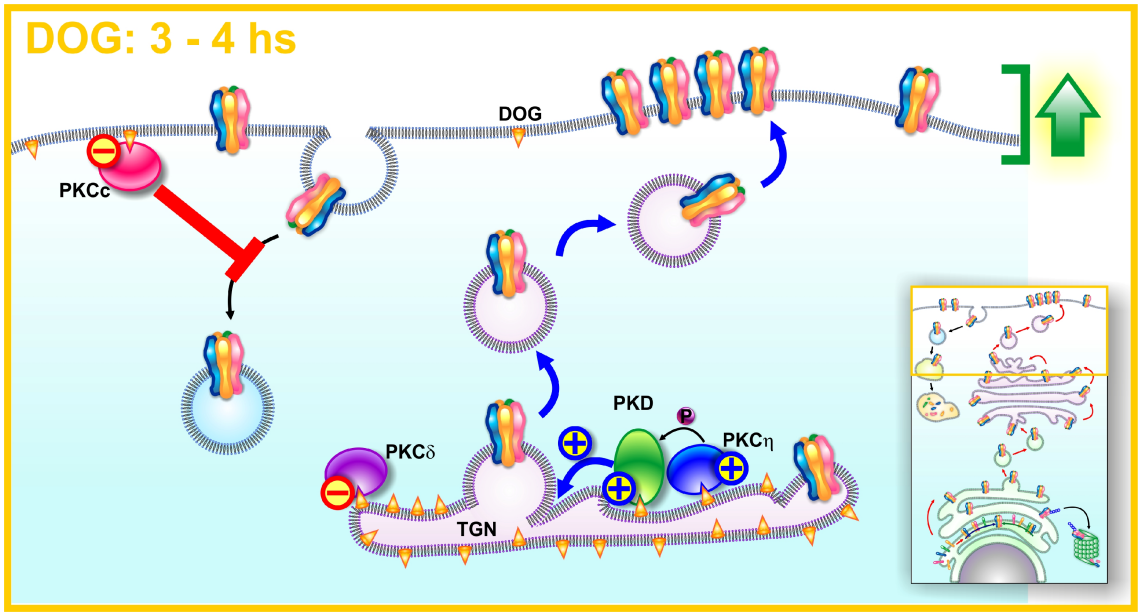


Figura 1-82. Mecanismos de transducción de señales gatillados por la incubación con DOG a tiempos cortos. La localización de las PKCc y las PKCn se corresponde a la acción de cada grupo enzimático en respuesta al incremento de DAG, tal como lo indica Newton A., 2010.

A diferencia de lo que ocurre a tiempos cortos, la inhibición de las PKCc mediada por Gö 6976 impide que el DOG ejerza su efecto sobre la distribución del AChR tras 18 hs de incubación (Figura 1-60B). Además, el tratamiento con Gö 6976, no solo aumentó los AChR de superficie, sino también los niveles totales del receptor en las células CHO-K1/A5 (Figura 1-57B) sin encontrarse afectado su ensamblado (Figura 1-59). Se incrementa entonces el efecto ejercido por el inhibidor sobre el AChR a tiempos cortos (1-57A). Estos resultados indicarían que *la activación de las PKCc mediaría la acción del DOG a tiempos largos* (Figura 1-83). En efecto, la fosforilación relativa de las PKCc aumenta, demostrando que hay más enzimas catalíticamente maduras listas

para ser activadas por el DOG, aunque los niveles totales de PKCβ disminuyen (Figura 1-64).

La acción del DOG sobre las PKCc coincide completamente con los datos aportados en la bibliografía sobre la exposición prolongada a los EF (Newton A., 2009; Gould C. y col., 2008; Santiskulvong C. y Rozengurt E., 2007; Rucci N. y col. 2005; Leontieva O. y Black J., 2004; Junoy B. y col., 2002; Liu W. y Heckman C., 1998; Parker P. y col., 1995). Estos análogos del DAG, tras promover la desfosforilación de las PKC (como el DOG a tiempos cortos; Figura 1-63, A y C), llevan a la disminución de los niveles totales de estas enzimas, favoreciendo el proceso de degradación (como el DOG a tiempos largos; Figura 1-64, A y B). No obstante, frente a la exposición prolongada con EF (y en este caso particular, con DOG), la fosforilación de las enzimas puede recuperarse (Figura 1-64, A y C), mediante la acción de proteínas chaperonas capaces de rescatar a las PKC de su degradación al promover su refosforilación (Gao T. y Newton. A, 2006; Newton A., 2010).

El tratamiento con ROT durante 18 hs, aumenta los niveles de AChR en superficie y disminuye los de receptor intracelular (Figura 1-65A), reduciendo también los niveles de pPKCδ (Figura 1-67, A y C). Por el contrario, los niveles de PKCδ total y fosforilada, no cambian luego del tratamiento con DOG durante 18 hs (Figura 1-67), respecto de los encontrados en células control, lo que indicaría que está perdiéndose la inhibición provocada por el DOG a 4 hs (Figura 1-68). Además, el efecto del DOG sobre la distribución del AChR es bloqueado por la ROT (Figura 1-65A) y esto fue coincidente con una disminución en la fosforilación de la PKCδ, causada por la presencia del inhibidor (Figura 1-67, A y C). Estos experimentos sugieren entonces que *la activación de la PKCδ también contribuye al accionar del DOG sobre el AChR en las células CHO-K1/A5 a tiempos largos* (Figura 1-83).

A las 18 hs, al igual que a tiempos cortos, aumenta la fosforilación de la PKD como consecuencia de la incubación con DOG, pero en menor magnitud (Figura 1-74, 18 hs). Como ya mencionáramos, la activación de esta enzima requiere de la fosforilación previa de una PKCn y la presencia de DAG (Young S. y col., 2012; Rozengurt E., 2010; Sinnett-Smith J. y col., 2009; Sinnett-Smith J. y col., 2011; Matthews S. y col., 1999). En las células CHO-K1/A5 tratadas con DOG durante 18 hs, la PKD podría ser fosforilada por la PKCδ (Storz P. y col., 2004) y/o la PKCη (Díaz Añel A. y Malhotra V., 2005) (Figura 1-83), ya que ambas enzimas se encuentran catalíticamente maduras para ser

activadas por el DOG (Figura 1-67 y 1-70, respectivamente). Sin embargo, los niveles de DOG en el complejo de Golgi a 18 hs son menores que a 4 hs (Figura 1-15B), lo que explicaría una menor activación de la PKD a tiempos largos de incubación. Además, la inhibición de la PKD por el CID755673 durante 18 hs no afecta la distribución del AChR (Figura 1-73B). Por lo tanto, *la activación de PKD no sería el mecanismo principal mediado por el DOG para producir cambios en el patrón de expresión del AChR en las células CHO-K1/A5* (Figura 1-83).

Los resultados correspondientes a las PKCc y las PKCn estudiadas en este capítulo, indican que el DOG podría ejercer su efecto a tiempos largos mediante la activación de estas PKC. Estos resultados son coincidentes con los estudios del AChR en la UNM (Martinez-Pena y Valenzuela I. y col., 2013) y en cultivos primarios de miotubos (Lanuza M. y col., 2000; Nelson P. y col., 2003), donde el estímulo de las PKC por EF favorece la eliminación del receptor de las membranas postsinápticas. Se conoce que las subunidades α y δ del AChR son fosforiladas por las PKC (Changeux JP. y col., 1984; Nimnual A. y col., 1998; Lanuza M. y col., 2006; Martinez-Pena y Valenzuela I. y col., 2013) y esta fosforilación promueve la liberación del receptor de su anclaje a proteínas que lo fijan en la membrana (Nimnual A. y col., 1998; Lanuza M. y col., 2000; Lanuza M. y col., 2006). Esto conlleva a la dispersión de los clústeres de AChR y el consiguiente detrimento de la eficacia sináptica (Lanuza M. y col., 2000).

En la búsqueda de las isoformas de PKC involucradas en estos efectos sobre el AChR, se descubrió que en los ratones deficientes en la expresión de la PKCθ, una PKCn expresada en la UNM y en los linfocitos T, hay un retraso en la maduración de la UNM, coincidente con una disminución en la fosforilación de la subunidad δ del AChR (Lanuza M. y col., 2010). Esto es atribuido a fallas en el proceso de eliminación sináptica, que se inicia con la dispersión del AChR en las membranas postsináticas (Lanuza M. y col., 2010).

En conclusión, en nuestro sistema de estudio, *el estímulo con DOG a tiempos largos (18 hs) de las distintas PKC estudiadas, favorecería la internalización del AChR. Estos efectos llevarían a una disminución del AChR en la membrana y a un concomitante aumento en los niveles del receptor en el compartimento intracelular* (Figura 1-83).

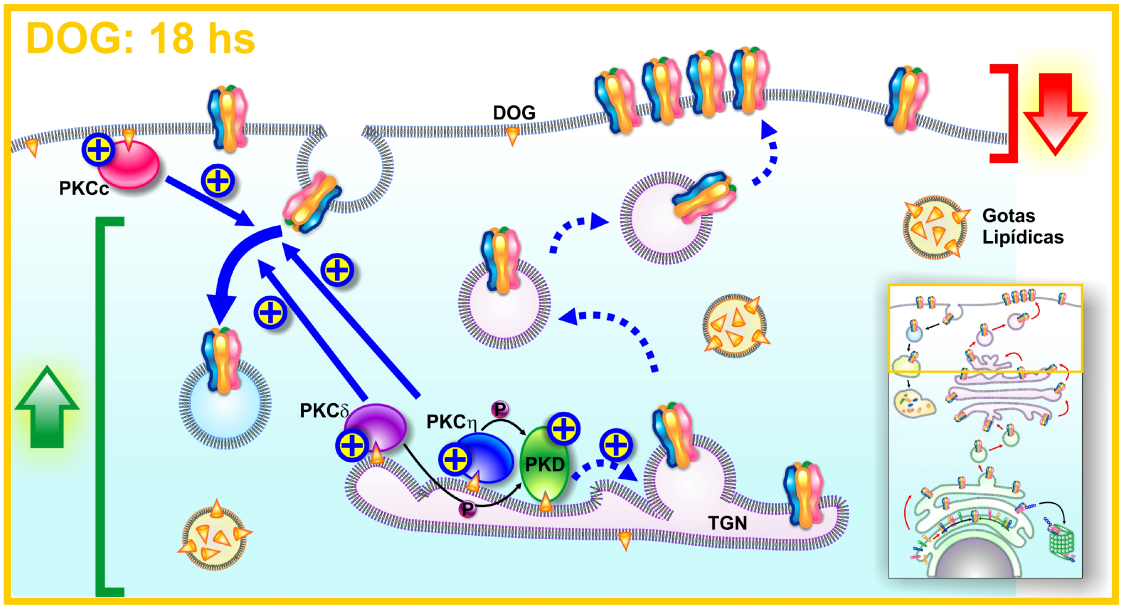


Figura 1-83. El DOG a tiempos largos de incubación y los mecanismos de señalización involucrados. La localización de las PKCc y las PKCn se corresponde a la acción de cada grupo enzimático en respuesta al incremento de DAG, tal como lo indica Newton A., 2010.

EL Ca^{2+} Y EL AChR

Tanto el A23187 como la Thapsi generan incremento del Ca^{2+} citoplasmático, aunque lo hacen por mecanismos diferentes. El A23187 es un ionóforo que permite la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular (Figura 1-39) (Verma A. y col., 2011; Zmijewski M. y col., 1983; Chaney M. y col., 1974; Reed P. y Lardy H., 1972), mientras la Thapsi inhibe la recaptación de Ca^{2+} por el RE (Figura 1-47) (Rasmussen U. y col., 1978; Inesi G. y col., 2005; Michelangeli F. y East J., 2011).

El tratamiento de las células CHO-K1/A5 con A23187 (Figura 1-40B y 1-41) o con Thapsi (Figura 1-49A y 1-50) durante 3 hs, disminuye los niveles del AChR, tanto en la superficie como en el compartimento intracelular. A su vez, con el incremento intracelular de Ca^{2+} se observan niveles mayores de PKCβ (Figura 1-63, A y B), y también de su fracción fosforilada (Figura 1-63, A y C, Thapsi). Tal como se observa en la figura 1-3, la unión del Ca^{2+} a las PKCc es indispensable para la translocación de las enzimas hacia la membrana plasmática, para ser finalmente activadas. Por lo que una mayor población enzimática a causa del incremento del Ca^{2+} intracelular, indicaría una mayor probabilidad de activación de las PKCc. Esta activación mediada por el Ca^{2+},

estaría relacionada no solo con su unión directa a las PKCc, sino que también generaría el estímulo directo/indirecto a enzimas como la PLD, que llevan a la formación de DAG en las membranas (Gonzalez-García J. y col., 2013), ya sea plásmática (Kunkel M. y col., 2007) o del complejo de Golgi (Kunkel M. and Newton A., 2010). De esta forma el incremento de Ca^{2+} también activaría a las PKCn.

Dado que el DOG agregado durante 3 hs funciona como un inhibidor de las PKCc (Figura 1-82), es esperable entonces que el incremento de Ca^{2+} y el tratamiento con DOG no produzcan el mismo efecto sobre la distribución del AChR. La co-incubación del DOG con A23187 (Figura 1-42) altera la distribución del AChR de manera diferencial a lo observado con la incubación de las drogas por separado. Además, el DOG en presencia de Thapsi (Figura 1-51) a tiempos cortos no afecta la distribución del AChR respecto del control. Estos resultados *reafirman la efectiva inhibición de las PKC en los efectos mediados por el DOG, ya que su co-incubación con drogas que aumentan los niveles de* Ca^{2+} *intracelular, se contraponen a los efectos del lípido sobre las PKCc a tiempos cortos.*

Estudios previos realizados por Macpherson P. y col. (2002) demostraron que el tratamiento a tiempos largos con A23187 o Thapsi, suprime la expresión de genes del AChR por un mecanismo independiente de PKC, que involucra a la miogenina, un factor de transcripción específico de músculo. Nuestro sistema experimental no expresaría este factor, ya que las células CHO-K1/A5 no son de origen muscular, por lo cual la regulación de la expresión del AChR no ocurriría por este mecanismo. Sin embargo tanto la Thapsi como el A23187 causan stress en el RE (Kuda O. y col., 2011; Morris J. y col., 1997), por lo cual se explicarían los efectos de *menor ensamblado del AChR* (Figura 1-45 y 1-54), la disminución del AChR total (Figura 1-43A y 1-52A), y el decaimiento de la cantidad de proteínas y de células por placa (Figura 1-43B y 1-52B), observados tras 18 hs de incubación. Como consecuencia, también disminuyen los niveles de AChR en superficie y en el interior celular (Figura 1-43A, 1-44, 1-52A y 1-53).

Luego de 18 hs de exposición a A23187 o Thapsi, disminuye la fosforilación de las PKCc (Figura 1-64, A y C), lo que sugiere una inhibición de la enzima por desfosforilación, como consecuencia del incremento prologado y sostenido del Ca^{2+} intracelular. Este mismo efecto sobre la fosforilación de las PKCc se observó tras el tratamiento prolongado con el inhibidor de las PKCc,

Gö 6976 (Figura 1-64, A y C). Sin embargo, el co-tratamiento del Gö 6976 con A23187 o con Thapsi, muestra que el incremento prolongado de Ca^{2+} bloquea la acción del inhibidor sobre el AChR (Figura 1-61A y 1-62). Estos resultados indicarían que *si bien el A23187 y la Thapsi inhiben a las PKCc tras 18 hs de incubación en las células CHO-K1/A5, esta inhibición no sería la causa de los efectos observados sobre la distribución y expresión del AChR*.

Por otra parte, el co-tratamiento de las células CHO-K1/A5 durante 18 hs con DOG, que a este tiempo activa a las PKC (Figura 1-83), y A23187 (Figura 1-46) o Thapsi (Figura 1-55), produce una sumatoria de los efectos individuales de cada droga.

Otro de los efectores activados por el incremento de Ca^{2+} intracelular es la CaMKII. Sin embargo, la inhibición de esta enzima mediante el tratamiento con KN-62 (Figura 1-75), no bloquea la acción del A23187 ni de la Thapsi sobre la distribución del AChR, ni tiempos cortos ni a tiempos largos (Figura 1-76 y 1-77). Estos resultados indicarían entonces que *la CaMKII no estaría involucrada en los efectos mediados por el Ca^{2+} sobre el AChR*.

Todos los resultados recopilados demostrarían *la participación de las PKCc en los efectos mediados por el Ca^{2+} sobre la distribución/expresión del AChR, principalmente a tiempos cortos de tratamiento en las células CHO-K1/A5.*

CONCLUSIÓN GENERAL

En resumen, en este capítulo determinamos que los DAG, actuando sobre las PKCc, las PKCn y la PKD, ejercen efectos diferenciales sobre la distribución del AChR muscular en las células CHO-K1/A5 según el tiempo estudiado y la localización subcelular de los acúmulos de este lípido. Por un lado, la *inhibición de la internalización* del AChR gatillada por la inhibición de las PKCc sería el mecanismo principal por el cual *el DOG favorecería el aumento del AChR en superficie celular*, a tiempos cortos de incubación. Por otro lado, el estímulo con DOG de las distintas PKC (tanto PKCc como PKCn) a tiempos largos, *favorecería la internalización del AChR, disminuyendo el receptor presente en la membrana y llevaría al concomitante aumento observado en los niveles del AChR en el compartimento intracelular*.

Capítulo II:

EL AChR Y

LOS DOMINIOS LIPÍDICOS

Introducción

Capítulo II

LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Composición

La membrana plasmática es una entidad dinámica que funciona como barrera de separación de los ambientes externos e internos de la célula, además de ser una estructura celular encargada de controlar los más variados procesos biológicos (Head B. y col., 2014). Es el punto de encuentro de lípidos y proteínas, estructuras involucradas en los diferentes mecanismos regulados por las membranas, a partir de la segregación lateral de sus componentes de manera no aleatoria (Escribá P. y col., 2008; Lingwood D. y Simons K., 2010).

Los fosfolípidos, los esfingolípidos y los esteroles, en particular el colesterol (Col), son los ingredientes lipídicos indispensables de las membranas celulares eucariotas. Las características anfifílicas de los fosfolípidos les permiten la formación espontánea de bicapas lipídicas cuando se disuelven en agua, donde la cola hidrocarbonada se aísla del contacto con la fase acuosa (Figura 2-1) (Komura S. y Andelman D., 2014). La presencia de esteroles y esfingolípidos aumenta la complejidad de las membranas, y las diferencia de las bicapas lipídicas presentes en células procariotas. Además, el Col contribuye a las membranas aportando mayor rigidez y aumentando el espesor de las mismas (Head B. y col., 2014).

Es importante destacar que en las biomembranas de las células eucariotas, cada monocapa tiene una composición lipídica diferencial, que le provee una asimetría única y esencial para el desarrollo de las funciones biológicas. Por ejemplo, en la capa externa de la membrana plasmática predomina la presencia de PC y de SM, mientras que la cara interna se encuentra enriquecida en PE y en PS (Figura 2-1). Esta diversidad en la composición de los fosfolípidos logra mantenerse por diferentes procesos, tales como el intercambio de lípidos entre membranas denominado *flip-flop* (Figura 2-1) (Zachowski A., 1993; Escribá P. y col., 2008; Komura S. y Andelman D., 2014).

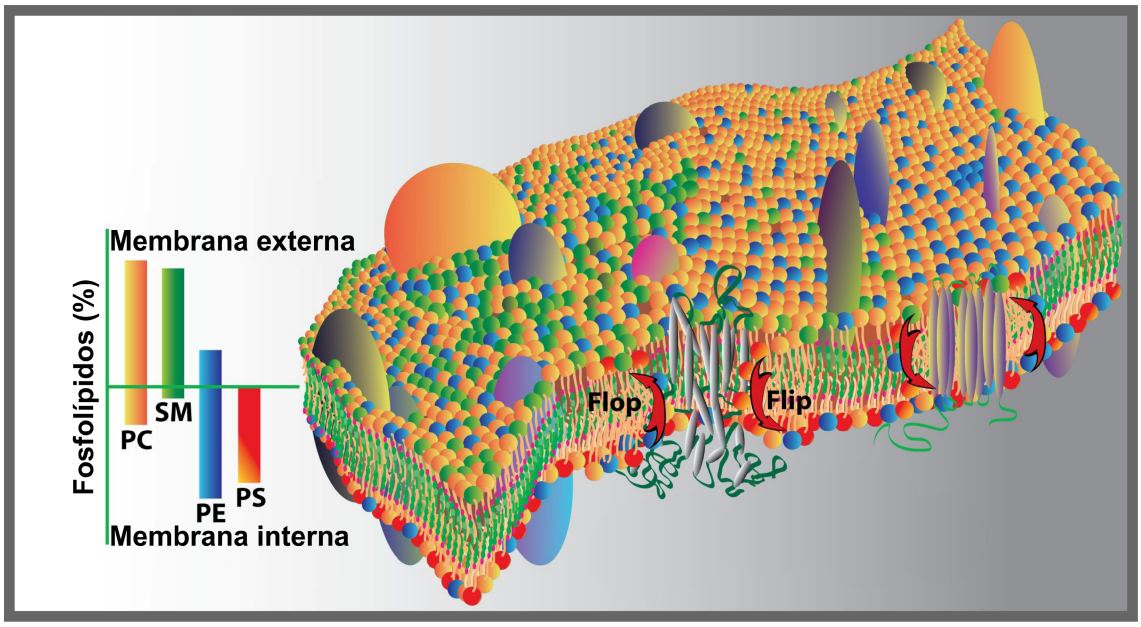


Figura 2-1. Distribución de los fosfolípidos en una membrana plasmática eucariota. En este esquema se pueden apreciar en los distintos colores (PC: amarillo; SM: verde; PE: azul; PS: rojo) la contribución diferencial y asimétrica de las distintas especies de fosfolípidos a la membrana interna y externa de las bicapas lipídicas. Imagen tomada y modificada de www.rbclab.com/Pages/500/520/520.html.

Modelo de membrana: ¿mosaico fluido o *raft*?

A temperatura fisiológica, las biomembranas se encuentran en un estado físico fluido, con el fin de garantizar la difusión lateral libre tanto de los lípidos como de las proteínas que la forman, dentro del plano de la membrana (Komura S. y Andelman D., 2014).

El primer modelo dinámico de las biomembranas lo postularon Singer S. y Nicolson G. en 1972, y fue llamado el modelo de mosaico fluido. Este modelo considera que las proteínas y los lípidos que conforman la membrana plasmática particionan al azar, con el fin de alcanzar la ubicación con el menor requerimiento de energía libre.

Sin embargo, la aceptación de este modelo entró en conflicto frente a la aparición del modelo *raft*, propuesto por Simons K. e Ikonen E. en 1997. Este modelo movilizó las bases de la comunidad científica, ya que considera la presencia de heterogeneidades dinámicas no azarosas en las bicapas lipídicas, de componentes múltiples no homogéneos. Estas diferencias en la membrana postuladas por el modelo *raft* se deben a la afirmación de la existencia de dominios en la nanoescala compuestos por Col y fosfolípidos específicos, como los esfingolípidos. Estos dominios lipídicos junto con las proteínas de

membrana actuarían como estaciones de relevo de la señalización celular, y por lo tanto serían indispensables para numerosos procesos biológicos (Komura S. y Andelman D., 2014).

La contribución del Col en la formación de estructuras no simétricas lateral ni transversalmente, se debe a su estructura química. Su grupo oxhidrilo interacciona con la fracción polar de los fosfolípidos, mientras que su esqueleto esteroide se encuentra en cercanías de las cadenas carbonadas de estos lípidos. Estas interacciones regulan la fluidez y el empaquetamiento de la membrana, así también como la formación de microdominios y la tendencia hacia una fase lipídica no laminar (Escribá P. y col., 2008).

De la recopilación de los experimentos realizados en las membranas, en 2006 se definió de forma unánime a los *raft* de membranas como dominios pequeños (10-200 nm), heterogéneos, altamente dinámicos y enriquecidos en esteroles y esfingolípidos, que compartimentan los procesos celulares (Pike L., 2006). La presencia del Col en los dominios *raft* podría ocupar hasta el 50 % de los mismos (Jurak M. y col., 2014). Los pequeños *raft* podrían estabilizarse para formar plataformas mayores a través de interacciones proteína-proteína o lípido-proteína (Komura S. y Andelman D., 2014).

La evidencia experimental a lo largo de los años también demostró que la organización/clusterización de los *raft* hacia plataformas de señalización más activas es dependiente de la interacción con el citoesqueleto, y de su reordenamiento dinámico. Los componentes del citoesqueleto así también como las moléculas que lo rodean, localizan a los dominios *raft* y participan de la regulación de la difusión lateral de las proteínas y lípidos de la membrana en respuesta a eventos intra/extracelulares (Head B. y col., 2014).

Gracias al desarrollo de la microscopía de fluorescencia de "molécula única" (*single-molecule imaging*), Kusumi A. y col. (2011) propusieron una clasificación jerárquica de los dominios presentes en estas membranas, basada en dominios mesoescala (diámetro: 2-300 nm) divididos en tres niveles:

1. **Compartimentos de membrana** (diámetro: 40-300 nm): corresponde a la compartimentación de toda la membrana plasmática mediada por el citoesqueleto de actina, encargado de formar "corrales", delimitados gracias a la presencia de proteínas transmembranales, que funcionan como "estacas" (Figura 2-2A).
2. **Dominios *raft*** (diámetro: 2-20 nm) (Figura 2-2B).

3. **Complejos proteicos** (diámetro: 3-10 nm): dominios formados por la interacción directa entre proteínas, sin ninguna participación lipídica (Figura 2-2C).

Los autores utilizaron el término mesoescala para definirlos ya que no consideraron correcto nombrar a estos dominios dentro de la nanoescala, debido a la amplia variación de tamaño que puede existir entre ellos (Kusumi A. y col., 2011).

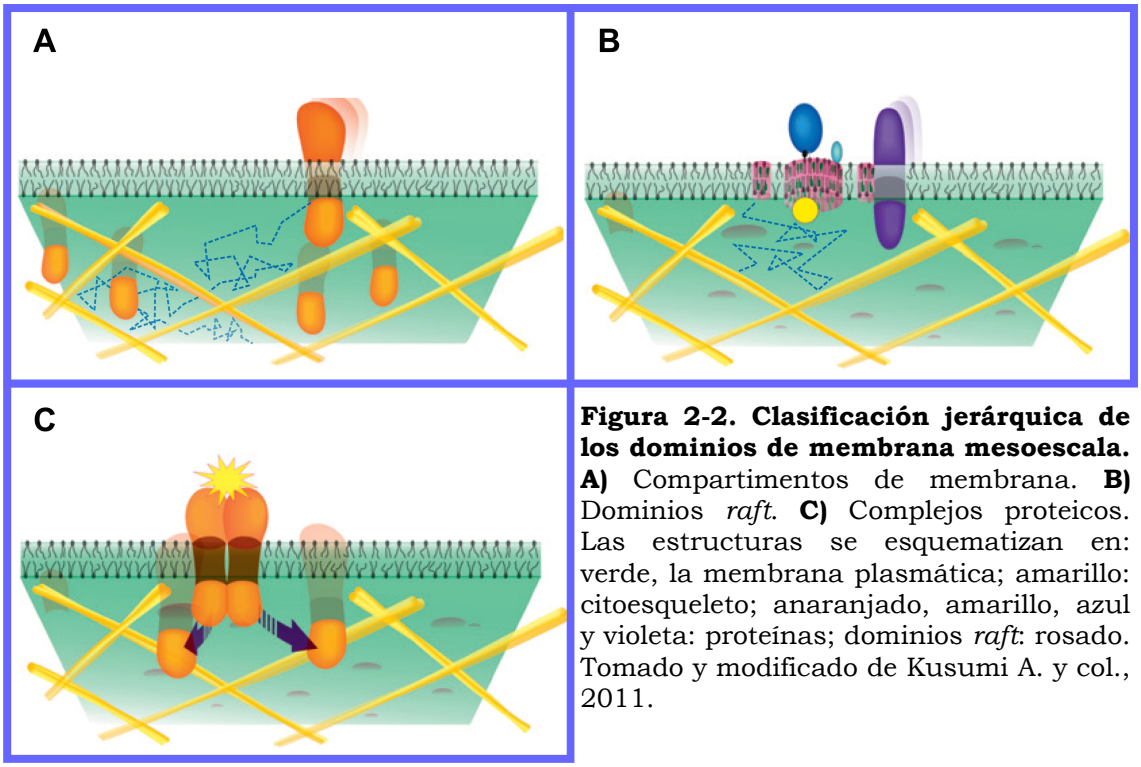


Figura 2-2. Clasificación jerárquica de los dominios de membrana mesoescala. A) Compartimentos de membrana. **B)** Dominios *raft*. **C)** Complejos proteicos. Las estructuras se esquematizan en: verde, la membrana plasmática; amarillo: citoesqueleto; anaranjado, amarillo, azul y violeta: proteínas; dominios *raft*: rosado. Tomado y modificado de Kusumi A. y col., 2011.

Los modelos de membranas

A pesar de todos los avances tecnológicos y experimentales, a la fecha aun no se han resuelto las incógnitas sobre el origen y la naturaleza real de los *raft* de membranas, principalmente por la ausencia de métodos/fluoróforos que permitan su visualización directa en las biomembranas (Komura S. y Andelman D., 2014).

