



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS

DOCTOR EN BIOLOGIA

**“ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y BIOFISICOS DE LA
INTERACCION DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA
NICOTINICO CON ACIDOS GRASOS LIBRES Y ESTEROIDES”**

Gaspar Antonio Fernández Nieves

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2008



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS

DOCTOR EN BIOLOGIA

**“ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y BIOFISICOS DE LA
INTERACCION DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA
NICOTINICO CON ACIDOS GRASOS LIBRES Y ESTEROIDES”**

Gaspar Antonio Fernández Nievas

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2008

Director de tesis: Dr. Francisco José Barrantes

Director Asistente de tesis: Dra. Silvia Susana Antollini

PREFACIO

“Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título de esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca dependiente de la Universidad Nacional del Sur y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas durante el período comprendido entre el 4 julio de 2006 y el 28 de noviembre de 2008, bajo la dirección del Dr. Barrantes, Francisco J. y la asistencia de la Dra. Antollini, Silvia S.”

Gaspar Antonio Fernández Nievas



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

Agradecimientos

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca dependiente de la Universidad Nacional del Sur y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. A estas instituciones les agradezco el apoyo material brindado para la concreción de este trabajo. También agradezco a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica por la beca de iniciación en investigación (período 01/06/2004-31/03/2007). Agradezco a mi director de Tesis, Dr. Barrantes, Francisco J., y a mi directora asistente de Tesis, Dra. Antollini, Silvia S., por la confianza depositada en mi y la enseñanza durante estos años compartidos. También agradezco a todas las personas que conforman el INIBIBB por la camaradería, la amistad generada, y los buenos momentos vividos.

28 de noviembre de 2008

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

RESUMEN

Esta Tesis estudia al receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) de *Torpedo californica*, una proteína integral de membrana compuesta por cinco subunidades homólogas organizadas en forma pseudosimétrica formando un poro de canal central, con una estequiometría $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Cada subunidad contiene un dominio extracelular amino terminal, cuatro segmentos hidrofóbicos transmembrana (M1-M4) conectados por lazos de longitud variable, y un pequeño dominio carboxilo terminal. Los segmentos transmembrana de cada subunidad están organizados en tres anillos concéntricos. Los segmentos M2 forman las paredes del canal, los segmentos M1 y M3 constituyen el anillo medio, y los segmentos M4 forman el anillo externo, en íntimo contacto con los lípidos de membrana.

La función del AChR es modulada por distintos compuestos que actúan como inhibidores. Los inhibidores competitivos se unen a los mismos sitios que el agonista; los no competitivos lo hacen en sitios diferentes. La interfase lípido-proteína ha sido foco de gran interés como potencial sitio de acción de un grupo de inhibidores no competitivos (NCI) de baja afinidad que comparten la característica de ser altamente hidrofóbicos. Se ha demostrado que distintos ácidos grasos libres (AGL) y esteroides modulan la funcionalidad del AChR a través de un mecanismo de inhibición no competitiva.

Dos posibles hipótesis han sido propuestas para explicar tal mecanismo de acción. Una propone un efecto indirecto, considerando que la presencia de estos compuestos en el micro-ambiente lipídico del AChR perturba las propiedades biofísicas de la membrana, lo cual a su vez conduciría a cambios conformacionales de la proteína AChR. La otra hipótesis propone una acción directa: la interacción del compuesto exógeno con el AChR resultaría en forma directa en cambios conformacionales del AChR o en el desplazamiento de lípidos esenciales de su micro-entorno, esenciales para su correcta función.

En el Capítulo I de esta Tesis se utilizó espectroscopía de fluorescencia, particularmente la técnica de transferencia de energía resonante de tipo Förster (FRET). Se evaluaron cambios en la eficiencia del proceso de FRET (E) entre el AChR, que actúa como donante de fluorescencia, y la sonda fluorescente Laurdan, que actúa como aceptor: la disminución de la E sugirió que el aceptor es desplazado del micro-entorno lipídico del AChR por la presencia de moléculas lipídicas exógenas. De esta manera, se pudo demostrar la localización de diferentes esteroides y AGL en el micro-ambiente lipídico del AChR.

En el Capítulo II de esta Tesis se utilizó la sonda fluorescente cristal violeta, que posee mayor afinidad por el estado desensibilizado del AChR que por su estado de reposo. Se concluyó que el mecanismo de inhibición del AChR de distintos esteroides y de los AGL involucra una perturbación en el equilibrio conformacional del AChR. Además, utilizando la sonda fluorescente Laurdan, y calculando la denominada "polarización generalizada" de esta sonda, pudo relacionarse los efectos que estos compuestos ejercen sobre las características biofísicas de la membrana con el estado conformacional del AChR.

ABSTRACT

This Thesis concerns the study of the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*, an integral membrane protein composed by five homologous subunits pseudo-symmetrically organized around a central pore with the stoichiometry $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Each subunit contains an extracellular amino-terminal domain, four hydrophobic transmembrane segments (M1-M4) connected by loops of varying length, and a short extracellular carboxyl terminal domain. The transmembrane segments of each subunit are arranged in three concentric rings. The M2 segments form the walls of the ion channel, the segments M1 and M3 constitute the middle ring, and the M4 segments form the outer ring, in close contact with the membrane lipids.

The AChR function is modulated by different compounds that act as inhibitors. Competitive inhibitors bind to the same sites to which agonist bind; non-competitive inhibitors bind to different sites. The lipid-protein interface has been the focus of great interest as a potential site of action of a group of low-affinity non-competitive inhibitors (NCI) that share the property of being highly hydrophobic. It has been demonstrated that free fatty acids (FFA) and different steroids modulate the AChR functionality by a non-competitive inhibition mechanism.

Two possible hypotheses have been proposed to explain the mechanism of action of these NCI on the AChR. One proposes an indirect mechanism, suggesting that the presence of exogenous compounds at the AChR lipid microenvironment perturbs the biophysical properties of the membrane, which, in turn, leads to conformational changes of the AChR protein. The other hypothesis proposed a direct action: the interaction of the exogenous compound with the AChR would result in AChR conformational changes or cause the

displacement of essential lipids from the AChR microenvironment, which are necessary for its correct functionality.

In the first Chapter of this Thesis, use was made of fluorescence spectroscopy, in particular Förster-type resonance energy transfer (FRET). Changes of the energy transfer efficiency (E) between the AChR, the fluorescence donor, and the fluorescent probe Laurdan, the acceptor, were evaluated: The diminution of E suggested that the acceptor is displaced from the AChR lipid micro-environment by the presence of the exogenous lipid molecules. Thus, the localization of different steroids and FFA could be established at the AChR lipid micro-environment.

In the second Chapter of this Thesis, use was made of the fluorescent probe crystal violet, which exhibits higher affinity for the AChR desensitized state than for the AChR resting state. The conclusion was reached that the inhibitory mechanism of different steroids and FFA involves a perturbation of the conformational equilibrium of the AChR. Furthermore, by using the probe Laurdan and by calculating the so-called "generalized polarization" of this probe, it was possible to correlate the effects of these compounds on the biophysical properties of the membrane with the conformational state of the AChR.

INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION GENERAL.....	3
Receptores de lazos de cisteína	5
El receptor de acetilcolina nicotínico	6
Subunidades del AChR	8
El AChR y su ambiente lipídico	13
Acción de los ácidos grasos y esteroides sobre los canales iónicos.....	17
MATERIALES Y METODOS	23
MATERIALES.....	23
METODOS	23
1. Preparación de membranas crudas y ricas en AChR de <i>T. californica</i>	23
2. Preparación de soluciones de esteroides y ácidos grasos.	26
3. Digestión enzimática de la porción extra-membrana del AChR por acción de proteinasa K..	26
4. Producción endógena de AGL por acción de PLA ₂	27
5. Preparación de la columna	29
6. Marcación del AChR con maleimido-pireno	35
7. Mediciones de fluorescencia.....	36
7.1. Mediciones de Laurdan	36
7.1.a Mediciones de fluorescencia mediante transferencia de energía resonante de tipo Förster (FRET).....	36
7.1.b Cálculo de la polarización generalizada.....	41
7.2 Medición de fluorescencia de la sonda cristal violeta	41
7.2.a Tratamiento matemático de los registros de fluorescencia obtenidos	43
7.3 Medición de fluorescencia de AChR marcado con maleimido-pireno	44
7.3.a Extinción de la fluorescencia del AChR marcado con maleimido-pireno por acrilamida y por un ácido graso “spin-marcado”	44
7.3.b Cambios en la extinción de fluorescencia de pireno por presencia de lípidos exógenos ...	45
CAPITULO I	46
RESULTADOS	46
1. Distintos esteroides se localizan en la interfase lípido-AChR.	46
2. Distintos esteroides se unen a los mismos sitios en la interfase lípido-AChR.....	50
3. Los sitios de unión de esteroides también son compartidos por ácidos grasos libres.	52

4. Estudio de la topología de los sitios para esteroides y ácidos grasos en membranas ricas en AChR.....	55
5. Sitios para ácidos grasos libres generados endógenamente en membranas ricas en AChR. ..	60
6. La disponibilidad de los sitios de interacción con moléculas hidrofóbicas se modifica en el estado desensibilizado.	62
DISCUSIÓN	65
CAPITULO II	72
RESULTADOS	72
1. Caracterización de los estados conformacionales del AChR de membranas.....	73
2. Los esteroides inducen un cambio conformacional del AChR.	74
3. Los ácidos grasos libres modifican los estados de reposo y desensibilizado del AChR.....	76
4. La acción conjunta de ácidos grasos libres y esteroides afectan ambos estados conformacionales del AChR.	80
5. La polaridad de membrana condiciona la transición del AChR al estado D.....	81
6. Efecto de ácidos grasos endógenos en la conformación del AChR.....	85
7. Estudio de cambios conformacionales de las porciones transmembrana del AChR inducidos por la presencia de ácidos grasos y esteroides.	87
DISCUSION	91
CONCLUSIONES	98
REFERENCIAS	100
BUFFER.....	116
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS ORIGINADAS EN ESTA TESIS	117
PUBLICACIONES	117
COMUNICACIONES A CONGRESOS	117

ABREVIATURAS

AChR: receptor de acetilcolina nicotínico

AGL: ácidos grasos libres

BP: constante de unión estimado para esteroides o AGL

Carb: carbamilcolina

cort: cortisona

CrV: sonda fluorescente cristal violeta

D.O: densidad óptica

D: estado conformacional del AChR desensibilizado

DTT: ditioneitol

E: eficiencia de transferencia de energía

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetil éter)N,N,N',N'-tatraacético

FRET: transferencia de energía resonante de tipo Förster

GP: polarización generalizada

HC: hidrocortisona

K_D : constante de disociación de la sonda CrV

NCI: inhibidores no competitivos

PA: ácido fosfatídico

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PLA₂: enzima fosfolipasa A₂

PMSF: fenil-metil-sulfonil fluoruro

r.p.m.: revoluciones por minuto

R: estado conformacional del AChR de reposo

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida desnaturizante con dodecil sulfato de sodio

T. californica: Torpedo californica

TLC: cromatografía líquida en capa fina

TM: transmembrana

18:0: ácido esteárico

20:0: ácido araquídico

20:4: ácido araquidónico

trans-18:1: ácido eláico

cis-18:1: ácido oléico

Los ácidos grasos se nombran mediante dos números: el primero se refiere al número de átomos de carbono y el segundo al número de dobles ligaduras en la molécula (por ejemplo: 18:1 es un ácido graso de 18 átomos de carbono y una doble ligadura)

INTRODUCCION GENERAL

El sistema nervioso está compuesto por billones de células especializadas denominadas neuronas. Una eficiente comunicación entre estas células es crucial para el normal funcionamiento del sistema nervioso central y periférico. La estructura en la cual la información es transmitida de una célula a otra se denomina sinapsis. Algunas células se comunican por sinapsis eléctricas. En este caso, el potencial de acción simplemente se desplaza de una célula a otra a través de canales especializados denominados uniones estrechas, que conectan ambas células. Sin embargo, la mayoría de las células se comunican a través de sinapsis químicas. Estas células se encuentran separadas por un estrecho espacio denominado hendidura sináptica, razón por la cual no pueden transmitir el potencial de acción en forma directa. Así, pequeñas moléculas, denominadas neurotransmisores, son utilizadas para comunicar la señal de una célula a la siguiente.

En la sinapsis química, cuando el potencial de acción de la célula presináptica llega hasta el terminal axónico, se produce un aumento localizado de Ca^{2+} en el citoplasma por activación de canales regulados por voltaje (Zimmermann, 1979; Ceccarelli & Hurlbult, 1980). Este aumento de iones induce a que las vesículas cargadas con un neurotransmisor en particular se fusionen con la membrana plasmática, liberando su contenido a la hendidura sináptica (Heuser & Reese, 1981). Los neurotransmisores difunden a través de la hendidura sináptica y se unen a los receptores localizados en la membrana post-sináptica de la célula vecina, proceso que transcurre en el orden de los milisegundos (Matthews-Belinger & Salpeter, 1978). La unión de los neurotransmisores con los receptores produce un cambio en la permeabilidad iónica de la membrana plasmática post-sináptica, lo cual a su vez, modifica el potencial eléctrico de la membrana en ese punto. Si la célula post-sináptica es una neurona, esta alteración localizada puede ser suficiente para producir un potencial eléctrico. Si es una

fibra muscular, dicha alteración puede desencadenar una contracción muscular específica; mientras que en una célula glandular puede inducir a la secreción de una hormona específica. Luego de la activación del receptor, el neurotransmisor debe ser inactivado para impedir una estimulación constante de la célula post-sináptica, y así liberar los sitios de los receptores para que puedan interactuar con nuevas moléculas de neurotransmisor (Zigmond et al., 1999).

Los receptores de neurotransmisores localizados en la membrana post-sináptica se clasifican en dos grandes grupos: los receptores que poseen en su estructura sitios de unión a ligando y un canal iónico como parte intrínseca de su estructura, y que son activados precisamente por tales ligandos (LGIC de sus sigla en inglés: *ligand gated ion channel*); y otra gran superfamilia de receptores que están acoplados a proteína G, también activados por ligandos, pero con respuestas consistentes en diversas modalidades de cascadas metabólicas. Estos dos tipos de receptores varían en la velocidad de su respuesta, siendo los primeros responsables de mediar las sinapsis rápidas.

Entre los canales iónicos con sitios de unión a ligando se encuentran los receptores de acetilcolina (AChR). La sinapsis cuyo neurotransmisor es la acetilcolina se denomina sinapsis colinérgica. Al grupo de receptores que producen respuestas excitatorias en el orden de los diez milisegundos de duración (Barrantes, 1979; Sine et al., 2002), mediando la neurotransmisión rápida en la sinapsis colinérgicas, pertenecen los AChR nicotínicos. Este mecanismo rápido de señalización requiere volúmenes de reacción limitados y concentraciones de las especies reactantes suficientemente elevadas. Ambos requerimientos son consumados a la perfección por la organización supra-molecular de los componentes pre- y post-sinápticos de la sinápsis colinérgica. La liberación del neurotransmisor alcanza concentraciones milimolares discretas de acetilcolina, mientras que las moléculas de AChR, que se localizan en la membrana post-sináptica de las uniones neuromusculares y en las

sinapsis electromotoras, se encuentran empaquetadas en una elevada densidad (10000-20000 μm^2) (Barrantes, 1979).

Receptores de lazos de cisteína

Constituyen una amplia familia de proteínas oligoméricas compuestas por cinco subunidades donde una de las características relevantes es la presencia de un lazo de cisteína que comprende trece aminoácidos que le da el nombre a esta familia de receptores (Barrantes, 2003). Este lazo de cisteína, localizado en la región amino terminal extracelular, se encuentra en todas las subunidades que componen a estos receptores. Los receptores de lazos de cisteína, parte de la superfamilia de LGIC introducida en párrafos anteriores, demuestran poseer selectividad iónica y por lo tanto pueden dividirse en dos grupos, dependiendo de su efecto/función en las células. Los canales que presentan selectividad aniónica ejercen sobre las células un efecto inhibitorio, como es el caso de los canales de γ - ácido aminobutírico de tipo A o de tipo C (GABA_A o GABA_C) y de glicina (Schofield et al., 1987; Betz, 1990; Ortells & Lunt, 1995). Por el contrario, los canales que poseen selectividad catiónica producen un efecto excitatorio en las células. A este último grupo pertenecen el AChR y el receptor subtipo 3 de hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT_3). Todas estas proteínas son altamente homólogas, compartiendo características similares (Ortells & Lunt, 1995, 1996; Ortells et al., 1997). Los receptores del glutamato e histidina también son receptores cuyas subunidades poseen un lazo de cisteína, pero sus estructuras no coinciden con la establecida para la súperfamilia de LGIC. De todos los receptores pertenecientes a esta familia, el receptor de acetilcolina nicotínico es el que ha sido mejor caracterizado a la fecha (Zigmond et al., 1999; Barrantes 1979, 1983, 2002, 2003, 2004, 2007).

El receptor de acetilcolina nicotínico

Comenzaremos definiendo las características funcionales que caracterizan a esta familia de receptores: el AChR cumple con todos los requisitos para ser considerado una proteína alostérica, pudiendo existir al menos en tres estados conformacionales distintos e interconvertibles entre sí (Krauss et al., 2000), a saber: 1) el estado de reposo (R), en el cual el AChR posee una baja afinidad por la acetilcolina y el canal iónico se encuentra cerrado; 2) el estado activado o de canal abierto, al cual arriba luego de la unión de dos moléculas de su agonista natural, la acetilcolina, de una manera cooperativa positiva, provocando la apertura o gatillado del canal iónico intrínseco y el consecuente pasaje de cationes; y 3) estado desensibilizado (D), generado por la exposición prolongada al agonista, en el cual el canal iónico se encuentra cerrado y con una mayor afinidad por la acetilcolina (comparativamente al estado de reposo).

Dado que la unión del agonista y el gatillado del canal iónico ocurren en sitios topológicamente distintos en el AChR, cabe considerar el papel de otras regiones de la

molécula con importantes atributos funcionales. Una de las regiones candidatas es, obviamente, el sitio de contacto entre las distintas subunidades, ya que tales interfases, además de constituir (al menos dos de ellas) el sitio de unión canónico para agonistas y antagonistas competitivos, podrían desempeñar un papel importante en las propiedades alostéricas del AChR. Otra región del AChR cuya importancia funcional es destacable comprende la relativamente extensa interfase proteico-lipídica, que es objeto de análisis pormenorizado en esta Tesis.

Pueden considerarse dos tipos principales de AChRs según su localización y composición: a) el AChR de tipo muscular (embrionario o adulto) que se localiza en el músculo esquelético de los vertebrados, donde media la transmisión neuromuscular, y en los órganos eléctricos de ciertos peces como la raya marina y la anguila eléctrica de río (*Torpedo sp.*, *Electrophorus electricus*), respectivamente, y 2) el AChR de tipo neuronal que se encuentra presente/distribuido no sólo a lo largo del sistema nervioso central y periférico sino también en ciertos tejidos no neuronales. Estos AChRs muestran una variada combinación de subunidades α y no α pudiendo ser homopentámeros como α_7 o heteropentámeros como $\alpha_4\beta_2$ (Karlin, 2002). Los AChR musculares son los responsables de la contracción muscular en los músculos esqueléticos mientras que los AChR neuronales están relacionados con una gran variedad de funciones tales como el desarrollo neuronal, el funcionamiento motor y cognitivo, la memoria, el aprendizaje, etc., además de estar relacionados con distintas patologías como la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson, el dolor neuropático, el déficit de atención, ciertas epilepsias, la depresión, etc. (Lindstrom, 1997, 2003; Barrantes et al. 2000a).

El AChR (290 KDa) de *T. californica* está compuesto por cuatro subunidades distintas (α , β , γ , y δ) que poseen pesos moleculares relativos de 40, 50, 60, y 65 KDa, respectivamente. Estas subunidades se arreglan en una estequiometría $\alpha_2\beta\gamma\delta$ formando una

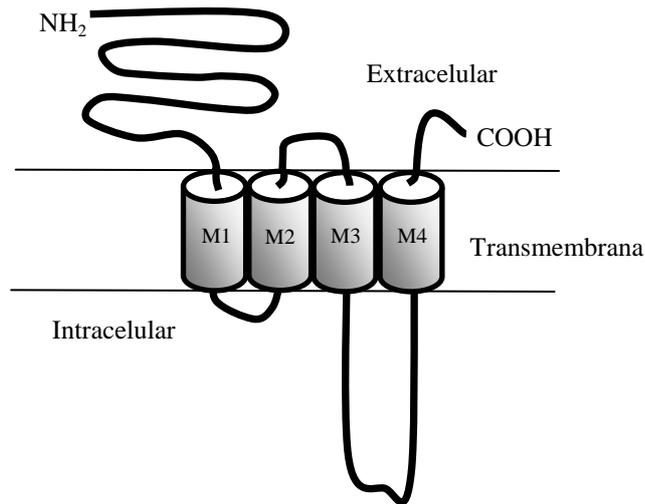
estructura pentamérica (Reynolds & Karlin, 1978; Lindstron et al., 1979; Raftery et al., 1980) y encontrándose dispuestas en una forma pseudosimétrica simétrica en el orden α - γ - α - δ - β (Prince & Sine, 1998; Unwin, 2005).