Los modelos de membranas resultan entonces la forma más accesible de estudiar la organización lipídica en las membranas celulares. Sin embargo, una de las críticas más comunes a estos modelos es la ausencia de proteínas, ya que la contribución porcentual de los lípidos y las proteínas a la formación

de la membrana plasmática es similar. Con el fin de determinar la contribución real de las proteínas al interior de la bicapa lipídica, Sheetz M. (1993) realizó un estudio de distribución proteica. Llamativamente, encontró que el 80 % de las estructuras aminoacídicas de la membrana se encuentran en contacto con porciones acuosas, ya sea intra o extracelulares. Esto significaría finalmente que la estructura la membrana plasmática propiamente dicha, se encontraría formada por un nivel casi insignificante de proteínas (10-15 %), y validaría por lo tanto la utilización de membranas modelos lipídicas (Heberle F. y Feigenson G., 2011).

En las membranas modelos formadas exclusivamente por lípidos, la variación de la temperatura conlleva un cambio de fase estructural, reflejado en el cambio del orden de orientación de las cadenas hidrocarbonadas. A altas temperaturas, las bicapas lipídicas se encuentran en una fase líquido cristalina (Lc), mientras que a bajas temperaturas aparece la fase gel, que casi imposibilita la difusión de las moléculas presentes en la membrana (Komura S. y Andelman D., 2014).

En la preparación de membranas modelos, se utiliza generalmente una mezcla ternaria de Col con un lípido saturado y uno insaturado, generalmente dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dioleilfosfatidilcolina (DOPC), respectivamente (Figura 2-3A). Debido a que los lípidos saturados presentan una temperatura de transición de fase mayor que los lípidos insaturados, en un determinado rango de temperatura coexisten dos fases, ubicadas entre las fases gel y cristalina: líquido ordenada (Lo) y desordenada (Ld) (Figura 2-3, B, C y D: Lo en verde y Ld en rojo) (Komura S. y Andelman D., 2014; Risselada H. y Marrink S., 2008).

El Col (Figura 2-3A) es la molécula clave para la formación de dominios *raft*, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. A niveles de Col representativos a los encontrados en membranas biológicas (10-30 %), las mezclas ternarias se separan en dominios macroscópicos de fases Lo y Ld (Figura 2-3, B, C y D). Por su composición, se considera que los dominios Lo son tipo *raft*, mientras que los dominios Ld forman parte de los dominios no *raft*. El agregado de Col a la mezcla ternaria a una concentración menor del 10 mol %, no permite la separación de fases, ya sea en simulaciones computacionales o en sistemas *in vitro* (Risselada H. y Marrink S., 2008).

Es importante considerar que los términos Lo y Ld no deberían utilizarse para las membranas celulares. Esto se debe a que estos términos

hacen referencia a fases presentes en sistemas modelos, de las cuales se puede determinar de forma exacta sus propiedades relacionadas al orden conformacional y traslacional (Lingwood D. y Simons K., 2010).

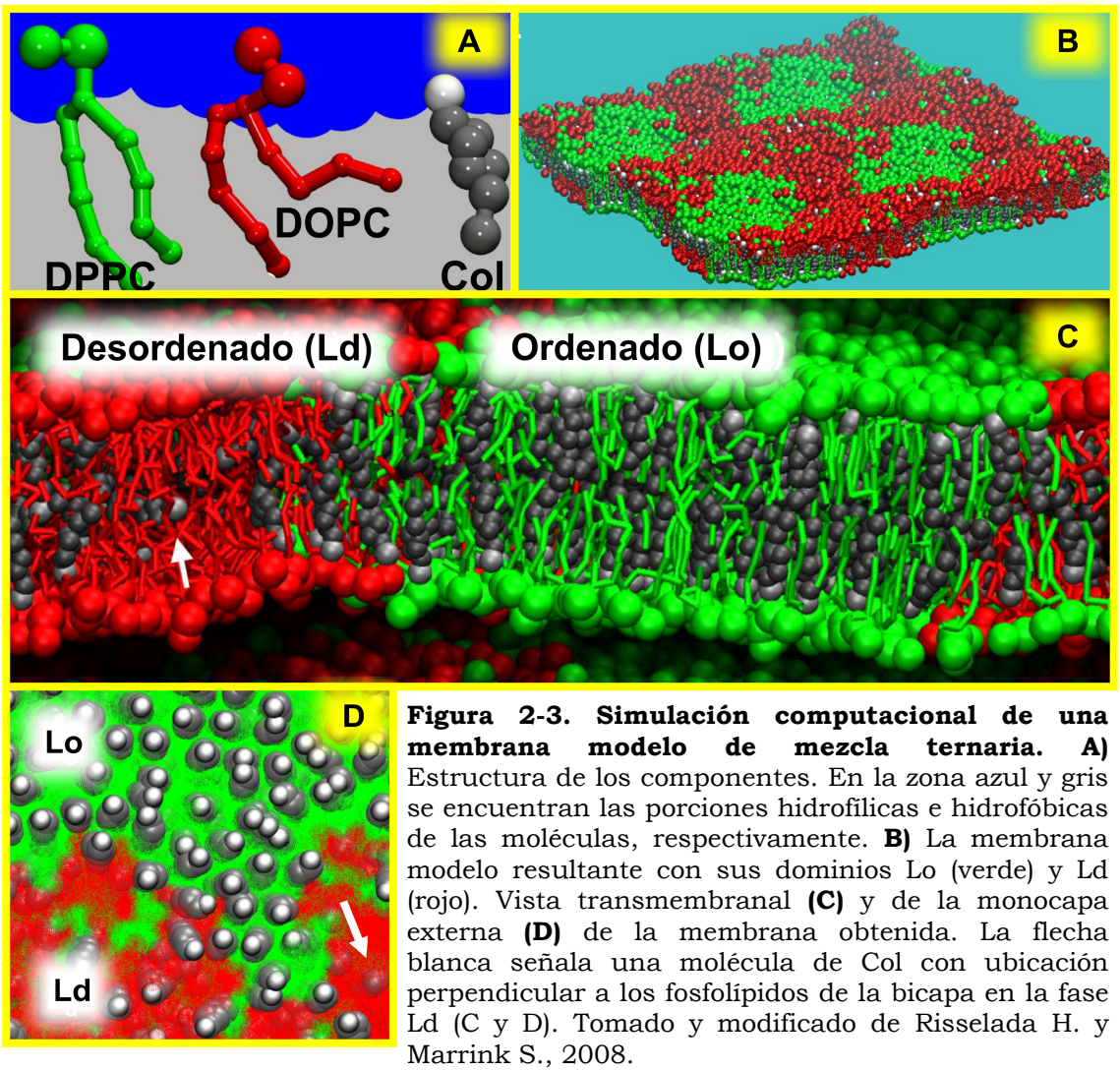


Figura 2-3. Simulación computacional de una membrana modelo de mezcla ternaria. A) Estructura de los componentes. En la zona azul y gris se encuentran las porciones hidrofílicas e hidrofóbicas de las moléculas, respectivamente. **B)** La membrana modelo resultante con sus dominios Lo (verde) y Ld (rojo). Vista transmembranal **(C)** y de la monocapa externa **(D)** de la membrana obtenida. La flecha blanca señala una molécula de Col con ubicación perpendicular a los fosfolípidos de la bicapa en la fase Ld (C y D). Tomado y modificado de Risselada H. y Marrink S., 2008.

Cómo medir el orden de membrana: Laurdan y di-4-ANEPPDHQ

Tras el postulado del modelo *raft*, comenzó su búsqueda mediante el estudio del orden diferencial de las membranas (Owen D. y col., 2012). Este es uno de los principales parámetros biofísicos relacionado con los dominios lipídicos. Un ambiente de membrana altamente ordenado afecta a la dinámica de las proteínas insertas en la bicapa lipídica (Tanimura N. y col., 2003), ya

que altera la probabilidad de interacción entre proteínas y por lo tanto se producen variaciones en la eficiencia de los distintos mecanismos de señalización (Owen D. y col., 2009).

El orden de membrana depende del grado de empaquetamiento lipídico, del espesor de la bicapa lipídica y de la libertad rotacional de los lípidos dentro de la membrana. Por lo tanto, la determinación del empaquetamiento lipídico es una forma de cuantificar el orden de membrana: cuanto más eficiente sea el empaquetamiento, mayor es la exclusión de moléculas polares, como el agua, de la porción no polar de la bicapa lipídica (Owen D. y col., 2012).

Una técnica cuantitativa basada en la microscopía de fluorescencia permite localizar los diferentes microambientes lipídicos de la membrana en las imágenes adquiridas, y cuantificar así su orden lipídico (Owen D. y col., 2012). Las dos sondas más comúnmente utilizadas para el estudio de las diferencias en el orden de membrana en células y/o membranas modelos son Laurdan (Weber G. Y Farris F., 1979) y di-4-ANEPPDHQ (Jin L. y col., 2005; Jin L. y col., 2006) (Figura 2-4). Ambos fluoróforos son solvatocrómicos, por lo que presentan una mayor separación de sus cargas cuanto más polar sea el solvente donde se encuentren disueltos, aumentando de esta forma su momento dipolar (Owen D. y col., 2012). En las membranas, modelos o celulares, estos fluoróforos registran la polaridad según el nivel de penetración de las moléculas de agua en las mismas, exhibiendo un corrimiento en el espectro de emisión hacia menores longitudes de onda a mayor orden de la membrana (menos agua, menos polar) (Figura 2-4) (Dinic J. y col., 2011; Parasassi T. y col., 1994).

La utilidad de Laurdan y di-4-ANEPPDHQ se comprobó marcando a dos tipos de membranas modelos, con composición lipídica correspondiente a los dominios Lo y Ld (generalmente compuestas por 7 DPPC : 3 Col y DOPC, respectivamente). El corrimiento del espectro de emisión a longitudes de onda menores, como consecuencia de un mayor orden de las membranas, registró una diferencia entre los máximos de emisión de 50 y 60 nm, para Laurdan (Figura 2-4A) y di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-4B), respectivamente (Owen D. y col., 2012; Jin L. y col., 2005; Jin L. y col., 2006).

Los cambios en el perfil de emisión registrado en membranas modelo entre sus fases Lo y Ld, permiten una valoración cuantitativa del orden de membrana mediante el cálculo de una medición radiométrica de la intensidad de fluorescencia registrada en los dos canales espectrales, conocida como

polarización generalizada (GP) (Para más detalles, ver la sección Materiales y Métodos) (Krasnowska y col., 1998; Parasassi T. y col., 1997; Parasassi T. y col., 1990; Miguel L. y col., 2011).

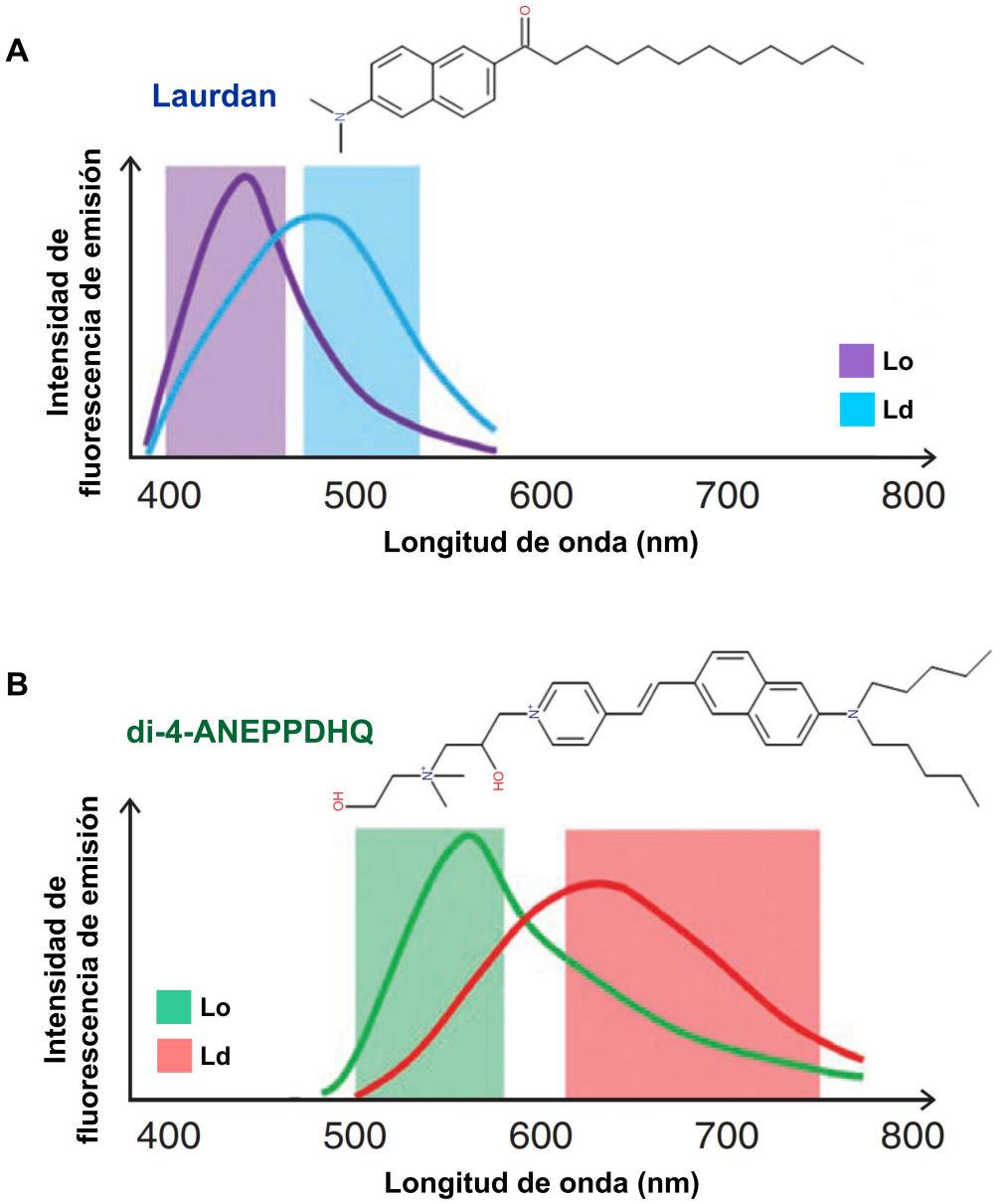


Figura 2-4. Laurdan y di-4-ANEPPDHQ. Estructura química y espectros de emisión esquemáticos de membranas modelos Lo y Ld, para Laurdan **(A)** y di-4-ANEPPDHQ **(B)**. En los espectros, las líneas delimitan la fluorescencia emitida por cada membrana modelo, mientras que los cuadrados del mismo color muestran el ancho de banda recolectado de cada imagen para realizar los cálculos de la GP. Tomado y modificado de Owen D. y col., 2012.

Posteriormente, se demostró que la incorporación de proteínas en las membranas de liposomas no modificaba los espectros de emisión obtenidos para Laurdan ni para di-4-ANEPPDHQ (Dinic J. y col., 2011), indicando la

conveniencia del empleo de estas sondas en el estudio de las propiedades físicas de las membranas de células vivas. Si bien, no es recomendable referirse a dominios Lo y Ld en membranas celulares (Lingwood D. y Simons K., 2010), con los valores de las GP obtenidos en los distintos experimentos, se puede inferir un orden relativo en los distintos microambientes de las membranas celulares estudiadas, al recolectar la fluorescencia en el ancho de banda de emisión correspondiente a los dominios Lo y Ld, definido en las membranas modelo para cada fluoróforo (Figura 2-4, Lo y Ld).

Dentro de las ventajas de la utilización de di-4-ANEPPDHQ sobre Laurdan se encuentran:

- La longitud de onda de excitación: di-4-ANEPPDHQ se excita a 488 nm, longitud de onda correspondiente al espectro visible, mientras que Laurdan tienen su longitud de onda de excitación en el rango ultravioleta del espectro, la cual produce eventos de fototoxicidad cuando se trabaja con células vivas (Jin L. y col., 2005; Jin L. y col., 2006).
- La menor marcación del citosol, lo que facilita la visualización de la membrana plasmática (Owen D. y col., 2012).
- Su solubilidad en agua, mientras que Laurdan requiere de solventes orgánicos (Jin L. y col., 2006).
- La presencia de dos cargas positivas (ver estructura química en la figura 2-4B), las que retardan los movimientos del tipo *flip-flop* entre las monocapas externas e internas de las membranas, y por lo tanto retrasan su internalización (Jin L. y col., 2006).

Por lo expuesto, en este capítulo de Tesis decidimos realizar la tinción de las células CHO-K1/A5 con di-4-ANEPPDHQ con el fin de determinar el orden relativo de la membrana plasmática.

EL AChR Y LAS MEMBRANAS LIPÍDICAS

El AChR es el miembro fundador de los LGIC que componen la familia de receptores *Cys-loop*. Cada subunidad que forma a este receptor pentamérico posee cuatro segmentos transmembranales (M1-M4), de una longitud aproximada de 20-30 aminoácidos (Figura 4) (Barrantes F. y col., 2010). Los estudios de nuestro laboratorio han demostrado la vital

importancia de la interacción de este receptor con los lípidos que lo rodean (Barrantes F., 2003; Barrantes F., 2004; Barrantes F., 2010).

Marsh D. y Barrantes F. (1978) demostraron la existencia de lípidos que interaccionan directamente con el AChR, conformando un anillo lipídico (Figura 2-5, fosfolípidos rojos). Gracias a la utilización de ERS (*spin label electron paramagnetic resonance*), observaron la presencia de una población de lípidos única e inmovilizada, asociada a la proteína. Sin embargo los espectros de ESR obtenidos no permitieron discriminar la composición lipídica del anillo que rodeaba a los AChR (Levitan I. y col., 2014).

En membranas ricas en AChR aisladas del órgano eléctrico de *Torpedo*, se observó que todos sus lípidos se encuentran en una fase del tipo Lo. Sin embargo, cuanto menor era la distancia entre los lípidos de la membrana y los AChR, disminuía la polaridad de la bicapa lipídica, indicando una mayor rigidez y orden en cercanías del receptor (Antollini S. y col., 1996; Antollini S. y Barrantes F., 2002). Por lo tanto, se concluyó que los AChR de *Torpedo* se encuentran embebidos en microambientes lipídicos que poseen diferencias físicas con el resto de la membrana lipídica (Barrantes F., 2004; Jones O. y McNamee M., 1988). El descubrimiento de un anillo lipídico relativamente inmóvil (Figura 2-5) rodeando a cada AChR, dejó de manifiesto la presencia de heterogeneidades laterales en la membrana, mucho antes del postulado del modelo *raft* (Fantini J. y Barrantes F., 2009).

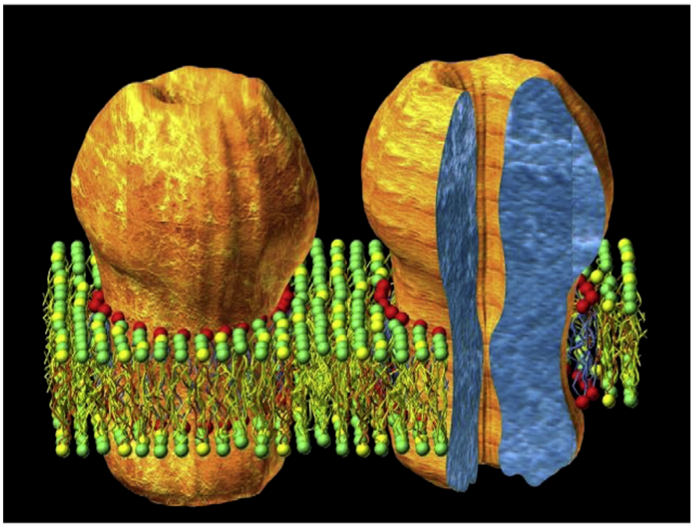


Figura 2-5. El AChR y el anillo lipídico. Esquema del AChR en una membrana proveniente de *Torpedo*. Los fosfolípidos coloreados en rojo y verde/amarillo corresponden al anillo lipídico y a los que componen el resto de la membrana, respectivamente. Tomado de Fantini J. y Barrantes F., 2009.

Mantipragada S. y col. (2003) describieron por primera vez la composición dinámica del anillo lipídico que rodea a los AChR en membranas de *Torpedo*. Estos lípidos se clasificaron en tres categorías, según su

especificidad por el anillo: alta (ácidos grasos, cardiolipina, fosfatidilinositol, androstanol y PA); intermedia (SM, PS y prostaglandinas); y moderada a baja (PC, PE y gangliósidos).

La influencia de los microambientes lipídicos sobre la función de canal iónico del AChR (apertura, cierre, cinética de desensibilización, etc.) es probablemente el aspecto más importante de la interacción del receptor con los lípidos (Barrantes F., 2004). La correcta funcionalidad del AChR en sistemas reconstituidos demostró ser dependiente de la inclusión de esteroles y de determinados fosfolípidos en las membranas modelos, siendo 45 el número mínimo de moléculas de estos lípidos requeridas por receptor (Epstein M. y Racker E., 1978; Jones O. y col, 1988; Barrantes F., 2004).

Una pregunta que sigue en vigencia es cómo sucede la interacción entre el AChR y el Col. A lo largo de los años, se postularon dos posibles localizaciones del Col: como componente del anillo lipídico que rodea al AChR o en sitios no anulares ubicados entre las hélices α transmembranales del receptor, sin acceso a los fosfolípidos. Que el mínimo número de lípidos requeridos por cada AChR sea mayor a la cantidad de moléculas necesarias para rodear al receptor, indicaría que parte de estos lípidos se encontrarían en una posición no anular, completando los espacios libres entre las hélices transmembranales del receptor (Levitan I. y col., 2014; Fantini J. y Barrantes F., 2013).

Gracias a la técnica de modelado molecular, se demostró la existencia de 15 sitios posibles de unión de Col en la región transmembranal del AChR de *Torpedo* (Figura 2-6, A y B) (Brannigan G. y col., 2008) y del AChR muscular humano (Figura 2-6, C y D) (Baier C. y col., 2011). Sin embargo, la ubicación de los sitios posibles de unión del Col postulados por estos dos grupos, fueron completamente distintos. Brannigan G. y col. (2008) localizan a las moléculas de Col insertas profundamente entre los espacios que quedan entre los segmentos M1-M4 (Figura 2-6, A y B), mientras que el modelado propuesto por nuestro grupo (Baier C. y col., 2011) muestra al Col interaccionando solamente con los segmentos transmembranales que tienen contacto directo con los lípidos de la membrana (M1, M3 y M4), pudiendo entonces el Col formar parte del anillo lipídico (Figura 2-6, C y D). Tan necesario es el Col para el AChR, que la realización del modelado del receptor en ausencia de este lípido lleva al colapso de la estructura del AChR (Brannigan G. y col., 2008).

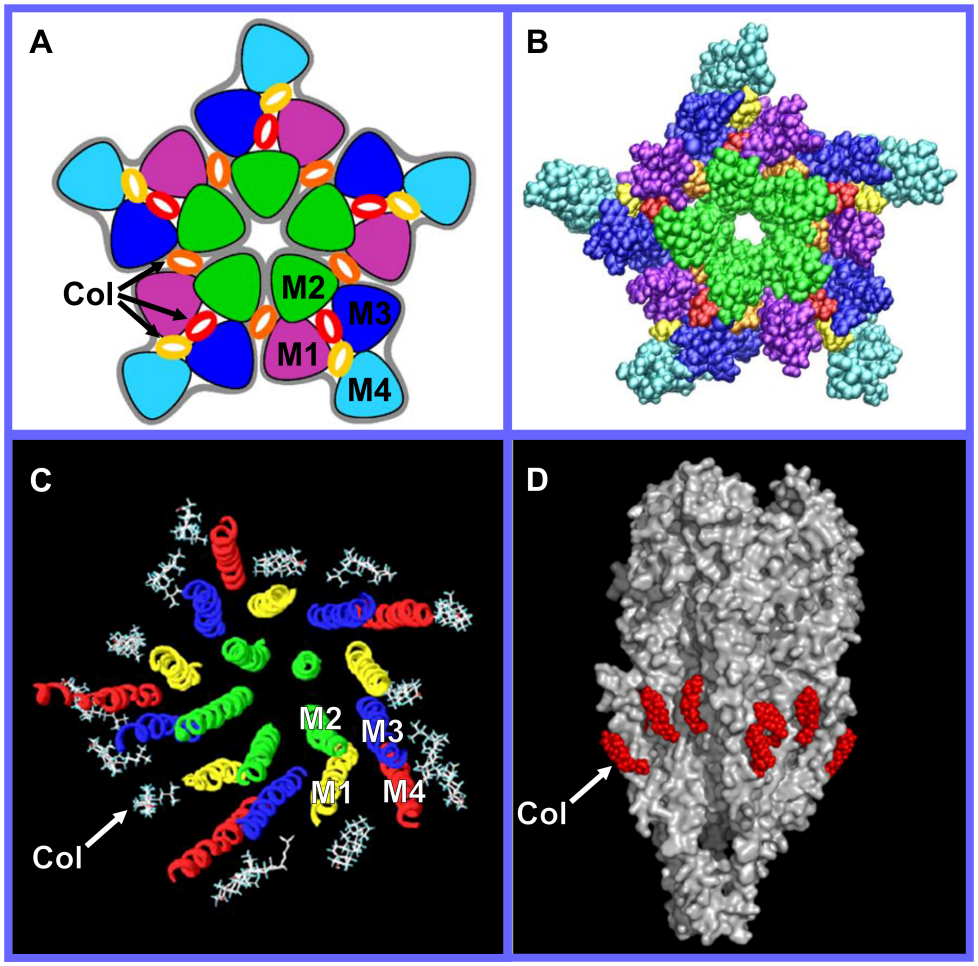


Figura 2-6. Sitios posibles de unión del Col al AChR, determinados por modelado molecular. La estructura esquemática **(A)** y atómica **(B)** de los segmentos transmembrana del AChR de *Torpedo* con la localización del Col propuesta por Brannigan G. y col., 2008, ocupando los espacios libres entre los segmentos. El modelo postulado por Baier C. y col. (2011), indica la ubicación de los sitios posibles de unión de Col rodeando al AChR muscular humano: vista transversal **(C)** y lateral **(D)**.

La importancia del estudio de la interacción del AChR con los diferentes dominios lipídicos de la membrana plasmática se fundamenta en la segregación que sufren las proteínas integrales como mecanismo de regulación espaciotemporal de la señalización y del tráfico (Allen J., 2007; Barrantes F., 2007).

Antecedentes y Objetivos

Capítulo II

ANTECEDENTES

La eficacia de la sinapsis colinérgica depende de los niveles de AChR en las membranas postsinápticas y de su correspondiente organización. Esta dependencia se hace evidente en la enfermedad autoinmune miastenia gravis, donde la mayoría de los pacientes (85 %) presentan anticuerpos contra los AChR presentes en el músculo esquelético (Silvestri N. y Wolfe G., 2012; Wondolowski J. y Dickman D., 2013). Estos anticuerpos contra la región MIR del receptor inducen la pérdida de los AChR ubicados en la superficie postsináptica de la UNM, afectando gravemente la transmisión sináptica normal (Gómez A. y col., 2010). La pérdida de AChR de la superficie celular mediada por anticuerpos, es consecuencia de un incremento en la velocidad de endocitosis del receptor, y se ha logrado evidenciar *in vitro* en nuestro laboratorio utilizando las células CHO-K1/A5 (Roccamo A. y col., 1999, Kumari S. y col., 2009).

En nuestro laboratorio se encontró la dependencia de Col y del citoesqueleto en la organización y cantidad de clústeres del AChR inducidos por anticuerpo, así también como en su interrelación (Borroni V. y col., 2007; Borroni V. y Barrantes F., 2011; Kellner R. y col., 2007; Wenz J. y col., 2010). La asociación del AChR en miotubos en cultivo es extraordinariamente similar a la observada en las células CHO-K1/A5 (Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a; Stetzkowski-Marden F. y col., 2006b; Willmann R. y col., 2006; Zhu D. y col., 2006), ya que la formación y mantenimiento de los clústeres de AChR depende de la asociación de estos receptores con dominios ricos en Col. Se cree que estos dominios lipídicos promueven la reorganización del citoesqueleto, lo que finalmente desencadena la agrupación de AChR (Cartaud A. y col., 2011). Los grandes clústeres de AChR en miotubos se desintegran como consecuencia de la depleción de Col (Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a; Stetzkowski-Marden F. y col., 2006b; Willmann R. y col., 2006; Zhu D. y col., 2006), sugiriendo la existencia de mecanismos conservados con el fin de mantener niveles basales de AChR y su correcta organización, aun en ausencia de señalización neuronal (Barrantes F., 2010).

Anteriormente, en nuestro laboratorio realizamos estudios combinados de patch-clamp con espectroscopía de fluorescencia en células enteras o membranas plasmáticas aisladas de células CHO-K1/A5 teñidas con Laurdan

(Zanello L. y col., 1996), donde se estudió la correlación de las propiedades del canal en función las propiedades físicas de la membrana afectadas por cambios en la temperatura.