Topográficamente, el AChR está asimétricamente localizado con respecto a la membrana, presentando un 55% de su masa total del lado extracelular y un 20% del lado citoplasmático (Unwin, 1993). Posee una longitud total de 120 Å, sobresaliendo 65 Å hacia el espacio extracelular desde la membrana plasmática y 20 Å de la superficie de la membrana intracelular hacia el interior celular. La porción citoplasmática está constituida por secuencias aminoacídicas que unen los segmentos transmembrana de cada subunidad. La pared proteica que forma la entrada del canal (vestíbulo) sería aproximadamente de 25 Å de espesor y actuaría como un aislante de los posibles cambios de carga de la superficie de la membrana (Unwin, 1993).

Subunidades del AChR

Las distintas subunidades del AChR poseen un tamaño similar, con dimensiones máximas de 30 Å x 40 Å x 160 Å, mostrando, además, el mismo empaquetamiento tridimensional (Unwin, 2005). Poseen características comunes entre ellas, a saber:

- Un gran dominio amino-terminal extracelular.
- Cuatro segmentos transmembrana denominados M1 a M4.
- Un lazo citoplasmático que se encuentra entre los segmentos M3 y M4.
- Un pequeño dominio carboxilo terminal extracelular.



El dominio amino-terminal está construido alrededor de un “núcleo” β -*sandwich* consistente en diez láminas β , el cual contiene una hélice α similar a la AChBP (“*acetylcholine binding protein*”: proteína que une acetilcolina, aislada originalmente del caracol marino *Lymnaea stagnalis* y luego de otras varias especies de caracoles) (Brejc et al., 2001). En este dominio se encuentra el lazo de cisteínas característico de esta familia de receptores. Este lazo incluye a las cisteínas C128 y C142 que se encuentran altamente conservadas en todas las subunidades. La funcionalidad de este lazo no está bien definida. Sin embargo, el mismo parecería estar implicado en el ensamblado de las subunidades del AChR (Zigmond et al., 1999). Los sitios de unión a agonista se encuentran a 40 Å de la superficie de la membrana, localizados en la interfase de las subunidades $\alpha\gamma$ y $\alpha\delta$ (Unwin, 2005). En el sitio de unión a agonista las subunidades están organizadas alrededor de dos *sets* de láminas β incluidas dentro de un sándwich β curvo y unidas por un puente disulfuro formando el lazo de cisteínas. De esta forma, los sitios de unión a agonista no son equivalentes entre sí. Además, se ha demostrado la existencia de una significativa cooperatividad en la que la unión de una primera molécula de acetilcolina aumenta la afinidad de la segunda por el AChR.

Cada subunidad posee cuatro segmentos transmembrana de unos 30 aminoácidos de largo, los cuales se disponen en una forma pseudo-simétrica, mostrando una estructura α -

hélice (Miyazawa et al., 2003). Se ha descrito la disposición de las hélices en tres anillos concéntricos (Barrantes, 2003). El anillo interno está formado por los segmentos M2 de cada subunidad, el anillo intermedio está compuesto por los segmentos M1 y M3; y el anillo externo está formado por los segmentos M4:

Figura extraída de Barrantes, 2003.

Los segmentos M2 de cada subunidad conforman las paredes del canal iónico propiamente dicho, sin establecer contacto alguno con los lípidos de la membrana. Desde el vestíbulo superior, estos segmentos se encuentran inclinados hacia el eje central del poro hasta el nivel del centro de la membrana para luego torcerse ligeramente. Cuando el AChR se encuentra cerrado (estado de reposo), las α -hélices de los segmentos M2 de cada subunidad se encuentran juntas pero separadas del resto de los otros segmentos TM, creando espacios llenos de agua entre ambos grupos. Estos espacios tendrían un papel importante durante la apertura del poro al proveer un espacio a los segmentos M2 para su movimiento relativo hacia el “extremo externo” de la proteína (Unwin, 2003). Así, la separación entre los segmentos M2 es mínima cuando el poro se encuentra cerrado. Las cadenas laterales de los

aminoácidos que forman los segmentos M2, de carácter hidrofóbico, interaccionan entre sí creando un ajustado cinturón (o anillo) hidrofóbico. Se forma así una barrera energética que impide el paso de iones de sodio o potasio ya que el poro de 6 Å de diámetro es muy pequeño para que los iones pasen sin tener que perder su cubierta de hidratación. La inexistencia de otra barrera energética que pueda bloquear el flujo de iones, indicaría que esta barrera energética representaría las “compuertas” del canal iónico. Otra propiedad estructural importante es la presencia de tres anillos de aminoácidos cargados negativamente a distintas alturas del canal (extracelular, intermedio y citoplasmático). Estos anillos estarían implicados en la selectividad iónica del AChR (Changeux, 1993; Corringer et al., 2000; Karlin, 2002). Por ejemplo, se ha observado que mutaciones localizadas en el anillo medio que reducen la carga, cambian la selectividad catiónica del AChR $\alpha 7$ por aniónica (Galzi et al.; 1992; Corringer et al., 1999).

Los segmentos M1 y M3 conforman el anillo medio del AChR. Si bien no forman parte estructural del poro del canal, estudios de mutagénesis dirigida acoplados a mediciones electro-fisiológicas indican que están implicados en la funcionalidad del receptor (Wang et al. 1997, 1999). Así, Corradi et al. (2007) han descrito una interacción entre residuos de los segmentos M1 y M2 involucrada en el proceso de gatillado del AChR. Estos segmentos estarían expuestos, al menos en forma parcial, a la membrana ya que estudios de fotomarcación han demostrado la incorporación de sondas hidrofóbicas, aunque en menor magnitud comparada con la incorporación en los segmentos M4 (Blanton & Wang, 1991; Blanton & Cohen, 1994; Blanton et al., 1998, 1999; Leite et al., 2003; Hamouda et al., 2006, 2007). Recientemente se ha descrito la presencia de sitios de unión a colesterol, profundamente inmersos en la estructura del AChR, a nivel de este anillo medio. A través de estudios de dinámica molecular, se ha postulado que la presencia de colesterol en dichos

sitios sería fundamental para que el AChR pueda mantener su estructura (Brannigan et al., 2008).

El segmento M4 es el más externo, hidrofóbico y menos conservado del AChR. Mediante estudios de foto-marcación se ha demostrado que es el segmento que más interacciona con los lípidos de membrana. Llamativamente, si bien no está en contacto con la región del poro del canal, varios estudios de mutagénesis y electrofisiología han demostrado su participación en el proceso de gatillado del AChR (Bouzat et al., 1998, 2000, 2002; Tamamizu et al., 1999). Estudios de dinámica molecular muestran movimientos estructurales asincrónicos de las subunidades. Así, las interacciones de los segmentos M4 con segmentos M1-M3 por un lado y con moléculas de lípidos por el otro, constituiría la relación entre las dinámicas estructurales del canal y el ambiente lipídico (Xu et al., 2005). Esto podría contribuir al entendimiento de por qué las mutaciones en los segmentos M4 de todas las subunidades afectan la función del AChR (Tamamizu et al., 2000; Lee, 2004; Bouzat & Barrantes, 1994, Bouzat et al., 1998), ya que indicarían una estrecha relación con su microambiente lipídico (Barrantes, 2003; Xu et al., 2005).

Los distintos segmentos transmembrana de cada subunidad están unidos por secuencias aminoacídicas cortas (extracelulares o citoplasmáticas), con la excepción de la porción que conecta a los segmentos M3 y M4, que constituye un lazo citoplasmático de una mayor longitud (aproximadamente 40 aminoácidos). Este lazo, generalmente conocido como dominio C2, presenta una zona altamente hidrofóbica por lo que se lo denomina segmento anfipático (Finner-Moore & Stroud, 1984). El dominio C2 de cada subunidad contiene secuencias únicas que sirven como “huellas digitales” para poder distinguirlas. Si bien diversos estudios han sugerido que estos dominios podrían estar involucrados en: procesos de tráfico, mediando interacciones con el citoesqueleto (Bencherif & Lukas, 1993; Colledge & Froehner, 1997, Shoop et al., 2000), en el ensamblado de receptor (Yu & Hall, 1994a), y

siendo blanco de fosforilación (Yu & Hall, 1994b; Colledge & Froehner, 1997); el rol funcional de C2 ha sido escasamente estudiado (Kuo et al., 2005). Particularmente se relaciona este segmento con el proceso de agregación del AChR durante la formación de la unión neuromuscular. En este proceso, la proteína agrina induce a MuSK (*Muscle Specific Kinase*), la cual actúa sobre la proteína rapsina (proteína asociada al AChR en una estequiometría 1:1), produciéndose por último la fosforilación del AChR, lo que llevaría a una estabilización del AChR en la membrana (Kuo et al., 2005).

El AChR y su ambiente lipídico

El estudio del AChR podría dividirse en tres áreas generales (Barrantes, 2003). El centro de atención en las dos primeras recae sobre el pasaje de iones que involucra al canal propiamente dicho (los segmentos M2 de cada subunidad) y el sitio de unión de agonista. El estudio de estas áreas se ha llevado a cabo mediante la combinación de técnicas de mutagénesis dirigida y electrofisiología. El uso de estas técnicas ha posibilitado una caracterización detallada del canal iónico. Estos estudios han permitido también definir la localización de los sitios de unión a agonista, encontrándose en las interfases que forman las subunidades α con las subunidades γ y δ . La tercera área de estudio comprende a los segmentos transmembrana del AChR que se encuentran en íntimo contacto con los lípidos de la membrana. En este sentido, la posibilidad de purificación y reconstitución del AChR en distintos medios lipídicos definidos ha sido una herramienta de gran utilidad en el estudio de las necesidades lipídicas del receptor.

Marsh & Barrantes (1978), utilizando la técnica de ESR (de sus siglas en inglés: *electron spin resonance*) describieron la presencia de lípidos “inmovilizados” en la interfase lípido-proteína del AChR en membranas ricas en AChR de *Torpedo marmorata*. Este

resultado abrió un nuevo camino en el estudio del AChR, en el que tanto la composición lipídica, la presencia indispensable de ciertos lípidos, como las interacciones lípido-proteína, fueron investigadas en forma detallada tratando de encontrar una relación lípido-funcionalidad del AChR. Así, los primeros trabajos estuvieron orientados a determinar los requerimientos lipídicos del AChR. En sistemas reconstituidos se describió los requisitos diferentes, y la presencia necesaria del colesterol, durante los proceso de solubilización y purificación del AChR en detergentes para que esta proteína retenga su capacidad de respuesta a agonistas (Criado et al., 1982). Posteriormente, el grupo de McNamee (Ochoa et al., 1983) describió la necesidad tanto de colesterol como de lípidos cargados negativamente para mantener la funcionalidad del AChR cuando éste es purificado a partir de membranas de *Torpedo californica*. A estos trabajos se suman otros estudios de nuestro grupo (Criado et al., 1984) indicando que la presencia de colesterol en membranas de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) es necesaria para mantener las propiedades de respuesta a agonista del receptor extraído de las membranas nativas de *Torpedo*. Este trabajo también hace referencia al efecto de diferentes fosfolípidos con distintas cadenas acílicas, lo cual sugiere que el empaquetamiento de las mismas también es crítico para la funcionalidad del AChR. Por su parte, Ellena et al. (1983), usando AChR reconstituido en DOPC y la técnica de ESR, estudiaron las afinidades de distintos lípidos por el micro-entorno lipídico del AChR. Determinaron que tanto los ácidos grasos como un derivado del colesterol marcado tenían una afinidad notablemente mayor por el AChR que la observada con fosfatidilcolina (PC). Siguiendo esta línea de estudio, Fong & McNamee (1986) reconstituyeron el AChR en distintos modelos lipídicos, utilizando muestras preparadas con distintas concentraciones de PC, colesterol, ácido fosfático (PA), fosfatidiletanolamina (PE) y asolectina. En este estudio se demostró que en el AChR, tanto su conductividad iónica como el cambio conformacional de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad ocasionada por la

presencia de agonista, son altamente dependientes del ambiente lipídico. Se concluyó que una apropiada fluidez de membrana sería necesariamente requerida para permitir esta interconversión entre ambos estados. Sin embargo, la fluidez de membrana no sería la única condición para mantener la actividad del AChR. De las membranas que mostraban actividad, sólo las que contenían colesterol y fosfolípidos cargados negativamente (como PA) pudieron mantener la actividad del AChR.

La presencia de sitios discretos en la interfase lípido-proteína, y más particularmente en los lípidos inmovilizados en la vecindad inmediata de la proteína receptora, fue sugerida inicialmente por Marsh & Barrantes (1978). Tal hipótesis proponía que los agentes farmacológicos que ejercen efectos sobre el AChR, ya sea por modificación de su afinidad a ligandos colinérgicos o por modulación de sus propiedades de gatillado, interactuarían con el micro-entorno lipídico inmediato del AChR. Similarmente, Simmonds et al. (1982) describieron la interacción de moléculas hidrofóbicas con otra proteína de membrana, la enzima $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPasa del retículo sarcoplasmático, describiendo la presencia de sitios anulares y no-anulares en la interfase lípido-proteína, en los cuales las moléculas hidrofóbicas se localizan exhibiendo distintas constantes de interacción dependiendo de su naturaleza (Simmonds et al., 1982; Lee et al., 1982, 1983). Basados en estos trabajos, Jones & McNamee (1988) describieron en mayor detalle el micro-dominio lipídico del AChR trabajando con sistemas reconstituidos. Definieron la presencia de un cinturón lipídico alrededor del AChR denominado lípido "anular", donde se localizarían los fosfolípidos, y sitios "no-anulares" a los cuales los fosfolípidos no podrían acceder. Las moléculas de colesterol parecerían unirse más fuertemente a los sitios no-anulares, en comparación con los sitios anulares. Por su parte, los ácidos grasos podrían localizarse en ambos sitios. En forma coincidente, Fong & McNamee (1987) habían demostrado que las α -hélices del AChR

pueden ser estabilizadas por acción del colesterol, pudiéndose así asignar un papel funcional a los sitios no-anulares, ya que el colesterol se localizaría en dichos sitios.

Estudios posteriores realizados por Narayawasnami et al. (1993) con AChR purificado y marcado con la sonda maleimido-pireno confirmaron la existencia de sitios especiales para colesterol, en los cuales éste pasa mayor tiempo en relación a los otros lípidos de membrana. Este trabajo constituye un significativo avance debido a que la localización de la sonda está limitada a unas pocas cisteínas, de las cuales, sólo una está localizada en el segmento transmembrana (γ 453), cercano a la interfase membrana/agua. Posteriormente, Barrantes et al. (2000b) extendieron la información a otros esteroides, ácidos grasos y fosfolípidos, estableciendo constantes de afinidad relativas por sitios localizados superficialmente en la interfase lípido-proteína en un sistema reconstituido.

Por último, nuestro grupo introdujo el uso de la sonda fluorescente Laurdan en el estudio del AChR (Antollini et al., 1996), demostrando que el AChR y la molécula Laurdan cumplen con las condiciones necesarias para actuar como par donante-aceptor en el proceso de transferencia de energía resonante de tipo Förster (FRET). Antollini & Barrantes (1998) utilizaron esta herramienta en el estudio del micro-entorno lipídico del AChR, logrando caracterizar por primera vez la presencia de sitios discretos e independientes (anulares y no-anulares) en membranas nativas ricas en AChR de *T. marmorata*. En concordancia con otros trabajos en sistemas reconstituidos, los resultados obtenidos indicaron que los fosfolípidos se localizarían en los sitios anulares, mientras que esteroides en los sitios no-anulares. Por su parte, los ácidos grasos tendrían la capacidad de localizarse en ambos sitios.

Acción de los ácidos grasos y esteroides sobre los canales iónicos.

Los ácidos grasos se encuentran en las membranas biológicas, principalmente formando parte de los fosfolípidos. De este modo, la acción de distintas fosfolipasas puede liberar a los mismos, produciéndose además lisofosfolípidos. Se ha demostrado que una gran variedad de ácidos grasos poseen la capacidad de regular la actividad de canales iónicos (Ordway et al., 1991).

La acción de los ácidos grasos sobre los canales iónicos podría efectivizarse a través de dos vías, a saber, por interacción directa y por interacción indirecta. Mientras que los mecanismos de interacción indirecta implican una acción enzimática sobre el ácido graso, produciendo así metabolitos que afectan a ciertos canales, los efectos directos pueden comprender tanto una interacción directa con el canal como una alteración de la bicapa lipídica. Inicialmente, Andreassen & McNamee (1980) postularon que los ácidos grasos libres actuarían como inhibidores del AChR, siendo su supuesto sitio de acción la interfase lípido-proteína y atribuyendo dicha acción a una perturbación de las interacciones lípido-proteína. Por su parte, Villar et al. (1988) demostró por calorimetría diferencial de barrido (DSC: *differential scanning calorimetry*) que la hidrólisis de fosfolípidos de membrana por acción de fosfolipasa A₂ (PLA₂) produce una desestabilización de la estructura del AChR, asignando ese efecto a los productos liberados. Posteriormente, a través de la técnica de “*patch-clamp*”, Bouzat & Barrantes (1993a) determinaron que los ácidos grasos de cadena larga actúan como inhibidores del AChR. Estudios de nuestro laboratorio realizados en membranas de *Torpedo marmorata* ricas en AChR utilizando la sonda Laurdan, demostraron que distintos ácidos grasos (independientemente de sus características estructurales) se localizarían en el micro-entorno lipídico del AChR (Antollini & Barrantes, 2002). Además, utilizando la propiedad de la sonda Laurdan de censar dipolos mediante el cálculo de la polarización generalizada (*GP*) (Parasassi et al. 1991), se demostró que la perturbación de este micro-entorno lipídico es

dependiente de la estructura de los ácidos grasos. Así, mientras que la presencia de ácidos grasos *cis*-insaturados produce una disminución del valor de *GP*, el mismo aumenta levemente por el agregado de ácidos grasos *trans*-insaturados, sin encontrarse diferencias con respecto al control en presencia ácidos grasos saturados (Antollini & Barrantes 1998; 2002). En este sentido, el mecanismo de acción inhibitoria de los ácidos grasos podría obedecer a la perturbación que los mismos ejercen sobre la membrana, cambiando las propiedades biofísicas de la misma. Otro posible mecanismo de acción podría involucrar una alteración de las interacciones específicas entre lípidos y canales iónicos.

Así, Ordway et al. (1991) explican que existe una gran variedad de fuentes de ácidos grasos que pueden modificar la actividad de los canales iónicos:

- Unidos a albúmina o a otras lipoproteínas en circulación, pueden ser transportados hacia los canales iónicos.
- Pueden ser generados por el metabolismo intracelular y dirigidos a la membrana por difusión a través del citoplasma, o por proteínas de unión citoplasmáticas.
- Pueden ser liberados de los fosfolípidos de membrana por acción de fosfolipasas endógenas.

Las hormonas esteroidales ejercen su acción principalmente modulando la transcripción proteica. Además de este modo de acción, en los últimos años, se ha postulado que los esteroides ejercen un efecto rápido, no genómico, mediado por interacciones específicas con componentes de la membrana presentes en la superficie celular (Barrantes et al., 2000c).

A partir de estudios de electrofisiología, la inhibición causada por esteroides fue inicialmente descrita para el receptor GABA_A, miembro de la familia de los receptores LGIC. Así, la rápida acción del esteroide anestésico alfaxalona observada (pocos minutos) involucraría un mecanismo no genómico (Harrison & Simmonds, 1984). Un estudio posterior

realizado por Harrison et al. (1987) demuestra un alta relación estructura-actividad entre los distintos esteroides ensayados, sugiriendo una interacción directa con el receptor GABA_A. Turner et al. (1989) estudiaron la acción del esteroide anestésico alfaxalona y de una serie de análogos estructurales naturales en la modulación del receptor GABA_A. En este trabajo se sugiere que dada la distinta potencia ejercida sobre este receptor, los esteroides endógenos podrían modular la función neuronal. Finalmente, Lambert et al. (1995) demostraron que los esteroides interaccionan directamente con el receptor a través de sitios distintos de aquellos para barbitúricos y benzodiazepinas.