En el órgano eléctrico de *Torpedo*, los AChR se encuentran embebidos en microambientes lipídicos que poseen diferencias físicas con el resto de la membrana lipídica (Barrantes F., 2004; Jones O. y McNamee M., 1988). Esto también ocurre en los miotubos C2C12, donde los grandes clústeres formados en la membrana plasmática como consecuencia del estímulo de la agrina, residen en dominios lipídicos más ordenados (Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a). Sin embargo, el efecto de esta asociación en la endocitosis del AChR aun no ha sido dilucidado.

OBJETIVOS

En este capítulo de Tesis nos propusimos estudiar en las células CHO-K1/A5:

- ☑ La relación espacial entre los clústeres de AChR y el estado físico de la membrana plasmática donde se encuentran insertos.

- ☑ La necesidad del Col y de la integridad del citoesqueleto para la ubicación de los clústeres de AChR en los diferentes dominios lipídicos de la membrana.

- ☑ La dependencia de la localización de los clústeres de AChR en dominios de membrana específicos, para la endocitosis del receptor gatillada por la unión de anticuerpos.

Resultados

Capítulo II

LA POLARIZACIÓN GENERALIZADA DE DI-4-ANEPPDHQ

La sonda di-4-ANEPPDHQ, sintetizada por Jin L. y col. (2005), es un fluoróforo capaz de registrar cambios en la polaridad de las membranas, ya que su emisión depende del estado físico y/o del contenido de colesterol de la membrana en la que se encuentra inmerso (Jin L. y col., 2006). Su espectro de emisión sufre un corrimiento de 60 nm hacia menores longitudes de onda cuando la sonda se ubica en membranas ordenadas o con colesterol, lo que permite distinguir con muy buen contraste los dominios líquido ordenados (Lo) de los líquidos desordenados (Ld), cuando estos coexisten en vesículas unilaminares grandes o gigantes (Figura 2-4B) (Jin L. y col., 2005, Jin L. y col., 2006). Di-4-ANEPPDHQ también se utilizó para estudiar los cambios en la estructura de la membrana de neutrófilos, cuando estos se activan/adquieren el fenotipo migratorio. Los valores de emisión de di-4-ANEPPDHQ obtenidos en la región del lamelipodio son consistentes con un enriquecimiento en colesterol de esta zona (Jin L. y col., 2006). Debido a la complejidad de la membrana celular, el contraste entre los dos canales de emisión de di-4-ANEPPDHQ fue menor en las células que en las vesículas (Jin L. y col., 2006).

En este trabajo de Tesis se utilizó por primera vez a este fluoróforo para marcar la superficie de un fibroblasto que expresa de forma estable y robusta al AChR muscular adulto: las células CHO-K1/A5. Para ello, utilizamos el *Dual-Viewer*, un instrumento que nos permitió registrar en simultáneo y en una misma cámara, las dos señales de emisión (Figura 9) de di-4-ANEPPDHQ separadas espectralmente: la señal del canal azul, correspondiente a regiones de la membrana más ordenadas y la señal del canal rojo, correspondiente a regiones más desordenadas (Jin L. y col., 2005; Jin L. y col., 2006). Cuando el *Dual-Viewer* se alinea correctamente, la imagen de los dos canales registrados proporciona un mapa de la distribución 2-D de la sonda (Figura 10), demostrando según la emisión de fluorescencia recolectada en cada pixel, el estado de fase de las membranas.

Di-4-ANEPPDHQ y las GUV: Lo y Ld

En la literatura está reportado el uso de diferentes combinaciones de filtros para la recolección de la emisión de di-4-ANEPPDHQ, que varían fundamentalmente en el ancho de longitudes de onda recolectado en el canal azul (Jin L. y col., 2005; Jin L. y col., 2006; Owen D. y col., 2010; Owen D. y col., 2011; Miguel L. y col., 2011). Por lo tanto, antes de comenzar nuestros estudios en las células CHO-K1/A5, validamos nuestro sistema de filtros a utilizar en el *Dual Viewer*, preparando GUV con diferentes composiciones lipídicas, para asemejar membranas Lo (DPPC:Col, 7:3) y Ld (DOPC) (Figura 2-7). En las GUV que contienen DPPC:Col, la membrana está más empaquetada, por la presencia de los ácidos grasos saturados y del Col, mientras que en las GUV formadas por DOPC, la membrana se encuentra más desordenada por la presencia de los ácidos grasos insaturados (Figura 2-3).

Recolectamos la emisión de fluorescencia de di-4-ANEPPDHQ en un microscopio confocal, el cual nos permitió obtener un barrido espectral de ambas clases de GUV, luego de la excitación de la sonda con el láser de 488 nm. Como podemos observar en la figura 2-7A, el espectro de emisión de fluorescencia de di-4-ANEPPDHQ se desplaza hacia longitudes de onda menores en las GUV Lo, respecto de las GUV Ld (Figura 2-7A, espectro azul y espectro rojo, respectivamente).

A continuación, recolectamos la intensidad de fluorescencia en el canal azul y en el canal rojo (Figura 2-7B), y con ellas, calculamos la GP para cada clase de GUV (Figura 2-7C) (para más información, ver la sección Materiales y Métodos). La GP de di-4-ANEPPDHQ obtenida para las GUV Lo es mayor a la obtenida para las GUV Ld, validando entonces el uso de los filtros seleccionados para la recolección de la emisión de di-4-ANEPPDHQ en ambos canales (Figura 2-7C).

Di-4-ANEPPDHQ y las células CHO-K1/A5

Habiendo demostrado que los filtros de recolección de la emisión en los canales azul y rojo, son adecuados para diferenciar las distintas fases de las membranas mediante el cálculo de la GP de di-4-ANEPPDHQ, emprendimos el estudio en las células CHO-K1/A5. Para tal fin, las marcamos con di-4-ANEPPDHQ 20 μM, durante 15 min a 4 °C, y tomamos las imágenes de

fluorescencia en simultáneo para los canales azul y rojo (Figura 2-8), utilizando el *Dual-Viewer* (Figura 9). La utilización de este dispositivo nos permitió realizar los siguientes experimentos en un microscopio de fluorescencia de campo ancho.

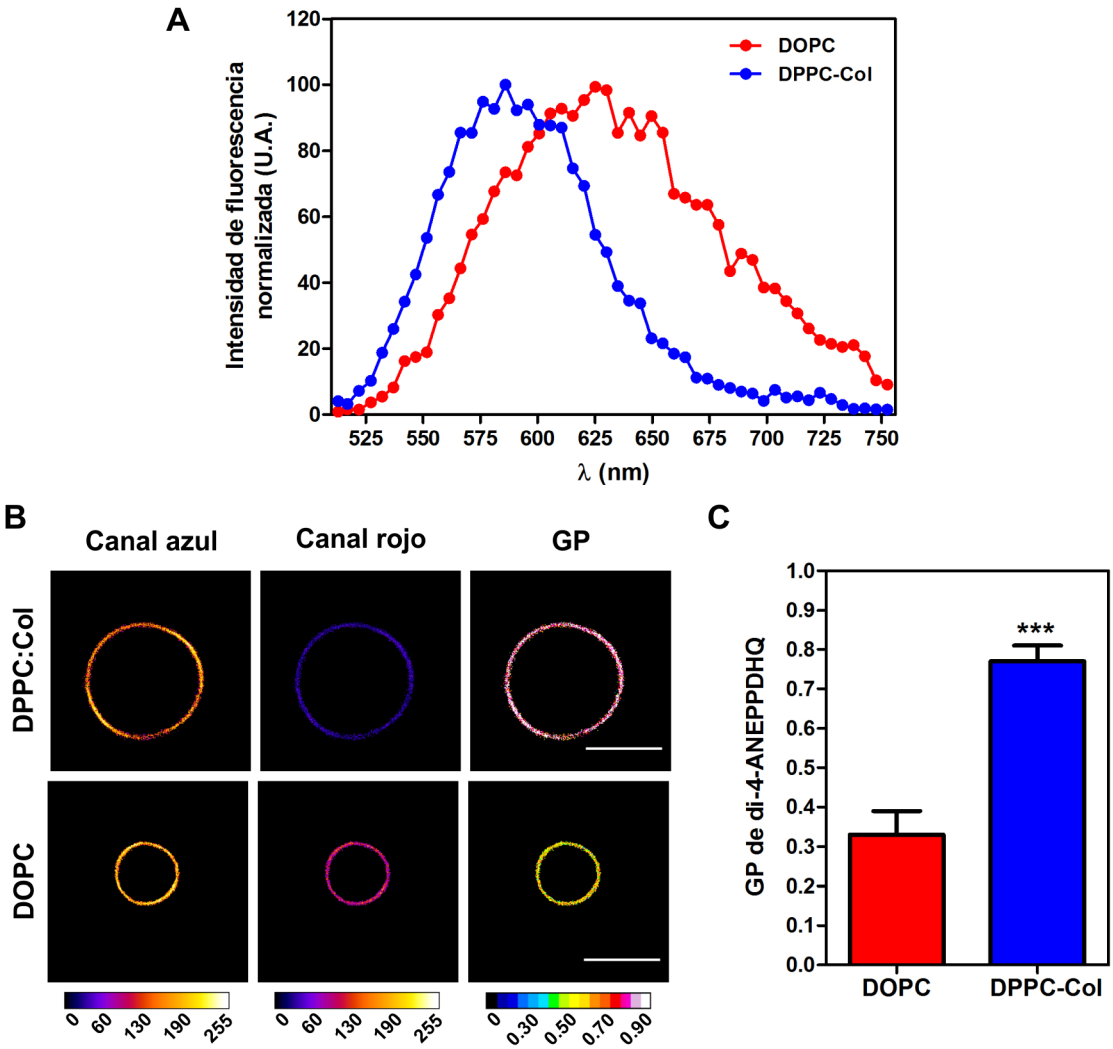


Figura 2-7. La emisión de di-4-ANEPPDHQ en membranas modelos. Tras la preparación de GUV Lo (DPPC:Col) y Ld (DOPC) y la tinción con di-4-ANEPPDHQ, se tomaron las imágenes en un microscopio confocal, para la realización de un barrido espectral **(A),** y a las longitudes de onda específicas de los canales azul y rojo **(B)** para la obtención de los valores de la GP promedio en cada caso **(C)**. Escala en (B): 10 µm. (***) $p < 0{,}001$.

La marcación de las células CHO-K1/A5 con di-4-ANEPPDHQ a bajas temperaturas se visualizó principalmente en la membrana plasmática, debido a que a 4 °C los procesos de internalización se encuentran inhibidos (Figura 2-8, canal azul y canal rojo). Las imágenes de fluorescencia recolectadas para

cada canal (Figura 2-8, canal azul y canal rojo), poseen diferencias en los niveles de intensidad, siendo el canal azul más intenso que el rojo. Además, la superposición de estas imágenes evidencia una co-localización casi perfecta (Figura 2-8, Superposición), calculada mediante los coeficientes de Pearson, Manders y Costes, lo que demuestra que la alineación del *Dual-viewer* es correcta (Figura 10). No obstante, si observamos la zona de la membrana celular, ninguna de las imágenes muestra heterogeneidades en la marca, lo que indica que la intensidad de la fluorescencia emitida por di-4-ANEPPDHQ *per se* no es adecuada para diferenciar dominios lipídicos. Sin embargo, la obtención de la imagen de la GP de di-4-ANEPPDHQ, pone en evidencia la heterogeneidad presente en la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 (Figura 2-8, GP). Podemos observar regiones con valores de la GP altos, pseudo-coloreados en amarillo-rojo, principalmente en las protrusiones de la superficie celular y en los filopodios finos (Figura 2-8, GP: flechas).

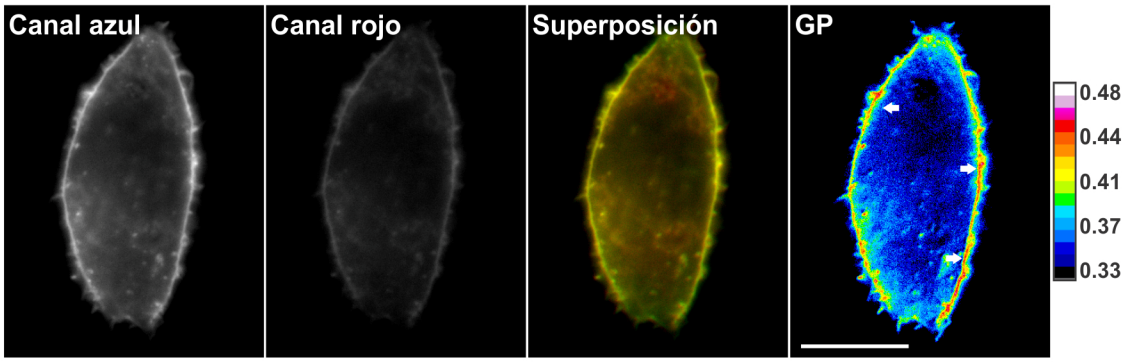


Figura 2-8. La GP de di-4-ANEPPDHQ en células CHO-K1/A5 vivas. La GP se calculó sobre una matriz de pixeles obtenida de la intensidad de fluorescencia emitida por di-4-ANEPPDHQ, en el canal azul y rojo. Previamente al cálculo de GP, se realizó la superposición de las imágenes de ambos canales (canal azul = verde; canal rojo = rojo). Los valores de la GP se muestran en una escala de pseudo-color. Las flechas señalan regiones con valores de la GP altos (mayor orden de membrana, pseudo-coloreados en amarillo/rojo). Escala: 10 µm.

Por lo tanto, al igual que lo que ocurre en las GUV (Figura 2-7), di-4-ANEPPDHQ también es capaz de diferenciar exitosamente zonas con diferente orden en la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 *in vivo*.

A continuación realizamos experimentos en un fluorímetro, con el fin de determinar los espectros de excitación y de emisión de di-4-ANEPPDHQ cuando se encontraba embebido en la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 (Figura 2-9). Tal como es de esperar para una medición generalizada de todas las células, donde no hay resolución espacial, se

observa un solo pico de emisión de la sonda, que abarca un amplio rango de longitudes de onda (Figura 2-9, espectro en gris oscuro: 480-750 nm, aproximadamente). Este pico de emisión recolectado incluye las longitudes de onda seleccionadas por los filtros de emisión instalados en el *Dual-Viewer*.

El ancho del espectro de excitación de di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-9, espectro en gris claro: 400-550 nm, aproximadamente) limitó la elección de fluoróforos para los experimentos en los que se requería a una co-marcación. Por esto, el empleo de sondas excitadas en la zona del rojo lejano del espectro, como por ejemplo la Alexa^{647}, fueron las únicas que nos aseguraron la ausencia de sangrado en los experimentos de co-marcación con di-4-ANEPPDHQ.

Mediante la utilización del fluorímetro, corroboramos a su vez, que los anchos de banda de los filtros empleados en el *Dual-Viewer*, correspondían a los declarados por el fabricante (Figura 2-9, filtros de excitación, en verde, y de emisión en el canal azul y rojo, en sus respectivos colores).

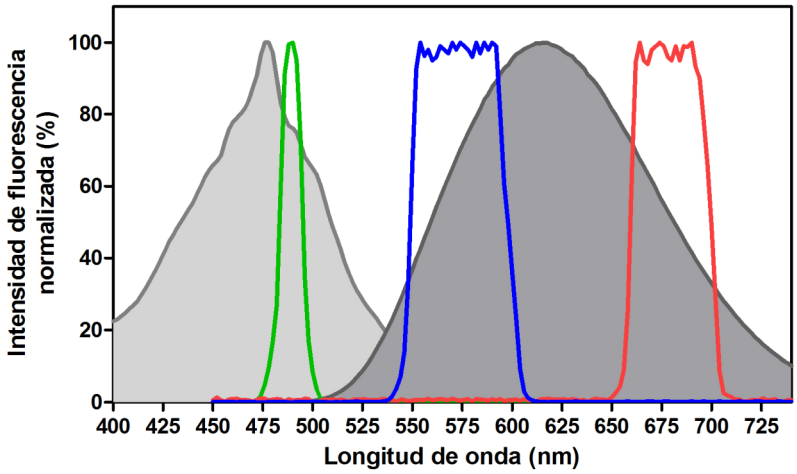


Figura 2-9. Espectros de excitación y de emisión de di-4-ANEPPDHQ en las células CHO-K1/A5. Los espectros se obtuvieron de células teñidas con el fluoróforo, colocadas en suspensión en cubetas de cuarzo de 1 cm. En gris claro se marca el espectro de excitación, mientras que el espectro de emisión de di-4-ANEPPDHQ se observa en gris oscuro. Sobre estos espectros, se observan los anchos de banda correspondientes a los filtros de excitación (verde) y de emisión, en el canal azul y rojo.

A continuación, se realizaron experimentos de depleción del colesterol celular mediante metil-β-ciclodextrina (CDx), con el objeto de evaluar si la disminución de este lípido neutro afectaba la distribución de lípidos de membrana, medida por la GP de di-4-ANEPPDHQ. La CDx fue ampliamente

utilizada en distintos sistemas celulares por su habilidad de reducir el contenido de Col presente en la superficie celular (Borroni V. y Barrantes F., 2011; Buschiazzo J. y col., 2011; Borroni V. y col., 2007; Christian A. y col., 1997). La CDx es un oligosacárido cíclico, formado por moléculas de glucosa contiguas unidas en las posiciones 1 y 4. La estructura cilíndrica de la CDx le brinda propiedades únicas, ya que posee un exterior con características hidrofílicas, mientras que la cavidad central es hidrofóbica. Por lo tanto, si bien la CDx es soluble en agua, la cavidad central ofrece un microambiente compatible con compuestos lipofílicos (López C. y col., 2013; Christian A. y col., 1997).

El parámetro limitante en la formación de complejos entre la CDx y las moléculas lipofílicas es el diámetro interno del cono de la CDx, que mide 7,8 Å, equivalente a 7 monómeros de glucosa. Esto convierte a la CDx en una herramienta eficaz y relativamente específica para el estudio de la remoción del Col de las biomembranas, ya que moléculas más grandes no son afectadas (López C. y col., 2013).

El dímero de CDx es el estado de agregación predominante de estas moléculas cuando se encuentran en solución (López C. y col., 2011). El modelo de depleción de Col mediado por CDx en membranas lipídicas, se detalla en la figura 2-10 (López C. y col., 2013). En este modelo, los dímeros de CDx (Figura 2-10, estructuras blancas) se unen a la superficie de las membranas con gran afinidad (35 kJ/mol), sin discriminar entre dominios Lo o Ld (Figura 2-10A, Lo: fosfolípidos en verde y Ld: fosfolípidos en rojo). Sin embargo, la extracción de Col (Figura 2-10, estructuras amarillas) es más favorable en las membranas Ld, ya que de este proceso se obtiene un aumento de la energía libre de 40 kJ/mol, comparado con los escasos 10 kJ/mol resultantes de la extracción de Col en dominios Lo (Figura 2-10A). Esto se debe a que el Col forma complejos estequiométricos con los fosfolípidos saturados (Lo), que le impiden su proyección en la fase acuosa, y por lo tanto limitan su contacto con la CDx. Sin embargo, en dominios de membrana Ld, el Col presenta constantes movimientos oscilatorios que facilitan su captura por los dímeros de CDx (Figura 2-10B).

López C. y col. (2013) proponen que la depleción de Col en dominios Ld causaría la redistribución del Col desde los dominios Lo a los Ld, llevando finalmente a la desaparición de la coexistencia de las fases en las membranas modelo (Figura 2-10A).

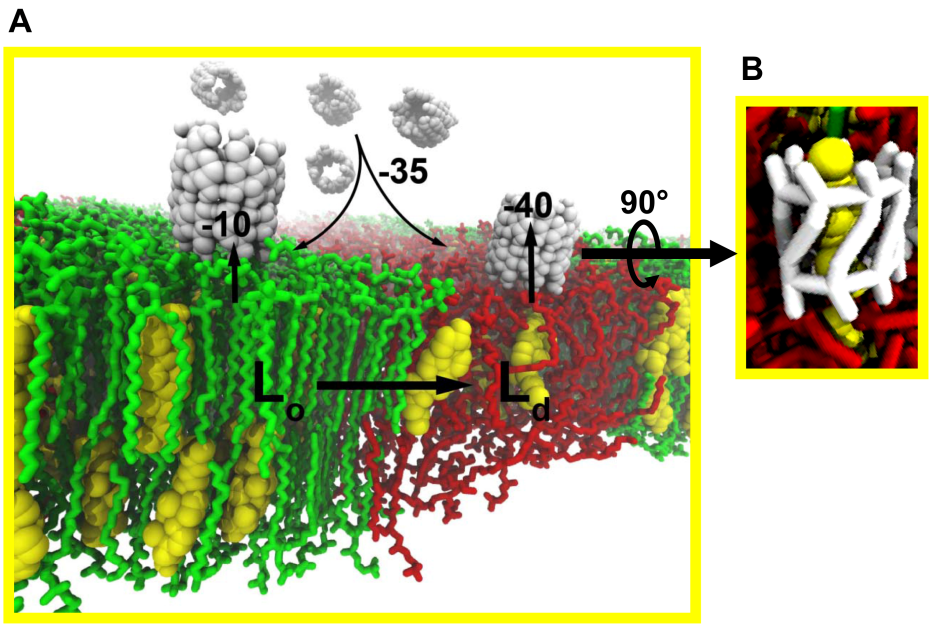


Figura 2-10. La CDx y la extracción del Col de membranas lipídicas. A) Modelo del mecanismo de acción de los dímeros de CDx (estructuras blancas) en la extracción de Col (estructuras amarillas) sobre membranas con dominios Lo (fosfolípidos en verde) y Ld (fosfolípidos en rojo). Los valores -35, -10 y -40 corresponden a valores de la energía libre (kJ/mol) resultante de la interacción de la CDx con membranas Lo y Ld, y de la extracción de lípidos de dominios Lo o Ld, respectivamente. **B)** Esquema de la extracción de Col por un dímero de CDx, observando desde la superficie de la cara externa de la bicapa lipídica, en este caso Ld. Tomado y modificado de López C. y col., 2013.

Estudios previos de nuestro laboratorio, establecieron la concentración óptima de CDx para la incubación de las células CHO-K1/A5, con el fin de alcanzar la depleción aguda del Col de la membrana sin afectar la viabilidad celular: 30 min a 37 °C con CDx en el rango de concentraciones de 10-15 mM en m1 (Borroni V. y col., 2007).

En esta serie de experimentos, incubamos las células durante 30 min con tres concentraciones de CDx (5, 10 y 15 mM), y determinamos posteriormente la depleción de Col, con fPEG-Chol (Figura 2-11), y los cambios en el orden de la membrana, con di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-12).

La sonda fPEG-Chol es un análogo fluorescente y soluble del Col, que tiene la particularidad ubicarse en la capa externa de membrana plasmática, preferentemente en dominios ricos en Col, y permanecer en ella por tiempo prolongado. Su internalización es lenta y se realiza en endosomas junto a marcadores de dominios *raft*, por un mecanismo independiente de clatrina. Por lo expuesto, la sonda es una excelente herramienta para el estudio de la dinámica de dominios ricos en Col en la membrana plasmática (Sato S. y col., 2004).

La tinción de las células con fPEG-Col, tras el tratamiento con diferentes concentraciones de CDx (5, 10 y 15 mM) (Figura 2-11A), demuestra una reducción del contenido de Col en la membrana, evidenciada por la disminución de la marcación en la superficie celular de dicha sonda (Figura 2-11). Este descenso se hace estadísticamente significativo luego de la incubación con CDx 10 y 15 mM (Figura 2-11B). Además, investigaciones previas de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento con CDx 15 mM, reduce en al menos un 50 % los niveles de Col totales en las células CHO-K1/A5 (Borroni V. y Barrantes F., 2011). Esto corrobora que el tratamiento con CDx en estas condiciones afecta principalmente a la superficie celular.

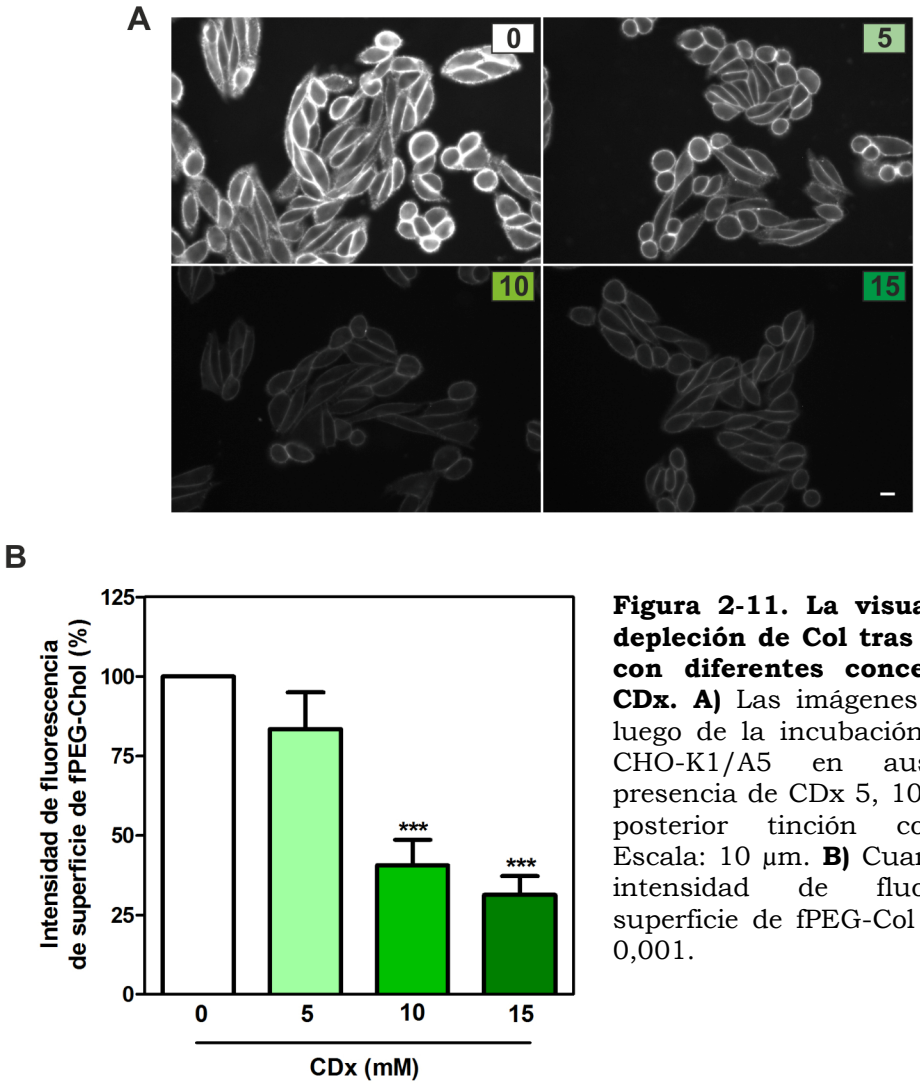


Figura 2-11. La visualización de la depleción de Col tras el tratamiento con diferentes concentraciones de CDx. A) Las imágenes se adquirieron luego de la incubación de las células CHO-K1/A5 en ausencia (0) o presencia de CDx 5, 10 o 15 mM, y su posterior tinción con fPEG-Chol. Escala: 10 µm. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de superficie de fPEG-Col (n=3). (***) $p < 0,001$.

El descenso del contenido de Col en la membrana plasmática (Figura 2-11) está directamente relacionado con la disminución en los valores de la GP promedio de di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-12, A, B y C). Este último cambio, se hace estadísticamente significativo tras la incubación con CDx 15 mM (Figura 2-12C), concentración utilizada para los posteriores experimentos con CDx.

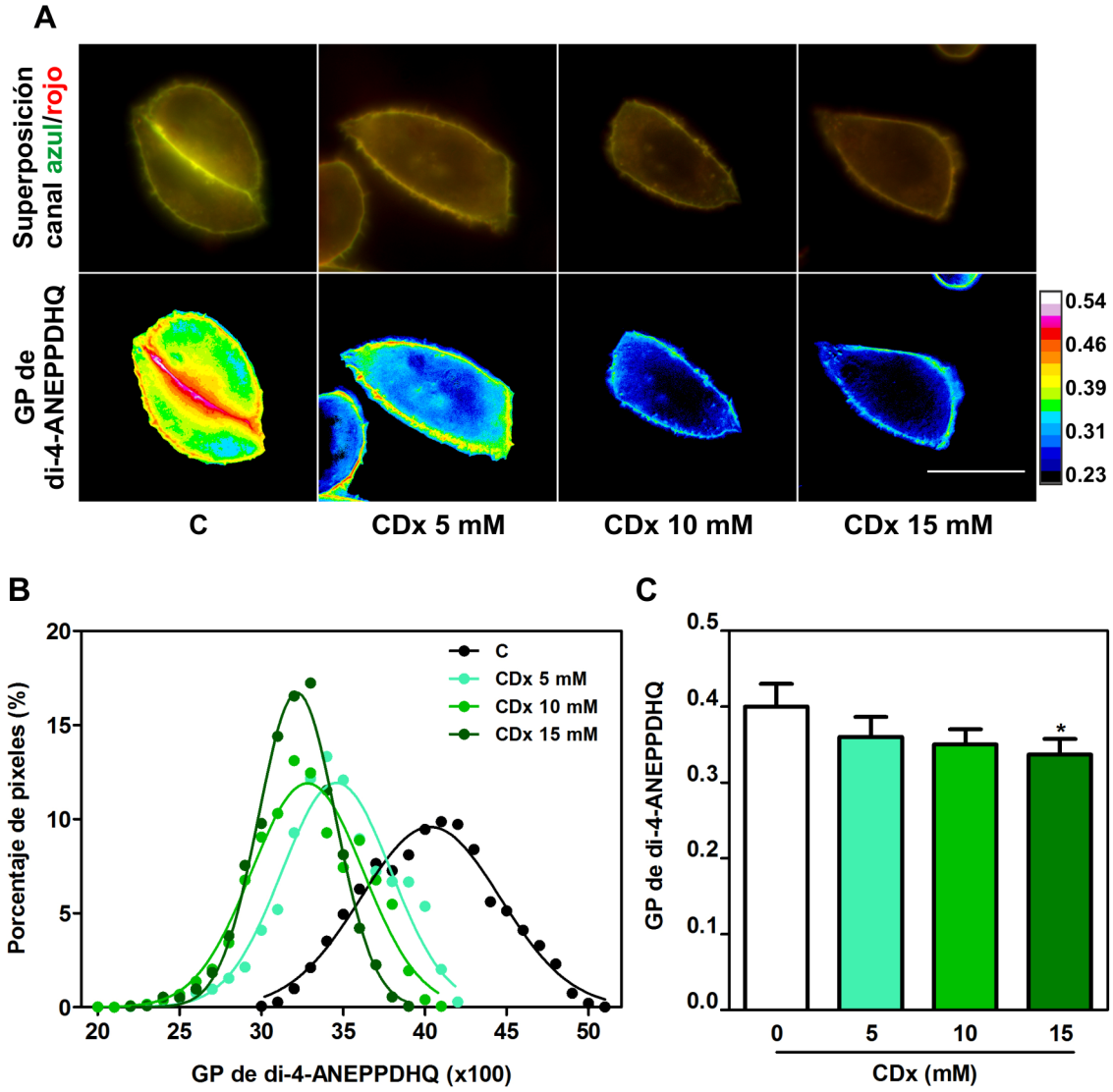


Figura 2-12. Cambios en los valores de la GP de di-4-ANEPPDHQ inducidos por la depleción de Col. A) Imágenes de fluorescencia obtenidas por la superposición de los canales azul y rojo (pseudocoloreados en verde y rojo, respectivamente) y sus correspondientes imágenes de la GP, en células control y tratadas con CDx. Escala: 10 µm. **B)** Histogramas de la distribución de los valores de la GP en la membrana plasmática, basados en una matriz de pixeles normalizada, de las células CHO-K1/A5 para las diferentes condiciones experimentales (n=10 células/condición). **C)** Valores de la GP promedio de membrana, obtenidos por el ajuste de los histrogramas de (B) a distribuciones gausianas (n=3). (*) $p < 0,05$.

Es importante destacar, que debido al tratamiento con concentraciones crecientes de CDx, no solo disminuye la GP promedio, sino que la distribución de la GP por pixel en la superficie celular se hace más homogénea, siendo las regiones con mayor GP, las más afectadas tras la depleción de Col (Figura 2-12A). En consecuencia, el histograma de frecuencias de los valores de la GP se hace más angosto (Figura 2-12B). Estos resultados demuestran que la depleción de Col conduce a la pérdida de la compartimentación de la membrana (Figura 2-12, A y B), coincidentemente con lo demostrado en membranas modelo por López C. y col. (2013).

Nos propusimos luego, determinar si di-4-ANEPPDHQ era capaz de registrar cambios en la GP como consecuencia del incremento de los niveles de Col en la superficie celular (Figura 2-13). Para tal fin, preparamos complejos de CDx-Col tal como lo indicaran Christian A. y col. (1997). En estos complejos, la CDx funciona como vehículo para favorecer el ingreso del Col a las membranas celulares.

La incubación de las células CHO-K1/A5 con CDx-Col durante 30 min a 37 °C, produce un pequeño enriquecimiento de Col en las membranas plasmáticas, evidenciado por el aumento de fluorescencia proveniente del fPEG-Chol (~10 %) (Figura 2-13A). Sin embargo, este cambio no es detectado por la GP de di-4-ANEPPDHQ, que no muestra diferencias significativas entre la condición control y la incubada con CDx-Col (Figura 2-13B).

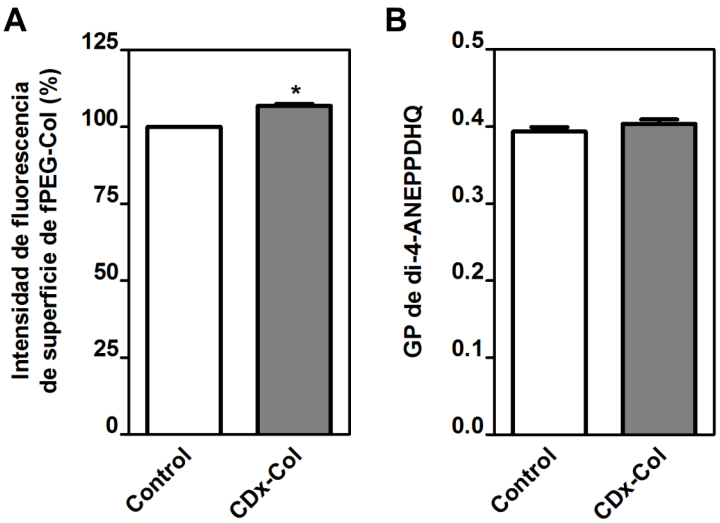


Figura 2-13. El tratamiento con CDx-Col no afecta a la GP de di-4-ANEPPDHQ. Las células CHO-K1/A5 se incubaron durante 30 min a 37 °C con CDx-Col, y posteriormente se tiñieron con fPEG-Chol **(A)** o di-4-ANEPPDHQ **(B)**, y se cuantificaron los cambios en la intensidad de fluorescencia o los valores de la GP promedio de membrana, respectivamente. (*) $p < 0,05$.

EL AChR Y LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La BTX vs el mAb 210

Como ya mencionáramos, la amplitud del espectro de excitación de di-4-ANEPPDHQ, genera inconvenientes para la elección de un fluoróforo que no produzca interferencias al co-marcar al AChR en las células CHO-K1/A5 (Figura 2-9, espectro gris claro).

Evaluamos entonces, si la tinción de las células con Alexa^{647}-BTX o con di-4-ANEPPDHQ producía sangrado en los canales correspondientes al otro fluoróforo (Figura 2-14). La figura 2-14A muestra la adquisición de las imágenes para cada fluoróforo, excitado a las longitudes de onda correspondientes a sí mismo y a la otra sonda. Comprobamos que, en las condiciones de marcación aplicadas y con la combinación de filtros seleccionada, no existe sangrado de la señal de di-4-ANEPPDHQ ni de Alexa^{647}-BTX, por lo cual es adecuado el uso de esta toxina para la marcación del AChR (Figura 2-14B).

Sin embargo, la marcación de las células CHO-K1/A5 con BTX fluorescentes, tal como se puede observar en las imágenes del capítulo 1, tiñe a toda la membrana plasmática de forma difusa, lo que impide determinar la localización del AChR en dominios más o menos ordenados (Figura 2-15). No obstante, la unión del anticuerpo monoclonal mAb 210 a la subunidad α1 del AChR en células CHO-K1/A5, produce la clusterización de los receptores. Estos clústeres son visibles con el microscopio de campo ancho, lo que nos permite diferenciar zonas de la superficie celular con o sin agregados de AChR (Borroni V. y col., 2007; Baier C. y Barrantes F., 2007; Gallegos C. y col., 2008). Aprovechando esta segregación de los AChR en la membrana plasmática, incubamos las células CHO-K1/A5 con este anticuerpo, seguido de la marcación con un anticuerpo secundario Alexa^{647} (Figura 2-16, A, C, D y E), y finalmente di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-16B), con el fin de establecer si existía una correlación entre los clústeres de AChR y el estado físico de la membrana donde se encontraban insertos.

Es de destacar, que la clusterización del AChR por mAb 210 no afectó las propiedades de la membrana, ya que los valores de la GP promedio

obtenidos (Figura 2-16F) son iguales a los valores de la GP de las células CHO-K1/A5 en ausencia de marcación con anticuerpo (Figura 2-12C). A su vez, los valores de la GP promedio correspondientes a regiones de la membrana delimitadas (Figura 2-16, D y F: mAb 210+) o no (Figura 2-16, E y F: mAb 210-) por clústeres de AChR no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

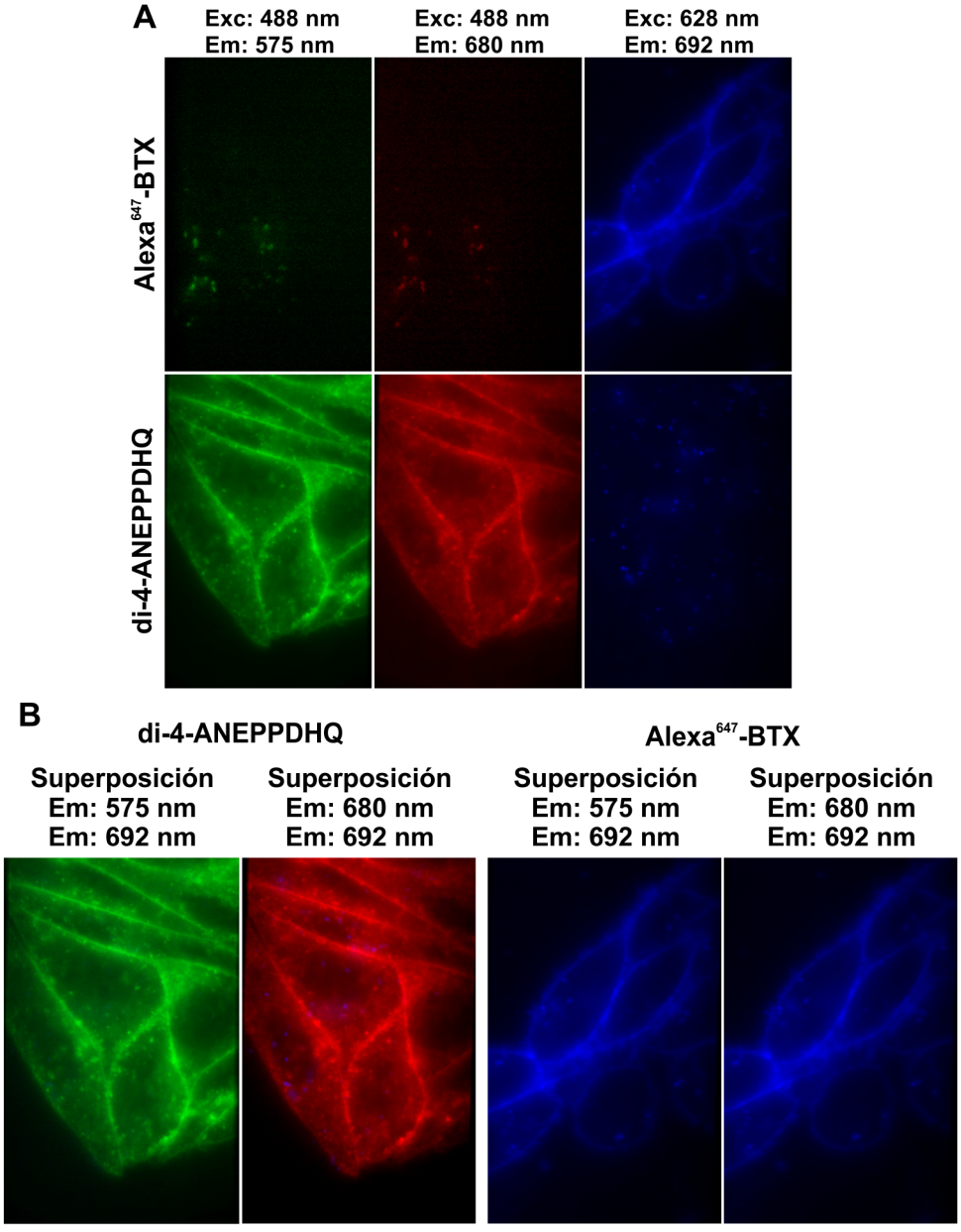


Figura 2-14. Ausencia de sangrado entre los canales de emisión de Alexa^{647}-BTX y de di-4-ANEPPDHQ. A) Las células CHO-K1/A5 se marcaron con Alexa^{647}-BTX (arriba) o con di-4-ANEPPDHQ (abajo) y se registró la emisión (Em) en los canales de los dos fluoróforos a la excitación (Exc) correspondiente a cada uno de ellos. **B)** Superposición de las imágenes obtenidas en (A). Imágenes representativas de tres experimentos.

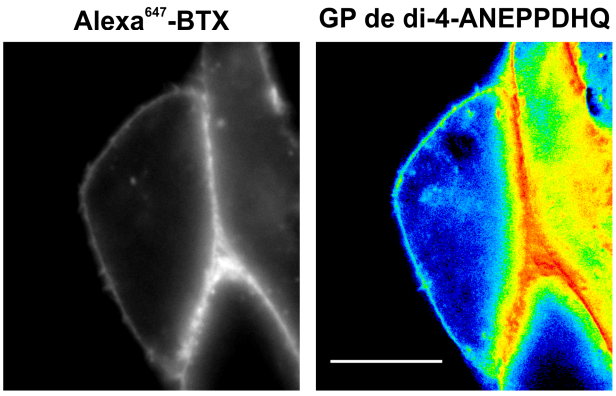


Figura 2-15. Alexa^{647}-BTX y di-4-ANEPPDHQ. Células CHO-K1/A5 co-marcadas con ambos fluoróforos. Escala: 10 µm.

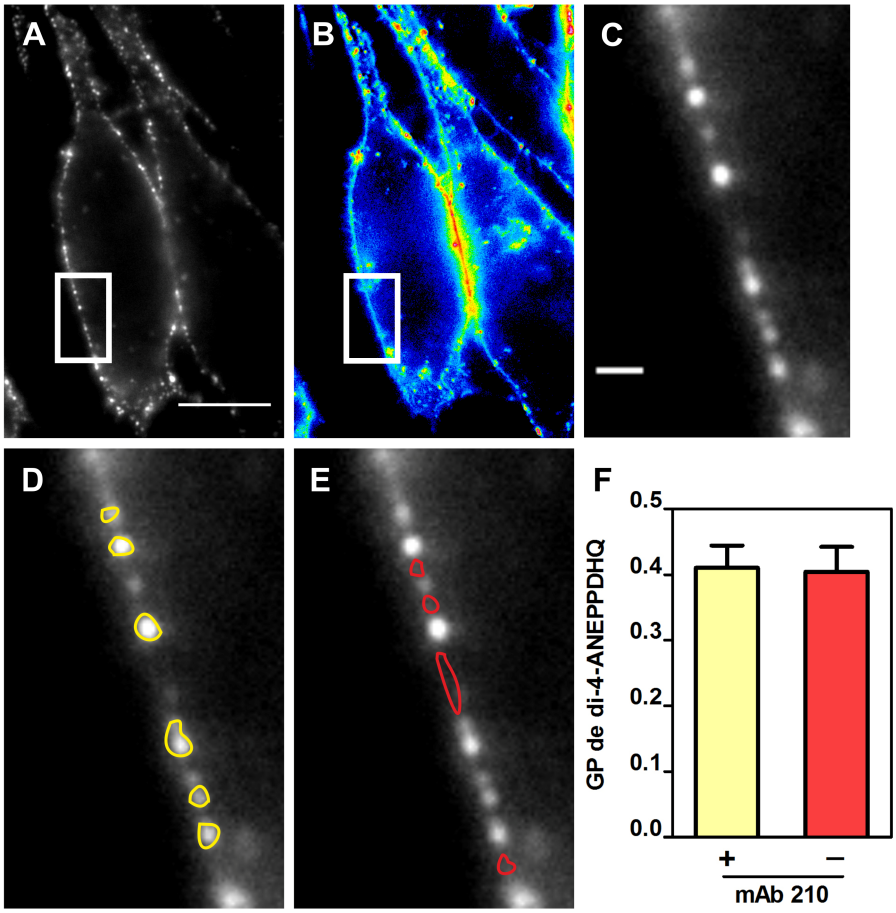


Figura 2-16. Los valores de la GP en regiones de la membrana con o sin presencia de AChR. Las células CHO-K1/A5 se co-marcaron primero con mAb 210 junto al anticuerpo secundario Alexa^{647} (A, C, D, E), y finalmente con di-4-ANEPPDHQ (B), antes de la adquisición de las imágenes. **A)** La unión de mAb 210 al AChR en la membrana plasmática induce la clusterización de los receptores. **B)** Imagen de la GP de di-4-ANEPPDHQ. El rectángulo blanco en (A) y (B) señala la zona donde se realizó el análisis. **C-E)** Área magnificada, correspondiente a la imagen (A). Se muestran las ROI trazadas en zonas de la membrana donde se localizan (**D**, en amarillo zonas mAb 210+) o no (**E**, en rojo zonas mAb 210-) los clústeres de AChR. **F)** Valores de la GP promedio de la superficie celular en zonas mAb 210+ (amarillo) o mAb 210- (rojo) (n=3). Escala: 10 µm en (A) y (B), y 1 µm en (C), (D) y (E).

Estos resultados demuestran que los agregados de AChR en las células CHO-K1/A5 se encuentran asociados a dominios de membrana con una composición lipídica, y por lo tanto contenido de Col, similar al resto de la membrana. Sin embargo, la imposibilidad de detectar cambios podría atribuirse también al hecho de que el tamaño de los dominios de membrana buscados, es menor al límite de resolución de la microscopía de campo ancho empleada (Kellner R. y col., 2007; Owen D. y col., 2011). Para subsanar esta situación, decidimos comparar el valor de la GP de di-4-ANEPPDHQ correspondiente a cada ROI de clúster de AChR, con el valor promedio de la GP de la membrana celular completa (ver más detalles en la sección en Materiales y Métodos).

El AChR y el Col

El Col es uno de los componentes estructurales principales de los dominios más ordenados de las membranas celulares (Jin L. y col., 2006), y en particular, es un elemento esencial de estabilización y determinación del mecanismo y la velocidad de endocitosis del AChR (Borroni V. y Barrantes F., 2011). Con el fin de evaluar la participación de este lípido en la asociación del AChR con dominios de membrana, incubamos las células CHO-K1/A5 con CDx 15 mM a 37 °C durante 30 min, para lograr la disminución de los niveles de Col en la superficie celular. Pasado este tiempo, se realizó la tinción correspondiente con mAb 210 junto con el anticuerpo secundario Alexa^{647} y finalmente di-4-ANEPPDHQ, todos tratamientos realizados a 4 °C. Las imágenes se procesaron y analizaron, para obtener la distribución de los AChR con respecto al promedio de la GP de la membrana plasmática. Tal como lo describimos en la sección Materiales y Métodos, clasificamos los valores de la GP asociados a los clústeres de AChR en mayor, menor o igual a la GP de la membrana.

La intensidad de marcación de los clústeres de AChR con mAb 210/Alexa^{647} disminuye casi un 70 % como consecuencia del tratamiento con CDx 15 mM (Figura 2-17). A su vez, tal como mostramos previamente (Figura 2-12), se puede observar que el tratamiento con CDx reduce los valores de la GP promedio de la membrana (Figura 2-18, A y B). Además, casi el 90 % de los clústeres de AChR en las células CHO-K1/A5 depletadas de Col, se localizan en dominios de membrana con valores de la GP menores que los

correspondientes a los AChR en la condición control. Esto puede inferirse de la escasa superposición de los histogramas de distribución de la GP asociada a los clústeres de AChR (Figura 2-18C).

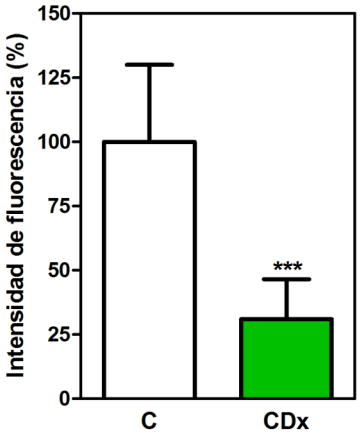


Figura 2-17. Disminución de la intensidad de fluorescencia en los clústeres de AChR por el tratamiento con CDx. Las células CHO-K1/A5 se tiñeron con mAb 210/Alexa^{647} y se cuantificó la intensidad de fluorescencia emitida por cada clúster de AChR (n = 200 clústeres de AChR). (***) $p < 0{,}001$.

Es importante destacar que la disminución de los niveles de Col afecta significativamente a la distribución de los clústeres de AChR en la membrana plasmática. La cantidad de acúmulos de AChR asociados con valores de la GP menor que el promedio de la GP de la membrana aumenta, con el concomitante descenso del número de clústeres asociados a dominios de membrana con GP mayor (Figura 2-18D).

El AChR y el citoesqueleto de actina

Diversos estudios en distintos sistemas establecieron la importancia del citoesqueleto de actina para una correcta organización y estabilidad del AChR en la membrana plasmática (Godfrey E. y Schwarte R., 2010; Pato C. y col., 2008; Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a). El mismo fenómeno fue establecido en las células CHO-K1/A5, en donde la despolimerización del citoesqueleto de actina, inhibe la endocitosis del AChR, e incrementa el tamaño de los clústeres de receptor (Kumari S., y col., 2008; Baier C. y col., 2010; Borroni V. y Barrantes F., 2011, Wenz J. y col., 2010).

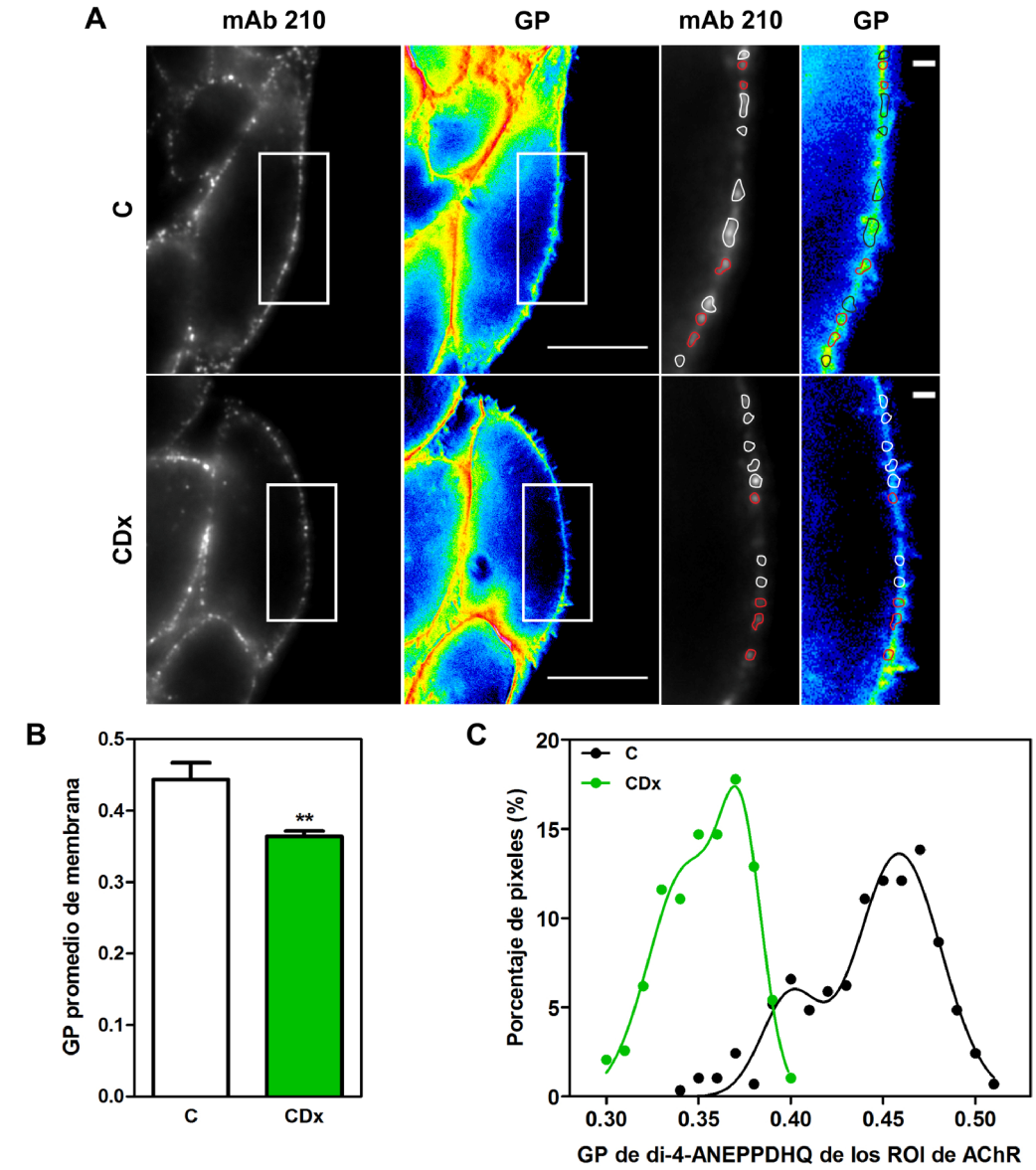


Figura 2-18. La distribución de los clústeres de AChR en la membrana se modifica por la depleción de Col. A) Las células CHO-K1/A5, en la condición control y CDx (15 mM), se co-marcaron con anti-AChR Alexa^{647} (mAb 210) y con di-4-ANEPPDHQ. Las regiones de la membrana celular donde se realizó el análisis, se destacan con un rectángulo. Los clústeres de AChR asociados con áreas de la membrana con valores de la GP menores o mayores que el promedio de la GP de la membrana, se resaltan en blanco o en rojo, respectivamente. Escala: 10 µm, en las imágenes con el rectángulo blanco, y 1 µm, en las imágenes magnificadas. **B)** La GP promedio de membrana para la condición control y depletada de Col (CDx). **C)** Histogramas de la distribución de los valores de la GP de la membrana subyacente a los ROI de clústeres de AChR para cada condición, ajustados a la suma de dos funciones Gaussianas. **D)** Clústeres de AChR con valores de la GP menores, mayores o iguales que los valores promedio de la GP de la membrana donde se localizan.
(n=3). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Es de destacar, que la unión del antagonista BTX o de anticuerpos, gatilla la internalización del AChR, que ocurre por mecanismos independientes de clatrina, caveolina y dinamina, pero requiere de la correcta polimerización del citoesqueleto de actina (Figura 2-19A) (Kumari S., y col., 2008). Por el contrario, en las células CHO-K1/A5 depletadas de Col, como consecuencia del tratamiento con CDx, la internalización del AChR no depende de la unión de ligandos, de clatrina ni de dinamina, y tampoco es afectada por la disrupción del citoesqueleto (Figura 2-19B) (Borroni V. y Barrantes F., 2011).

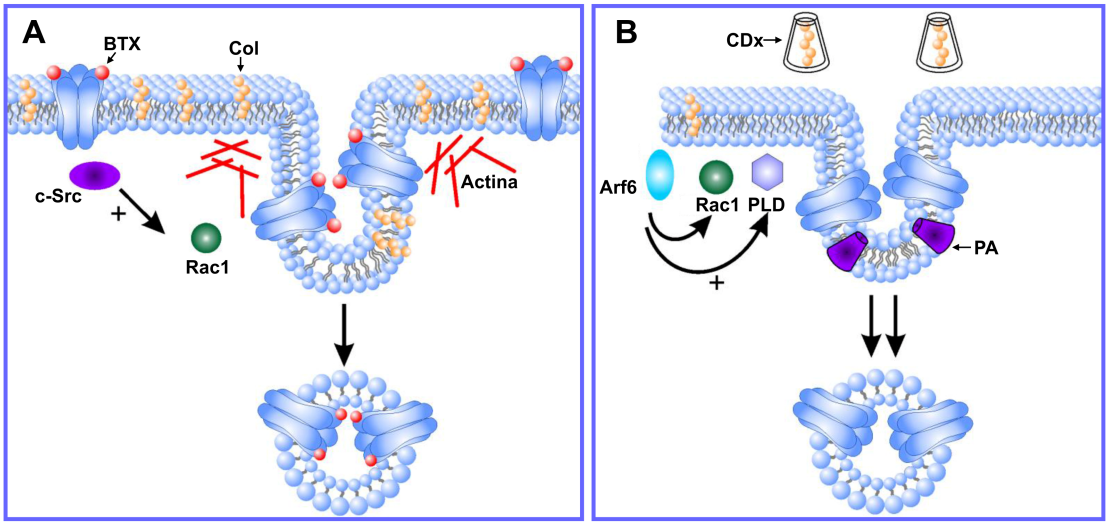


Figura 2-19. La internalización del AChR. Esquemas de los mecanismos de endocitosis seguidos por el AChR en células CHO-K1/A5, en condiciones normales **(A)** y tras la depleción de Col por CDx **(B)**. **A)** La unión del antagonista BTX al AChR gatilla su internalización, mediante una cascada de señalización que involucra la activación de c-Src quinasas y Rac1. El citoesqueleto de actina es regulado por las Rac1 GTPasas, para permitir finalmente la endocitosis del AChR. **B)** La depleción de Col de la superficie celular, acelera la internalización del AChR, proceso independiente de la unión de BTX y de la integridad del citoesqueleto. Sin embargo, requiere de la activación de otra GTPasa, Arf6, y sus efectores Rac1 y PLD. La producción de PA por esta última, cumpliría la función del Col en el microambiente lipídico, favoreciendo la formación de vesículas endocíticas. Tomado y modificado de Borroni V. y Barrantes F., 2011.