Para el caso del AChR, estudios realizados por Bertrand et al. (1991) determinaron que el esteroide progesterona actúa como inhibidor no competitivo del AChR de tipo neuronal y muscular, siendo su efecto casi inmediato, indicando así una acción no genómica. Trabajos de nuestro laboratorio también demostraron que distintos esteroides actúan como inhibidores no competitivos (NCI) del AChR. Mediante la técnica de “*patch-clamp*”, Bouzat & Barrantes (1993a) demostraron que los esteroides hidrocortisona (HC) y 11-desoxicortisona reducen el tiempo de apertura del AChR de manera dependiente de la concentración. Dado que efectos similares fueron obtenidos cuando el esteroide HC fue agregado por ambas caras de la membrana, se propuso que el sitio de acción puede ser alcanzado a través de la membrana, pudiendo ser a través del anillo lipídico que rodea al AChR (interfase lípido-proteína). En un trabajo posterior, Bouzat & Barrantes (1996) estudiaron el efecto del esteroide HC en células que expresaban en forma pasajera los subtipos musculares, embrionario y adulto del AChR. Este trabajo confirmó que dicho esteroide actúa como un inhibidor no competitivo del AChR. En forma adicional, por medio de estudios de competencia con el bloqueador de canal QX-222 fue posible determinar que ambas moléculas actúan en sitios distintos del AChR. Una vez más, estos resultados evidenciarían que, dada su naturaleza altamente hidrofóbica, el esteroide HC actuaría a nivel de la membrana, en la interfase lípido-proteína. Dicha teoría

podría extenderse a otros glucocorticoides y NCI altamente hidrofóbicos (Bouzat & Barrantes, 1996). En contraposición con esta hipótesis, Valera et al. (1992) proponen que el sitio de interacción con esteroides estaría localizado en la región extracelular dado que tanto la progesterona como la 11 α -hidroxiprogesterona hemisuccinato acoplados a albúmina bovina sérica (BSA) (siendo así solubles en agua) son capaces de inhibir al AChR. Dicha conclusión estaría basada en una supuesta baja probabilidad de partición de estas moléculas en la membrana. Asimismo, estudios realizados por Nurowska & Ruzzier (2002) también describen al esteroide HC como un inhibidor no competitivo del AChR y, basados en la teoría propuesta por Valera et al. (1992), también infieren que su sitio de acción se localizaría en la porción extracelular. Por su parte, Blanton et al. (1999) definieron al esteroide promegestona como un inhibidor no competitivo del AChR. Además, para identificar los dominios implicados en la interacción con el esteroide, realizaron estudios de foto-marcación del AChR con [³H]promegestona, seguido por digestión proteolítica y posterior secuenciación, determinando que la marca radiactiva correspondiente al esteroide estaba localizada principalmente en el segmento transmembrana M4, el más expuesto a los lípidos. De esta manera se establece que el esteroide promegestona es un inhibidor no competitivo del AChR que podría alterar la función del AChR por interacciones a nivel de la interfase-lípido proteína. Utilizando la misma técnica, se obtuvieron resultados similares con la sonda [³H]azidocolesterol, análogo estructural del colesterol, donde nuevamente la marcación principal ocurrió a nivel del segmento M4, aunque también se evidenció cierta marcación de los segmentos M1 y M3 (Hamouda et al., 2006). En un trabajo de nuestro laboratorio (Garbus et al., 2001) se analizó la acción de varios esteroides (naturales y sintéticos) concluyendo que más allá de sus diferencias estructurales, todos los esteroides evaluados actuarían como NCI del AChR.

Planteado sobre la base del cúmulo de evidencias analizadas en esta Introducción, este trabajo de Tesis consta de dos objetivos generales, los cuales están separados en dos Capítulos para su mejor entendimiento. El Capítulo I está orientado a definir en forma fehaciente la localización de los esteroides y ácidos grasos en el micro-entorno lipídico del AChR en membranas nativas ricas en AChR de *T. californica*. Para tal fin se utilizó la técnica de FRET entre la fluorescencia intrínseca del AChR y la sonda Laurdan sobre preparaciones de membranas nativas obtenidas de electrocitos del órgano eléctrico del elasmobranquio *Torpedo californica*, (comúnmente denominado raya eléctrica). El órgano eléctrico es una forma especializada de músculo esquelético que tiene la capacidad de generar grandes voltajes (hasta 500 V en algunos casos) por una apertura simultánea de sus canales. Constituye así una fuente rica de AChR, por lo que gran número de análisis bioquímicos y estructurales se han realizado a partir de receptores aislados de este tejido especializado en el curso de las últimas tres décadas.

El Capítulo II tiene como objetivo general estudiar los cambios conformacionales que el AChR experimenta en presencia de estas moléculas. Con esta finalidad, se utilizó la sonda fluorescente cristal violeta (de la familia de los triarilmetano), que muestra una mayor afinidad por el AChR en estado desensibilizado con respecto al receptor en estado nativo (Lurtz & Pedersen, 1999). También se hizo uso de la sensibilidad de la sonda fluorescente Laurdan a la presencia de dipolos para estudiar las perturbaciones que estas moléculas altamente hidrofóbicas ejercen sobre las características biofísicas de la membrana, y del micro-entorno lipídico del receptor. Adicionalmente, para evaluar cambios conformacionales del AChR a nivel transmembrana, inducidos por estas moléculas altamente hidrofóbicas, se purificó el AChR, se reconstituyó en un sistema modelo y posteriormente se marcó con la sonda maleimido-pireno. Fueron evaluados cambios en la extinción de fluorescencia de la

sonda maleimido-pireno, usando un ácido graso esteárico spin-marcado, inducido por la presencia de estas moléculas lipídicas exógenas.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Los especímenes de *Torpedo californica* son obtenidos de la costa del Pacífico de California (Estados Unidos), ejecutados por desmedulación y sus órganos eléctricos disecados y conservados a una temperatura de -70°C hasta su uso.

Las sondas fluorescentes Laurdan y maleimido-pireno fueron obtenidas de Molecular Probes (Eugene, OR). La fosfolipasa A₂ (PLA₂) fue obtenida de Boehringer (Ingelheim, Alemania). Affi-Gel® 10 Gel y ditiotreitól provienen de BioRad. Lípidos sintéticos y ácido esteárico spin-marcado (5-SLFA) fueron obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc (Birmingham, AL). La proteinasa K se obtuvo de Promega (Madison, WI). El resto de las drogas usadas (carbamilcolina, bromuro de bromoacetilcolina, esteroides, ácidos grasos, etc) provienen de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

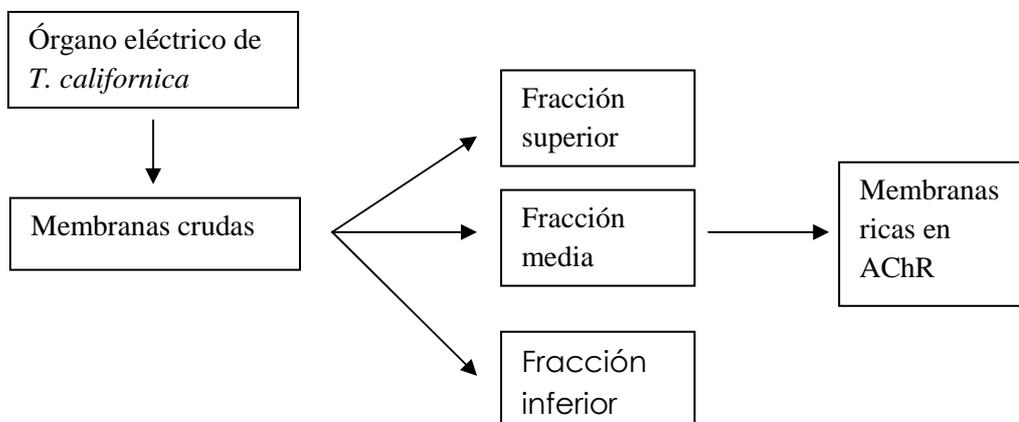
METODOS

1. Preparación de membranas crudas y ricas en AChR de T. californica.

Para la obtención de membranas ricas en AChR se siguió el protocolo detallado en Barrantes (1982) con algunas modificaciones. El tejido de órgano eléctrico, almacenado a -70°C, es descongelado gradualmente (a 0°C) en presencia de buffer de homogenización (BH, ver apéndice "Buffer"). Una vez descongelado, el tejido es homogenizado utilizando un homogenizador Virtis^(R) (30 segundos, 30K, tres veces). El homogenato es centrifugado a 5000 r.p.m. (rotor JA 17) durante 10 minutos. El sobrenadante, filtrado utilizando una malla de entrecruzado medio, es sometido a una segunda centrifugación a 15000 r.p.m. (rotor JA 17000) durante tres horas. El pellet obtenido es resuspendido en BH conteniendo sacarosa

(25-30%). La preparación obtenida corresponde a la totalidad de las membranas plasmáticas de órganos eléctricos, denominada preparación de membranas crudas. Para la obtención de membranas ricas en AChR, se realiza una nueva centrifugación en un gradiente de sacarosa (buffer de sacarosa: 50%, 35% y 30%; ver apéndice "Buffer"), sembrándose las membranas crudas resuspendidas en sacarosa en la parte superior del gradiente. Los gradientes son centrifugados 3 horas (usando un rotor SW-28) a 25000 r.p.m.

Una vez finalizada la centrifugación se obtienen tres fracciones de membranas, denominadas superior, media, e inferior. Estas fracciones ya han sido exhaustivamente caracterizadas (Elliot et al., 1980). La fracción superior posee una baja proporción de AChR; la fracción media está altamente enriquecida en AChR, convirtiéndola así en la fracción de interés; mientras que la fracción inferior prácticamente no posee AChR.



Cada una de las fracciones obtenidas es diluida tres veces en buffer de fosfato 10 mM, pH 7,4 y centrifugada a 45000 r.p.m. (rotor 70.1 TI) durante una hora, para lavar la muestra de sacarosa. El pellet obtenido es resuspendido (en poco volumen) en buffer fosfato 10 mM, pH 7,4 obteniéndose así las membranas ricas en AChR. A cada fracción de membrana

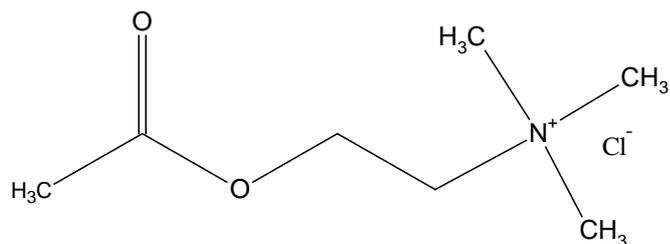
(membrana cruda, fracción superior, fracción media, y fracción inferior) se les determina la concentración proteica mediante el método de Lowry et al. (1951), y la actividad específica por la unión de α -bungarotoxina marcada con ^{125}I , para determinar la eficacia del fraccionamiento subcelular. Los valores de actividad específica para la fracción media son del orden de 2,0-2,8 nmol de sitios de α -bungarotoxina por miligramo de proteína. La correcta orientación del AChR en las vesículas se determinó siguiendo el protocolo de Harting & Raftery (1979) por comparación del número de sitios totales de unión de α -bungarotoxina en presencia de Triton X-100 con el número de sitios en orientación correcta en ausencia de detergente (ver también: Gutierrez-Merino et al., 1995). Una vez preparadas y caracterizadas, las membranas ricas en AChR (fracción media) son alicuotadas y almacenadas a -70°C hasta su utilización.

Para las mediciones de fluorescencia, las membranas ricas en AChR son suspendidas en buffer de fluorescencia (ver apéndice) a una concentración final de 50 μg ó 100 μg proteína/mL según corresponda (0,2 μM o 0,4 μM , respectivamente), siendo la densidad óptica de la suspensión de membrana menor a 0,1, para minimizar la dispersión de luz.

1.1 AChR en estado desensibilizado

Cuando los experimentos fueron realizados con muestras de membranas ricas en AChR en estado desensibilizado, se agregó carbamilcolina (Carb) a una concentración final de 1 mM, con 15 minutos de incubación previo al agregado de la sonda fluorescente (Laurdan o cristal violeta).

carbamilcolina



2. Preparación de soluciones de esteroides y ácidos grasos.

Los esteroides cortisona y HC fueron disueltos en una solución etanol/dimetilsulfóxido (DMSO) en una relación 1:1 (v/v). El esteroide 11-hidroxi-progesterona fue disuelto en etanol/DMSO en una relación 1:2 (v/v).

Todos los ácidos grasos libres (AGL) fueron disueltos en una solución concentrada en etanol, la que se gaseó con N₂ cada vez que se utilizó. Diariamente se prepararon soluciones diluidas de AGL, que se utilizaban en ese experimento y luego se descartaban. De esta manera se trató de controlar la calidad de los AGL, evitando el uso de muestras peroxidadas (principalmente en el caso de AGL muy insaturados). Después del agregado de un esteroide o un AGL, las muestras fueron incubadas 30 minutos para permitir que la partición del mismo en la membrana llegue a un equilibrio. En todos los casos la cantidad de solvente orgánico que se agregó a las muestras fue menor al 0,5%.

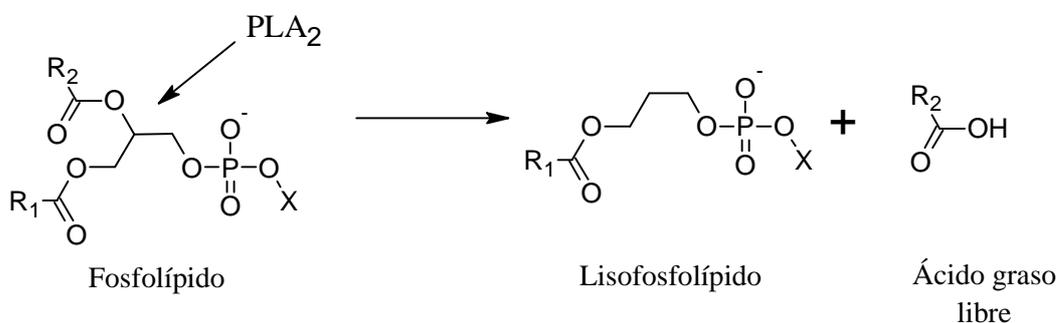
3. Digestión enzimática de la porción extra-membrana del AChR por acción de proteinasa K.

La digestión de la porción extra-membrana del AChR se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Görne-Tschelnokow et al. (1994), con ciertas modificaciones. A una suspensión de membranas ricas en AChR en buffer proteinasa K (ver apéndice "Buffer") con una concentración final de 1 mg/mL, se le adicionó 1 mg/mL de proteinasa K y se incubó bajo agitación a 37°C. Distintas alícuotas fueron tomadas a distintos tiempos con la finalidad

de obtener diferentes niveles de digestión proteica extracelular. En cada muestra la digestión fue detenida por la adición de 1 mM PMSF y 0,5 M NaCl. A continuación las muestras fueron agitadas una hora a 0°C para remover los agregados peptídicos, luego diluidas 10 veces en buffer sodio fosfato (ver apéndice “Buffer”) y finalmente centrifugadas a 45000 r.p.m. (rotor 70.1 Ti) durante 45 minutos. La concentración proteica de cada muestra fue determinada por el método de Lowry et al. (1951). El nivel de degradación fue calculado con respecto a una muestra sometida a todos los pasos en ausencia de proteinasa K, que representa el 0% de degradación. Con la finalidad de mantener una masa constante de segmentos transmembrana de AChR en cada cubeta, cada condición de digestión contuvo la misma cantidad de proteína inicial. De tal manera, al final del procedimiento de degradación, se obtuvieron distintos niveles de digestión proteica, siendo el número de segmentos transmembrana el mismo en cada condición.

4. Producción endógena de AGL por acción de PLA₂.

Para la producción endógena de AGL se utilizó la acción de la enzima PLA₂ proveniente del veneno de la serpiente *Naja naja*. Esta enzima hidroliza fosfolípidos liberando como productos lisofosfolípidos y AGL.



Membranas ricas en AChR fueron resuspendidas a una concentración proteica final de 1 mg/mL en buffer de hidrólisis PLA₂ (ver apéndice "Buffer") en presencia de 1,5 unidades

enzimáticas de PLA₂ y se incubaron a temperatura ambiente. Alícuotas de la reacción fueron tomadas a diferentes tiempos con el fin de obtener distintos grados de hidrólisis de fosfolípidos. La reacción fue detenida diluyendo la muestra 10 veces con buffer de inhibición PLA₂ a 0°C y posterior centrifugación a 45000 r.p.m. (rotor 70.1 Ti) durante 45 minutos. Como control de la acción enzimática de PLA₂, a cada muestra se le extrajeron los lípidos por el método de Bligh & Dyer (1959), siendo los mismos resueltos por cromatografía líquida en capa fina (TLC, “*thin liquid chromatography*”) como se explica a continuación. Los extractos lipídicos fueron secados bajo corriente de N₂ y resuspendidos en solvente orgánico (cloroformo:metanol 2:1, v/v), realizándose la cuantificación de fósforo por el método de Rouser (1970). A continuación se sembró en una placa de TLC comercial los distintos extractos lipídicos y se realizó la separación de sus componentes. El primer sistema de solventes utilizado fue cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua (30:40:10:10:5, v/v), el cual corrió hasta la mitad de la placa. El segundo sistema de resolución fue una composición de solventes hexano/éter/ácido acético (60:40:2, v/v), dejándolo correr hasta el extremo superior de la placa. En la Figura 1 se puede apreciar que las muestras obtenidas a distintos tiempos de incubación con PLA₂ claramente muestran un incremento de lisofosfolípidos y AGL y una disminución de fosfolípidos.

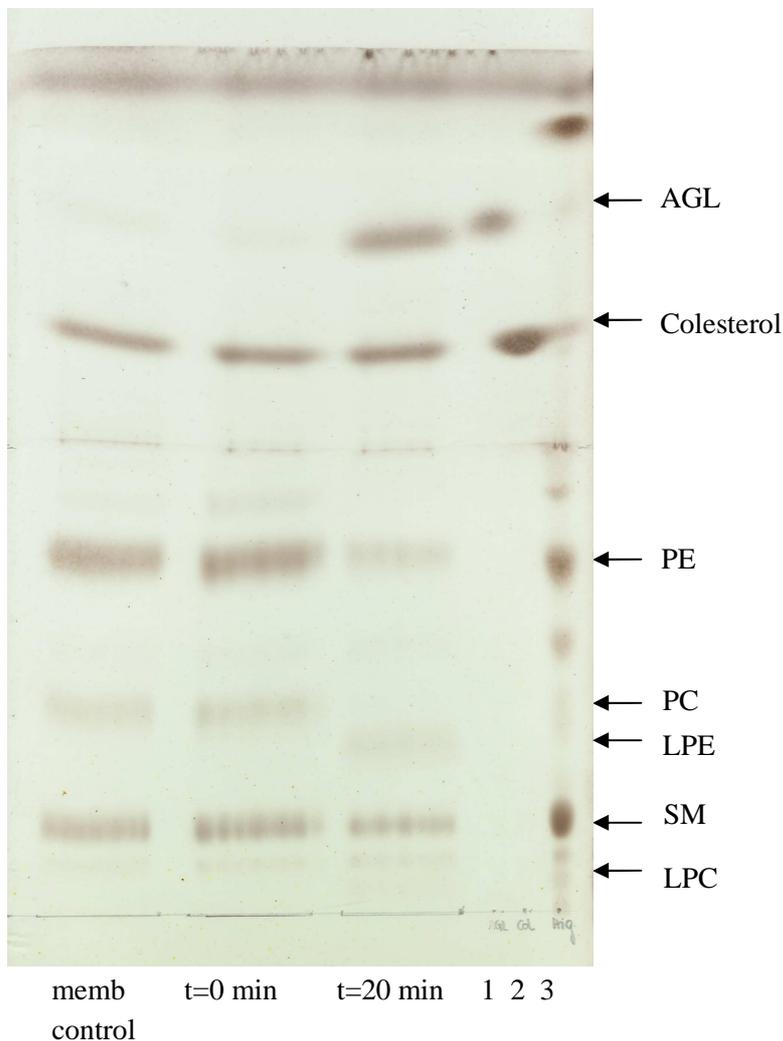


Figura 1. Evaluación de la producción endógena de ácidos grasos libres en membranas ricas en AChR de *T. californica* previamente incubadas con PLA₂ mediante TLC. Se estudiaron tres condiciones experimentales: membranas nativas, membranas con agregado de PLA₂ e inmediata inactivación de la enzima (tiempo cero) y luego de 20 minutos de acción enzimática. Los lípidos fueron visualizados mediante revelado con acetato cúprico 3% en una solución de ácido fosfórico al 8 %, seguido por calentamiento a 150°C por 10 minutos. Se sembraron los siguientes estándares: 1) ácido graso libre, 2) colesterol libre, y 3) extracto lipídico de hígado de rata.

5. Purificación del AChR.

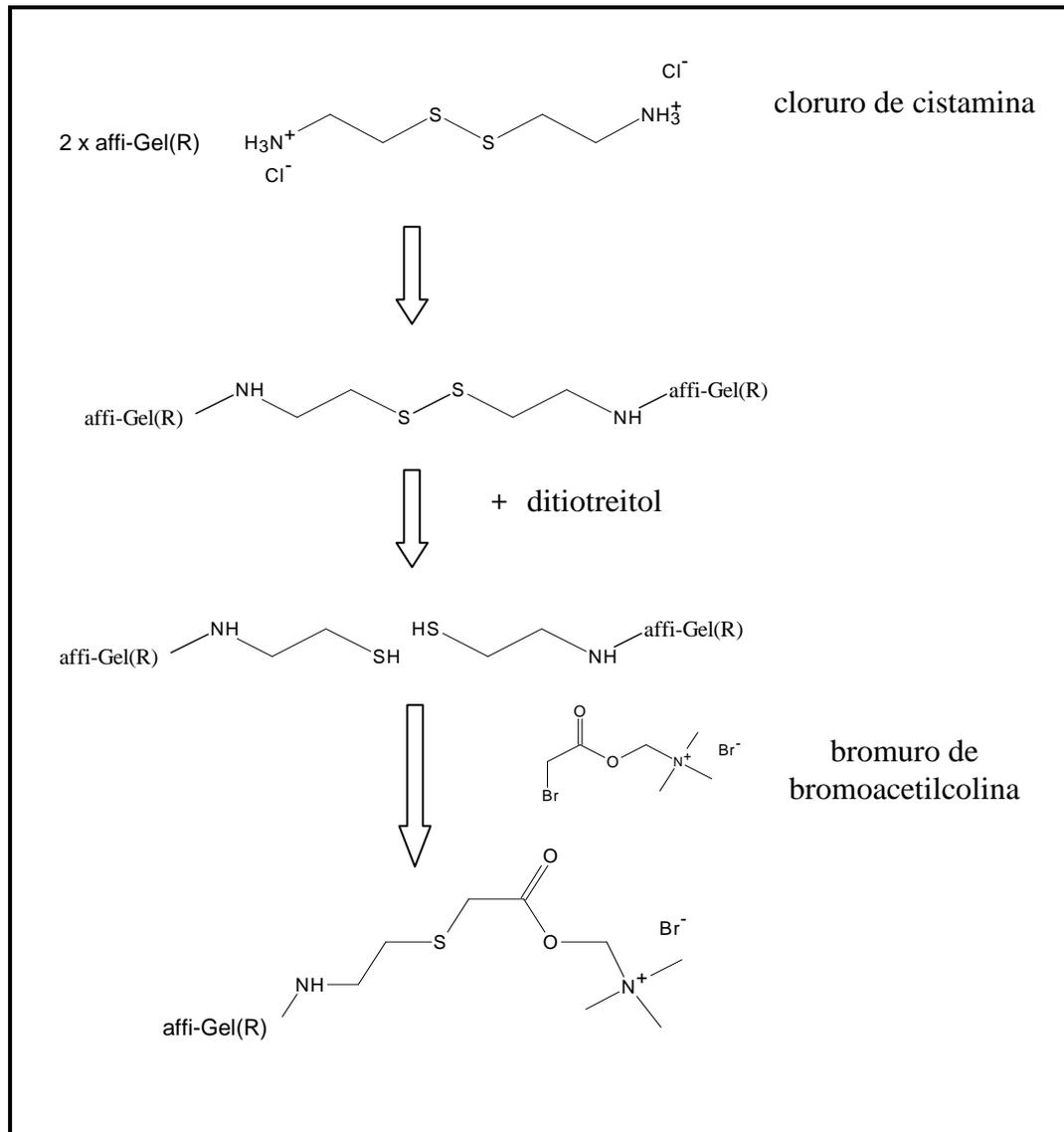
Preparación de la columna

Se vertieron 8 mL de AffiGel® en una columna de plástico (0,5 cm de diámetro y 5 cm de alto), y se lavó con 50 mL de agua desionizada (calidad miliQ) a 5°C, hasta eluir todo el isopropanol. A continuación el gel fue vertido en un vaso de precipitado, se agregó 20 mL de cloruro de cistamina (20 mg/mL), se burbujeó con nitrógeno gaseoso, se tapó con

Parafilm® y se agitó suavemente (evitando el uso de agitador magnético) durante una hora a 5°C. Durante este período se produce la unión covalente de la cistamina al gel, a través de sus aminas primarias. El sobrenadante fue removido y el gel fue lavado con agua desionizada miliQ (60 mL) a 5°C. Se agregó al gel 20 mL de solución ditioneitol (DTT), se burbujeó con nitrógeno gaseoso, y se agitó suavemente a 5°C. Este procedimiento produce la reducción de la unión bisulfuro de la cistamina para dar como resultado sulfidrilos libres (-SH). Seguidamente el gel fue colocado en la columna, y el eluido fue sometido al ensayo de DTNB¹ para grupos -SH, dando positivo (color amarillo intenso). Luego la columna fue lavada con agua miliQ para remover el exceso de DTT. Se realizó el ensayo de DTNB del eluido hasta que la prueba dió negativa, no debe virar a color amarillo, indicando que no hay -SH libres. La columna fue lavada con buffer fosfato 0,1 M pH 7,4, y se tomó una muestra del gel para realizar la prueba de DTNB, la cual debe dar positiva, indicando presencia de SH-. Luego se agregó 0,2 mg de bromuro de bromoacetilcolina, se cubrió con Parafilm® y se agitó suavemente a 5°C durante una hora. Aquí se produce la unión covalente de la bromoacetilcolina al gel por reacción con los grupos -SH. A continuación la columna fue lavada con exceso de agua miliQ. Se tomó una muestra del gel, y se realizó la prueba de DTNB. Esta debe dar negativa, indicando que no hay grupos -SH libres, si todos han reaccionado con la bromoacetilcolina. La columna fue lavada con buffer de almacenaje de columna, el cual tiene un pH ácido para evitar que se hidrolice la unión de bromoacetilcolina al gel y guardada a 4°C hasta su uso. Típicamente, la vida de la columna es de un mes.

¹ *Prueba de DTNB*: 0,33 mL de una solución concentrada de DTNB-son diluidos a 10 mL con buffer sodio fosfato pH 8. Se coloca 1 mL de la solución en varios tubos de ensayo, a los que se les va agregando 50 µL del eluido de la columna. Si la solución vira al amarillo significa que hay presencia de grupos -SH libres (prueba positiva) mientras que si no hay cambio de color (la solución permanece incolora) indica que no hay presencia de grupos -SH libres (prueba negativa).

Preparación de columna de afinidad



Purificación del AChR

Membranas crudas de *T. California* (ver 1. *Preparación de membranas crudas*) fueron solubilizadas en buffer de solubilización (ver apéndice “Buffer”) en una concentración final proteica de 2 mg/mL, a 5°C durante 45 minutos. Luego las muestras fueron centrifugadas a 32000 r.p.m. (rotor 70.1 Ti) durante una hora, para descartar el material insoluble. El sobrenadante fue cargado en la columna de afinidad derivatizada haciéndolo pasar dos veces a través de la misma a un flujo de 1 mL/minuto (daCosta et al., 2002, 2004). Así, el AChR queda retenido en la columna de afinidad por unión a la bromoacetilcolina, mientras que las otras proteínas son eluidas.

Con el objetivo de facilitar el completo intercambio de lípidos endógenos por lípidos definidos, la columna con el AChR unido fue lavada con un gradiente lineal de lípidos (POPC:POPA:colesterol) (3:1:1) disueltos en buffer de diálisis (ver apéndice “Buffer”) conteniendo 1% de colato sódico. El gradiente comenzó con una concentración lipídica de 1,3 mM hasta llegar a un máximo de 3,2 mM y luego disminuir gradualmente hasta una concentración lipídica de 0,13 mM (daCosta et al., 2002). De esta manera se asegura un intercambio lipídico total, reemplazando los lípidos endógenos, por los lípidos sintéticos exógenos.

Luego, el AChR fue eluido de la columna con buffer de elución conteniendo una concentración lipídica de 0,13 mM. La elución del AChR de la columna fue seguida por medición de la absorbancia a 280 nm, correspondiente a la absorción proteica. Las fracciones eluidas (0,5 mL) con un valor de densidad óptica superior a 0,05 fueron seleccionadas y se juntaron para formar un pool (fig. 2).

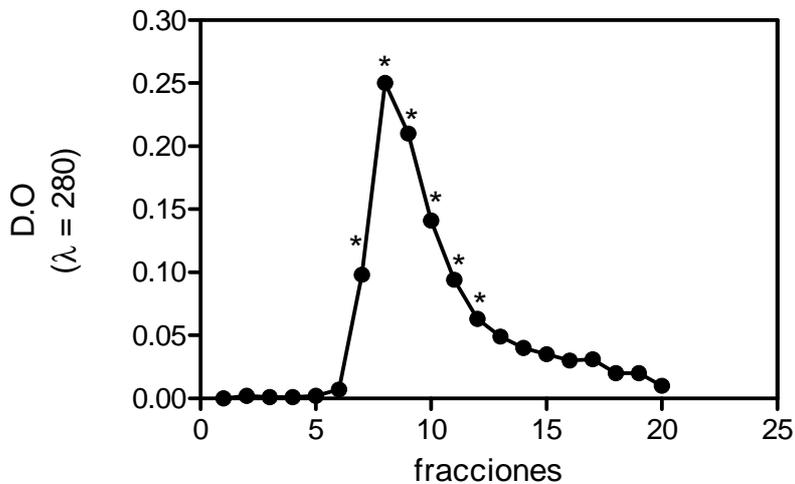


Figura 2. Patrón de elución de una purificación típica. Las fracciones mostraron un valor de absorbancia mayor a 0,05 a $\lambda = 280$ nm (*) fueron seleccionadas para formar un pool, el cual luego fue dializado.

Con la finalidad de eliminar el detergente colato de la muestra, la solución conteniendo AChR purificado fue dializada contra un litro de buffer de diálisis con cinco cambios, uno cada 12 horas, a 4°C. Al final de la diálisis la concentración de colato en la muestra sería despreciable. La purificación del AChR fue controlada mediante una electroforesis de gel de poliacrilamida desnaturalizante con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, ver sección siguiente) y la concentración proteica fue determinada por el método de Lowry et al. (1951). El resto de la muestra fue luego fraccionada en volúmenes discretos y guardada a -70°C hasta su posterior uso.

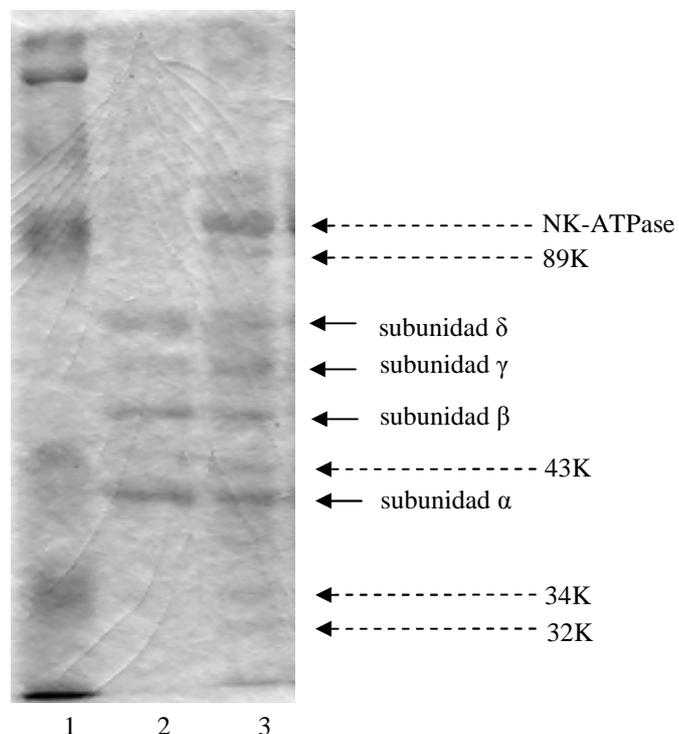
Control mediante SDS-PAGE

Una alícuota de la muestra fue incubada con 10% de ácido tricloroacético (TCA) durante treinta minutos. Luego se centrifugó diez minutos a máxima velocidad (14000 r.p.m.) en una microcentrífuga. El pellet obtenido fue lavado primero con una solución de TCA 7,5 %, con incubación de diez minutos, y luego centrifugado a máxima velocidad. El último lavado fue realizado con agua destilada (calidad miliQ) y centrifugado a máxima velocidad.

El pellet obtenido fue resuspendido en buffer de siembra (Laemmli). Para corregir el pH se agregó 1,5 μ L de carbonato de calcio 1,5 M o 1,5 μ L Tris-base 1 M. La muestra se sembró en un gel de acrilamida al 8% (concentración apropiada para lograr la mejor resolución de las cuatro bandas del AChR). La electroforesis fue realizada inicialmente a 40 V, 45 minutos, y luego se incrementó el voltaje a 60 V (aproximadamente 3 hrs). En todo momento el voltaje se mantuvo constante. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con una solución de Coomassie blue durante toda la noche. A continuación se destiñó el gel con una solución decolorante (ver apéndice “Buffer”) hasta visualizar las bandas. Para aumentar la velocidad de desteñido del gel, se agregó papel adsorbente. Una vez desteñido, el gel fue secado utilizando un secador de geles BioRad® y luego escaneado a alta resolución.

A continuación se muestra un gel típico. La primera calle corresponde a los marcadores de peso molecular. La segunda calle corresponde a la muestra con AChR purificado. La tercera calle corresponde a membranas ricas en AChR.

Gel de acrilamida al 8%



32K: homólogo de la proteína transportadora de ATP/ADP de membrana mitocondrial; peso molecular: 32 kDa.
 34K: canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC); peso molecular: 34 kDa.

43K: proteína rapsina, asociada al AChR; peso molecular: 43 kDa.
89K: canal clorhídrico dependiente de voltaje (CLC-0); peso molecular: 89 kDa.
NK-ATPase: subunidad α de la ATPasa Na^+K^+ ; peso molecular: 95 kDa.

Pesos moleculares de las subunidades del AChR:

- α : 40 kDa.
- β : 50 kDa.
- γ : 60 kDa.
- δ : 65 kDa.

6. *Marcación del AChR con maleimido-pireno*

La marcación de las cisteínas transmembrana del AChR fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Li et al. (1990) y Narayanaswami et al. (1993) introduciendo pequeñas modificaciones. Brevemente, el AChR purificado, concentración final de 1 mg/mL en buffer de solubilización fue incubado en presencia de maleimido-pireno (1 mM) una hora a temperatura ambiente, en completa oscuridad y con una suave agitación. Posteriormente, la solución fue centrifugada a 32000 r.p.m. (rotor 70.1 Ti) durante 30 minutos para precipitar los agregados insolubles. El sobrenadante obtenido fue dializado contra un litro de buffer de diálisis a 4°C, en permanente oscuridad, con el objetivo de descartar los agregados que no pudieron ser eliminados en el primer proceso. Se realizaron cinco cambios de buffer, uno cada 12. Luego, la muestra fue separada en volúmenes discretos y guardados a -70°C hasta su posterior uso. Como control del procedimiento de marcación, una alícuota de la muestra de AChR marcado con maleimido-pireno fue sometida a SDS-PAGE, y la marca de pireno fue visualizada en un trans-iluminador de luz ultravioleta (UV). La emisión de fluorescencia correspondiente a la sonda pireno fue coincidente con la banda correspondiente a la subunidad γ , confirmando una correcta y eficiente marcación del AChR purificado, como se demostró en los trabajos previamente mencionados.

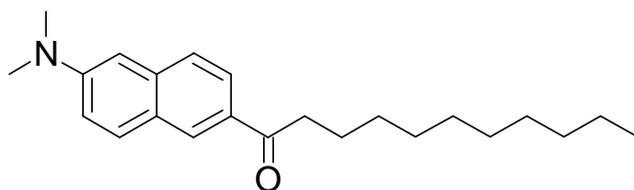
7. Mediciones de fluorescencia

Todas las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un fluorímetro SLM modelo 4800, formato T, usando un rayo de luz polarizado verticalmente de una lámpara Hannovia 200-W mercurio/xenón común, polarizador Glan-Thompson (4-nm de apertura) y cubetas de cuarzo de 2 mL y 0,7 mL según se especifique. La temperatura de las muestras fue controlada mediante un baño de agua circulante con termostato (Haake, Darmstadt, Alemania).

7.1. Mediciones de Laurdan

La sonda fluorescente Laurdan, disuelta en etanol, fue agregada a las muestras de membrana ricas en AChR, antes o después de distintos tratamientos, según se indique, dando una concentración final de 0,6 μM . Las muestras fueron incubadas una hora en oscuridad a temperatura ambiente (22 °C).

Laurdan



7.1.a Mediciones de fluorescencia mediante transferencia de energía resonante de tipo

Förster (FRET)

El proceso de transferencia de energía resonante de tipo Förster (FRET) implica la transferencia de energía entre dos cromóforos. El primer cromóforo, que actúa como donante de energía, es excitado a una determinada longitud de onda, coincidente con su máxima absorción. En estado excitado, cede energía a un segundo cromóforo, denominado cromóforo aceptor, en forma de energía resonante, a través de interacciones dipolo-dipolo (Lakowicz, 1999). Este proceso no libera energía, ni involucra colisiones moleculares. Básicamente

consiste en la excitación inicial del donante a una longitud de onda apropiada, la que produce que los electrones pasen desde el nivel de energía basal (S_0) a un estado excitado (a un nivel de mayor vibración molecular). Estos electrones decaen rápidamente a un nivel de energía intermedio (S_1) y eventualmente vuelven a su estado de reposo emitiendo un fotón. Bajo condiciones de FRET existe una competencia entre este decaimiento, visualizado como fluorescencia, y la transferencia de energía hacia el aceptor (Lakowicz, 1999). El proceso de FRET no está mediado por la emisión de fotones, ni requiere que el cromóforo aceptor sea fluorescente, aunque es una estrategia experimental muy interesante si ambos cromóforos son fluorescentes. En este caso, el proceso de FRET se manifiesta por la extinción de la fluorescencia del cromóforo donante acompañado por un incremento de la emisión de la fluorescencia del cromóforo aceptor.

Condiciones para que ocurra el proceso de FRET

Si bien muchas condiciones deben cumplirse para que el proceso de FRET sea exitoso, las principales son tres. En primera medida, los espectros de emisión del donante y de absorción del aceptor deben estar superpuestos. Un requerimiento adicional es que el tiempo de vida del donante en estado excitado sea suficiente para poder transferir energía al cromóforo aceptor. Además, la eficiencia de la transferencia de energía resonante (E), es decir la eficiencia del proceso de desactivación del donante en estado excitado, también depende de la distancia entre el donante y el aceptor, en una relación a la inversa de la sexta potencia, tal como se indica en la siguiente ecuación,

$$E = 1/(1 + r / R_0)^6$$

donde R_0 o distancia de Förster, es la distancia entre el donante y el aceptor a la cual la E es del 50% y r la distancia de separación entre el par donante-aceptor. Las distancias de Förster son generalmente del orden de 30-60 Å, comparables con el tamaño de moléculas biológicas y distancias intermoleculares funcionalmente relevantes. Por tal motivo, la transferencia de energía se ha utilizado como una “regla espectroscópica” (Weber, 1952). Si la distancia es menor a 1 nm, otros procesos físicos de transferencia de energía pueden ocurrir.

En los experimentos de FRET, si bien no es necesario que la molécula aceptora sea fluorescente, generalmente lo son. En estos casos la luz absorbida por la molécula donante y transferida al aceptor se hace evidente en un aumento en la emisión de fluorescencia del aceptor. El aumento en la emisión de fluorescencia colectado experimentalmente presenta "contaminación", contribución proveniente de la emisión de fluorescencia de la molécula donante (Figura 3), que al ser a menudo difícil de disecar de la emisión del aceptor, complica el uso de intensidades de emisión de fluorescencia provenientes de este último en los estudios de FRET.

De acuerdo con la teoría de Förster, una posible manera de calcular la E es a partir de la relación entre dos intensidades de emisión de fluorescencia de la molécula donante de la siguiente manera,

$$E = 1 - (I / I_D)$$

donde I e I_D representan las intensidades de emisión de fluorescencia del dador en presencia y ausencia de aceptor, respectivamente.

En este trabajo de Tesis, I corresponde al máximo de emisión de la fluorescencia intrínseca de la membrana, a 330 nm, dada principalmente por los Trp del AChR (51 en total), que actuaron como cromóforos donantes en el proceso de FRET, siendo la longitud de

onda de excitación 290 nm. La molécula aceptora de energía resonante utilizada fue el Laurdan. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Antollini et al, 1996; Antollini & Barrantes, 1998) han demostrado que este par de cromóforos no sólo reúne las condiciones básicas para que el proceso de FRET ocurra, sino que además constituye un par de FRET sumamente ventajoso.

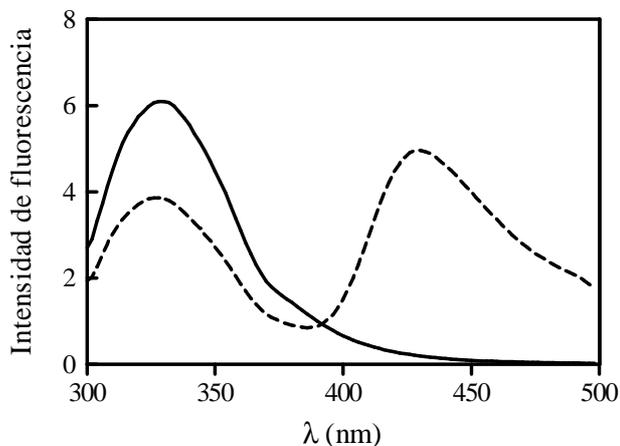


Figura 3. Espectros de emisión de fluorescencia de membranas de *Torpedo californica* ricas en AChR en ausencia (línea continua) o en presencia (línea discontinua) de la sonda Laurdan. Las membranas fueron excitadas a 290 nm y el espectro de emisión de fluorescencia fue registrado en el intervalo 300-500 nm.

Corrección del valor de I por efecto de filtro interno

Dado que las moléculas de esteroides absorben a las longitudes de onda de excitación/emisión utilizadas en estos estudios, los valores de intensidad se corrigieron aplicando la siguiente fórmula,

$$I_{\text{cor}} = I \text{ antilog } \{(\text{DO}_{290} + \text{DO}_{330})/2\}$$

siendo I la intensidad de emisión de fluorescencia a 330 nm, y DO_{290} y DO_{330} las densidades ópticas de la muestra a 290 y 330 nm, respectivamente.