Estas diferencias entre los mecanismos de internalización, nos llevaron a investigar si la localización del AChR, en regiones de la membrana plasmática con diferentes valores de la GP, dependía o no de la integridad del citoesqueleto de actina. Por tal motivo, incubamos las células con tres toxinas permeables a la membrana celular, que desorganizan el citoesqueleto de actina por diferentes mecanismos (Figura 2-20). El tratamiento con Citocalasina D (Cito D) o con Latruculina A (Lat A), inhibe la polimerización de

actina, mientras que la Jasplakinolida (Jas) induce la polimerización exacerbada de actina (Figura 2-20).

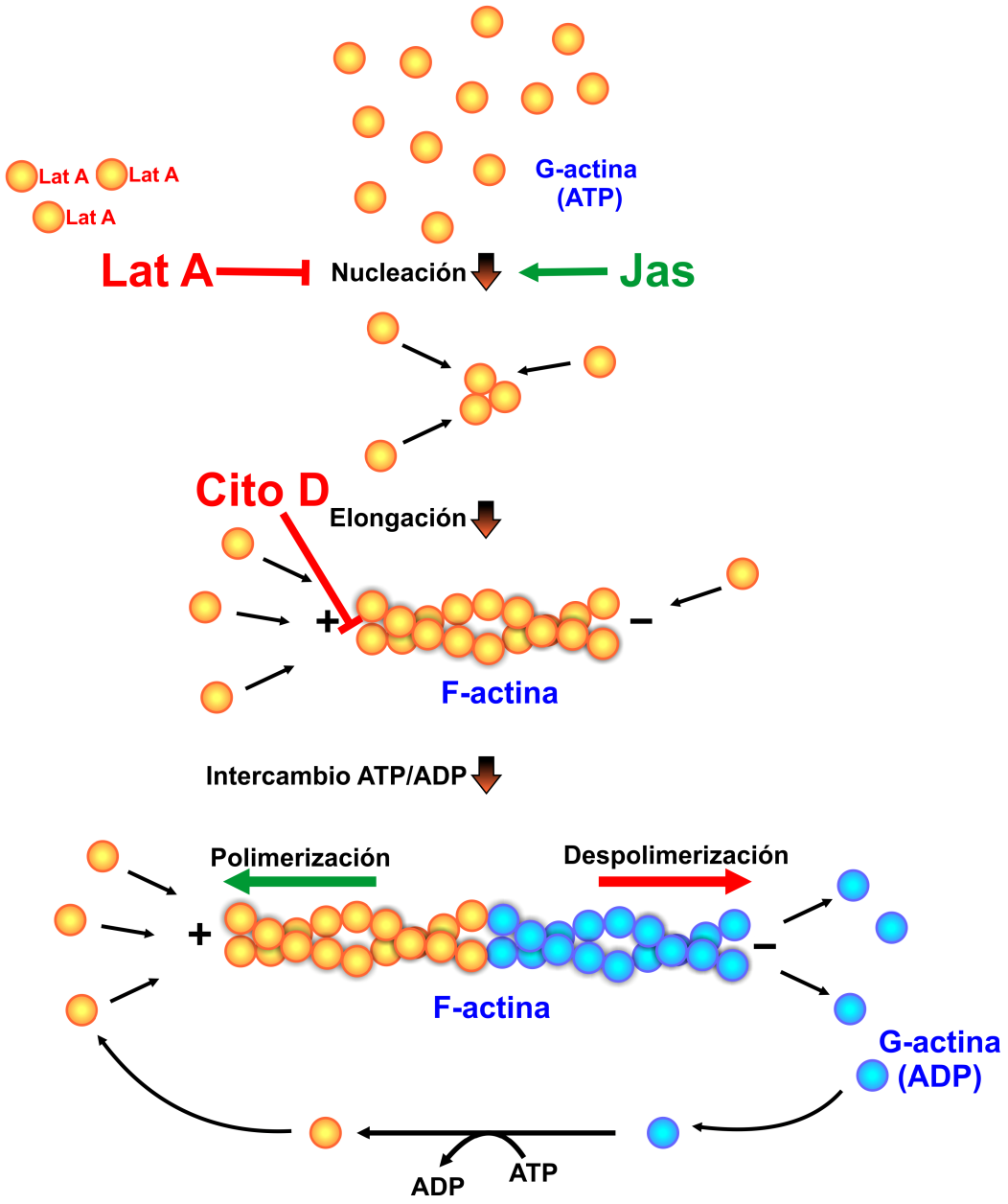


Figura 2-20. La polimerización de actina. En el esquema se muestran los diferentes pasos involucrados en la conversión de G-actina en F-actina. Además se observan a qué niveles actúan las drogas que afectan la polimerización de actina utilizadas: Cito D, Lat A y Jas.

La Cito D se une al extremo positivo (+) de los filamentos de actina (F-actina), bloqueando así la adición de nuevos monómeros (G-actina) e impidiendo su elongación (Figura 2-20, Cito D) (Fujimoto L. y col., 2000; Lamaze C. y col., 1997; Sampath P. y Pollard T., 1991). Esta inhibición en la

polimerización de actina termina produciendo el agrupamiento de los filamentos restantes en la célula (Borroni V. y Barrantes F., 2011).

La Lat A forma complejos con la G-actina (1:1) (Figura 2-20, Lat A), y de esta forma, secuestra los monómeros de actina impidiendo que se polimericen en filamentos. Como consecuencia, el equilibrio de formación de actina se desplaza hacia el estado desensamblado (Fujimoto L. y col., 2000; Lamaze C. y col., 1997; Coue M. y col., 1987).

La Jas induce la formación espontánea de sitios de nucleación de G-actina (Figura 2-20, Jas), y por lo tanto, la polimerización desorganizada y desregulada de la actina en masas amorfas. Esto trae como consecuencia la disminución del remodelado de las fibras de stress, y su posterior desaparición, ya que se consumen todos los monómeros de actina libres. A diferencia del tratamiento con Cito D o Lat A, es difícil de observar los cambios sobre el citoesqueleto producidos con Jas mediante la tinción con Faloidina-Rodamina, ya que la Jas compite con el fluoróforo por su sitio de unión a la F-actina (Bubb M. y col., 2000; Fujimoto L. y col., 2000; Bubb M. y col., 1994).

La disrupción del citoesqueleto de actina, tras la incubación durante 2 hs a 37 °C con Cito D 2,5 µM, Lat A 4 µM o Jas 1 µM, produjo cambios en la morfología de las células CHO-K1/A5 (Figura 2-21). La observación de estas alteraciones fue indicativa de la eficacia del tratamiento con las drogas empleadas (Borroni V. y Barrantes F., 2011).

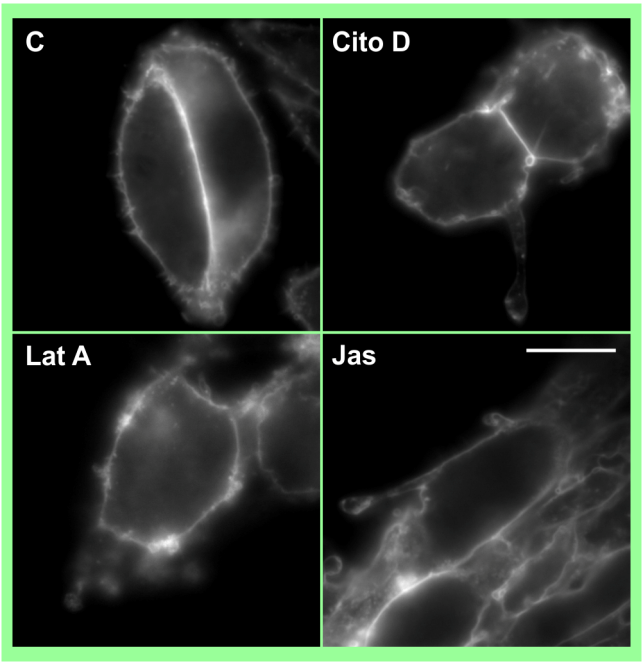


Figura 2-21. Cambios en la morfología celular debidos a la disrupción del citoesqueleto de actina. Imágenes de células CHO-K1/A5 teñidas con di-4-ANEPPDHQ (canal azul), tras el tratamiento con Cito D, Lat A o Jas, y su correspondiente control. Escala: 10 µM.

Además, la incubación con estas tres drogas disruptoras del citoesqueleto produce la inhibición de la internalización del receptor mediada por la BTX (Figura 2-19A) (Kumari S., y col., 2008; Baier C. y col., 2010; Borroni V. y Barrantes F., 2011), tal como lo muestra la figura 2-22A para el tratamiento con Lat A 4 μM (Internalización de la BTX).

Tras aplicar el análisis realizado previamente (Figura 2-18), observamos que la despolimerización de la actina gatillada por Lat A aumenta el número de clústeres de AChR ubicados en regiones de la membrana plasmática con valores de la GP mayores al promedio general de toda membrana. Esto es acompañado por la disminución de los clústeres de AChR asociados a regiones con menor GP (Figura 2-22, A y B). La misma tendencia de cambio se produce por el tratamiento con Cito D y Jas. Sin embargo, la dispersión de los datos impide la obtención de un resultado con significancia estadística (Figura 2-22B).

Es importarte destacar, que los valores de la GP promedio de la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 no se encuentran modificados por las alteraciones del citoesqueleto de actina inducidas por el tratamiento durante 2 hs a 37 °C con Cito D 2,5 μM, Lat A 4 μM o Jas 1 μM (Figura 2-22C).

Con los resultados obtenidos en las figuras 2-22 y 2-18, podemos concluir que la disrupción del citoesqueleto con Lat A 4 μM afecta de manera opuesta a la localización de los clústeres de AChR en dominios lipídicos, que la depleción del Col causada por el tratamiento con CDx 15 mM.

El AChR: la interacción con antagonistas y agonistas

Nos propusimos a continuación, determinar si la unión de antagonistas o agonistas al AChR afectaba su distribución en dominios de membrana con diferentes valores de la GP.

Entre los ligandos que se unen al AChR, la BTX merece una mención especial, ya que facilitó la visualización y determinación de este receptor, para lograr su estudio exhaustivo a lo largo de los años (Changeux JP., 2012). Comenzamos entonces los experimentos con este antagonista, que además, luego de unirse al AChR de forma casi irreversible, induce su endocitosis en células CHO-K1/A5, con una vida media de internalización de 1,98 hs (Figura

2-23A, Internalización de la BTX) (Borroni V. y col., 2007; Kumari S. y col., 2008).

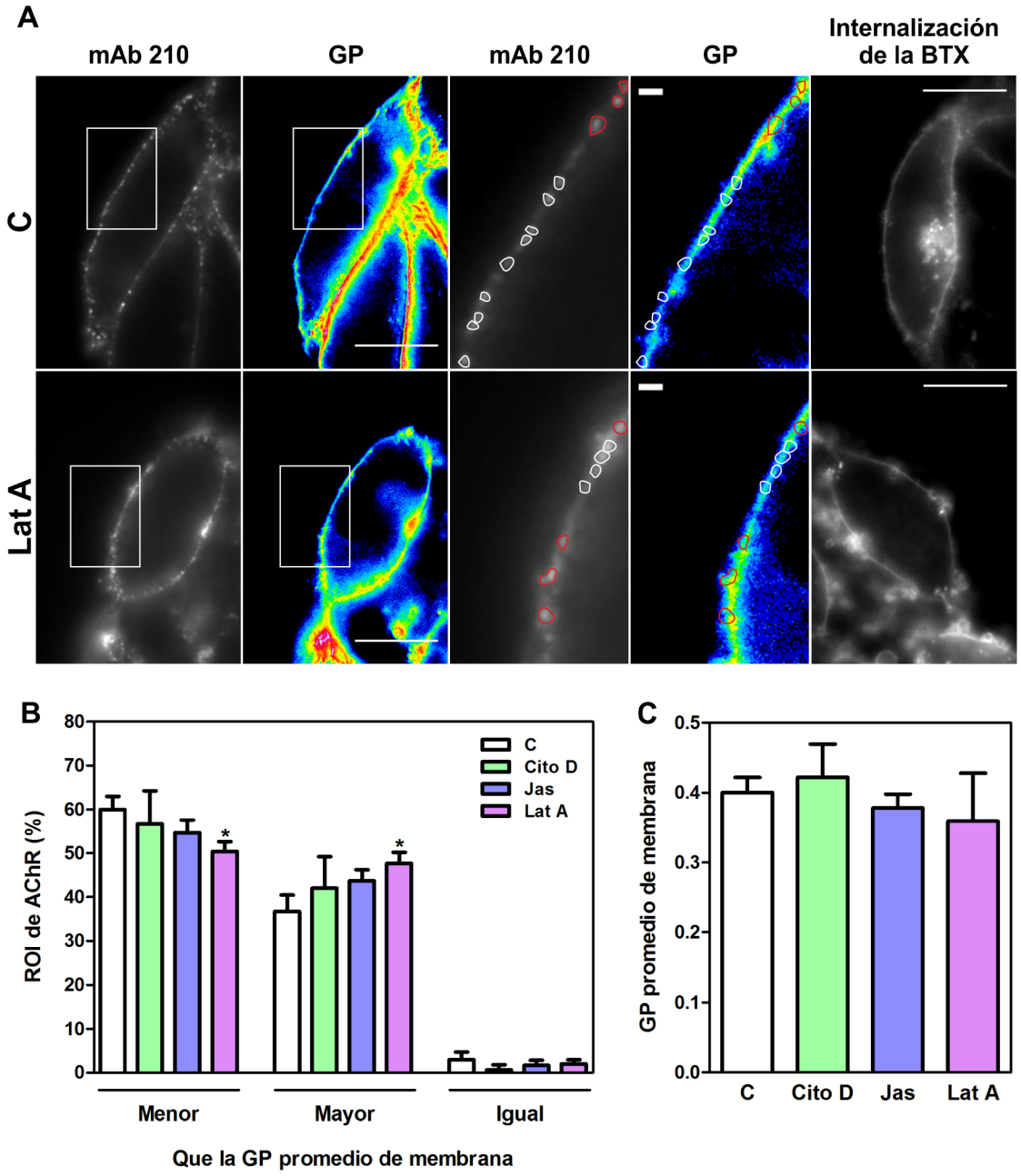


Figura 2-22. La integridad del citoesqueleto de actina afecta la distribución del AChR en regiones de la membrana con diferentes valores de la GP. Las células CHO-K1/A5 se incubaron durante 2 hs a 37 °C con DMSO (C), Cito D 2,5 µM, Jas 1 µM o Lat A 4 µM. **A)** Imágenes de fluorescencia de las células de la condición control y Lat A, marcadas y analizadas como en la figura 2-18. En las imágenes correspondientes a la internalización de BTX para ambas condiciones, la tinción con Alexa^{647}-BTX se realizó previamente a la incubación con las drogas 2 hs a 37 °C. Escala: 10 µm, en las imágenes con el rectángulo blanco y de internalización de BTX, y 1 µm, en las imágenes magnificadas. **B)** ROI de clústeres de AChR con valores de la GP menores, mayores o iguales que los valores promedio de la GP de la membrana donde se localizan. **C)** La GP promedio de la membrana plasmática para las condiciones control y con alteraciones en el citoesqueleto de actina (Cito D, Jas y Lat A).
(n=3). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Por lo expuesto, decidimos cuantificar la asociación de los clústeres de AChR remanentes en la superficie celular, luego de la endocitosis inducida por la BTX, con dominios lipídicos de diferentes valores de la GP. Para tal fin, tratamos a las células CHO-K1/A5 con BTX, para luego incubarlas durante 2 hs a 37 °C y así permitir la internalización del AChR. Finalmente teñimos a las células con el par de anticuerpos mAb 210/secundario Alexa^{647}, y di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-23A).

Al realizar el mismo análisis que en los experimentos de las figuras 2-18 y 2-22, observamos que la internalización del AChR gatillada por la BTX no modifica la localización en dominios lipídicos de los clústeres de receptor remanentes en la superficie celular (Figura 2-23B), ni tampoco altera los valores de la GP promedio de la membrana plasmática (Figura 2-23C). Estos resultados indicarían que los efectos de este antagonista sobre el AChR son indiferentes a la distribución de la proteína receptora en regiones de la membrana con diferentes valores de la GP.

Luego, nos preguntamos si la unión de agonistas al AChR alteraría la ubicación de los clústeres de receptor en la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5. Elegimos dos agonistas que se unen a este receptor de forma reversible y con gran afinidad: Nicotina (Nic) y Carbamilcolina (Carb). Akk G. y Auerbach A. (1999) demostraron que la Carb presenta mayor afinidad que la Nic por el AChR muscular adulto, logrando en consecuencia una mayor constante de apertura del canal. La exposición prolongada del AChR a altas concentraciones de agonistas, lleva al receptor a un estado conformacional en el que el canal está cerrado, pero tiene ocupados los sitios de unión a ligandos. Este estado se denomina desensibilizado y tiene importancia, ya que impide la sobre-activación del AChR (daCosta C. y Baenziger J., 2013; Zouridakis M. y col., 2009; Andreeva I. y col., 2006). Es por eso que decidimos probar los efectos de la desensibilización del AChR en las células CHO-K1/A5, sobre la asociación con dominios de membrana con diferente GP.

Las células se expusieron a altas concentraciones de los agonistas, Nic 100 μM y Carb 500 μM, con el objetivo de alcanzar la desensibilización de los AChR. Luego de la incubación con Nic y Carb durante 30 y 50 min a 37 °C, respectivamente, se realizó la tinción con los anticuerpos y di-4-ANEPPDHQ, como en los experimentos con BTX (Figura 2-23).

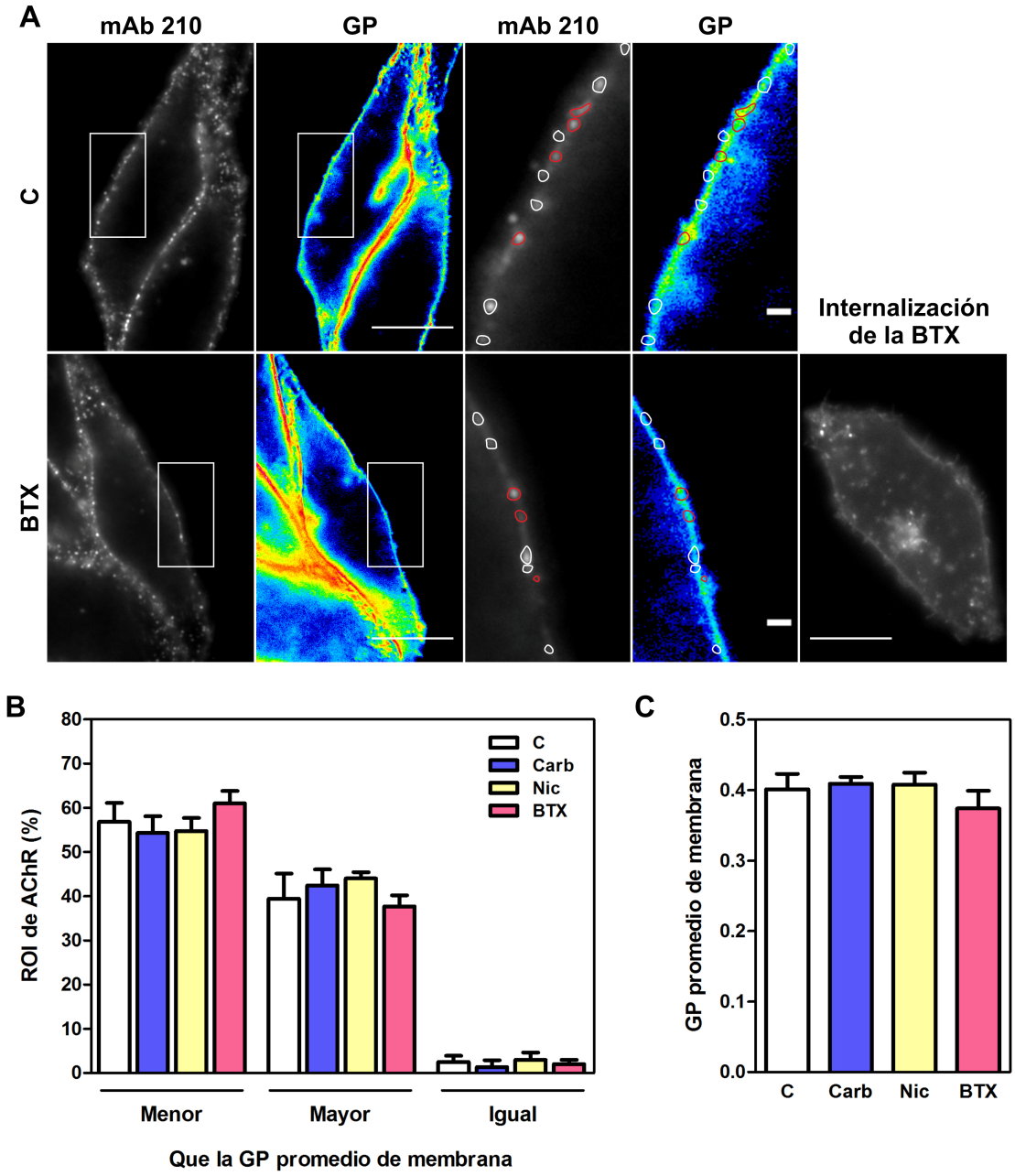


Figura 2-23. La distribución del AChR en dominios de membrana con menor o mayor GP no se modificó por la unión de antagonista o agonistas. A) Células CHO-K1/A5 incubadas en presencia o ausencia de BTX, y luego llevadas a una estufa a 37 °C durante 2 hs. Las condiciones de marcación con los fluoróforos se realizaron como en la figura 2-18. La verificación de la internalización de la BTX durante el intervalo de tiempo elegido (2 hs a 37 °C), se realizó con un control adicional, en el cual las células se tiñeron con Alexa^{647}-BTX (Internalización de la BTX). Escala: 10 µm, en las imágenes con el rectángulo blanco y de internalización de BTX, y 1 µm, en las imágenes magnificadas. **B)** Distribución de los clústeres de AChR (ROI) en regiones con valores mayores, menores o iguales que la GP promedio de la membrana plasmática, luego de la internalización (BTX) o la desensibilización (Nic y Carb) del AChR. **C)** Valores de la GP promedio de la membrana tras la incubación de las células CHO-K1/A5 con Carb, Nic y BTX.
(n=3).

Tal como sucede tras la unión del antagonista, la desensibilización de los AChR inducida por los agonistas, no modifica la GP promedio de la membrana plasmática (Figura 2-23C), ni la localización de los clústeres de AChR en los diferentes dominios de la membrana (Figura 2-23B).

Habiendo demostrado como se afecta o no la localización de los clústeres de AChR en dominios de la membrana con diferentes valores de GP como consecuencia de la depleción del Col (Figura 2-18), la disrupción del citoesqueleto (Figura 2-22) o la unión de antagonistas y agonistas (Figura 2-23), en la Tabla 1 compilamos un resumen de los resultados obtenidos (marcados con una cruz):

Drogas utilizadas	GP promedio de la membrana plasmática vs la condición control			Ubicación predominante de los clústeres de AChR vs la condición control		
	Menor GP	Mayor GP	Sin cambio	Menor GP	Mayor GP	Sin cambio
CDx	X			X		
Cito D			X			X
Jas			X			X
Lat A			X		X	
BTX			X			X
Nic			X			X
Carb			X			X

Tabla 1. Modificaciones sufridas por las células CHO-K1/A5 debidas a los tratamientos con las diferentes drogas.

LA ENDOCITOSIS DEL AChR Y LOS DOMINIOS LIPÍDICOS

Luego del estudio de los cambios de la localización de los clústeres de AChR en dominios de membrana con diferentes valores de la GP como consecuencia de la depleción del Col (Figura 2-18) o de la disrupción del citoesqueleto (Figura 2-22), nos propusimos evaluar el destino del AChR internalizado y su asociación con la GP de los compartimentos intracelulares de membrana.

Comenzamos estos experimentos, determinando que sucedía con la internalización de la sonda que ampliamente utilizamos en este capítulo con el fin de cuantificar indirectamente los cambios en la fluidez de las membranas estudiadas: di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-24). Teñimos las células CHO-K1/A5 con este fluoróforo a 4 °C, y seguidamente las incubamos durante 2 hs a 37 °C, condiciones experimentales elegidas por permitir la internalización del 50 % del AChR presente en la membrana plasmática (Borroni V. y col., 2007; Kumari S. y col., 2008). En las imágenes obtenidas mediante el *Dual-Viewer*, se observa a di-4-ANEPPDHQ en pequeñas vesículas intracelulares y en un compartimento central interno (Figura 2-24, di-4-ANEPPDHQ: flecha y punta de flecha, respectivamente). En las vesículas, la emisión de fluorescencia de la sonda ocurre preferencialmente en el canal rojo (Figura 2-24, di-4-ANEPPDHQ: Superposición canal azul/rojo, flecha), mientras que en el compartimento central predomina la emisión de di-4-ANEPPDHQ en el canal azul (Figura 2-24, di-4-ANEPPDHQ: Superposición canal azul/rojo, punta de flecha). En consecuencia, los valores de la GP de las vesículas son muchísimo menores a los del compartimento central (Figura 2-24, di-4-ANEPPDHQ: GP, flecha y punta de flecha, respectivamente).

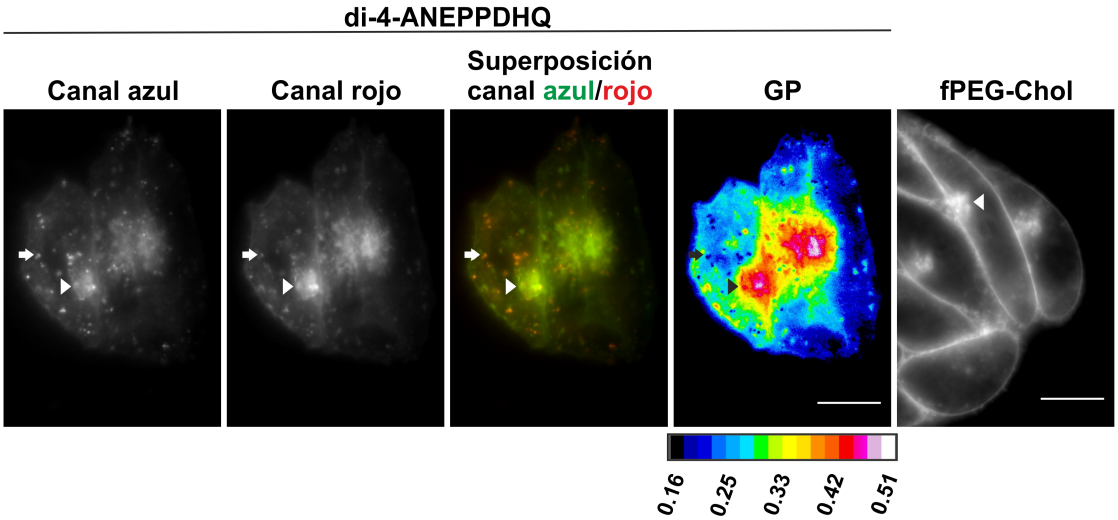


Figura 2-24. La internalización de di-4-ANEPPDHQ y fPEG-Chol en células CHO-K1/A5. Las células se marcaron con di-4-ANEPPDHQ o fPEG-Chol a 4 °C, y luego se incubaron durante dos horas a 37 °C. Di-4-ANEPPDHQ se hizo presente intracelularmente en vesículas pequeñas (flecha) o en un compartimento central (punta de flecha). Este compartimento también se observó tras la internalización del fPEG-Chol (punta de flecha). Escala: 10 µM.

La diferencia en el orden de estas membranas internas podría estar reflejando diferencias en el contenido de Col de estos compartimentos. Como

herramienta para la visualización de este lípido, incubamos a las células con fPEG-Chol, siguiendo el mismo protocolo de internalización que empleamos para di-4-ANEPPDHQ y el AChR (Figura 2-24, fPEG-Chol). El sangrado entre los espectros de fPEG-Chol y di-4-ANEPPDHQ (ambas sondas se excitan a 488 nm) imposibilitó la co-marcación de las células con estos fluoróforos. Sato S. y col. (2004) demostraron que el fPEG-Chol se une a la membrana plasmática en dominios ricos en Col, para ser luego lentamente internalizado en endosomas junto con marcadores de dominios *raft*, por un mecanismo independiente de clatrina.

Luego de 2 horas de incubación a 37 °C, el fPEG-Chol se localiza en la membrana plasmática y en un compartimento intracelular (Figura 2-24, fPEG-Chol, punta de flecha) de morfología similar al observado en las células CHO-K1/A5 tras la internalización de di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-24, di-4-ANEPPDHQ, punta de flecha). Esto sugeriría que existe una relación entre los valores altos de la GP y el alto contenido de fPEG-Chol de este compartimento. Por lo tanto, como ya observamos en la membrana plasmática (Figura 2-12), di-4-ANEPPDHQ parece ser un fluoróforo altamente confiable, capaz de poner en evidencia las propiedades biofísicas de los diferentes compartimentos de membrana y reflejar de esta forma su contenido de Col.