Para cada condición, la eficiencia de FRET fue calculada de la siguiente manera,

$$E = (1 - I/I_0)_L - (1 - I/I_0)$$

donde I_0 e I corresponden a las intensidades de fluorescencia inicial de la muestra y luego del agregado de moléculas altamente hidrofóbicas, tales como esteroides y/o AGL, a una determinada concentración, respectivamente. El subíndice L (Laurdan) indica que los experimentos se realizaron en presencia de aceptor. Así, el primer término de la ecuación explica la disminución de la eficiencia de transferencia de energía entre la fluorescencia

intrínseca y Laurdan, por presencia de esteroides/AGL, mientras que el segundo término explica la disminución inespecífica de la misma ya que no hay presencia de moléculas aceptoras (Lakowicz, 1999).

7.1.b Cálculo de la polarización generalizada

La polarización generalizada (*GP*) explota la capacidad de la sonda Laurdan de censar la polaridad del ambiente en que se encuentra, lo cual se refleja en cambios en su espectro de emisión de fluorescencia.

Los valores de *GP* se calcularon a partir de espectros de emisión de fluorescencia de Laurdan obtenidos por excitación de las muestras a dos longitudes de onda, 290 nm y 360 nm, obteniendo así valores de *GP* en condición de FRET o de excitación directa, respectivamente. Indistintamente de la longitud de onda de excitación, el valor de *GP* fue calculado utilizando la siguiente fórmula,

$$GP = (I_{434} - I_{490}) / (I_{434} + I_{490})$$

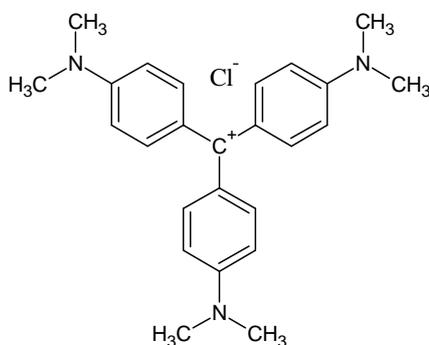
siendo I_{434} e I_{490} las intensidades de emisión de fluorescencia a 434 nm y 490 nm, correspondientes a la fase gel y a la fase líquido-cristalina, respectivamente.

7.2 Medición de fluorescencia de la sonda cristal violeta

La sonda fluorescente cristal violeta (CrV), de la familia de los triarilmetano, muestra una mayor afinidad por el AChR en estado desensibilizado respecto al receptor en estado de reposo (Lurtz & Pedersen, 1999). Además, cuando la sonda se encuentra en solución prácticamente no emite fluorescencia, mientras que unida a una proteína (p. ej. al AChR), e independientemente de su conformación, experimenta un aumento de la emisión de fluorescencia de 200 veces. Esto se debe a que la sonda, cuando se encuentra en un medio

líquido sufre un proceso de des-excitación debido a la libre rotación de los sustituyentes arilo. Al unirse al receptor, dos de los tres grupos amino sustituyentes de la sonda CrV interaccionan con dos residuos glutámico de cada subunidad α . Esta interacción evitaría la libre rotación de los anillos produciendo un aumento en la fluorescencia de la sonda. A su vez, la unión de la sonda con el AChR no se vería afectada por la temperatura (Arias et al., 2005).

cristal violeta



La sonda fluorescente CrV se disolvió en buffer de fluorescencia (ver apéndice “Buffer”), preparándose tres soluciones con distintas concentraciones (10 μ M, 50 μ M y 350 μ M) las que se guardaron a -20°C hasta su uso en los experimentos de titulación. Los experimentos de titulación con la sonda CrV consistieron en agregar la sonda CrV en concentraciones crecientes a las muestras de membranas ricas en AChR (100 μ g proteína /mL), con una posterior incubación de 15 minutos, antes de realizar cada medición.

Los espectros de emisión de la sonda CrV fueron obtenidos por excitación a 600 nm, recogiendo la emisión entre 605 nm y 700 nm. El máximo de emisión de fluorescencia de CrV fue registrado a 623-625 nm. Un espectro de fluorescencia inespecífico (basal) fue

obtenido excitando las muestras en las condiciones anteriormente mencionadas pero en ausencia de la sonda CrV.

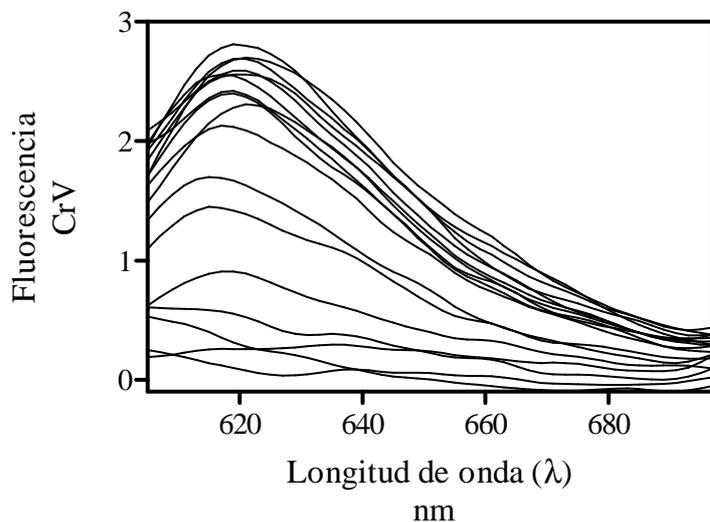


Figura 4. Espectros de emisión de fluorescencia de la sonda CrV a concentraciones crecientes, en membranas de *Torpedo californica* ricas en AChR. Las membranas fueron excitadas a 600 nm y el espectro de emisión de fluorescencia fue registrado en el intervalo 605-699 nm.

7.2.a Tratamiento matemático de los registros de fluorescencia obtenidos

Con la finalidad de determinar las constantes de disociación (K_D) de la sonda CrV del AChR, se graficaron los valores de intensidad de emisión de CrV a 623 nm en función del logaritmo de la concentración molar de la sonda correspondiente a ese espectro. El perfil de distribución de los datos corresponde a una curva sigmoidea, la cual fue ajustada a la función de Boltzmann, y el K_D calculado.

Ecuación de Boltzmann:

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + e^{\frac{(x - x0)}{dx}}}$$

Con la finalidad de controlar la unión inespecífica de la sonda CrV (Lurtz & Pedersen, 1999) se realizaron experimentos con membranas de la fracción inferior (fracciones de membrana plasmática de *Torpedo californica* carentes de AChR, obtenidas luego de la separación mediante un gradiente de sacarosa de la fracción de membrana plasmática total).

Tal como se observa en la Figura 16a, la señal de unión inespecífica de la sonda CrV resultó ser significativamente menor a la obtenida en membranas ricas en AChR, por lo que la unión inespecífica de CrV no produce cambios significativos en el cálculo del K_D de la sonda.

7.3 Medición de fluorescencia de AChR marcado con maleimido-pireno

Para la medición de fluorescencia del AChR marcado covalentemente con maleimido-pireno, el mismo fue resuspendido en buffer de fluorescencia a una concentración de 20 μg proteína /mL.

7.3.a Extinción de la fluorescencia del AChR marcado con maleimido-pireno por acrilamida y por un ácido graso “spin-marcado”

Los experimentos de extinción de fluorescencia fueron realizados con muestras de AChR purificado marcado con maleimido-pireno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), excitando las muestras a 345 nm (longitud de onda en la que ocurre la máxima absorción del pireno), y obteniendo espectros de emisión de fluorescencia en el rango de 360 nm a 500 nm. El máximo de emisión de fluorescencia fue a 374 nm. Para confirmar que la unión de pireno ocurrió en la región TM del AChR, la muestra fue titulada con acrilamida, un conocido extintor hidrosoluble de fluorescencia, hasta una concentración de 500 mM, evaluando tanto la fluorescencia intrínseca del AChR como la fluorescencia de la sonda pireno. Mientras que la intensidad de emisión de la fluorescencia intrínseca de la membrana, correspondiente a la presencia de triptófanos en la proteína receptora (290 nm) fue disminuyendo a medida que la concentración de acrilamida aumentaba, la emisión de fluorescencia correspondiente a la sonda pireno (365 nm) se mantuvo constante, indicando así que el pireno se encuentra localizado en la región TM, siendo inaccesible a la acrilamida.

7.3.b Cambios en la extinción de fluorescencia de pireno por presencia de lípidos exógenos

Las muestras de AChR marcado con maleimido-pireno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron tituladas con el esteroide hidrocortisona o con distintos AGL, hasta concentraciones de 600 μM o 60 μM , respectivamente. A cada muestra se le agregó secuencialmente un ácido esteárico 5-spin- marcado, molécula hidrofóbica que localizada su grupo extintor (grupo nitroxido) a nivel TM dependiendo su ubicación de la posición en que está unido a la cadena acílica del ácido graso. Luego de cada agregado, las muestras fueron incubadas 30 minutos a 25°C antes de la determinación de la fluorescencia, para permitir que la partición en la membrana del ácido spin-marcado llegue a equilibrio.

A partir de los datos de fluorescencia fueron obtenidas las curvas de Stern-Volmer de acuerdo a la siguiente ecuación,

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q]$$

donde I_0 y I corresponden a la emisión de fluorescencia del AChR marcado con pireno en ausencia y en presencia de ácido esteárico 5-spin-marcado, respectivamente; y K_{SV} la constante de Stern-Volmer, que representa una medición de la concentración del extintor de fluorescencia en la vecindad del fluoróforo, lo cual permite obtener información topológica de la ubicación transversal de las distintas cisteínas marcadas (Lakowicz, 1999).

CAPITULO I

Para poder avanzar en la comprensión del mecanismo de acción de los NCI del AChR, de baja afinidad por dicho receptor y de carácter altamente hidrofóbico, inicialmente estudiamos las posibles interacciones entre estos compuestos exógenos, específicamente esteroides y AGL, y la proteína receptora. En este primer capítulo nos dedicamos a definir en forma fehaciente la localización de los esteroides y ácidos grasos en el micro-entorno lipídico del AChR en membranas ricas en AChR de *T. californica*.

RESULTADOS

1. Distintos esteroides se localizan en la interfase lípido-AChR.

Se escogieron tres esteroides que, por medio de estudios previos de electrofisiología realizados en nuestro laboratorio y en otros, demostraron ser NCI del AChR: cortisona, hidrocortisona, y 11-hidroxi-progesterona (Bouzat & Barrantes, 1993a; Garbus et al.; 2001; Nurowaska & Ruzzier, 2002).

Para estudiar la interacción entre el AChR y los esteroides fue utilizado el par de FRET AChR-Laurdan, estrategia experimental previamente aplicada en nuestro laboratorio para el estudio de la interacción entre el AChR y distintos AGL (Antollini et al., 1996; Antollini & Barrantes, 1998; Antollini & Barrantes, 2002). En dicho par, la fluorescencia intrínseca del AChR actúa como donante mientras que la sonda Laurdan lo hace como aceptor. La eficiencia del proceso de FRET (E) entre el donante y el aceptor está relacionada con la sexta potencia de la distancia presente entre ambas moléculas (Lakowicz, 1999; Materiales y Métodos). Mediante este método, una disminución en la eficiencia de FRET

ocasionada por el agregado de moléculas exógenas (esteroides, o más adelante, AGL) evidencia un desplazamiento de la sonda Laurdan del micro-ambiente lipídico del AChR.

A las membranas ricas en AChR de *T. californica* se les incorporó la sonda fluorescente Laurdan y luego se procedió a la titulación con concentraciones crecientes de un esteroide en particular en cada caso. Luego de cada agregado se obtuvieron espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de la proteína, a partir de los cuales se calculó la eficiencia de FRET según se explicó en Materiales y Métodos. La magnitud de la eficiencia de FRET fue dependiente de la concentración de esteroide en todos los casos, observándose una disminución de la misma a medida que aumentaba la concentración de esteroide en la membrana. Se registró una aparente saturación del sistema cuando dicha concentración llegó a 600 μM (Figura 5). Al normalizarse los valores de la E obtenidos en presencia de esteroide con respecto al obtenido en su ausencia ($E = 1$ en la situación control), pudo observarse que la E disminuyó en una forma sigmoidea al incrementar la concentración de esteroide, lo que sugiere una competencia directa entre la sonda Laurdan y el compuesto exógeno agregado. Sabiendo que en este sistema la distancia mínima del par Trp-Laurdan es de 14 Å (Antollini et al., 1996), estos resultados estarían indicando que el esteroide desplaza a la sonda Laurdan de una posición muy cercana al AChR, es decir, del micro-entorno lipídico. A partir de las curvas sigmoideas obtenidas pudo determinarse la concentración de esteroide que ocasiona el 50% de desplazamiento de la sonda (DC_{50} , tabla 1).

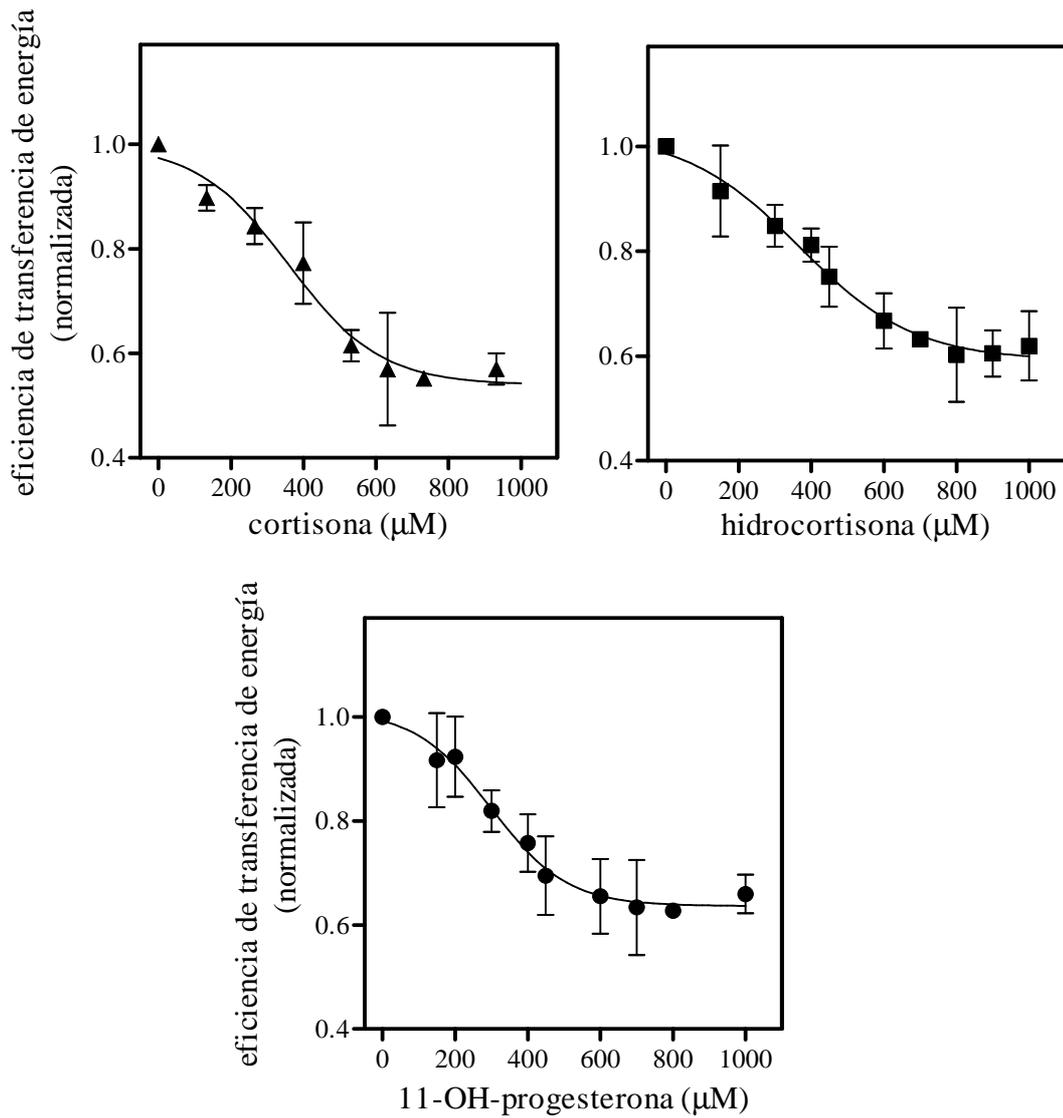


Figura 5. Cambios en la eficiencia de FRET normalizada entre la fluorescencia intrínseca de membranas ricas en AChR de *T. californica* y la sonda Laurdan luego del agregado de cantidades crecientes del esteroide indicado. Los valores de E obtenidos en presencia del esteroide fueron normalizados con respecto al correspondiente valor en su ausencia (100%). Los datos fueron analizados mediante una curva sigmoidea. Cada punto corresponde al promedio de seis o más experimentos independientes.

Tabla 1 Cálculo de la concentración de desplazamiento del 50% de la sonda Laurdan (DC_{50}) y del coeficiente de Hill para los distintos esteroides estudiados. Los valores de DC_{50} fueron obtenidos a partir de las curvas de E (Figura 5), mientras que los distintos coeficientes de Hill se calcularon a partir de las curvas de BP (Figura 6).

Esteroides	DC_{50} (μM)	coef. Hill
Cortisona	359,1	3,5
Hidrocortisona	367,2	2,9
11-hidroxi-progesterona	298,9	3,2

Se realizó un análisis más exhaustivo de los datos a partir de una curva dosis-respuesta utilizando la ecuación de Hill para analizar el parámetro de unión (BP , “*binding parameter*”) de cada esteroide en función de la concentración agregada del mismo (Figura 6). El parámetro BP fue calculado asumiendo que E es inversamente proporcional al número de moléculas exógenas localizadas en la interfase lípido-AChR, de la siguiente manera:

$$BP = E^{-1} - 1$$

donde, a E^{-1} , la inversa de la E normalizada y que representa la disminución de la E , se le resta una unidad para obtener un valor de BP igual a cero en ausencia de ligando ($0 \mu\text{M}$) (Figura 6).

En todos los casos se obtuvo un valor de coeficiente de Hill mayor a dos unidades para cada esteroide, lo que indica una unión cooperativa positiva a más de un sitio de unión común en la interfase lípido-AChR (Tabla 1).

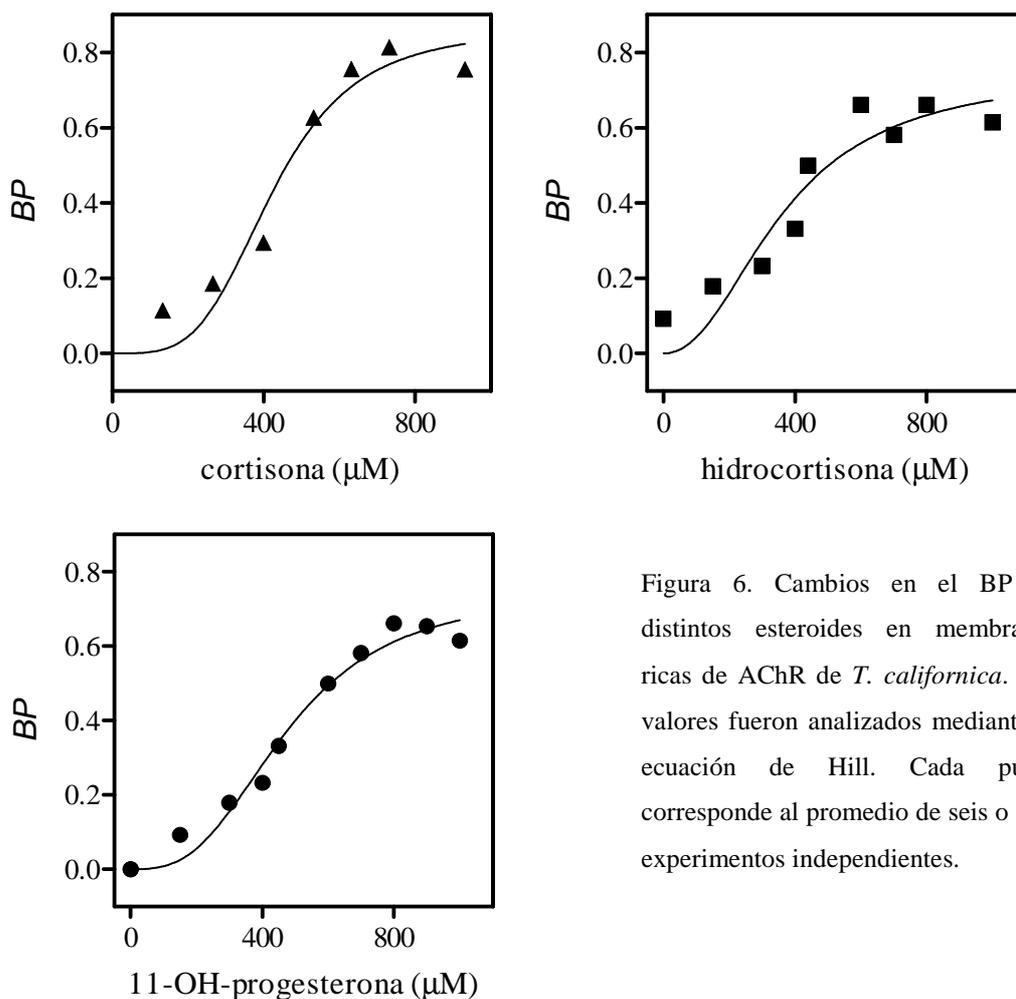
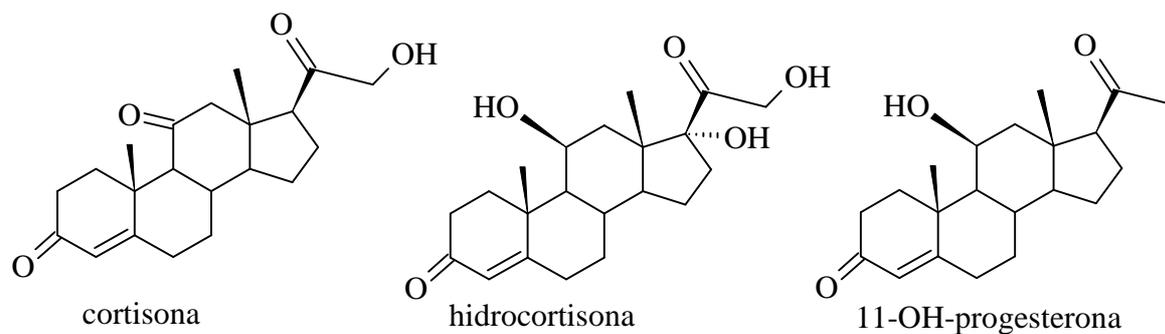


Figura 6. Cambios en el BP de distintos esteroides en membranas ricas de AChR de *T. californica*. Los valores fueron analizados mediante la ecuación de Hill. Cada punto corresponde al promedio de seis o más experimentos independientes.

2. Distintos esteroides se unen a los mismos sitios en la interfase lípido-AChR.

Dado que la disminución de la E causada por los distintos esteroides ensayados fue similar, a pesar de sus diferencias físicas y estereoquímicas (Figura 5), a continuación estudiamos si dicha similitud sería consecuencia de la localización de estos esteroides en los mismos sitios en la interfase lípido-AChR. Con esta finalidad, se realizaron experimentos en los cuales las membranas ricas en AChR fueron tratadas previamente con un esteroide (cortisone, hidrocortisone o 11-hidroxi-progesterone) hasta alcanzar su concentración de saturación (600 μM), y luego se les agregó un segundo esteroide. El planteo experimental se basa en la hipótesis de que si los distintos esteroides se unen a distintos sitios en la interfase

lípid-AChR, al agregar el segundo esteroide (estructuralmente diferente al primero) debería producirse una disminución de la *E* adicional a la producida por el primer esteroide. Por el contrario, si el segundo esteroide se localiza en los mismos sitios que el primero, no debería producirse una disminución adicional de la *E*.



Fórmula química de los tres esteroides utilizados que muestra la estereoquímica de cada uno de los compuestos.

Los resultados obtenidos muestran que luego del agregado de un segundo esteroide el valor de *E* se mantuvo constante. Un mismo resultado fue obtenido cuando se agregaron cantidades adicionales del mismo esteroide (Figura 7). De esta manera, los esteroides estructuralmente diferentes compartirían los mismos sitios en la interfase lípido proteína.

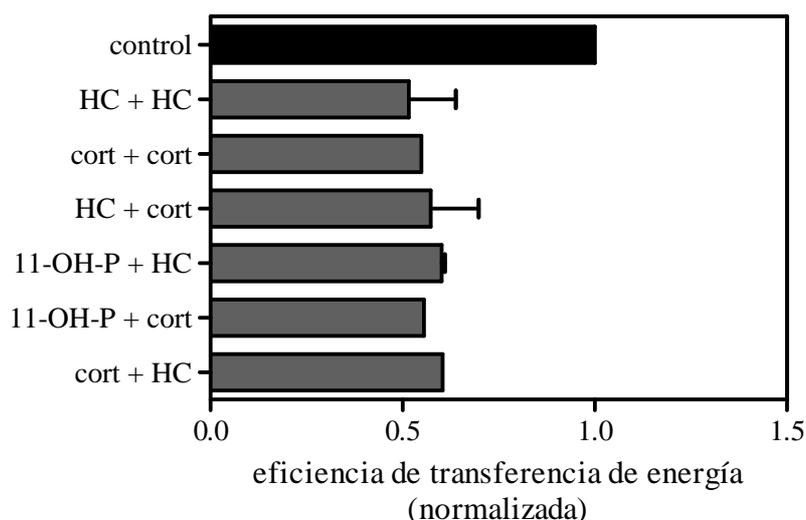


Figura 7. Eficiencia de la transferencia de energía entre membranas ricas en AChR de *T. californica* y la sonda Laurdan. Las membranas se incubaron con un primer esteroide (HC, 11-OH-P, o cort) hasta la concentración de saturación (600 μM). Luego se realizó una segunda incubación en presencia del mismo esteroide o de otro (300 μM) llegando a una concentración final de 900 μM . La barra control corresponde a membranas únicamente incubadas con el solvente vehículo, utilizado para solubilizar los esteroides (es decir, condición de máxima FRET entre la fluorescencia intrínseca y las moléculas de Laurdan). Cada valor corresponde al promedio de al menos a seis experimentos diferentes. No hay diferencias estadísticas entre las distintas condiciones experimentales.

3. Los sitios de unión de esteroides también son compartidos por ácidos grasos libres.

Se ha observado que diferentes esteroides y ácidos grasos libres ocasionan efectos similares de inhibición de la funcionalidad del AChR (inhibición no competitiva de baja afinidad, ver Introducción). Dado que ambos tipos de moléculas son altamente hidrofóbicas, se consideró la posibilidad de que el sitio de acción de las mismas sea común a ambas. Para estudiar esta hipótesis, membranas ricas en AChR de *T. californica* fueron incubadas primero a concentraciones crecientes de ácido araquidónico (AA) (Figura. 8). La curva dosis-respuesta obtenida fue ajustada a una curva sigmoidea, al igual que lo realizado en estudios con esteroides, obteniéndose un valor de DC_{50} de 8,1 μM . El análisis de la misma indicó que el sistema alcanza la saturación a una concentración de 20 μM .

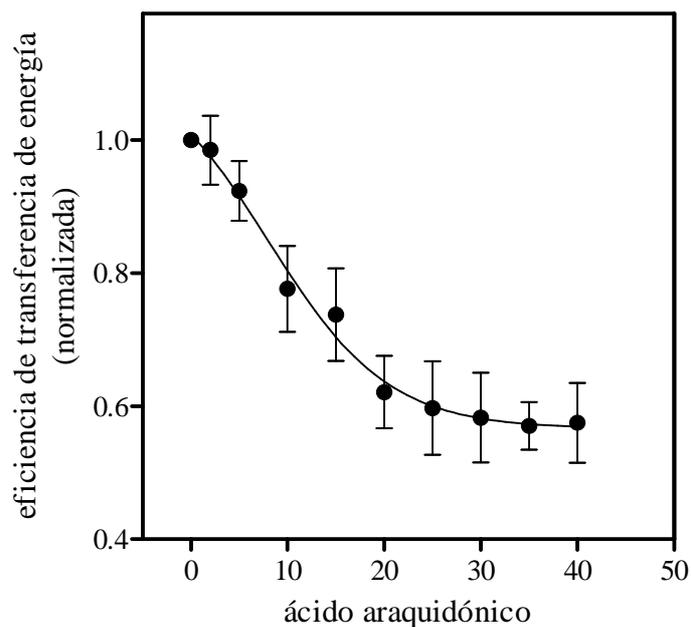


Figura 8. Cambios en la eficiencia de FRET normalizada entre la fluorescencia intrínseca de membranas ricas en AChR de *T. californica* y la sonda Laurdan luego del agregado de cantidades crecientes ácido araquidónico. Los valores de E obtenidos en presencia de ácido graso fueron normalizados con respecto al correspondiente valor en su ausencia (100%). Los datos fueron analizados mediante una curva sigmoidea. Cada punto corresponde al promedio de seis o más experimentos diferentes.

Para el estudio de la disminución de la E observada a concentraciones crecientes de AA agregado fue usado el mismo formalismo aplicado para los esteroides, calculándose el parámetro de unión y utilizando la ecuación de Hill (Fig. 9). Se obtuvo un valor de coeficiente de Hill de 2,2. La similitud en el perfil de los resultados obtenidos con AA y los tres esteroides indicaría que ambos tipos de moléculas se unirían a sitios similares en la interfase lípido-AChR.

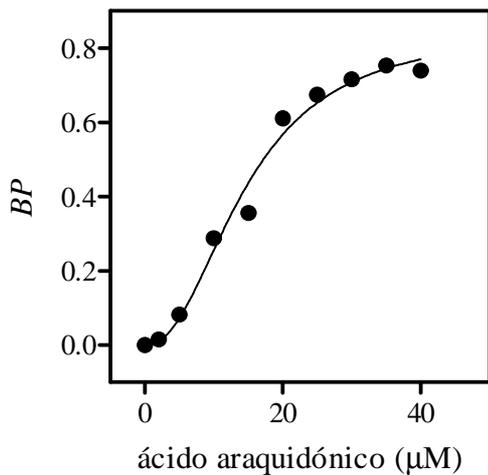


Figura 9. Cambios en el BP de AA en membranas ricas de AChR de *T. californica*. Los valores fueron analizados mediante la ecuación de Hill. Cada punto corresponde al promedio de seis o más experimentos

Con la finalidad de comprobar si estos sitios son los mismos en los que se localizan los distintos esteroides, se realizaron experimentos de competencia entre estos dos tipos de moléculas altamente hidrofóbicas. Se agregaron concentraciones crecientes de esteroide (en este caso se utilizó HC como la molécula representativa de los esteroides) o ácido graso (AA) a membranas ricas en AChR de *T. californica* hasta llegar a la concentración de saturación (600 μM para el esteroide y 20 μM para el ácido graso). Luego se agregaron cantidades crecientes del segundo tipo de molécula altamente hidrofóbica. Independientemente del orden de agregado de las moléculas, el valor final de E fue el mismo, es decir, los efectos ocasionados por una y otra molécula no fueron aditivos (Fig. 10).

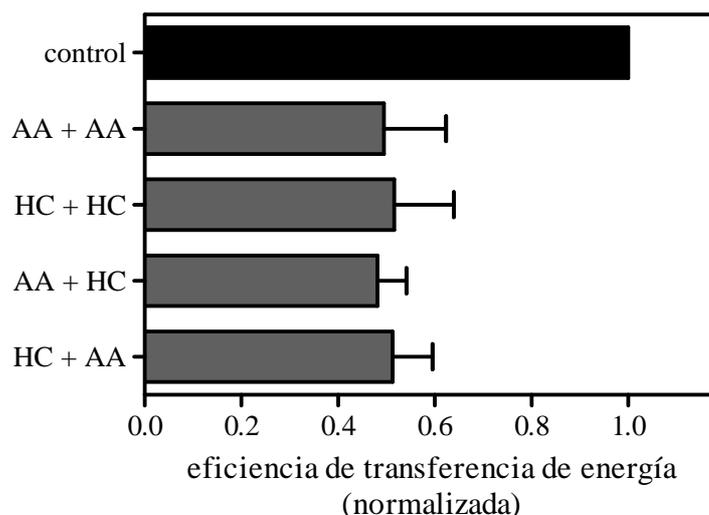


Figura 10. Membranas ricas en AChR en presencia de Laudan (0.6 μM) fueron inicialmente incubadas con AA o HC hasta llegar a la concentración de saturación (20 μM o 600 μM , respectivamente). Posteriores agregados de AA o HC fueron realizados en las distintas combinaciones: AA + AA (+ 20 μM); HC + HC (+300 μM); AA + HC (+300 μM) y HC + AA (+20 μM). La barra control corresponde a membranas en presencia de Laurdan, incubadas únicamente con el solvente transportador. Cada barra corresponde al promedio de al menos seis experimentos independientes.

4. Estudio de la topología de los sitios para esteroides y ácidos grasos en membranas ricas en AChR.

Con el objetivo de profundizar en la localización de los sitios comunes de unión de esteroides y ácidos grasos en membranas ricas en AChR, se realizaron hidrólisis enzimáticas controladas de estas membranas utilizando la enzima proteinasa K. La proteinasa K es hidrosoluble, por lo tanto, sólo puede digerir las porciones del AChR expuestas al ambiente extra-membrana mientras que las porciones hidrofóbicas del receptor (segmentos transmembrana) y la porción citoplasmática quedan protegidas de su acción proteolítica. Hucho et al. (1996) caracterizaron esta metodología siendo en la actualidad ampliamente

utilizada para generar membranas con distintos grados de digestión de la porción extracelular del AChR.

La finalidad de este estudio fue determinar si los distintos esteroides y ácidos grasos interaccionan con el AChR a nivel de la región transmembrana, descartando la posibilidad de que sitios extracelulares del receptor estén involucrados en la interacción con esteroides y ácidos grasos libres.

De acuerdo con el porcentaje remanente de proteína obtenido luego de la digestión con proteinasa K, las preparaciones de membrana fueron agrupadas en distintos grupos: 100% (control), 80-60%, 60-40%, 40-30%, y menor a 30%. Además, la cantidad de segmentos transmembrana (TM) por molécula de Laurdan, es decir, el número de posibles sitios de interacción, se mantuvo constante en todos los casos (ver Materiales y Métodos). Esta clasificación se realizó por comparación con una preparación de membranas ricas en AChR que fue sometida a todos los pasos del protocolo pero que no fue expuesta a la proteinasa K (100%, control).

El AChR de *T. californica* posee 51 residuos de triptófano, de los cuales 31 se encuentran en la región extracelular, 19 en la región citoplasmática y sólo uno en la región TM, en la subunidad γ (Trp⁴⁵⁸), siendo este último el que participa más activamente del proceso de FRET (Chattopadhyay & McNamee, 1991; Antollini & Barrantes, 1996; Barrantes et al., 2000b). De esta manera, aunque se perderían Trp extracelulares durante la digestión, el proceso de FRET entre la fluorescencia intrínseca de las membranas ricas en AChR y la molécula Laurdan se mantendría prácticamente igual si estos sitios estuvieran a nivel TM. Efectivamente, hasta una digestión de ~70% no se observaron cambios en el patrón de disminución de la *E* por presencia de AGL o esteroides con respecto a las membranas control. Las membranas con un porcentaje de proteína remanente menor al 30% no mostraron

un proceso de FRET, posiblemente debido a que las porciones TM de la proteína se encontrasen desorganizadas como consecuencia de lo extensivo del proceso de digestión del AChR. Este resultado es consistente con la información que afirma que un 75% de la masa del AChR es extracelular.

El esteroide HC fue agregado a los distintos grupos de membranas con diferente porcentaje de digestión proteica y la E fue determinada en cada caso. La Figura 11 muestra los valores obtenidos de E en presencia de HC a dos concentraciones, 600 μM y 900 μM . Se pudo observar que el valor de la E fue similar para todas las muestras de membrana digeridas, sin encontrarse diferencias significativas entre ellas.

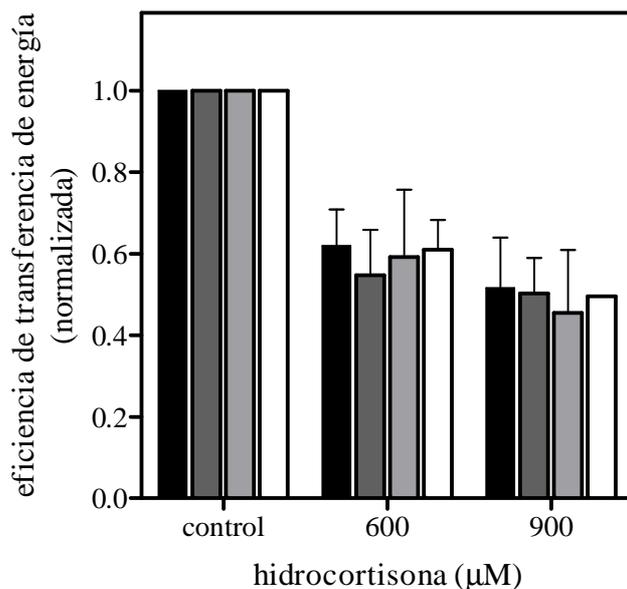


Figura 11. Eficiencia de transferencia de energía entre membranas de *T. californica* sometidas a distintos grados de proteólisis controlada con proteinasa K y la sonda Laurdan, en presencia del esteroide HC. Membranas con distintos grados de hidrólisis: 0% (barras negras), 20-40% (barras grises), 40-60% (barras gris claro) y 70% (barras blancas), en presencia de Laurdan, fueron incubadas a distintas concentraciones del esteroide hidrocortisona (600 μM y 900 μM). La barra control corresponde a membranas incubadas únicamente con el solvente utilizado para solubilizar a la HC. Cada barra corresponde al menos a cuatro experimentos independientes. No hay diferencias estadísticamente significativas.

De manera similar, se realizaron estudios con el ácido graso AA a concentraciones de 20 μM y 35 μM . Al igual que los resultados obtenidos con HC, los valores de E obtenidos con AA no mostraron diferencias significativas entre las distintas condiciones de membrana (Figura 12).

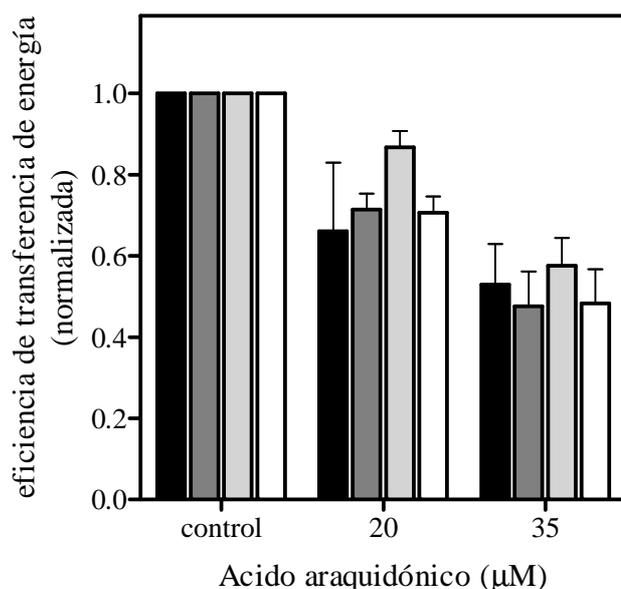


Figura 12. Eficiencia de la transferencia de energía entre membranas de *T. californica* sometidas a distintos grados de proteólisis controlada con proteinasa K y la sonda Laurdan en presencia de esteroides. Membranas con distintos grados de hidrólisis, 0% (barras negras), 20-40% (barras grises), 40-60% (barras gris claro) y 70% (barras blancas), en presencia de Laurdan, fueron incubadas a distintas concentraciones del ácido araquidónico (AA) (20 μM y 35 μM). La barra control corresponde a membranas incubadas únicamente con el solvente utilizado para solubilizar al AA. Cada barra corresponde al menos a cuatro experimentos independientes. No hay diferencias estadísticamente significativas.

Esta serie de experimentos indica que mientras se mantenga la integridad de los segmentos TM, independientemente del grado de conservación de la porción extra-membrana, se conservan los sitios de interacción para esteroides y ácidos grasos.

Al igual que lo observado en membranas controles, se mantuvo la similitud entre los efectos ocasionados por la presencia de esteroides o de ácidos grasos luego de ser digerida gran parte de la porción extracelular del AChR. *A posteriori* se estudió si dicho resultado se debe a que ambas moléculas tienen una localización común a nivel TM.

Con tal finalidad, se realizaron estudios de competencia similares a los de la Figura 10 con muestras de membranas digeridas con proteinasa K (80-60% y 60-40% de proteína remanente). Los valores de *E* obtenidos con el agregado de 600 μM HC o de 20 μM de AA no mostraron diferencias significativas entre ellos ni con los valores de *E* obtenidos luego del agregado de 600 μM HC más 10 μM de AA (o más 200 μM de HC) (Figura 13). En consecuencia, estos resultados confirman que la naturaleza de los sitios de interacción se conserva aun a alto grado de hidrólisis de la porción extracelular del receptor, manteniendo las características de su estado nativo y que éstos serían similares para ambas familias de lípidos.

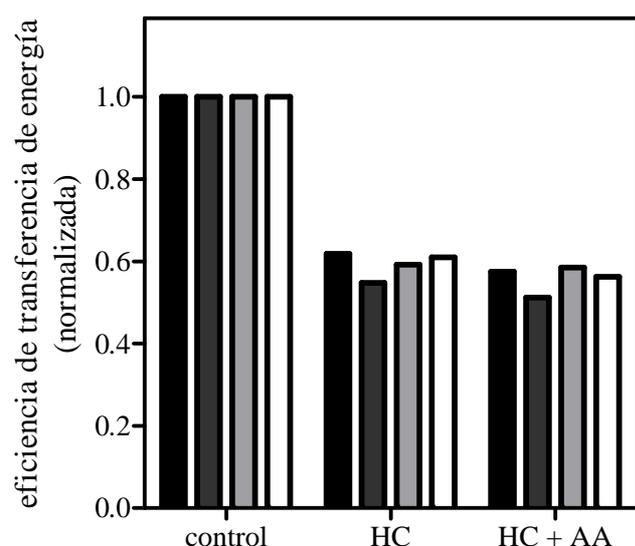


Figura 13. Eficiencia de transferencia de energía entre membranas de *T. californica* sometidas a distintos grados de proteólisis controlada con proteinasa K y la sonda Laurdan. Membranas con distintos grados de hidrólisis, 0% (barras negras), 20-40% (barras grises), 40-60% (barras gris claro) y 70% (barras blancas), en presencia de Laurdan, fueron incubadas inicialmente con el esteroide hidrocortisona (HC) hasta alcanzar la concentración de saturación (600 μM). Luego se le agregaron 10 μM de ácido. La barra control corresponde a membranas incubadas únicamente con el solvente utilizado para solubilizar al AA o HC.