Una vez conocidos los patrones de internalización de las sondas a utilizar, nos propusimos realizar la marcación en las células CHO-K1/A5 conjuntamente con Alexa^{647}-BTX, y de esta forma poder relacionar la endocitosis del receptor con el orden de las membranas lipídicas que lo acompañaban en este camino hacia el interior celular (Figura 2-25 y 2-26).

El protocolo de tinción aplicado fue específicamente desarrollado para visualizar exclusivamente a los AChR y a la sonda di-4-ANEPPDHQ, presentes en la membrana plasmática al comienzo del experimento. Por tal motivo, las células CHO-K1/A5 co-marcadas con Alexa^{647}-BTX y di-4-ANEPPDHQ a 4 °C se trasladaron a una estufa a 37 °C durante 2 hs, para permitir la internalización de las sondas (Figura 2-25A).

Se puede observar que el AChR presenta un patrón de internalización similar al de di-4-ANEPPDHQ (Figura 2-25A, BTX y di-4-ANEPPDHQ), en vesículas pequeñas (Figura 2-25A, BTX: flecha) y en un compartimento central (Figura 2-25A, BTX: punta de flecha). La marcación de las vesículas pequeñas evidenciada por Alexa^{647}-BTX, co-localiza en un 40 % con el fluoróforo di-4-ANEPPDHQ internalizado (Figura 2-24A, flecha: BTX y di-4-ANEPPDHQ:

Superposición canal rojo/BTX y canal azul/BTX). Los valores de la GP en estas pequeñas vesículas que contienen moléculas de AChR internalizado, es mucho menor que los valores obtenidos para la membrana plasmática (Figura 2-25B: V y MP, respectivamente; y 2-25A, di-4-ANEPPDHQ GP: flecha). A su vez, el compartimento central de depósito de Alexa^{647}-BTX presenta valores de la GP mayores que la membrana plasmática y por lo tanto, que las vesículas (Figura 2-25B: CI, MP y V, respectivamente; 2-25A, di-4-ANEPPDHQ GP: punta de flecha).

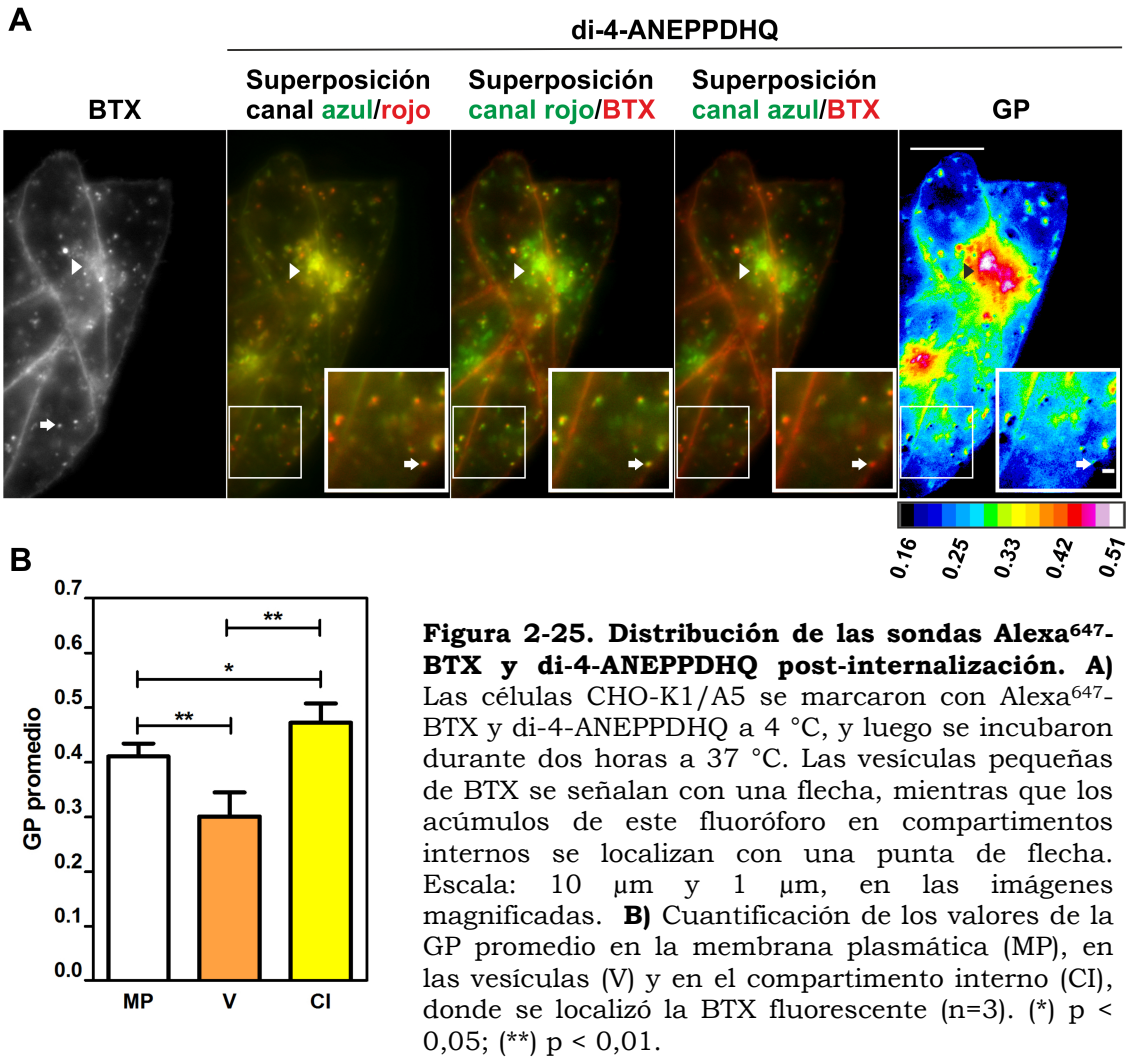


Figura 2-25. Distribución de las sondas Alexa^{647}-BTX y di-4-ANEPPDHQ post-internalización. A) Las células CHO-K1/A5 se marcaron con Alexa^{647}-BTX y di-4-ANEPPDHQ a 4 °C, y luego se incubaron durante dos horas a 37 °C. Las vesículas pequeñas de BTX se señalan con una flecha, mientras que los acúmulos de este fluoróforo en compartimentos internos se localizan con una punta de flecha. Escala: 10 µm y 1 µm, en las imágenes magnificadas. **B)** Cuantificación de los valores de la GP promedio en la membrana plasmática (MP), en las vesículas (V) y en el compartimento interno (CI), donde se localizó la BTX fluorescente (n=3). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Por otra parte, las vesículas que contienen AChR internalizado no co-localizan con la sonda fPEG-Chol (Figura 2-26, flecha), confirmando entonces que la disminución en los valores de la GP de las membranas que componen las vesículas pequeñas refleja su bajo contenido de Col (Figura 2-25B). La

superposición de la marcación de la BTX en el compartimento interno intracelular y el fPEG-Chol internalizado (Figura 2-26, punta de flecha), también es coincidente con los valores de GP encontrados en la figura 2-25B.

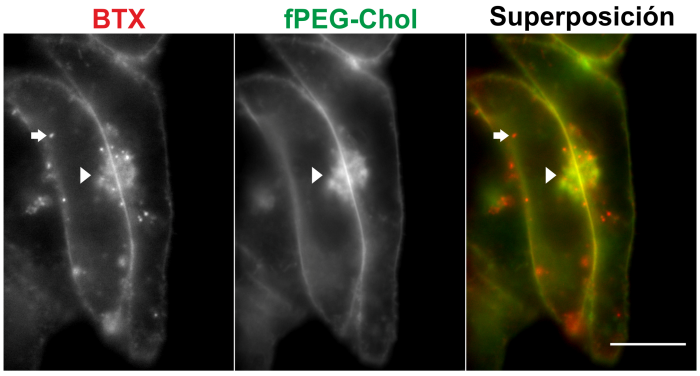


Figura 2-26. La internalización de fPEG-Chol y Alexa^{647}-BTX en células CHO-K1/A5. La co-marcación con estos fluoróforos se realizó a 4 °C, para luego incubar las células durante dos horas a 37 °C. Las vesículas pequeñas de BTX se señalan con una flecha, mientras que los acúmulos de este fluoróforo y fPEG-Chol en compartimentos internos se puntualizan con una punta flecha. Escala: 10 µm.

Como estudiamos en este capítulo de Tesis, la depleción de Col propiciada por el tratamiento con CDx, además de acelerar la internalización del AChR (Borroni V. y Barrantes F., 2011), aumenta la población de clústeres de AChR que se asocian con dominios lipídicos de membrana con bajos valores de la GP (Figura 2-18). Para evaluar si estos cambios afectaban también a las membranas que acompañaban al AChR internalizado, teñimos a las células CHO-K1/A5 con Alexa^{647}-BTX y fPEG-Chol a 4 °C, y las trasladamos durante 30 min a una estufa a 37 °C, en presencia o ausencia de CDx (Figura 2-27).

En la figura 2-27 se observa que en la condición control, tanto la BTX fluorescente como el fPEG-Chol apenas se internalizan durante los 30 min del experimento. Esto es contrastante con lo que sucede tras el tratamiento con CDx, donde todo el AChR presente en la membrana plasmática se internaliza en vesículas pequeñas (Figura 2-27, CDx: BTX). Es de destacar que el patrón de internalización del fPEG-Chol cambia drásticamente, como consecuencia de la incubación con CDx (Figura 2-27, fPEG-Chol). Además de reducirse el contenido total de fPEG-Chol (Figura 2-11), esta sonda se internaliza en vesículas pequeñas intracelulares. Sin embargo, solamente el 12 % de las vesículas de BTX co-localizan con las de fPEG-Chol (Figura 2-27, CDx: Superposición). Estos resultados sugieren que la internalización del AChR que

ocurre en endosomas con bajo contenido de Col, es independiente de la vía endocítica que siga este receptor.

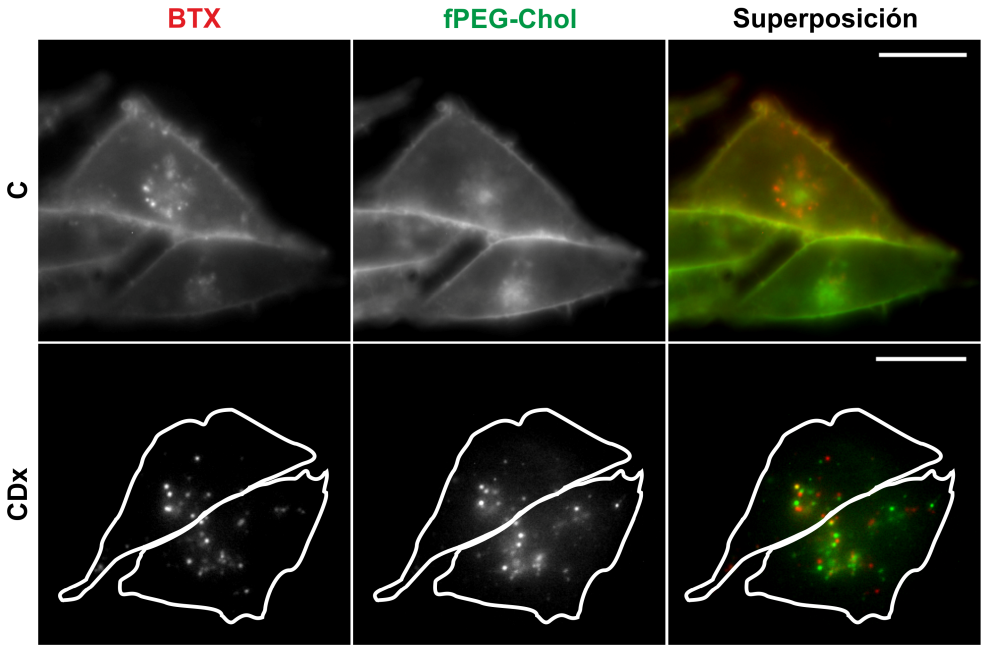


Figura 2-27. La CDx cambia el patrón de internalización de Alexa^{647}-BTX y de fPEG-Chol. Las células CHO-K1/A5 se tiñeron con Alexa^{647}-BTX y fPEG-Chol a 4 °C. A continuación, se incubaron durante 30 min a 37 °C, en presencia o ausencia de CDx 15 mM. Para el tratamiento con CDx, se delimita en blanco el borde de las células. Escala: 10 µm.

Discusión

Capítulo II

Las membranas celulares poseen heterogeneidades laterales, denominadas dominios lipídicos, que funcionarían como centros organizadores de la señalización originada en la superficie celular. Estos dominios actuarían como plataformas, en donde las moléculas de señalización alcanzan una concentración adecuada para lograr una transducción de señales eficiente. La principal característica de estas heterogeneidades es que sus lípidos se encuentran en un estado más ordenado que el resto de los lípidos que conforman la membrana. La posibilidad de ensamblado-desensamblado de estos dominios proporciona un mecanismo de control espaciotemporal sobre los procesos de señalización (Coskun U. y Simons K., 2010; Scott J. y col., 2012).

El Col es uno de los componentes más abundantes de las heterogeneidades laterales de las membranas celulares (Jin L. y col., 2006). Además, es abundante en la membrana de la postsinápsis colinérgica, donde modula la distribución y funcionalidad del AChR (Barrantes F., 2010; Barrantes F. y col., 2010; Barrantes F., 2012). El mecanismo por el cual el Col interacciona con el AChR y produce cambios en la afinidad de unión hacia ligandos, en las propiedades del canal iónico o en la distribución a lo largo de los diferentes compartimentos celulares, todavía no está completamente dilucidado (Barrantes F., 2004; Barrantes F., 2007; Barrantes F., 2010; Barrantes F. y col., 2010).

El objetivo principal de este capítulo de Tesis fue buscar una correlación entre los clústeres de AChR presentes en la superficie celular y el estado físico de los dominios de membrana asociados a ellos. Con este propósito, elegimos utilizar la sonda fluorescente di-4-ANEPPDHQ, la cual es capaz de poner en evidencia la proporción relativa de los dominios Lo y Ld coexistentes en membranas modelos, independientemente del tamaño de estos dominios (Figura 2-4B) (Jin L. y col., 2005). El espectro de emisión de este fluoróforo sufre un corrimiento hacia menores longitudes de onda cuanto mayor es el orden de la membrana donde se localiza, con una diferencia aproximada de 60 nm entre dominios Lo y Ld (Figura 2-4B y 2-7B) (Jin L. y col., 2005; Jin L. y col., 2006; Dinic J. y col., 2011).

Basándonos en esta propiedad del fluoróforo, determinamos entonces el estado físico, e indirectamente el contenido de Col, de las regiones de la membrana plasmática en las que se localizaban los clústeres de AChR mediante la obtención de la GP de di-4-ANEPPDHQ. Es importante destacar

que los valores de la GP son cocientes de intensidades de fluorescencia, recogidas en los canales azul y rojo, y esto independiza a la medición de la concentración del fluoróforo o del área superficial de la región de la célula evaluada (Gaus K. y col., 2006).

El empleo del *Dual-Viewer* nos permitió evitar la distorsión entre las mediciones, que suele ocurrir cuando se realiza la toma de las imágenes de forma secuencial, debido al intervalo de tiempo que separa a la adquisición de ambas imágenes. Además, las imágenes nos brindan no solo la posibilidad de cuantificar la GP, sino que también aportan la resolución espacial necesaria para establecer la correlación entre de los valores de la GP y los clústeres de AChR (Figura 2-16). El grado de orden de la membrana plasmática observado en las células CHO-K1/A5 tras la tinción con di-4-ANEPPDHQ es similar al obtenido anteriormente utilizando espectroscopía de fluorescencia en membranas aisladas de estas mismas células, mediante el cálculo de la GP de Laurdan (Zanello L. y col., 1996).

La GP de di-4-ANEPPDHQ medida en la superficie celular se reduce como consecuencia de la disminución del contenido de Col, siendo las regiones con mayores valores de la GP las más afectadas por la depleción de este lípido mediada por CDx (Figura 2-12A). Este resultado es el esperable, ya que las regiones de la membrana con mayores valores de la GP, corresponden a dominios más ordenados, y por lo tanto con mayor contenido de Col (Jin L. y col., 2006).

Un trabajo recientemente publicado por López C. y col. (2013), detalla el mecanismo de depleción de Col por CDx en membranas modelos con coexistencia de dominios Lo y Ld (Figura 2-10). Si bien la afinidad de la CDx por ambos dominios lipídicos sería similar, los autores concluyen que la extracción de Col es más favorable en las membranas Ld, donde el Col presenta constantes movimientos oscilatorios que facilitan su captura por los dímeros de CDx (Figura 2-10B). En cambio en los dominios Lo, el Col forma complejos estequiométricos con los fosfolípidos saturados que le impiden su proyección en la fase acuosa, y por lo tanto limitan su contacto con la CDx. Por lo que, finalmente la depleción de Col en dominios Ld causaría la redistribución del Col desde dominios Lo a los Ld en membranas modelo (Figura 2-10A). En las células CHO-K1/A5 se observan cambios similares a los postulados por López C. y col. (2013), ya que *luego del tratamiento con CDx, la distribución de los valores de la GP se hace mas homogénea: la curva de*

distribución de los valores de la GP se desplaza hacia la izquierda, se hace más angosta y permite un mejor ajuste a una función Gaussiana (Figura 2-12B). El valor promedio de la GP de la membrana disminuye, demostrando que *la GP de di-4-ANEPPDHQ, calculada sobre una matriz de píxeles de intensidades de fluorescencia, nos brinda una buena estimación del contenido de Col en las células estudiadas* (Jin L. y col., 2005; Jin L. y col., 2006; Miguel L. y col., 2011).

El AChR ubicado en la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 se agrupa en clústeres que poseen un tamaño aproximado de 55 nm. Debido al límite impuesto por la difracción de la luz en la microscopia óptica convencional, este valor fue calculado en base a la aplicación de microscopía de superresolución (Kellner R. y col., 2007; Wenz J. y col., 2010). Sin embargo, tras la unión del mAb 210, los clústeres de AChR se agrupan y pueden ser resueltos mediante microscopia de fluorescencia convencional. En condiciones controles de experimentación (marcación con anticuerpos y di-4-ANEPPDHQ a 4 °C y posterior obtención de imágenes), *la GP promedio de la membrana donde se localizan los clústeres del AChR no difiere de los valores promedio obtenidos en regiones de la misma membrana que no presentan receptor* (Figura 2-16F). Esta ausencia de preferencia se observó anteriormente en los AChR reconstituidos en membranas modelo (Bermúdez V. y col., 2010) y en células C2C12 sin diferenciar (Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a), en ambos casos utilizando la sonda Laurdan.

En las células C2C12, el AChR se asocia con dominios lipídicos más ordenados luego del tratamiento con agrina, molécula que gatilla la formación de clústeres micrométricos de este receptor. La estabilidad de estos microagregados es dependiente de la asociación con dominios ricos en Col (Campagna J. y Fallon J., 2006; Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a). Por lo tanto, la asociación del AChR con dominios Lo estaría sujeta a la regulación de señales específicas. En este sentido, la organización del AChR en la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5 no sigue los pasos de las células C2C12, como consecuencia de la ausencia de proteínas específicas de señalización/clusterización presentes en el tejido muscular, como lo son rapsina y Musk (Borroni V. y col., 2007; Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a).

El Col actúa como un factor estabilizador del AChR en la superficie celular (Barrantes F., 2007; Barrantes F., 2012), por lo que su depleción acelera la endocitosis de este receptor (Borroni V. y col., 2007) y modifica el

camino de internalización del mismo volviéndolo dependiente de Arf6 (Figura 2-19) (Borroni V. y Barrantes F., 2011). Estos cambios serían una consecuencia de la disminución específica del Col en los dominios lipídicos a los que se asocian los clústeres de AChR en la membrana plasmática. Esto se ve reflejado *en las células CHO-K1/A5, en las que frente a la depleción del Col, se altera la distribución de los clústeres de AChR en la superficie celular, predominando los clústeres asociados con dominios de baja GP* (Figura 2-18 y 2-28). Es de destacar que estos experimentos se desarrollaron luego del tratamiento con CDx, cuando la mitad de los AChR de la superficie celular se encuentra internalizada, y por lo tanto la cuantificación de los cambios de distribución por la depleción de Col corresponde a los AChR remanentes en membrana plasmática.

En otra serie de experimentos, buscamos cuantificar el contenido de Col de los distintos compartimentos intracelulares. Utilizamos condiciones de experimentación en las cuales pusimos en evidencia únicamente el Col proveniente de la membrana plasmática, como consecuencia de su internalización. Para tal fin, las células se marcaron con fPEG-Chol, tal como lo indica la sección Materiales y Métodos. Es interesante observar que los AChR internalizados en vesículas pequeñas en las células CHO-K1/A5 no co-localizan con el análogo fluorescente del Col (Figura 2-26), siendo el valor promedio de la GP de estas vesículas menor que el de la membrana plasmática (Figura 2-25B). Este fenómeno es independiente del camino endocítico seguido por el AChR, ya que sucede lo mismo cuando las células son tratadas con CDx (Figura 2-27), situación en la cual los AChR se internalizan por una vía dependiente de Arf6 (Figura 2-19) (Borroni V. y Barrantes F., 2011). Los resultados encontrados sugieren que *la asociación de los AChR con dominios lipídicos con bajos valores de la GP, es decir bajo contenido de Col, favorece su endocitosis. Efectivamente, estos experimentos complementan a la premisa que establece que el Col es un factor estabilizante del AChR* (Barrantes F., 2007; Barrantes F., 2010; Barrantes F., 2012), *por lo que la posibilidad de que los AChR asociados a dominios con menor GP permanezcan en la superficie celular es menos probable* (Figura 2-28).

Tal como sucede con otras proteínas (Plowman S. y col., 2005; Tian T., 2007), *la distribución de los clústeres de AChR en dominios lipídicos es independiente de la cantidad neta de receptor en la superficie celular.* Cuando las células son incubadas con BTX y el 50 % de los AChR presentes en la

membrana plasmática se internaliza, la distribución del AChR en dominios con diferentes valores de la GP en relación al valor promedio de la membrana no difiere de lo observado en células en donde no se produjo dicha endocitosis (Figura 2-23). *Esto mostraría la contribución de las moléculas de AChR a la organización de su entorno lipídico*, tal como se demostrara por nuestro laboratorio en diferentes trabajos a lo largo de los años (Barrantes F., 2004; Barrantes F., 2007; Barrantes F., 2010; Barrantes F., 2012).

Como sucede con el Col, *la asociación de los clústeres de AChR con el citoesqueleto de actina es otro factor importante en la organización del entorno lipídico del receptor*. La disrupción de la actina en las células CHO-K1/A5 modifica la distribución de los clústeres de AChR en dominios lipídicos. *El tratamiento con Lat A*, droga que se une a los monómeros de actina para prevenir así la formación de F-actina (Figura 2-20) (Fujimoto L. y col., 2000; Lamaze C. y col., 1997; Coue M. y col., 1987) *conduce a la asociación del AChR con dominios de membrana con valores de la GP mayores que el promedio de la membrana plasmática* (Figura 2-22 y 2-28). Estos resultados sugieren que la distribución de los AChR en la superficie celular es regulada por la integridad del citoesqueleto de actina. Efectos similares mediados por actina se observan en otras proteínas, tales como receptores asociados a proteínas G (Ganguly S. y Chattopadhyay A., 2010; Sah V. y col., 2000), ERK (Pullikuth A. y Catling A., 2007) y Src quinasas (Chichili G. y Rodgers W., 2007). Se postula que esta asociación/disociación con dominios lipídicos de diferentes características estructurales sirven como control de la transducción de señales. Las modificaciones en la distribución de los clústeres de AChR por la disrupción del citoesqueleto de actina mediada por Lat A, podría ser consecuencia de alteraciones en la estructura de los dominios lipídicos y/o la deficiencia de interacciones entre el citoesqueleto de actina y el AChR.

Estudios previos demostraron que el citoesqueleto de actina puede impartir orden sobre los lípidos de la membrana plasmática (Gaus K. y col., 2005; Liu A. y Fletcher D., 2006), por lo que se propone a la actina como un factor de estructuración de los dominios lipídicos en las células (Chichili G. y Rodgers W., 2009). Sin embargo, *no detectamos cambios en los valores de la GP promedio de la membrana plasmática en las células CHO-K1/A5 tras el tratamiento con las tres drogas disruptoras del citoesqueleto* (Figura 2-22C). Esto nos indicaría que *en nuestro sistema de estudio, la alteración del citoesqueleto de actina no induce cambios generales en la fluidez de la*

membrana, sugiriendo entonces que la estructura de los dominios lipídicos permanece conservada.

Curiosamente, la internalización de los AChR de la superficie celular inducida por la unión del ligando BTX, es inhibida cuando la estructura del citoesqueleto de actina se encuentra alterada (Figura 2-22A, Internalización de la BTX) (Kumari S. y col., 2008). Es decir que la función del citoesqueleto de actina sobre la estabilidad del AChR es muy compleja y todavía no se alcanzó a dilucidar. Para la endocitosis del AChR gatillada por ligandos es indispensable la polimerización de la actina (Kumari S. y col., 2008), pero a su vez la interacción con actina es necesaria para estabilizar y mantener los clústeres de AChR encontrados en células musculares en cultivo, tales como la línea C2C12 (Godfrey E. y Schwarte R., 2010; Pato C. y col., 2008; Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a).

Los resultados encontrados en este capítulo nos indican que *la estabilidad del citoesqueleto de actina se encuentra directamente relacionada con la organización del AChR en la superficie celular*. La señalización mediada por agrina en las células musculares C2C12, lleva a que el efecto estructurador de la actina en la formación de dominios lipídicos ordenados permita la asociación de los clústeres de AChR con estos dominios y con proteínas que favorecen el proceso de clusterización, para finalmente formar agregados micrométricos de este receptor (Cartaud A. y col., 2011; Stetzkowski-Marden F. y col., 2006a). Sin embargo, en las células CHO-K1/A5, la unión de nanoclústeres de AChR y la polimerización de actina facilitan la internalización este receptor (Kumari S. y col., 2008). *Si el citoesqueleto de actina correctamente ensamblado previene la asociación de pequeños clústeres con dominios de membrana con valores altos de la GP, se puede suponer que su disrupción eliminará esta barrera* (Figura 2-22 y 2-28), y llevará al incremento en el tamaño de los nanoclústeres de AChR (Wenz J. y col., 2010) y por lo tanto a la reducción de la velocidad de internalización del receptor estudiado (Kumari S. y col., 2008).

En síntesis, en este capítulo de Tesis demostramos que la distribución de los AChR en los diferentes dominios lipídicos de la membrana se encontraría perfectamente balanceada por mecanismos dinámicos, sin depender exclusivamente de las propiedades biofísicas de esta proteína. Las modificaciones en este balance, traen consecuencias en los niveles del AChR presente en la superficie celular, así también como en el grado de

internalización. Los mecanismos que operan en la correcta distribución de los AChR en dominios específicos en las células CHO-K1/A5 involucran la disponibilidad de Col y la integridad del citoesqueleto de actina (Figura 2-28), elementos esenciales para lograr la compartimentación de la membrana plasmática.

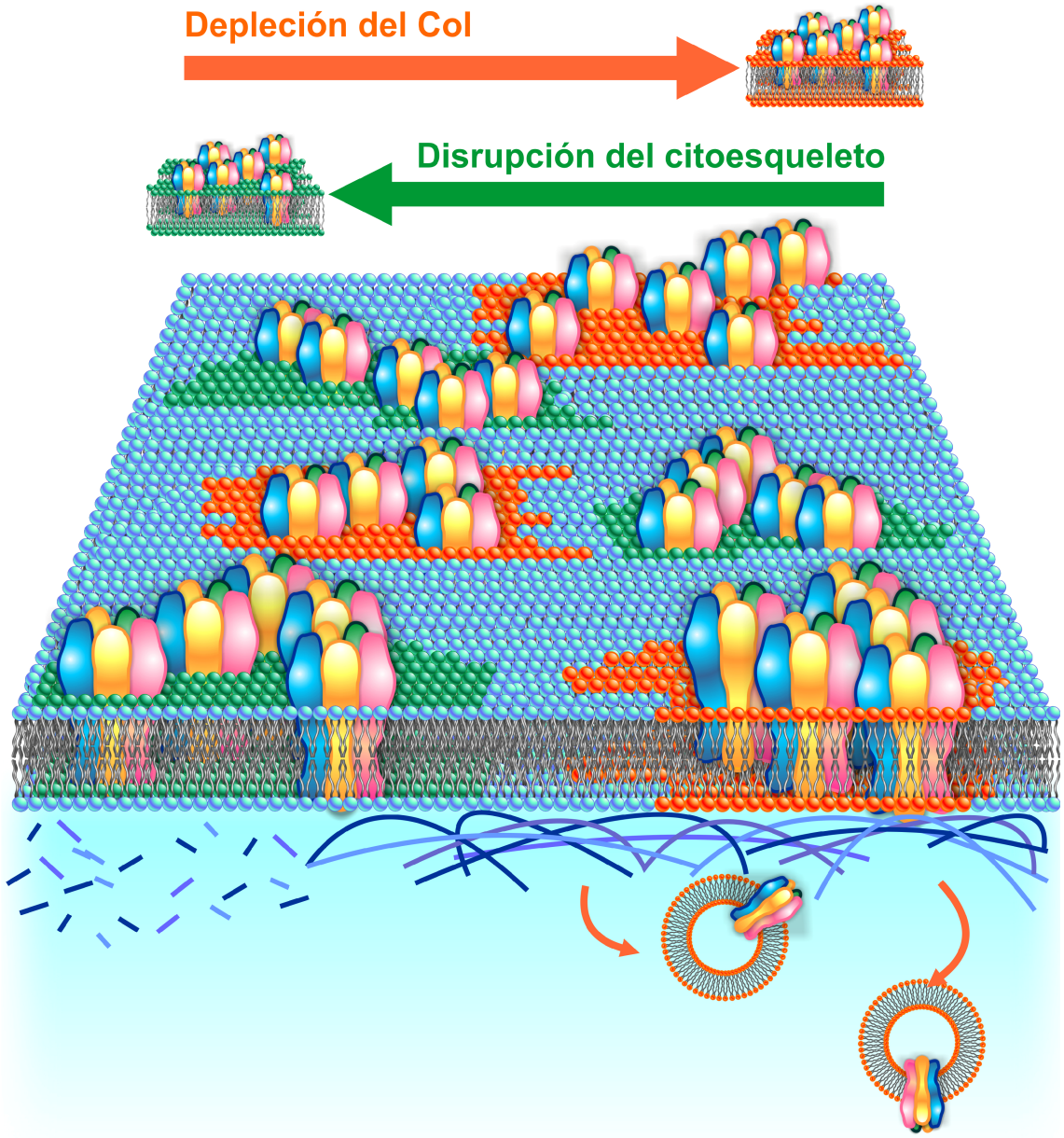


Figura 2-28. Cambios en la distribución de los clústeres de AChR mediados por la depleción del Col o la disrupción del citoesqueleto, en las células CHO-K1/A5. Los fosfolípidos coloreados en verde corresponden a regiones de la membrana plasmática con mayor valor de la GP, y por lo tanto más ordenadas, que el promedio de la GP de la membrana (fosfolípidos en celeste); mientras que los fosfolípidos naranjas corresponden a regiones con menor valor de la GP (más Ld).

Referencias

Akk,G. and Auerbach,A. (1999). Activation of muscle nicotinic acetylcholine receptor channels by nicotinic and muscarinic agonists. Br. J. Pharmacol. 128, 1467-1476.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. Molecular Biology of the Cell, 5th edition. 1-1726. 2008.

Albuquerque,E.X., Pereira,E.F., Alkondon,M., and Rogers,S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. Physiol Rev. *89*, 73-120.

Alder,N.N. and Johnson,A.E. (2004). Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. *279*, 22787-22790.

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

Andersen,N., Corradi,J., Sine,S.M., and Bouzat,C. (2013). Stoichiometry for activation of neuronal alpha7 nicotinic receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *110*, 20819-20824.

Andoh,T., Itoh,H., Higashi,T., Saito,Y., Ishiwa,D., Kamiya,Y., and Yamada,Y. (2004). PKC-independent inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by diacylglycerol. Brain Res. *1013*, 125-133.

Andoh,T., Itoh,H., Watanabe,I., Sasaki,T., and Higashi,T. (2001). Mechanisms of modulation of neuronal nicotinic receptors by substance P and OAG. Am. J. Physiol Cell Physiol *281*, C1871-C1880.

Andreeva,I.E., Nirthanan,S., Cohen,J.B., and Pedersen,S.E. (2006). Site specificity of agonist-induced opening and desensitization of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. Biochemistry *45*, 195-204.

Antal,C.E. and Newton,A.C. (2013). Spatiotemporal dynamics of phosphorylation in lipid second messenger signaling. Mol. Cell Proteomics. *12*, 3498-3508.

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., 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.

Athenstaedt,K. and Daum,G. (1999). Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. Eur. J. Biochem. *266*, 1-16.

Auerbach,A. (2012). Thinking in cycles: MWC is a good model for acetylcholine receptor-channels. J. Physiol *590*, 93-98.

Aveldano,M.I. and Bazan,N.G. (1983). Molecular species of phosphatidylcholine, -ethanolamine, -serine, and -inositol in microsomal and photoreceptor membranes of bovine retina. J. Lipid Res. *24*, 620-627.

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

Baier,C.J., Fantini,J., and Barrantes,F.J. (2011). Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. Sci. Rep. *1*, 69.

Baier,C.J., Gallegos,C.E., Levi,V., and Barrantes,F.J. (2010). Cholesterol modulation of nicotinic acetylcholine receptor surface mobility. Eur. Biophys. J. *39*, 213-227.

Bankaitis,V.A. (2002). Cell biology. Slick recruitment to the Golgi. Science *295*, 290-291.

Baron,C.L. and Malhotra,V. (2002). Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. Science *295*, 325-328.

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. (2010). Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor: cellular aspects. Subcell. Biochem. *51*, 467-487.

Barrantes,F.J. (2012). Regulation of the nicotinic acetylcholine receptor by cholesterol as a boundary lipid. John Wiley & Sons.), pp. 183-204.

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.

Bayes,A. and Grant,S.G. (2009). Neuroproteomics: understanding the molecular organization and complexity of the brain. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 635-646.

Bennett,M.V. (2000). Electrical synapses, a personal perspective (or history). Brain Res. Brain Res. Rev. *32*, 16-28.

Bermudez,V., Antollini,S.S., Fernandez Nievas,G.A., Aveldano,M.I., and Barrantes,F.J. (2010). Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstitution. J. Lipid Res. *51*, 2629-2641.

Beroukhim,R. and Unwin,N. (1995). Three-dimensional location of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. Neuron *15*, 323-331.

Blount,P., Smith,M.M., and Merlie,J.P. (1990). Assembly intermediates of the mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor in stably transfected fibroblasts. J. Cell Biol. *111*, 2601-2611.

Bocquet,N., Prado de,C.L., Cartaud,J., Neyton,J., Le,P.C., Taly,A., Grutter,T., Changeux,J.P., and Corringer,P.J. (2007). A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. Nature *445*, 116-119.

Borges,L.S., Yechikhov,S., Lee,Y.I., Rudell,J.B., Friese,M.B., Burden,S.J., and Ferns,M.J. (2008). Identification of a motif in the acetylcholine receptor beta subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. J. Neurosci. *28*, 11468-11476.

Borroni,V., Baier,C.J., Lang,T., Bonini,I., White,M.M., Garbus,I., and Barrantes,F.J. (2007). Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane. Mol. Membr. Biol. *24*, 1-15.

Borroni,V. and Barrantes,F.J. (2011). Cholesterol modulates the rate and mechanism of acetylcholine receptor internalization. J. Biol. Chem. *286*, 17122-17132.

Boulter,J., Evans,K., Goldman,D., Martin,G., Treco,D., Heinemann,S., and Patrick,J. (1986). Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. Nature *319*, 368-374.

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.

Brocco,M., Pollevick,G.D., and Frasch,A.C. (2003). Differential regulation of polysialyltransferase expression during hippocampus development: Implications for neuronal survival. J. Neurosci. Res. *74*, 744-753.

Brody,A.L., Mandelkern,M.A., London,E.D., Olmstead,R.E., Farahi,J., Scheibal,D., Jou,J., Allen,V., Tiongson,E., Chefer,S.I., Koren,A.O., and Mukhin,A.G. (2006). Cigarette smoking saturates brain alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. Arch. Gen. Psychiatry *63*, 907-915.

Bruneau,E.G. and Akaaboune,M. (2006). The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. Development *133*, 4485-4493.

Bubb,M.R., Senderowicz,A.M., Sausville,E.A., Duncan,K.L., and Korn,E.D. (1994). Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. J. Biol. Chem. *269*, 14869-14871.

Bubb,M.R., Spector,I., Beyer,B.B., and Fosen,K.M. (2000). Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. J. Biol. Chem. *275*, 5163-5170.

Bublitz,M., Musgaard,M., Poulsen,H., Thogersen,L., Olesen,C., Schiott,B., Morth,J.P., Moller,J.V., and Nissen,P. (2013). Ion pathways in the sarcoplasmic

reticulum Ca2+-ATPase. J. Biol. Chem. *288*, 10759-10765.

Buschiazzo,J., Alonso,T.S., Biscoglio,M., Antollini,S.S., and Bonini,I.C. (2011). Nongenomic steroid- and ceramide-induced maturation in amphibian oocytes involves functional caveolae-like microdomains associated with a cytoskeletal environment. Biol. Reprod. *85*, 808-822.

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.

Carrasco,S. and Merida,I. (2007). Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. Trends Biochem. Sci. *32*, 27-36.

Carrillo,C., Hichami,A., Andreoletti,P., Cherkaoui-Malki,M., del Mar,C.M., Abdoul-Azize,S., Alonso-Torre,S.R., and Khan,N.A. (2012). Diacylglycerol-containing oleic acid induces increases in [Ca(2+)](i) via TRPC3/6 channels in human T-cells. Biochim. Biophys. Acta *1821*, 618-626.

Cartaud,A., Stetzkowski-Marden,F., Maoui,A., and Cartaud,J. (2011). Agrin triggers the clustering of raft-associated acetylcholine receptors through actin cytoskeleton reorganization. Biol. Cell *103*, 287-301.

Chakrapani,S. and Auerbach,A. (2005). A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *102*, 87-92.

Chaney,M.O., Demarco,P.V., Jones,N.D., and Occolowitz,J.L. (1974). Letter: The structure of A23187, a divalent cation ionophore. J. Am. Chem. Soc. *96*, 1932-1933.

CHANG,C.C. and LEE,C.Y. (1963). ISOLATION OF NEUROTOXINS FROM THE VENOM OF BUNGARUS MULTICINCTUS AND THEIR MODES OF NEUROMUSCULAR BLOCKING ACTION. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. *144*, 241-257.

Changeux,J.P. (1989). The acetylcholine receptor: its molecular biology and biotechnological prospects. Bioessays *10*, 48-54.

Changeux,J.P. (2010). Allosteric receptors: from electric organ to cognition. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *50*, 1-38.

Changeux,J.P. (2012). The nicotinic acetylcholine receptor: the founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily. J. Biol. Chem. *287*, 40207-40215.

Changeux,J.P., Devillers-Thiery,A., and Chemouilli,P. (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. Science *225*, 1335-1345.

Changeux,J.P. and Edelstein,S.J. (2005). Allosteric mechanisms of signal transduction. Science *308*, 1424-1428.

Changeux,J.P., Kasai,M., Huchet,M., and Meunier,J.C. (1970). [Extraction from electric tissue of gymnotus of a protein presenting several typical properties characteristic of the physiological receptor of acetylcholine]. C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D. *270*, 2864-2867.

Changeux,J.P., Meunier,J.C., and Huchet,M. (1971). Studies on the cholinergic receptor protein of Electrophorus electricus. I. An assay in vitro for the cholinergic receptor site and solubilization of the receptor protein from electric tissue. Mol. Pharmacol. *7*, 538-553.

Chianale,F., Cutrupi,S., Rainero,E., Baldanzi,G., Porporato,P.E., Traini,S., Filigheddu,N., Gnocchi,V.F., Santoro,M.M., Parolini,O., van Blitterswijk,W.J., Sinigaglia,F., and Graziani,A. (2007). Diacylglycerol kinase-alpha mediates hepatocyte growth factor-induced epithelial cell scatter by regulating Rac activation and membrane ruffling. Mol. Biol. Cell *18*, 4859-4871.

Chichili,G.R. and Rodgers,W. (2007). Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. J. Biol. Chem. *282*, 36682-36691.

Chichili,G.R. and Rodgers,W. (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. Cell Mol. Life Sci. *66*, 2319-2328.

Choi,Y.H., Jin,G.Y., Li,L.C., and Yan,G.H. (2013). Inhibition of protein kinase C delta attenuates allergic airway inflammation through suppression of PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 alpha/VEGF pathway. PLoS. One. *8*, e81773.

Choquet,D. and Triller,A. (2013). The dynamic synapse. Neuron *80*, 691-703.

Christian,A.E., Haynes,M.P., Phillips,M.C., and Rothblat,G.H. (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. J. Lipid Res. *38*, 2264-2272.

Christianson,J.C. and Green,W.N. (2004). Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. EMBO J. *23*, 4156-4165.

Chuang,M. and Severson,D.L. (1998). Metabolic fate of exogenous diacylglycerols in A10 smooth muscle cells. Biochim. Biophys. Acta *1390*, 149-159.

Cohen,J.B., Weber,M., Huchet,M., and Changeux,J.P. (1972). Purification from Torpedo marmorata electric tissue of membrane fragments particularly rich in cholinergic receptor protein. FEBS Lett. *26*, 43-47.

Cohen-Cory,S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. Science *298*, 770-776.

Colbran,R.J. (2004). Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. J. Neurosci. *24*, 8404-8409.

Collins,M.O., Husi,H., Yu,L., Brandon,J.M., Anderson,C.N., Blackstock,W.P., Choudhary,J.S., and Grant,S.G. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. J. Neurochem. *97 Suppl 1*, 16-23.

Colombo,S.F., Mazzo,F., Pistillo,F., and Gotti,C. (2013). Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. Biochem. Pharmacol. *86*, 1063-1073.

Colon-Gonzalez,F. and Kazanietz,M.G. (2006). C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. Biochim. Biophys. Acta *1761*, 827-837.

Coorssen,J.R. and Rand,R.P. (1990). Effects of cholesterol on the structural transitions induced by diacylglycerol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayer systems. Biochem. Cell Biol. *68*, 65-69.

Corbalan-Garcia,S., Sanchez-Carrillo,S., Garcia-Garcia,J., and Gomez-Fernandez,J.C. (2003). Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC epsilon. Biochemistry *42*, 11661-11668.

Corringer,P.J., Poitevin,F., Prevost,M.S., Sauguet,L., Delarue,M., and Changeux,J.P. (2012). Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain. Structure. *20*, 941-956.

Coskun,U. and Simons,K. (2010). Membrane rafting: from apical sorting to phase segregation. FEBS Lett. *584*, 1685-1693.

Costes,S.V., Daelemans,D., Cho,E.H., Dobbin,Z., Pavlakis,G., and Lockett,S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. Biophys. J. *86*, 3993-4003.

Coue,M., Brenner,S.L., Spector,I., and Korn,E.D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. FEBS Lett. *213*, 316-318.

daCosta,C.J. and Baenziger,J.E. (2013). Gating of pentameric ligand-gated ion channels: structural insights and ambiguities. Structure. *21*, 1271-1283.

Dale, H. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. 6[J. Pharmacol.], 147-190. 1914.

Das,S. and Rand,R.P. (1986). Modification by diacylglycerol of the structure and interaction of various phospholipid bilayer membranes. Biochemistry *25*, 2882-2889.

Davies,S.P., Reddy,H., Caivano,M., and Cohen,P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem. J. *351*, 95-105.

Davis,R.J., Ganong,B.R., Bell,R.M., and Czech,M.P. (1985). sn-1,2-Dioctanoylglycerol. A cell-permeable diacylglycerol that mimics phorbol diester action on the epidermal growth factor receptor and mitogenesis. J. Biol. Chem. *260*, 1562-1566.

De,R.E. and Barrantes,F.J. (1972). Blocking by -bungarotoxin of the high affinity binding site of the cholinergic receptor proteolipid from Electrophorus. Eur. J. Pharmacol. *17*, 303-305.

Dellisanti,C.D., Yao,Y., Stroud,J.C., Wang,Z.Z., and Chen,L. (2007). Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-

bungarotoxin at 1.94 A resolution. Nat. Neurosci. *10*, 953-962.

Diaz Anel,A.M. and Malhotra,V. (2005). PKCeta is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus. J. Cell Biol. *169*, 83-91.

Dilger,J.P. and Brett,R.S. (1990). Direct measurement of the concentration- and time-dependent open probability of the nicotinic acetylcholine receptor channel. Biophys. J. *57*, 723-731.

Dinic,J., Biverstahl,H., Maler,L., and Parmryd,I. (2011). Laurdan and di-4-ANEPPDHQ do not respond to membrane-inserted peptides and are good probes for lipid packing. Biochim. Biophys. Acta *1808*, 298-306.

Drever,B.D., Riedel,G., and Platt,B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. Behav. Brain Res. *221*, 505-514.

Drexler,H.G., Gignac,S.M., Pettit,G.R., and Hoffbrand,A.V. (1990). Synergistic action of calcium ionophore A23187 and protein kinase C activator bryostatin 1 on human B cell activation and proliferation. Eur. J. Immunol. *20*, 119-127.

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.

Escriba,P.V., Gonzalez-Ros,J.M., Goni,F.M., Kinnunen,P.K., Vigh,L., Sanchez-Magraner,L., Fernandez,A.M., Busquets,X., Horvath,I., and Barcelo-Coblijn,G. (2008). Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. J. Cell Mol. Med. *12*, 829-875.

Evans,J.H., Murray,D., Leslie,C.C., and Falke,J.J. (2006). Specific translocation of protein kinase Calpha to the plasma membrane requires both Ca2+ and PIP2 recognition by its C2 domain. Mol. Biol. Cell *17*, 56-66.

Fan,Y., Li,J., Zhang,Y.Q., Jiang,L.H., Zhang,Y.N., and Yan,C.Q. (2014). Protein kinase C delta mediated cytotoxicity of 6-Hydroxydopamine via sustained extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in PC12 cells. Neurol. Res. *36*, 53-64.

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

Fantini,J. and Barrantes,F.J. (2013). How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. Front Physiol *4*, 31.

Fiszer de,P.S. and De,R.E. (1972). Binding of -bungarotoxin to the cholinergic receptor proteolipid from electrophorus electroplax. Biochim. Biophys. Acta *274*, 258-265.

Forster,T. (2012). Energy migration and fluorescence. 1946. J. Biomed. Opt. *17*, 011002.

Freeley,M., Kelleher,D., and Long,A. (2011). Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. Cell Signal. *23*, 753-762.

Fucile,S. (2004). Ca2+ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. Cell Calcium *35*, 1-8.

Fujimoto,L.M., Roth,R., Heuser,J.E., and Schmid,S.L. (2000). Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. Traffic. *1*, 161-171.

Gahring,L.C. and Rogers,S.W. (2010). Nicotinic receptor subunit alpha5 modifies assembly, up-regulation, and response to pro-inflammatory cytokines. J. Biol. Chem. *285*, 26049-26057.

Gallegos,C.E., Pediconi,M.F., and Barrantes,F.J. (2008). Ceramides modulate cell-surface acetylcholine receptor levels. Biochim. Biophys. Acta *1778*, 917-930.

Gallegos,L.L., Kunkel,M.T., and Newton,A.C. (2006). Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. J. Biol. Chem. *281*, 30947-30956.

Gallegos,L.L. and Newton,A.C. (2008). Spatiotemporal dynamics of lipid signaling: protein kinase C as a paradigm. IUBMB. Life *60*, 782-789.

Ganguly,S. and Chattopadhyay,A. (2010). Cholesterol depletion mimics the effect of cytoskeletal destabilization on membrane dynamics of the serotonin1A receptor: A zFCS study. Biophys. J. *99*, 1397-1407.

Gao,T., Brognard,J., and Newton,A.C. (2008). The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. J. Biol. Chem. *283*, 6300-6311.

Gao,T., Furnari,F., and Newton,A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. Mol. Cell *18*, 13-24.

Gao,T. and Newton,A.C. (2006). Invariant Leu preceding turn motif phosphorylation site controls the interaction of protein kinase C with Hsp70. J. Biol. Chem. *281*, 32461-32468.

Gaus,K., Chklovskaia,E., Fazekas de St,G.B., Jessup,W., and Harder,T. (2005). Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. J. Cell Biol. *171*, 121-131.

Gaus,K., Zech,T., and Harder,T. (2006). Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. Mol. Membr. Biol. *23*, 41-48.

Gharbi,S.I., Rincon,E., Avila-Flores,A., Torres-Ayuso,P., Almena,M., Cobos,M.A., Albar,J.P., and Merida,I. (2011). Diacylglycerol kinase zeta controls diacylglycerol metabolism at the immunological synapse. Mol. Biol. Cell *22*, 4406-4414.

Gibellini,F. and Smith,T.K. (2010). The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. IUBMB. Life *62*, 414-428.

Giorgione,J.R., Lin,J.H., McCammon,J.A., and Newton,A.C. (2006). Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase Cdelta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. J. Biol. Chem. *281*, 1660-1669.

Godfrey,E.W. and Schwarte,R.C. (2010). Nitric oxide and cyclic GMP regulate early events in agrin signaling in skeletal muscle cells. Exp. Cell Res. *316*, 1935-1945.

Gomez,A.M., Van Den Broeck,J., Vrolix,K., Janssen,S.P., Lemmens,M.A., Van Der Esch,E., Duimel,H., Frederik,P., Molenaar,P.C., Martinez-Martinez,P., De Baets,M.H., and Losen,M. (2010). Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis-pathogenesis at the neuromuscular junction. Autoimmunity *43*, 353-370.

Gonzalez-Garcia,J.R., Machaty,Z., Lai,F.A., and Swann,K. (2013). The dynamics of PKC-induced phosphorylation triggered by Ca2+ oscillations in mouse eggs. J. Cell Physiol *228*, 110-119.

Gotti,C. and Clementi,F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. Prog. Neurobiol. *74*, 363-396.

Gotti,C., Clementi,F., Fornari,A., Gaimarri,A., Guiducci,S., Manfredi,I., Moretti,M., Pedrazzi,P., Pucci,L., and Zoli,M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. Biochem. Pharmacol. *78*, 703-711.

Gould,C.M. and Newton,A.C. (2008). The life and death of protein kinase C. Curr. Drug Targets. *9*, 614-625.

Green,W.N. and Claudio,T. (1993). Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. Cell *74*, 57-69.

Greenspan,P., Mayer,E.P., and Fowler,S.D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J. Cell Biol. *100*, 965-973.

Griner,E.M. and Kazanietz,M.G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. Nat. Rev. Cancer *7*, 281-294.

Gschwendt,M., Muller,H.J., Kielbassa,K., Zang,R., Kittstein,W., Rincke,G., and Marks,F. (1994). Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Commun. *199*, 93-98.

Guo,Y., Cordes,K.R., Farese,R.V., Jr., and Walther,T.C. (2009). Lipid droplets at a glance. J. Cell Sci. *122*, 749-752.

Hall,C., Lim,L., and Leung,T. (2005). C1, see them all. Trends Biochem. Sci. *30*, 169-171.

Hamill,O.P., Marty,A., Neher,E., Sakmann,B., and Sigworth,F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch. *391*, 85-100.

Hanks,S.K. (2003). Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. Genome Biol. *4*, 111.

Hansra,G., Garcia-Paramio,P., Prevostel,C., Whelan,R.D., Bornancin,F., and Parker,P.J.

(1999). Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isotypes. Biochem. J. *342 (Pt 2)*, 337-344.

Harikumar,K.G., Puri,V., Singh,R.D., Hanada,K., Pagano,R.E., and Miller,L.J. (2005). Differential effects of modification of membrane cholesterol and sphingolipids on the conformation, function, and trafficking of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. J. Biol. Chem. *280*, 2176-2185.

Head,B.P., Patel,H.H., and Insel,P.A. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. Biochim. Biophys. Acta *1838*, 532-545.

Heberle,F.A. and Feigenson,G.W. (2011). Phase separation in lipid membranes. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*.

Heimburg,T., Wurz,U., and Marsh,D. (1992). Binary phase diagram of hydrated dimyristoylglycerol-dimyristoylphosphatidylcholine mixtures. Biophys. J. *63*, 1369-1378.

Henneberry,A.L., Lagace,T.A., Ridgway,N.D., and McMaster,C.R. (2001). Phosphatidylcholine synthesis influences the diacylglycerol homeostasis required for SEC14p-dependent Golgi function and cell growth. Mol. Biol. Cell *12*, 511-520.

Hogg,R.C., Raggenbass,M., and Bertrand,D. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. Rev. Physiol Biochem. Pharmacol. *147*, 1-46.

Holthuis,J.C. and Luberto,C. (2010). Tales and mysteries of the enigmatic sphingomyelin synthase family. Adv. Exp. Med. Biol. *688*, 72-85.

Hucho,F. and Changeux,J.P. (1973). Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from Electrophorus electricus electric tissue. FEBS Lett. *38*, 11-15.

Hudmon,A. and Schulman,H. (2002). Structure-function of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. Biochem. J. *364*, 593-611.

HUNTER,W.M. and GREENWOOD,F.C. (1962). Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature *194*, 495-496.

Hurst,R., Rollema,H., and Bertrand,D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. Pharmacol. Ther. *137*, 22-54.

Huttner,W.B. and Zimmerberg,J. (2001). Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission. Curr. Opin. Cell Biol. *13*, 478-484.

Inesi,G., Hua,S., Xu,C., Ma,H., Seth,M., Prasad,A.M., and Sumbilla,C. (2005). Studies of Ca2+ ATPase (SERCA) inhibition. J. Bioenerg. Biomembr. *37*, 365-368.

Inoue,M., Kishimoto,A., Takai,Y., and Nishizuka,Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. J. Biol. Chem. *252*, 7610-7616.

Jackson,M.B. (1988). Dependence of acetylcholine receptor channel kinetics on agonist concentration in cultured mouse muscle fibres. J. Physiol *397*, 555-583.

Jamora,C. (1999). 100 years of Golgi complexities. Trends Cell Biol. *9*, 37-38.

Jiang,Y., Sakane,F., Kanoh,H., and Walsh,J.P. (2000). Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. Biochem. Pharmacol. *59*, 763-772.

Jiménez-Monreal, AM., Villalaín, J., Aranda, FJ., and Gómez-Fernández, JC. The phase behavior of aqueous dispersions of unsaturated mixtures of diacylglycerols and phospholipids. [Biochim Biophys Acta], 209-228. 1998.

Jin,L., Millard,A.C., Wuskell,J.P., Clark,H.A., and Loew,L.M. (2005). Cholesterol-enriched lipid domains can be visualized by di-4-ANEPPDHQ with linear and nonlinear optics. Biophys. J. *89*, L04-L06.

Jin,L., Millard,A.C., Wuskell,J.P., Dong,X., Wu,D., Clark,H.A., and Loew,L.M. (2006). Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. Biophys. J. *90*, 2563-2575.

Johannes,F.J., Prestle,J., Eis,S., Oberhagemann,P., and Pfizenmaier,K. (1994). PKCu is a novel, atypical member of

the protein kinase C family. J. Biol. Chem. *269*, 6140-6148.

Johnson,J.E., Giorgione,J., and Newton,A.C. (2000). The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. Biochemistry *39*, 11360-11369.

Johnson,J.E., Zimmerman,M.L., Daleke,D.L., and Newton,A.C. (1998). Lipid structure and not membrane structure is the major determinant in the regulation of protein kinase C by phosphatidylserine. Biochemistry *37*, 12020-12025.

Jones,O.T., Eubanks,J.H., Earnest,J.P., and McNamee,M.G. (1988). Reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor using a lipid substitution technique. Biochim. Biophys. Acta *944*, 359-366.

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.

Jung,S.Y., Kim,O.B., Kang,H.K., Jang,d.H., Min,B.M., and Yu,F.H. (2013). Protein kinase Calpha/beta inhibitor Go6976 promotes PC12 cell adhesion and spreading through membrane recruitment and activation of protein kinase Cdelta. Exp. Cell Res. *319*, 153-160.

Junoy,B., Maccario,H., Mas,J.L., Enjalbert,A., and Drouva,S.V. (2002). Proteasome implication in phorbol ester- and GnRH-induced selective down-regulation of PKC (alpha, epsilon, zeta) in alpha T(3)-1 and L beta T(2) gonadotrope cell lines. Endocrinology *143*, 1386-1403.

Jurak,M., Golabek,M., Holysz,L., and Chibowski,E. (2014). Properties of Langmuir and solid supported lipid films with sphingomyelin. Adv. Colloid Interface Sci.

Kaech,S. and Banker,G. (2006). Culturing hippocampal neurons. Nat. Protoc. *1*, 2406-2415.

Kalamida,D., Poulas,K., Avramopoulou,V., Fostieri,E., Lagoumintzis,G., Lazaridis,K., Sideri,A., Zouridakis,M., and Tzartos,S.J. (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. FEBS J. *274*, 3799-3845.

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

Kazanietz,M.G., Caloca,M.J., Eroles,P., Fujii,T., Garcia-Bermejo,M.L., Reilly,M., and Wang,H. (2000). Pharmacology of the receptors for the phorbol ester tumor promoters: multiple receptors with different biochemical properties. Biochem. Pharmacol. *60*, 1417-1424.

Kearns,B.G., McGee,T.P., Mayinger,P., Gedvilaite,A., Phillips,S.E., Kagiwada,S., and Bankaitis,V.A. (1997). Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex. Nature *387*, 101-105.

Keller,S.H. and Taylor,P. (1999). Determinants responsible for assembly of the nicotinic acetylcholine receptor. J. Gen. Physiol *113*, 171-176.

Kellner,R.R., Baier,C.J., Willig,K.I., Hell,S.W., and Barrantes,F.J. (2007). Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy. Neuroscience *144*, 135-143.