5. Sitios para ácidos grasos libres generados endógenamente en membranas ricas en AChR.

Con la intención de comprender mejor las características de los sitios para esteroides y AGL a nivel TM, se procedió a estudiar la topología de estos potenciales sitios de interacción de los AGL con el AChR, tratando a las membranas con PLA₂ a distintos tiempos. Esta enzima hidroliza fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, liberando AGL del segundo carbono del esqueleto de glicerol y produciendo lisofosfatidilcolina. El proceso de digestión de la membrana fue seguido mediante TLC y los productos fueron visualizados luego de la carbonización de la placa (ver TLC en Materiales y Métodos).

Las membranas hidrolizadas con la PLA₂ fueron incubadas con la molécula de Laurdan con la finalidad de observar si se producía una alteración en la eficiencia de FRET en función de la producción de ácidos grasos *in situ*. En este sentido, si los AGL generados endógenamente se localizan en la interfase lípido-proteína, cuando se agregan las moléculas de Laurdan, posteriormente a la acción de PLA₂, tienen que competir con estos AGL endógenos, obteniéndose así un valor de *E* menor con respecto al control. La Figura 14a muestra que la *E* inicial disminuye a partir de un minuto de hidrólisis, obteniéndose una disminución del 25% a los 5 minutos, y del 27% a los 20 min de digestión. Esta disminución de la eficiencia de FRET en función del tiempo de tratamiento con PLA₂, o indirectamente, en función de la producción de AGL endógenos, estaría indicando que los ácidos grasos libres impiden, en parte, el acceso de moléculas de Laurdan a la interfase lípido-AChR. El hecho de que ácidos grasos generados *in situ* compitan con las moléculas de Laurdan de un modo similar a lo observado con ácidos grasos exógenos confirma la presencia de sitios para AGL a nivel TM, localizándose en la interfase lípido-proteína.

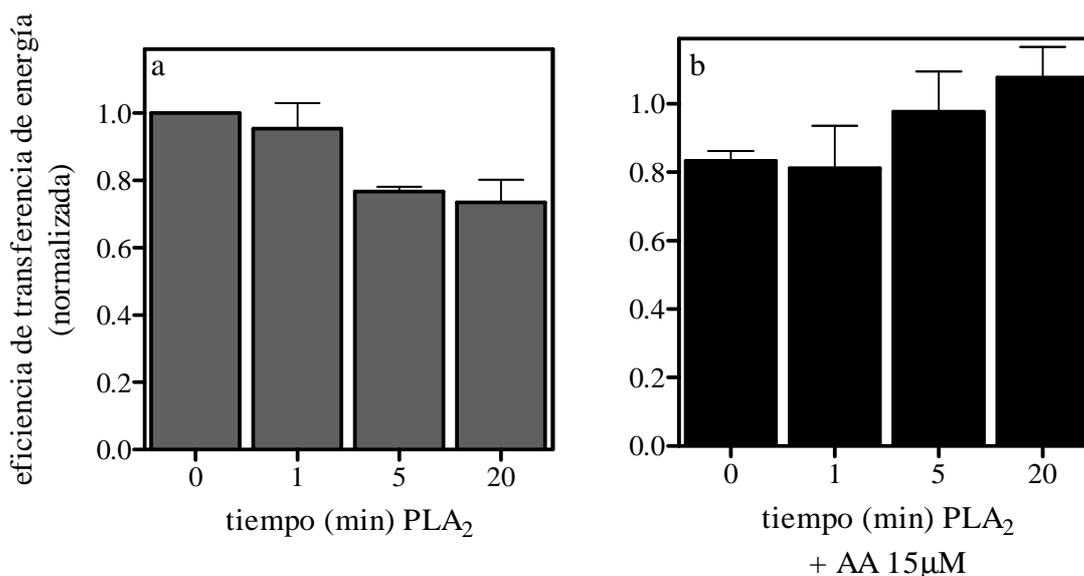


Figura 14. Efecto de la fosfolipasa A₂ en la eficiencia de transferencia de energía entre membranas ricas en AChR y la sonda Laurdan. a) cambios en la eficiencia transferencia de energía en función del tiempo de hidrólisis de fosfolípidos por acción de la PLA₂. A tiempo cero se obtiene un valor de $E = 0,28 \pm 0,02$. Valores de E obtenidos a distintos tiempos de acción de la PLA₂ fueron normalizados respecto al E en tiempo cero. b) Cambio en la eficiencia de transferencia de energía en membranas ricas en AChR pre-incubadas con PLA₂ a distintos tiempos, en presencia de Laurdan, incubadas con 15 μM de AA. Los valores de E obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis fueron normalizados con respecto al valor E en ausencia de AA. Cada barra corresponde al promedio de al menos cuatro experimentos independientes.

Se realizaron experimentos adicionales con la finalidad de determinar si los AGL endógenos y exógenos comparten los mismos sitios en la interfase lípido-proteína. Para ello, se incubaron membranas tratadas con PLA₂ a distintos tiempos con 15 μM de AA y luego se midió la eficiencia de FRET (Figura 14b). Es decir, se diseñó un experimento con la intención de poder evidenciar si existía competencia entre los dos tipos de AGL por sus sitios de interacción a nivel TM. Los resultados obtenidos indican que mientras una adición de AA a las muestras control (sometidas a todos los procedimientos de preparación de muestra pero en ausencia de PLA₂) produce una disminución de la E (resultado semejante al presentado en la Figura 8), cuando el tiempo de exposición a PLA₂ aumenta, la magnitud de disminución

causada por la adición de AGL exógenos disminuye, a tal punto que a los 20 minutos de exposición el agregado de AGL exógenos no produce una disminución adicional de la E . Dichos resultados se explicarían considerando que a tiempos cortos de acción de la PLA_2 , los AGL generados *in situ* no alcanzan a saturar los sitios y por tanto, tampoco logran un máximo desplazamiento de la sonda Laurdan del micro-entorno lipídico del AChR. Así, la saturación de estos sitios con el máximo desplazamiento de la sonda aceptora de fluorescencia y la mínima E recién se logra cuando posteriormente se agregan AGL exógenos. Sin embargo, a medida que el tiempo de reacción aumenta, queda liberada más cantidad de AGL endógenos y consiguientemente llegan a saturar los sitios en la interfase lípido-proteína ocasionando la máxima disminución posible del parámetro E . En consecuencia, un posterior agregado de los AGL exógenos, al localizarse en los mismos sitios y si bien desplazan efectivamente algún AGL endógeno de su sitio, no producen una variación en el efecto medido.

6. La disponibilidad de los sitios de interacción con moléculas hidrofóbicas se modifica en el estado desensibilizado.

Según se indicara en la Introducción de esta Tesis, el AChR en la membrana se encuentra en un equilibrio dinámico entre distintas conformaciones, estando su permanencia en uno u otro estado condicionada principalmente a la presencia de agonista. Por lo tanto, por exposición prolongada a agonista, el AChR pasa del estado R (activo) al estado D (inactivo), situación fisiológica normal en una sinapsis química en la que se produce una descarga masiva de acetilcolina proveniente del terminal axónico (ver Introducción) hacia la membrana post-sináptica. Los estudios mostrados hasta aquí corresponden a la existencia de sitios para AGL y esteroides en la interfase lípido-proteína, estando el AChR en estado R. A continuación se estudió si la interacción entre los AGL, o esteroides, con el

AChR se veía modificada al pasar del AChR al estado D. Por tal razón, se evaluó el efecto ejercido por el agregado de esteroides y AGL a membranas en presencia de 1 mM de carbamilcolina donde el AChR está mayoritariamente en estado D. Se observó una disminución de la E similar en ambos casos (Figura 15), pero menor y distinta a la obtenida en membranas con el AChR en estado R (Figura 15). En este caso, el efecto de esteroides y ácidos grasos libres no puede ser descripto por una curva sigmoidea, como la que se obtuvo cuando el agregado se realizó en membranas ricas en AChR de *T. californica* con el AChR en estado R, sino por una recta de pendiente suave (Figura 15).

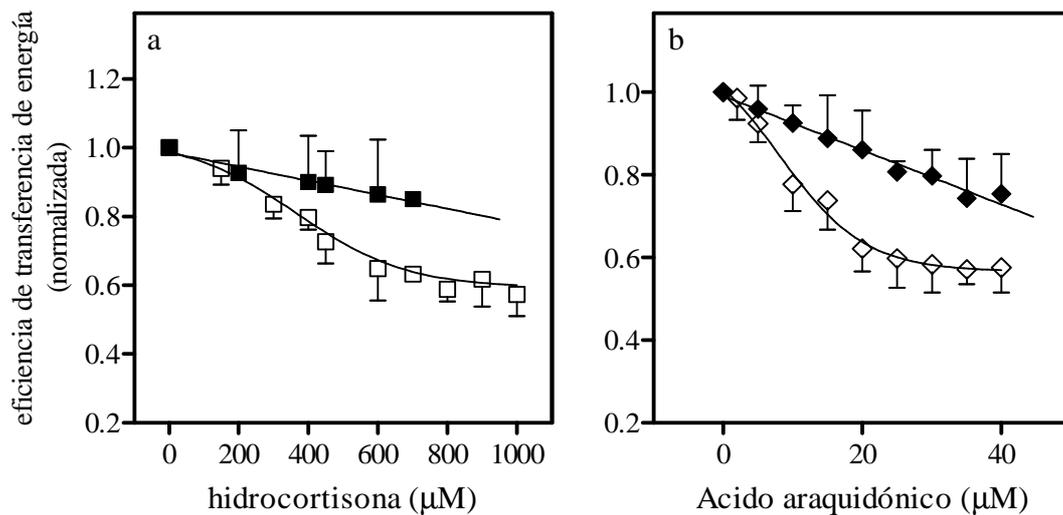


Figura 15. Eficiencia de transferencia de energía entre membranas ricas en AChR y la sonda Laurdan, en membranas ricas en AChR con el receptor en el estado conformacional de reposo (símbolo blanco) o en el estado desensibilizado (símbolo negro). Se llegó al estado desensibilizado del AChR incubando las membranas con carbamilcolina (1 mM) previo a las mediciones de fluorescencia. La Figura muestra los cambios de E membranas ricas en AChR de *T. californica* por agregado de a) hidrocortisona o b) ácido araquidónico. Cada punto corresponde al promedio de al menos ocho experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que según el estado conformacional del AChR, los sitios para los AGL y esteroides no son igualmente accesibles, quedando mucho más expuestos en

el estado R. Por otro lado, también indicarían que los estados conformacionales del AChR (estado R y estado D) están acoplados a cambios conformacionales globales de la proteína que afectan también las regiones de interacción lípido-AChR. Finalmente, estos resultados demuestran una alta sensibilidad de los ensayos de FRET con la sonda Laurdan para discriminar entre ambos estados conformacionales del AChR.

DISCUSIÓN

Estudios previos realizados en otros laboratorios y el nuestro han demostrado que esteroides estructuralmente distintos y ácidos grasos libres con diferente grado de insaturación y de longitud de cadena, actúan como NCI del AChR (Andreasen & McNamee, 1980; Valera et al., 1992; Bouzat & Barrantes, 1993 a,b; 1996; Garbus et al., 2001; Garbus et al., 2002; Nurowaska & Ruzzier, 2002). De las muchas hipótesis posibles que intentan explicar su mecanismo de acción, la más factible parece ser aquella que sugiere la inducción alostérica del AChR, por acción de las moléculas hidrofóbicas, hacia una conformación imposibilitada de conducir iones.

En esta primera parte del trabajo de Tesis se ha estudiado la interacción de esteroides o AGL con las membranas nativas de *T. californica* ricas en AChR. Para esto se determinó la eficiencia de la transferencia de energía entre la fluorescencia intrínseca de la membrana y la sonda fluorescente Laurdan por el proceso de FRET.

Trabajos de nuestro laboratorio (Antollini et al., 1996) han caracterizado al par triptófano-Laurdan como una “buena” pareja donante-aceptor en el proceso de FRET. Para dicho par, se determinó una distancia de Förster de $31 \pm 1 \text{ \AA}$, y una distancia mínima entre el donante y la sonda aceptora de $14 \pm 1 \text{ \AA}$, la cual corresponde al diámetro de la primera capa de lípidos asociados al receptor, denominados lípidos anulares o lípidos "fronterizos" (Barrantes, 2003, 2004). Utilizando la eficiencia de FRET entre la fluorescencia intrínseca de la proteína y la molécula de Laurdan se describió la presencia de sitios de interacción para moléculas de colesterol (sitios no-anulares) y otros para fosfolípidos (sitios anulares) en membranas nativas de *T. californica* ricas en AChR (Antollini & Barrantes, 1998), pudiendo localizarse las moléculas de AGL en ambos sitios. Posteriormente se demostró que la accesibilidad de los AGL a ambos sitios no está relacionada con la estructura de los mismos,

ya sea por el número de átomos de carbono o por el grado de insaturación (Antollini & Barrantes, 2002).

Los tres esteroides utilizados en el presente trabajo fueron seleccionados de una amplia serie de esteroides estudiados por electrofisiología en nuestro laboratorio (Garbus et al., 2001) por mostrar un alto poder de inhibición de la función del AChR. El agregado de cantidades crecientes de esteroides a las membranas nativas provocaron una disminución de la *E*, la cual se ajustó a una curva sigmoidea, indicando una competencia directa entre la sonda Laurdan y las moléculas de esteroide (Figura 5). Realizando un análisis más profundo, se determinó la existencia de más de un sitio común en el AChR (Figura 6). Los estudios de competencia entre dos esteroides distintos indicaron que a pesar de sus diferencias estructurales, los tres tipos de esteroides ensayados comparten los mismos sitios de interacción en la interfase lípido-AChR, ya que el agregado de un segundo esteroide a membranas saturadas con un primer esteroide no provocó una nueva disminución de la *E* (Figura 7). En este sentido, experimentos similares realizados con el ácido graso araquidónico y el esteroide hidrocortisona indicaron que ambos tipos de moléculas, estructuralmente diferentes, también comparten sitios semejantes en la interfase AChR-lípido (Figura 10).

Con la finalidad de avanzar en el conocimiento de la topografía de estos sitios, las membranas nativas de *T. californica* ricas en AChR fueron tratadas con la proteinasa K. Esta proteasa hidrosoluble hidroliza uniones peptídicas de manera no específica, accediendo, en este sistema, únicamente a las porciones extracelulares del AChR (Görne-Tschelnokow et al., 1994; Dreger et al., 1997; Méthot et al., 2001). Se estudió el proceso de FRET en membranas sometidas a distintos grados de digestión, en presencia de esteroides o de AGL (Figuras 11 y 12). Los resultados obtenidos indican que hasta una digestión del 70%, los valores de variación de la *E* fueron similares a los obtenidos con membranas control (sin hidrolizar). Teniendo en cuenta que el AChR es una proteína de membrana con un gran dominio

extracelular, un 70% de digestión indicaría una hidrólisis extracelular casi completa, consistente con datos que indican que la masa del AChR localizada por fuera de la membrana sería de 70-75% respecto del total (Görne-Tschelnokow et al., 1994; Dreger et al., 1997; Méthot et al., 2001). La observación según la cual los sitios para esteroides y AGL se conservan en el AChR, aun en membranas con una digestión exhaustiva (del 70%), sugiere una localización de los mismos en la región TM que aún conservaría su forma intacta. Esto está avalado por datos de crio-microscopía electrónica (Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005) de acuerdo con los cuales los 20 segmentos TM del AChR (4 por cada subunidad) están dispuestos en tres anillos concéntricos y estabilizados principalmente por interacciones proteína-proteína y proteína-lípidos (Barrantes, 2003; Xu et al., 2005). Estos resultados descartan la posibilidad de la existencia de sitios para esteroides o AGL en regiones extracelulares de la proteína que mediante un mecanismo alostérico ocasionen el desplazamiento de las moléculas de Laurdan de la interfase lípido-AChR.

En las células ocurre una constante producción de AGL endógenos, atribuyéndose distintos roles a dicho fenómeno. Más aun, bajo ciertas condiciones patológicas, y particularmente en neuronas, la cantidad de AGL endógeno puede aumentar drásticamente, hecho que puede interpretarse como un mecanismo de neuroprotección (Lauritzen et al., 2000; Blondeau et al., 2002; Buckler & Honore, 2005), aunque no se ha logrado una explicación consensuada del modo de acción de los mismos sobre los distintos canales iónicos afectados (Ordway et al., 1991; Petrou et al., 1995). Los experimentos realizados con membranas nativas de *T. californica* previamente incubadas con PLA₂ demuestran que los AGL generados endógenamente se localizarían en sitios de interacción en la interfase lípido-proteína, al igual que los AGL agregados exógenamente (Figura 14). Cuando las membranas fueron previamente tratadas con PLA₂, las moléculas de Laurdan experimentaron un impedimento para localizarse en dichos sitios. Además, los AGL exógenos compitieron en

forma efectiva con los AGL generados endógenamente por estos mismos sitios, dando así mayor sustento a la presencia de sitios para AGL en la región TM del AChR. Estos resultados contribuyen a describir el mecanismo de modulación ejercido por los AGL sobre el AChR u otros canales iónicos.

Dos sitios distintos han sido descritos en la interfase lípido-proteína del AChR (como así también en la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPasa) en sistemas modelos, a saber, los sitios anulares y los sitios no-anulares. Los sitios no-anulares comprenderían espacios entre las hélices α TM de las subunidades y también entre las distintas subunidades de proteínas multiméricas (Lee, 2004). Se ha observado que los lípidos no-anulares muestran una alta interacción con proteínas, siendo esenciales para su correcta función (actualmente se los denominan co-factores lipídicos). La tasa de intercambio entre los lípidos no-anulares y el resto de los lípidos de la membrana no ha podido ser determinada, pero se supone que es relativamente baja, mucho menor a la observada para el intercambio entre los lípidos anulares y los del resto de la membrana, como resultado de la alta especificidad de interacción entre los lípidos no-anulares y la proteína (Lee, 2004). Por otro lado, las moléculas lipídicas en los sitios anulares parecerían interactuar con proteínas de una forma menos específica (Lee, 2004), siendo en el caso particular del AChR alta la tasa de intercambio lipídico entre la capa anular y el resto de lípidos de la membrana (Marsh y Barrantes, 1978; Ellena et al., 1983; Mantipragada et al., 2003). Considerando la diferente estabilidad de las moléculas lipídicas por ambos tipos de sitios, se infiere que en equilibrio, la localización de AGL y esteroides en los sitios no-anulares se reflejaría en la fase inicial del decaimiento de la E , tal como se observa en la Figura 5 para el caso de los esteroides, y en la Figura 8 para el caso de AGL. El decaimiento lineal final de la E podría reflejar así la difusión y dilución lenta de estas moléculas lipídicas exógenas entre la zona de lípidos anulares y el resto de los lípidos de la membrana (Figura 15 a y b). Resultados previos de nuestro laboratorio también sustentan esta

observación (Antollini & Barrantes, 1998) ya que la presencia de cantidades crecientes de PC, lípido anular, produce un pequeño decaimiento lineal de la E , mientras que un lípido no-anular como el colesterol causa una marcada disminución inicial de la E y luego, con la subsecuente saturación del sistema, una leve disminución lineal.

Los resultados presentados en este primer capítulo de Tesis contribuyen a una visión más detallada de la interfase lípido-AChR, poniendo particular atención en los sitios de localización de distintas moléculas lipídicas. A partir de estos resultados, se puede expandir el concepto original de la existencia de dos clases distintas de sitios para el colesterol y los fosfolípidos, ambos accesibles a los ácidos grasos (Antollini & Barrantes, 1998), para incluir la idea de que distintos esteroides, estructuralmente diferentes, también pueden acceder a los mismos. Este nuevo concepto diferencia la localización del colesterol y de los esteroides, que aunque son moléculas estructuralmente relacionadas, son funcionalmente distintas. La apertura del canal, inducida por la unión de dos moléculas de agonista, necesariamente requiere de la presencia de colesterol (Criado et al., 1982; Baenziger et al., 2000; daCosta et al., 2002), mientras que los esteroides se comportan como NCI del receptor. A su vez, las moléculas de colesterol y los esteroides poseen distintas afinidades por el AChR (Barrantes, 2004). Más aun, en sistemas modelo se ha demostrado que, mientras la mayor parte de los esteroides son destabilizadores de dominios lipídicos, las moléculas de colesterol y 25-hidroxi-colesterol promueven la formación de dichos dominios (Wenz & Barrantes, 2003). La principal diferencia estructural entre estas dos clases de moléculas se encuentra a nivel de la cadena lateral de seis carbonos. Dicha diferencia estructural podría estar involucrada en la capacidad de los esteroides de acceder a ambos tipos de sitios en la interfase lípido-proteína (sitios anulares y no-anulares), mientras que el colesterol sólo se localiza en uno (sitios no-anulares). Esta conclusión estaría respaldada en resultados obtenidos mediante la técnica cinética de "*stopped-flow*" utilizando detección de fluorescencia, que indican que tanto

moléculas de colesterol como análogos estructurales se localizan en la interfase lípido-proteína (Addona et al., 1998).