KENNEDY,E.P. and WEISS,S.B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. J. Biol. Chem. *222*, 193-214.

Khor,E.C., Abel,T., Tickner,J., Chim,S.M., Wang,C., Cheng,T., Ng,B., Ng,P.Y., Teguh,D.A., Kenny,J., Yang,X., Chen,H., Nakayama,K.I., Nakayama,K., Pavlos,N., Zheng,M.H., and Xu,J. (2013). Loss of protein kinase C-delta protects against LPS-induced osteolysis owing to an intrinsic defect in osteoclastic bone resorption. PLoS. One. *8*, e70815.

Kim,K., Yang,J., Zhong,X.P., Kim,M.H., Kim,Y.S., Lee,H.W., Han,S., Choi,J., Han,K., Seo,J., Prescott,S.M., Topham,M.K., Bae,Y.C., Koretzky,G., Choi,S.Y., and Kim,E. (2009). Synaptic removal of diacylglycerol by DGKzeta and PSD-95 regulates dendritic spine maintenance. EMBO J. *28*, 1170-1179.

Kim,S., Kedan,A., Marom,M., Gavert,N., Keinan,O., Selitrennik,M., Laufman,O., and Lev,S. (2013a). The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling. EMBO Rep. *14*, 891-899.

Kim,Y.A., Kim,M.Y., and Jung,Y.S. (2013b). Glutathione Depletion by L-Buthionine-S,R-Sulfoximine Induces Apoptosis of

Cardiomyocytes through Activation of PKC-delta. Biomol. Ther. (Seoul.) *21*, 358-363.

Komura,S. and Andelman,D. (2014). Physical aspects of heterogeneities in multi-component lipid membranes. Adv. Colloid Interface Sci. *208*, 34-46.

Krasnowska,E.K., Gratton,E., and Parasassi,T. (1998). Prodan as a membrane surface fluorescence probe: partitioning between water and phospholipid phases. Biophys. J. *74*, 1984-1993.

Kuda,O., Jenkins,C.M., Skinner,J.R., Moon,S.H., Su,X., Gross,R.W., and Abumrad,N.A. (2011). CD36 protein is involved in store-operated calcium flux, phospholipase A2 activation, and production of prostaglandin E2. J. Biol. Chem. *286*, 17785-17795.

Kuhle,V., Abrahams,G.L., and Hensel,M. (2006). Intracellular Salmonella enterica redirect exocytic transport processes in a Salmonella pathogenicity island 2-dependent manner. Traffic. *7*, 716-730.

Kumari,S., Borroni,V., Chaudhry,A., Chanda,B., Massol,R., Mayor,S., and Barrantes,F.J. (2008). Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. J. Cell Biol. *181*, 1179-1193.

Kunkel,M.T. and Newton,A.C. (2010). Calcium transduces plasma membrane receptor signals to produce diacylglycerol at Golgi membranes. J. Biol. Chem. *285*, 22748-22752.

Kunkel,M.T., Toker,A., Tsien,R.Y., and Newton,A.C. (2007). Calcium-dependent regulation of protein kinase D revealed by a genetically encoded kinase activity reporter. J. Biol. Chem. *282*, 6733-6742.

Kusumi,A., Suzuki,K.G., Kasai,R.S., Ritchie,K., and Fujiwara,T.K. (2011). Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. Trends Biochem. Sci. *36*, 604-615.

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

Lagace,T.A. and Ridgway,N.D. (2013). The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. Biochim. Biophys. Acta *1833*, 2499-2510.

Lamark,T., Perander,M., Outzen,H., Kristiansen,K., Overvatn,A., Michaelsen,E., Bjorkoy,G., and Johansen,T. (2003). Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. J. Biol. Chem. *278*, 34568-34581.

Lamaze,C., Fujimoto,L.M., Yin,H.L., and Schmid,S.L. (1997). The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. J. Biol. Chem. *272*, 20332-20335.

Lanuza,M.A., Besalduch,N., Gonzalez,C., Santafe,M.M., Garcia,N., Tomas,M., Nelson,P.G., and Tomas,J. (2010). Decreased phosphorylation of delta and epsilon subunits of the acetylcholine receptor coincides with delayed postsynaptic maturation in PKC theta deficient mouse. Exp. Neurol. *225*, 183-195.

Lanuza,M.A., Gizaw,R., Viloria,A., Gonzalez,C.M., Besalduch,N., Dunlap,V., Tomas,J., and Nelson,P.G. (2006). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor in myotube-cholinergic neuron cocultures. J. Neurosci. Res. *83*, 1407-1414.

Lanuza,M.A., Li,M.X., Jia,M., Kim,S., Davenport,R., Dunlap,V., and Nelson,P.G. (2000). Protein kinase C-mediated changes in synaptic efficacy at the neuromuscular junction in vitro: the role of postsynaptic acetylcholine receptors. J. Neurosci. Res. *61*, 616-625.

LaValle,C.R., Bravo-Altamirano,K., Giridhar,K.V., Chen,J., Sharlow,E., Lazo,J.S., Wipf,P., and Wang,Q.J. (2010). Novel protein kinase D inhibitors cause potent arrest in prostate cancer cell growth and motility. BMC. Chem. Biol. *10*, 5.

Leontieva,O.V. and Black,J.D. (2004). Identification of two distinct pathways of protein kinase Calpha down-regulation in intestinal epithelial cells. J. Biol. Chem. *279*, 5788-5801.

Lev,S. (2006). Lipid homoeostasis and Golgi secretory function. Biochem. Soc. Trans. *34*, 363-366.

Levitan,I., Singh,D.K., and Rosenhouse-Dantsker,A. (2014). Cholesterol binding to ion channels. Front Physiol *5*, 65.

Liljedahl,M., Maeda,Y., Colanzi,A., Ayala,I., Van,L.J., and Malhotra,V. (2001). Protein kinase D regulates the fission of cell surface

destined transport carriers from the trans-Golgi network. Cell *104*, 409-420.

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

Lipp,P. and Reither,G. (2011). Protein kinase C: the "masters" of calcium and lipid. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*.

Litvak,V., Dahan,N., Ramachandran,S., Sabanay,H., and Lev,S. (2005). Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. Nat. Cell Biol. *7*, 225-234.

Liu,A.P. and Fletcher,D.A. (2006). Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. Biophys. J. *91*, 4064-4070.

Liu,W.S. and Heckman,C.A. (1998). The sevenfold way of PKC regulation. Cell Signal. *10*, 529-542.

Lopez,C.A., de Vries,A.H., and Marrink,S.J. (2011). Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. PLoS. Comput. Biol. *7*, e1002020.

Lopez,C.A., de Vries,A.H., and Marrink,S.J. (2013). Computational microscopy of cyclodextrin mediated cholesterol extraction from lipid model membranes. Sci. Rep. *3*, 2071.

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

Luo,B., Prescott,S.M., and Topham,M.K. (2004). Diacylglycerol kinase zeta regulates phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Ialpha by a novel mechanism. Cell Signal. *16*, 891-897.

Maconochie,D.J., Fletcher,G.H., and Steinbach,J.H. (1995). The conductance of the muscle nicotinic receptor channel changes rapidly upon gating. Biophys. J. *68*, 483-490.

Macpherson,P., Kostrominova,T., Tang,H., and Goldman,D. (2002). Protein kinase C and calcium/calmodulin-activated protein kinase II (CaMK II) suppress nicotinic acetylcholine receptor gene expression in mammalian muscle. A specific role for CaMK II in activity-dependent gene expression. J. Biol. Chem. *277*, 15638-15646.

Maioli,E., Torricelli,C., and Valacchi,G. (2012a). Rottlerin and cancer: novel evidence and mechanisms. ScientificWorldJournal. *2012*, 350826.

Maioli,E., Torricelli,C., and Valacchi,G. (2012b). Rottlerin and curcumin: a comparative analysis. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1259*, 65-76.

Malhotra,V. and Campelo,F. (2011). PKD regulates membrane fission to generate TGN to cell surface transport carriers. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*.

Manders,E.M., Stap,J., Brakenhoff,G.J., van,D.R., and Aten,J.A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. J. Cell Sci. *103 (Pt 3)*, 857-862.

Manders,E.M., Verbeek,F.J., and Aten,J.A. (1993). Measurement of co-localization of objets in dual-colour confocal images. Journal of Microscopy *169*, 375-382.

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.

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.

Martinez,P., Mouslim,C., and Akaaboune,M. (2010). Calcium/calmodulin kinase II-dependent acetylcholine receptor cycling at the mammalian neuromuscular junction in vivo. J. Neurosci. *30*, 12455-12465.

Martinez,P., Pires-Oliveira,M., and Akaaboune,M. (2013). PKC and PKA regulate AChR dynamics at the neuromuscular junction of living mice. PLoS. One. *8*, e81311.

Martiny-Baron,G., Kazanietz,M.G., Mischak,H., Blumberg,P.M., Kochs,G., Hug,H., Marme,D., and Schachtele,C. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. J. Biol. Chem. *268*, 9194-9197.

Martyn,J.A., Fagerlund,M.J., and Eriksson,L.I. (2009). Basic principles of neuromuscular transmission. Anaesthesia *64 Suppl 1*, 1-9.

Matthews,S.A., Rozengurt,E., and Cantrell,D. (1999). Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu. J. Biol. Chem. *274*, 26543-26549.

Merida, I., Carrasco, S., and Avila-Florez, A. Diacylglycerol Signaling: The C1 Domain, Generation of DAG, and Termination of Signals . [Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy], 55-78. 2010.

Meriney,S.D. and Dittrich,M. (2013). Organization and function of transmitter release sites at the neuromuscular junction. J. Physiol *591*, 3159-3165.

Merlie,J.P. and Lindstrom,J. (1983). Assembly in vivo of mouse muscle acetylcholine receptor: identification of an alpha subunit species that may be an assembly intermediate. Cell *34*, 747-757.

Michelangeli,F. and East,J.M. (2011). A diversity of SERCA Ca2+ pump inhibitors. Biochem. Soc. Trans. *39*, 789-797.

Miguel,L., Owen,D.M., Lim,C., Liebig,C., Evans,J., Magee,A.I., and Jury,E.C. (2011). Primary human CD4+ T cells have diverse levels of membrane lipid order that correlate with their function. J. Immunol. *186*, 3505-3516.

Miledi,R., Molinoff,P., and Potter,L.T. (1971). Isolation of the cholinergic receptor protein of Torpedo electric tissue. Nature *229*, 554-557.

Millar,N.S. and Gotti,C. (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. Neuropharmacology *56*, 237-246.

Millar,N.S. and Harkness,P.C. (2008). Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). Mol. Membr. Biol. *25*, 279-292.

Miquel,K., Pradines,A., Terce,F., Selmi,S., and Favre,G. (1998). Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. J. Biol. Chem. *273*, 26179-26186.

Moroni,M. and Bermudez,I. (2006). Stoichiometry and pharmacology of two human alpha4beta2 nicotinic receptor types. J. Mol. Neurosci. *30*, 95-96.

Morris,J.A., Dorner,A.J., Edwards,C.A., Hendershot,L.M., and Kaufman,R.J. (1997). Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. J. Biol. Chem. *272*, 4327-4334.

Murphy,D.J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. Protoplasma *249*, 541-585.

Nachmansohn, D. The Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity. [Academic Press, New York]. 1959.

Nai,Q., McIntosh,J.M., and Margiotta,J.F. (2003). Relating neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes defined by subunit composition and channel function. Mol. Pharmacol. *63*, 311-324.

Nanjundan,M. and Possmayer,F. (2003). Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol *284*, L1-23.

Nashmi,R. and Lester,H.A. (2006). CNS localization of neuronal nicotinic receptors. J. Mol. Neurosci. *30*, 181-184.

Neher,E. and Sakmann,B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature *260*, 799-802.

Nelson,N., Anholt,R., Lindstrom,J., and Montal,M. (1980). Reconstitution of purified acetylcholine receptors with functional ion channels in planar lipid bilayers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *77*, 3057-3061.

Nelson,P.G., Lanuza,M.A., Jia,M., Li,M.X., and Tomas,J. (2003). Phosphorylation reactions in activity-dependent synapse modification at the neuromuscular junction during development. J. Neurocytol. *32*, 803-816.

Newton,A.C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. J. Biol. Chem. *270*, 28495-28498.

Newton,A.C. (2009). Lipid activation of protein kinases. J. Lipid Res. *50 Suppl*, S266-S271.

Newton,A.C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab *298*, E395-E402.

Nimnual,A.S., Chang,W., Chang,N.S., Ross,A.F., Gelman,M.S., and Prives,J.M. (1998). Identification of phosphorylation sites on AChR delta-subunit associated with dispersal of AChR clusters on the surface of muscle cells. Biochemistry *37*, 14823-14832.

Noda,M., Takahashi,H., Tanabe,T., Toyosato,M., Kikyotani,S., Hirose,T., Asai,M., Takashima,H., Inayama,S., Miyata,T., and Numa,S. (1983). Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. Nature *301*, 251-255.

Nussinov,R. (2012). How do dynamic cellular signals travel long distances? Mol. Biosyst. *8*, 22-26.

Nussinov,R. (2013). The spatial structure of cell signaling systems. Phys. Biol. *10*, 045004.

Oda,K., Matsuoka,Y., Funahashi,A., and Kitano,H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. Mol. Syst. Biol. *1*, 2005.

Oh,Y.J., Youn,J.H., Ji,Y., Lee,S.E., Lim,K.J., Choi,J.E., and Shin,J.S. (2009). HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. J. Immunol. *182*, 5800-5809.

Oswald,R.E. and Changeux,J.P. (1982). Crosslinking of alpha-bungarotoxin to the acetylcholine receptor from Torpedo marmorata by ultraviolet light irradiation. FEBS Lett. *139*, 225-229.

Owen,D.M. and Gaus,K. (2010). Optimized time-gated generalized polarization imaging of Laurdan and di-4-ANEPPDHQ for membrane order image contrast enhancement. Microsc. Res. Tech. *73*, 618-622.

Owen,D.M., Oddos,S., Kumar,S., Davis,D.M., Neil,M.A., French,P.M., Dustin,M.L., Magee,A.I., and Cebecauer,M. (2010). High plasma membrane lipid order imaged at the immunological synapse periphery in live T cells. Mol. Membr. Biol. *27*, 178-189.

Owen,D.M., Rentero,C., Magenau,A., Abu-Siniyeh,A., and Gaus,K. (2012). Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. Nat. Protoc. *7*, 24-35.

Owen,D.M., Williamson,D., Rentero,C., and Gaus,K. (2009). Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organisation. Traffic. *10*, 962-971.

Padilla-Parra,S. and Tramier,M. (2012). FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. Bioessays *34*, 369-376.

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., Di,S.M., Loiero,M., Ravagnan,G., and Gratton,E. (1994). Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using Laurdan probe. Biophys. J. *66*, 763-768.

Parasassi,T., Gratton,E., Yu,W.M., Wilson,P., and Levi,M. (1997). Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. Biophys. J. *72*, 2413-2429.

Parker,P.J., Bosca,L., Dekker,L., Goode,N.T., Hajibagheri,N., and Hansra,G. (1995). Protein kinase C (PKC)-induced PKC degradation: a model for down-regulation. Biochem. Soc. Trans. *23*, 153-155.

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.

Pediconi,M.F., Gallegos,C.E., De Los Santos,E.B., and Barrantes,F.J. (2004). Metabolic cholesterol depletion hinders cell-surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. Neuroscience *128*, 239-249.

Pereda,A.E., Curti,S., Hoge,G., Cachope,R., Flores,C.E., and Rash,J.E. (2013). Gap junction-mediated electrical transmission: regulatory mechanisms and plasticity. Biochim. Biophys. Acta *1828*, 134-146.

Pike,L.J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. J. Lipid Res. *47*, 1597-1598.

Plowman,S.J., Muncke,C., Parton,R.G., and Hancock,J.F. (2005). H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *102*, 15500-15505.

Pullikuth,A.K. and Catling,A.D. (2007). Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. Cell Signal. *19*, 1621-1632.

Raftery,M.A. (1973). Isolation of acetylcholine receptor-- -bungarotoxin complexes from Torpedo californica electroplax. Arch. Biochem. Biophys. *154*, 270-276.

Rasmussen, U, Brøogger Christensen, S, and Sandberg, F. Thapsigargine and thapsigargicine, two new histamine liberators from Thapsia garganica L. [Acta Pharm Suec], 133-140. 1978.

Raymond-Delpech,V., Matsuda,K., Sattelle,B.M., Rauh,J.J., and Sattelle,D.B. (2005). Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. Invert. Neurosci. *5*, 119-133.

Reed,P.W. and Lardy,H.A. (1972). A23187: a divalent cation ionophore. J. Biol. Chem. *247*, 6970-6977.

Risselada,H.J. and Marrink,S.J. (2008). The molecular face of lipid rafts in model membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *105*, 17367-17372.

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.

Rozengurt, E. Regulation and Function of Protein Kinase D Signaling. [Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy], 117-154. 2010.

Rucci,N., DiGiacinto,C., Orru,L., Millimaggi,D., Baron,R., and Teti,A. (2005). A novel protein kinase C alpha-dependent signal to ERK1/2 activated by alphaVbeta3 integrin in osteoclasts and in Chinese hamster ovary (CHO) cells. J. Cell Sci. *118*, 3263-3275.

Ryan,T.J. and Grant,S.G. (2009). The origin and evolution of synapses. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 701-712.

Sah,V.P., Seasholtz,T.M., Sagi,S.A., and Brown,J.H. (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *40*, 459-489.

Sampath,P. and Pollard,T.D. (1991). Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. Biochemistry *30*, 1973-1980.

Sanchez,S.A., Tricerri,M.A., Ossato,G., and Gratton,E. (2010). Lipid packing determines protein-membrane interactions: challenges for apolipoprotein A-I and high density lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta *1798*, 1399-1408.

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

Santiskulvong,C. and Rozengurt,E. (2007). Protein kinase Calpha mediates feedback inhibition of EGF receptor transactivation induced by Gq-coupled receptor agonists. Cell Signal. *19*, 1348-1357.

Sato,M., Liu,K., Sasaki,S., Kunii,N., Sakai,H., Mizuno,H., Saga,H., and Sakane,F. (2013). Evaluations of the selectivities of the diacylglycerol kinase inhibitors R59022 and R59949 among diacylglycerol kinase isozymes using a new non-radioactive assay method. Pharmacology *92*, 99-107.

Sato,M., Ueda,Y., and Umezawa,Y. (2006). Imaging diacylglycerol dynamics at organelle membranes. Nat. Methods *3*, 797-799.

Sato,S.B., Ishii,K., Makino,A., Iwabuchi,K., Yamaji-Hasegawa,A., Senoh,Y., Nagaoka,I., Sakuraba,H., and Kobayashi,T. (2004). Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol. J. Biol. Chem. *279*, 23790-23796.

Scott,J.L., Musselman,C.A., Adu-Gyamfi,E., Kutateladze,T.G., and Stahelin,R.V. (2012). Emerging methodologies to investigate lipid-protein interactions. Integr. Biol. (Camb.) *4*, 247-258.

Sharlow,E.R., Giridhar,K.V., LaValle,C.R., Chen,J., Leimgruber,S., Barrett,R., Bravo-Altamirano,K., Wipf,P., Lazo,J.S., and Wang,Q.J. (2008). Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxoloazepinolone. J. Biol. Chem. *283*, 33516-33526.

Sheetz,M.P. (1993). Glycoprotein motility and dynamic domains in fluid plasma membranes. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. *22*, 417-431.

Shulga,Y.V., Topham,M.K., and Epand,R.M. (2011). Regulation and functions of diacylglycerol kinases. Chem. Rev. *111*, 6186-6208.

Silvestri,N.J. and Wolfe,G.I. (2012). Myasthenia gravis. Semin. Neurol. *32*, 215-226.

Simons,K. and Ikonen,E. (1997). Functional rafts in cell membranes. Nature *387*, 569-572.

Sine,S.M., Claudio,T., and Sigworth,F.J. (1990). Activation of Torpedo acetylcholine receptors expressed in mouse fibroblasts. Single channel current kinetics reveal distinct agonist binding affinities. J. Gen. Physiol *96*, 395-437.

Sine,S.M., Wang,H.L., Hansen,S., and Taylor,P. (2010). On the origin of ion selectivity in the Cys-loop receptor family. J. Mol. Neurosci. *40*, 70-76.

Singer,S.J. and Nicolson,G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science *175*, 720-731.

Sinnett-Smith,J., Jacamo,R., Kui,R., Wang,Y.M., Young,S.H., Rey,O., Waldron,R.T., and Rozengurt,E. (2009). Protein kinase D mediates mitogenic signaling by Gq-coupled receptors through protein kinase C-independent regulation of activation loop Ser744 and Ser748 phosphorylation. J. Biol. Chem. *284*, 13434-13445.

Sinnett-Smith,J., Rozengurt,N., Kui,R., Huang,C., and Rozengurt,E. (2011). Protein kinase D1 mediates stimulation of DNA synthesis and proliferation in intestinal epithelial IEC-18 cells and in mouse intestinal crypts. J. Biol. Chem. *286*, 511-520.

Smith,M.M., Merlie,J.P., and Lawrence,J.C., Jr. (1987). Regulation of phosphorylation of nicotinic acetylcholine receptors in mouse BC3H1 myocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *84*, 6601-6605.

Soltoff,S.P. (2007). Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. Trends Pharmacol. Sci. *28*, 453-458.

Steinlein,O.K. and Bertrand,D. (2008). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the genetic analysis to neurological diseases. Biochem. Pharmacol. *76*, 1175-1183.

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.

Storz,P., Doppler,H., and Toker,A. (2004). Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. Mol. Cell Biol. *24*, 2614-2626.

Taly,A., Corringer,P.J., Guedin,D., Lestage,P., and Changeux,J.P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. Nat. Rev. Drug Discov. *8*, 733-750.

Tanimura,N., Nagafuku,M., Minaki,Y., Umeda,Y., Hayashi,F., Sakakura,J., Kato,A., Liddicoat,D.R., Ogata,M., Hamaoka,T., and Kosugi,A. (2003). Dynamic changes in the mobility of LAT in aggregated lipid rafts upon T cell activation. J. Cell Biol. *160*, 125-135.

Tasneem,A., Iyer,L.M., Jakobsson,E., and Aravind,L. (2005). Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. Genome Biol. *6*, R4.

Thiele,C. and Spandl,J. (2008). Cell biology of lipid droplets. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 378-385.

Tian,T., Harding,A., Inder,K., Plowman,S., Parton,R.G., and Hancock,J.F. (2007). Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction. Nat. Cell Biol. *9*, 905-914.

Tokumitsu,H., Chijiwa,T., Hagiwara,M., Mizutani,A., Terasawa,M., and Hidaka,H. (1990). KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazi ne, a specific inhibitor of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J. Biol. Chem. *265*, 4315-4320.

Toro,C., Sanchez,S.A., Zanocco,A., Lemp,E., Gratton,E., and Gunther,G. (2009). Solubilization of lipid bilayers by myristyl sucrose ester: effect of cholesterol and phospholipid head group size. Chem. Phys. Lipids *157*, 104-112.

Torres-Marquez,E., Sinnett-Smith,J., Guha,S., Kui,R., Waldron,R.T., Rey,O., and Rozengurt,E. (2010). CID755673 enhances mitogenic signaling by phorbol esters, bombesin and EGF through a protein kinase D-independent pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. *391*, 63-68.

Treiman,M., Caspersen,C., and Christensen,S.B. (1998). A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. Trends Pharmacol. Sci. *19*, 131-135.

Tsetlin,V. and Hucho,F. (2009). Nicotinic acetylcholine receptors at atomic resolution. Curr. Opin. Pharmacol. *9*, 306-310.

Tsetlin,V., Kuzmin,D., and Kasheverov,I. (2011). Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. J. Neurochem. *116*, 734-741.

Tsetlin,V., Utkin,Y., and Kasheverov,I. (2009). Polypeptide and peptide toxins, magnifying lenses for binding sites in nicotinic acetylcholine receptors. Biochem. Pharmacol. *78*, 720-731.

Tzartos,S.J., Barkas,T., Cung,M.T., Mamalaki,A., Marraud,M., Orlewski,P., Papanastasiou,D., Sakarellos,C., Sakarellos-Daitsiotis,M., Tsantili,P., and Tsikaris,V. (1998). Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. Immunol. Rev. *163*, 89-120.

Tzartos,S.J. and Lindstrom,J.M. (1980). Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *77*, 755-759.

Unwin,N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. J. Mol. Biol. *346*, 967-989.

Unwin,N. (2013). Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from Torpedo postsynaptic membranes. Q. Rev. Biophys. *46*, 283-322.

Valverde,A.M., Sinnett-Smith,J., Van,L.J., and Rozengurt,E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *91*, 8572-8576.

Van Lint,J.V., Sinnett-Smith,J., and Rozengurt,E. (1995). Expression and characterization of PKD, a phorbol ester and diacylglycerol-stimulated serine protein kinase. J. Biol. Chem. *270*, 1455-1461.

Verma,A., Bhatt,A.N., Farooque,A., Khanna,S., Singh,S., and Dwarakanath,B.S. (2011). Calcium ionophore A23187 reveals calcium related cellular stress as "I-Bodies": an old actor in a new role. Cell Calcium *50*, 510-522.

Vogel,Z., Sytkowski,A.J., and Nirenberg,M.W. (1972). Acetylcholine receptors of muscle grown in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *69*, 3180-3184.

Wanamaker,C.P., Christianson,J.C., and Green,W.N. (2003). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. Ann. N. Y. Acad. Sci. *998*, 66-80.

Wattenberg,B.W., Pitson,S.M., and Raben,D.M. (2006). The sphingosine and diacylglycerol kinase superfamily of signaling kinases: localization as a key to signaling function. J. Lipid Res. *47*, 1128-1139.

Weber,G. and Farris,F.J. (1979). Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. Biochemistry *18*, 3075-3078.

Wenz,J.J., Borroni,V., and Barrantes,F.J. (2010). Statistical analysis of high-resolution light microscope images reveals effects of cytoskeleton-disrupting drugs on the membrane organization of the nicotinic acetylcholine receptor. J. Membr. Biol. *235*, 163-175.

Whiting,P. and Lindstrom,J. (1986). Pharmacological properties of immuno-isolated neuronal nicotinic receptors. J. Neurosci. *6*, 3061-3069.

Wictome,M., Henderson,I., Lee,A.G., and East,J.M. (1992). Mechanism of inhibition of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum by thapsigargin. Biochem. J. *283 (Pt 2)*, 525-529.

Winther,A.M., Liu,H., Sonntag,Y., Olesen,C., le,M.M., Soehoel,H., Olsen,C.E.,

Christensen,S.B., Nissen,P., and Moller,J.V. (2010). Critical roles of hydrophobicity and orientation of side chains for inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase with thapsigargin and thapsigargin analogs. J. Biol. Chem. *285*, 28883-28892.

Wondolowski,J. and Dickman,D. (2013). Emerging links between homeostatic synaptic plasticity and neurological disease. Front Cell Neurosci. *7*, 223.

Wu-Zhang,A.X. and Newton,A.C. (2013). Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. Biochem. J. *452*, 195-209.

Xu,Y.J., Yau,L., Yu,L.P., Elimban,V., Zahradka,P., and Dhalla,N.S. (1996). Stimulation of protein synthesis by phosphatidic acid in rat cardiomyocytes. Biochem. Pharmacol. *52*, 1735-1740.

Yeaman,C., Ayala,M.I., Wright,J.R., Bard,F., Bossard,C., Ang,A., Maeda,Y., Seufferlein,T., Mellman,I., Nelson,W.J., and Malhotra,V. (2004). Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. Nat. Cell Biol. *6*, 106-112.

Young,S.H., Rozengurt,N., Sinnett-Smith,J., and Rozengurt,E. (2012). Rapid protein kinase D1 signaling promotes migration of intestinal epithelial cells. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol *303*, G356-G366.

Zachowski,A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. Biochem. J. *294 (Pt 1)*, 1-14.

Zanello,L.P., Aztiria,E., Antollini,S., and Barrantes,F.J. (1996). Nicotinic acetylcholine receptor channels are influenced by the physical state of their membrane environment. Biophys. J. *70*, 2155-2164.

Zarei,M.M., Radcliffe,K.A., Chen,D., Patrick,J.W., and Dani,J.A. (1999). Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. Neuroscience *88*, 755-764.

Zeng,L., Webster,S.V., and Newton,P.M. (2012). The biology of protein kinase C. Adv. Exp. Med. Biol. *740*, 639-661.

Zhu,S., Yao,F., Li,W.H., Wan,J.N., Zhang,Y.M., Tang,Z., Khan,S., Wang,C.H., and Sun,S.R. (2013). PKC?-dependent activation of the ubiquitin proteasome system is responsible for high glucose-induced human breast cancer MCF-7 cell proliferation, migration and invasion. Asian Pac. J. Cancer Prev. *14*, 5687-5692.

Zmijewski,M.J., Jr. and Mikolajczak,M.J. (1983). Quinone modified derivatives of cyanonaphthyridinomycin. J. Antibiot. (Tokyo) *36*, 1767-1769.

Zouridakis,M., Zisimopoulou,P., Poulas,K., and Tzartos,S.J. (2009). Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. IUBMB. Life *61*, 407-423.