Un resultado importante y atractivo es la relación entre la presencia de estos sitios y el estado conformacional del receptor. Cuando el AChR en estado R en membranas de *Torpedo* fue dirigido hacia el estado D, su relación con los lípidos de la interfase cambió (Figura 15 a y b). En estado D, la disminución de la *E* por el agregado de lípidos exógenos fue leve, lineal y monótona; mientras que en estado R, la *E* disminuyó en forma drástica, ajustándose a una curva sigmoidea. Si se asume que el primer decaimiento de la *E* obtenido con el receptor en estado R corresponde al desplazamiento de la sonda Laurdan de los sitios no-anulares, la ausencia de este decaimiento cuando el AChR está en estado D sugeriría que los sitios no-anulares de la interfase lípido-AChR ya no están disponibles para estos lípidos. Por lo tanto, cuando el AChR se encuentra en estado D, las moléculas exógenas sólo pueden localizarse en los sitios anulares del AChR, desplazando a las moléculas de Laurdan de estos sitios, pero el rápido intercambio de la sonda fluorescente entre los lípidos anulares y los lípidos del resto de la membrana evita un decaimiento sustancial de la *E*. La explicación más sencilla para la diferencia del perfil de desplazamiento de la sonda Laurdan por parte de los esteroides y los AGL de la interfase lípido-proteína entre ambos estados conformacionales del AChR estaría basada en una disminución de la eficiencia por parte de estos lípidos exógenos para localizarse en dichos sitios. Esto podría explicarse pensando en que en el estado D, los sitios no-anulares ya no se encuentran tan expuestos al resto de la membrana y por tanto se dificulta la llegada a los mismos, principalmente considerando la información estructural del AChR a 4Å de resolución, donde los sitios no-anulares podrían corresponder a hendiduras entre los segmentos TM (Unwin, 2003). Así, una consecuencia de la transición conformacional del estado R al estado D del AChR podría ser el re-arreglo de la región TM, generando una oclusión total o parcial de los sitios no-anulares en la interfase lípido-proteína, o simplemente

cambiando la topología de la región TM del AChR de tal manera que disminuye la eficiencia de los lípidos para acceder a dichos sitios.

En la Introducción se detalló la íntima relación existente entre los lípidos de la membrana y la función del AChR. Se observó que dicha función está afectada tanto por cambios en la composición lipídica de la membrana (Baenziger et al., 2000; Criado et al., 1984; Sunshine & McNamee, 1994) como por la presencia de lípidos y moléculas hidrofóbicas exógenas (Valera et al., 1992; Bouzat & Barrantes, 1993a, b; Garbus et al., 2001; Nurowaska & Ruzzier, 2002). Además, mutaciones en el segmento M4 del AChR también han demostrado tener capacidad para modular la funcionalidad del AChR (Lee et al., 1994; Lasalde et al., 1996; Ortiz-Miranda et al., 1997; Bouzat et al., 1998; Tamamizu et al., 1999, 2000). Los estudios presentados en el capítulo I de este trabajo de Tesis evidencian que ciertas moléculas lipídicas endógenas, como también aquellas exógenas con alta hidrofobicidad, pueden entrar en íntimo contacto con los segmentos TM del AChR, dominios proteicos alejados tanto del sitio de unión al agonista como del poro del canal, sugiriendo que tal región TM podría participar en la modulación de la función del AChR. En este sentido, los segmentos M4 de las subunidades del AChR funcionarían como un dispositivo sensible al micro-ambiente lipídico del AChR, liberando una señal a los segmentos M2 que conforman el canal iónico. Esta señal podría ser iniciada por la inducción de cambios en la topografía del anillo externo (M4 de todas las subunidades) y por último, causando un cambio conformacional en todo el receptor (Xu et al., 2005). Se propone entonces que los esteroides y los AGL inducen o contribuyen a este fenómeno, al perturbar sitios no-anulares. Este mecanismo difiere del ejercido por otro grupo de NCI, bloqueadores de canal, que no inducen cambios conformacionales en el AChR. El siguiente capítulo de esta Tesis se focaliza en el estudio de los posibles cambios conformacionales del AChR inducidos por estas moléculas.

CAPITULO II

Con la intención de avanzar en el estudio de la relación entre los lípidos de la membrana y el AChR, centrándonos en la interrelación del AChR con su micro-entorno lipídico, y con las posibles alteraciones de la correcta comunicación lípido-proteína ocasionada por la presencia de moléculas exógenas en dicho micro-entorno (capítulo I), estudiamos los estados conformacionales del AChR y los efectos mediados sobre su función por moléculas inhibitorias.

RESULTADOS

Se discriminó entre los estados conformacionales R y D del AChR mediante el uso de la sonda fluorescente cristal violeta (CrV). Lurtz & Pedersen (1999) demostraron que dicha sonda muestra una mayor afinidad por el estado conformacional D del AChR respecto al estado conformacional R. También cuantificaron los sitios de unión de CrV por molécula de AChR, determinando que la estequiometría de unión es de 1:1. Una característica muy interesante de esta sonda es que evidencia un aumento en la emisión de fluorescencia (200 veces) cuando se encuentra unida a proteínas. Este aumento se debe a que cuando se encuentra en un ambiente acuoso, la sonda sufre un proceso de des-excitación debido a una rotación concertada de los tres anillos arilo (Duxbury, 1993). La unión al AChR evitaría dicha rotación, impidiendo este mecanismo de des-excitación, resultando así en un aumento en la emisión de fluorescencia. Mediante estudios de dinámica molecular utilizando AChR de *Torpedo marmorata* (PDB ID: 2BG9) en estado de reposo (Unwin, 2005), Arias et al. (2006) determinaron que dos de los tres grupos amino que posee la sonda CrV entran en contacto con residuos $\alpha 1\text{-Glu}^{262}$ localizados en el anillo extracelular (posición 20') del poro iónico. El

tercer grupo amino se encuentra hidratado por moléculas de agua. Además, se determinó que la unión de la sonda es insensible a cambios de temperatura (Arias et al., 2006).

1- Caracterización de los estados conformacionales del AChR de membranas.

Primeramente se estudió si el estado inicial R y final D del equilibrio conformacional del AChR podían ser resueltos por titulación con la sonda CrV en membranas ricas en AChR de *Torpedo californica*. Las curvas que se obtuvieron relacionando la intensidad máxima de emisión de fluorescencia de la sonda ($\lambda_{em} = 623-625$ nm) en función de la concentración de CrV presentaron marcadas diferencias entre las muestras en presencia y ausencia de agonista (Figura 16).

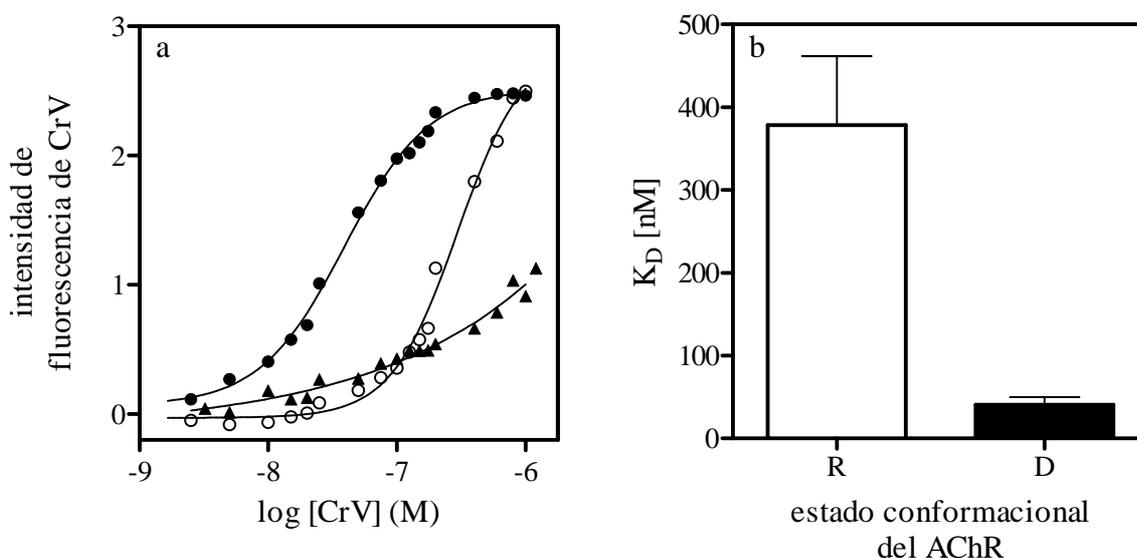
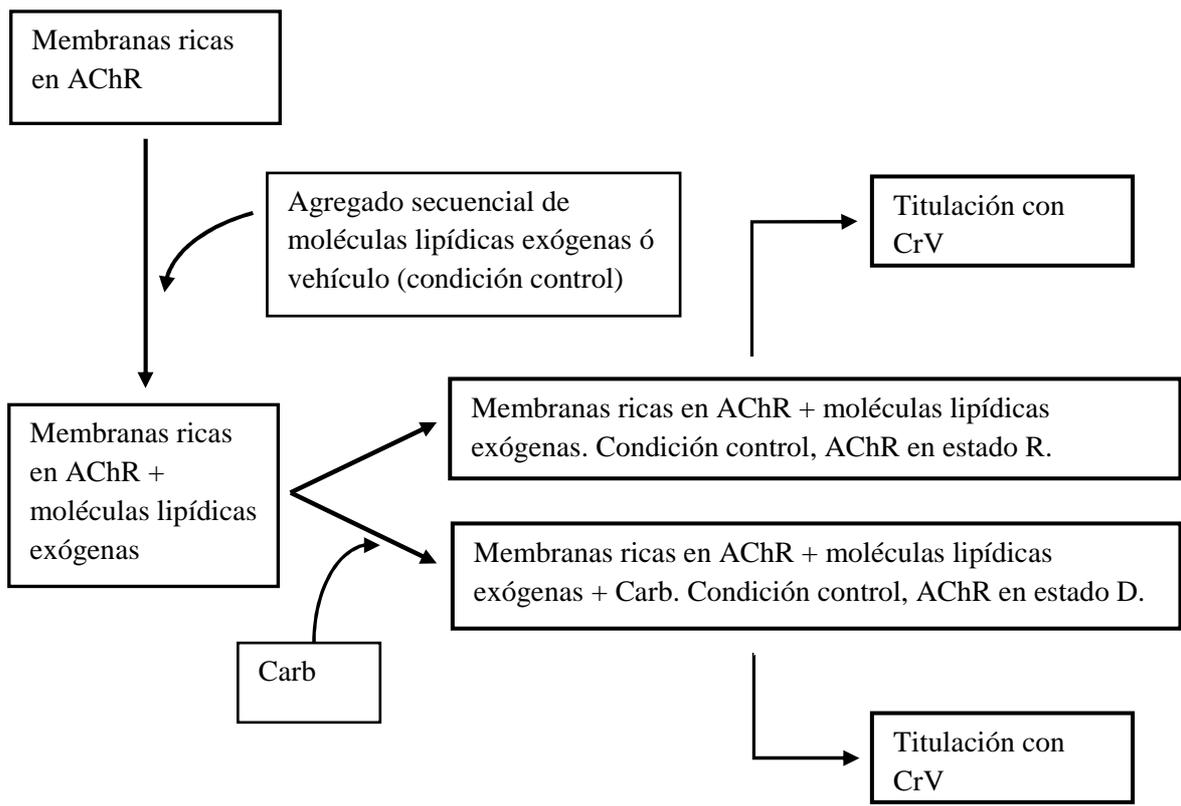


Figura 16. a) Intensidad de fluorescencia de la sonda CrV en membranas ricas en AChR de *T. californica* en ausencia (estado R, ○) o presencia (estado D, ●) de agonista (1 mM), en función de la concentración de CrV agregada. ▲, membranas de correspondientes a la fracción inferior del gradiente de sacarosa, las cuales están desprovistas de AChR. La fluorescencia se midió a 623 nm en cada concentración. b) A partir del análisis de los datos utilizando la ecuación de Boltzmann se obtuvieron los valores de K_D para cada estado conformacional (ver sección Materiales y Métodos).

El ajuste de las curvas obtenidas a la ecuación de Boltzmann permitió obtener los valores de K_D de la sonda CrV para ambos estados. Mientras que para el estado de reposo el valor de K_D obtenido fue de $378,6 \pm 83,1$ nM, en presencia de agonista, este valor disminuyó a $40,5 \pm 9,2$ nM. Estos valores coinciden con los resultados obtenidos por Lurtz & Pedersen (1999), los cuales indican una afinidad aproximadamente diez veces mayor de la sonda por el estado D (Fig. 16 b). Es decir, la diferencia entre los valores de K_D permite discriminar entre los estados conformacionales R y D sin ambigüedades, y así utilizar esta medición para evaluar el estado conformacional del AChR en las distintas condiciones experimentales estudiadas.

2- Los esteroides inducen un cambio conformacional del AChR.

Con la finalidad de evaluar si la presencia de esteroides afecta el equilibrio conformacional del AChR, se incubaron membranas ricas en AChR de *T. californica* con distintas concentraciones del esteroide cortisona o hidrocortisona (de 100 μ M a 600 μ M). En cada muestra los esteroides fueron agregados de forma secuencial, con intervalos de 30 minutos de incubación entre cada uno, hasta llegar a la concentración final deseada. Posteriormente, las membranas fueron separadas en dos poblaciones. Una correspondió a la muestra que en condición control, sin molécula agregada, posee al AChR en estado R. La otra fue incubada durante 15 minutos con Carb, un agonista del AChR, a una concentración final de 1 mM, obteniéndose una muestra que en condición control, sin molécula agregada, corresponde al AChR en estado D. A continuación, ambas muestras fueron tituladas con la sonda CrV.



Las curvas de emisión de fluorescencia de CrV obtenidas en presencia de esteroide (y ausencia de agonista) se desplazaron, en forma dependiente de la concentración del esteroide, hacia la curva correspondiente al estado desensibilizado del AChR (Figura 17). Por otro lado, las curvas obtenidas en presencia de agonista no mostraron diferencias entre las muestras control y las incubadas con esteroides a las distintas concentraciones.

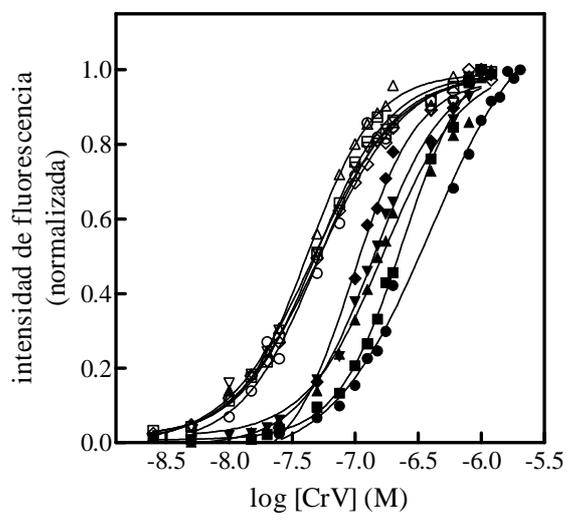


Figura 17. Intensidad de fluorescencia de la sonda CrV membranas ricas en AChR de *T. californica* incubadas con distintas concentraciones de HC y en ausencia (símbolos negros) o en presencia (símbolos blancos) de 1mM de Carb. Concentraciones: 0 μM (\bullet, \circ); 100 μM (\blacksquare, \square); 200 μM ($\blacktriangle, \triangle$); 400 μM ($\blacktriangledown, \triangledown$); 600 μM (\blacklozenge, \lozenge). Cada valor corresponde al promedio de cuatro o más experimentos independientes.

A partir del ajuste de las curvas a la ecuación de Boltzmann, se obtuvieron las K_D para las distintas concentraciones de esteroide utilizadas. El valor de K_D en ausencia de agonista, estado R del AChR, disminuyó hacia los valores de K_D en estado D del AChR de manera dependiente de la concentración de esteroide agregada (Figura 18). Mientras que en presencia de agonista los valores de K_D obtenidos se mantuvieron constantes, indicando que no existen diferencias significativas entre la presencia y la ausencia de esteroide cuando el AChR se encuentra en el estado D (Figura 18).

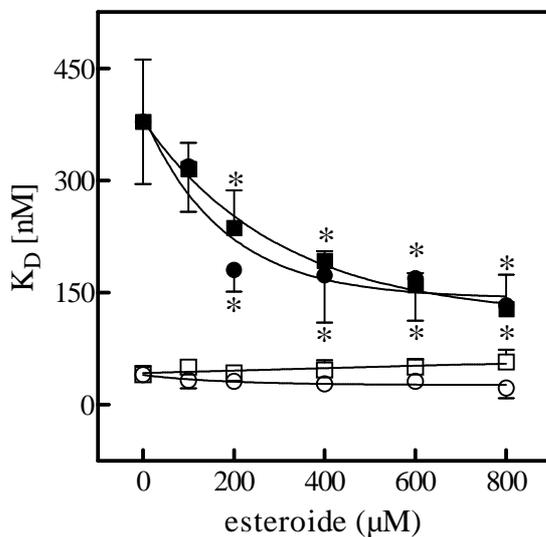


Figura 18. Efecto de la presencia de distintos esteroides sobre la K_D de CrV. Las K_D fueron calculados a partir de las curvas de titulación con CrV en función de la concentración del esteroide cortisona (■,□; ausencia y presencia de agonista, respectivamente) o del esteroide hidrocortisona (●,○; ausencia, y presencia de agonista, respectivamente). Cada punto corresponde al promedio de cuatro o más experimentos independientes. *, diferencia significativa con respecto al control ($p < 0,05$).

3- Los ácidos grasos libres modifican los estados de reposo y desensibilizado del AChR.

También se estudió el efecto que ejercen distintos AGL sobre el equilibrio conformacional del AChR. Para ello, membranas ricas en AChR de *T. californica* fueron incubadas con distintas concentraciones de ácidos grasos *cis*-insaturados (hasta 60 µM, concentración final) siendo estos: ácido araquidónico (*cis*-20:4), ácido linolénico (*cis*-18:3) y ácido oleico (*cis*-18:1). Luego, las membranas fueron separadas en dos poblaciones, agregándose Carb (1 mM) a sólo una de ellas. A continuación se realizó la titulación con

CrV. Los valores de K_D de la sonda CrV se calcularon como se realizó en el ítem anterior. La Figura 19 muestra que el ácido graso *cis*-18:1 produjo una disminución del K_D de CrV dependiente de su concentración, en ausencia de agonista. Un efecto opuesto se observó en presencia de agonista, ya que el ácido graso *cis*-18:1 produjo un aumento del K_D de CrV, estadísticamente significativo. Resultados similares fueron obtenidos con *cis*-20:4 y *cis*-18:3.

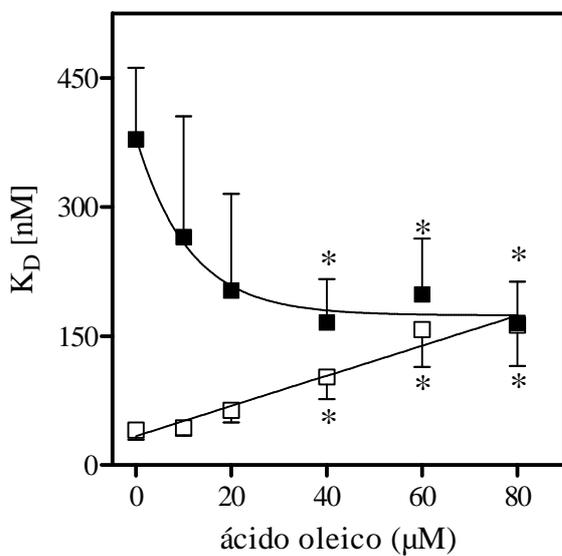


Figura 19. Efecto de la presencia del ácido graso oleico (*cis*-18:1) sobre la K_D de CrV. Membranas ricas en AChR previamente incubadas con ácido oleico a distintas concentraciones fueron tituladas con la sonda CrV. A partir de las curvas de titulación se obtuvieron los valores de K_D en ausencia (símbolos negros) o presencia (símbolos blancos) de Carb 1mM. Cada valor corresponde al promedio de cuatro o más experimentos independientes. *, diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$).

Experimentos similares se realizaron con AGL saturados. Membranas ricas en AChR de *T. californica* fueron incubadas en presencia de concentraciones crecientes de ácido araquídico (20:0) o ácido esteárico (18:0). A diferencia de lo observado con los AGL *cis*-insaturados, no se observaron diferencias significativas en las K_D de CrV tanto en presencia como en ausencia de agonista (Figura 20).

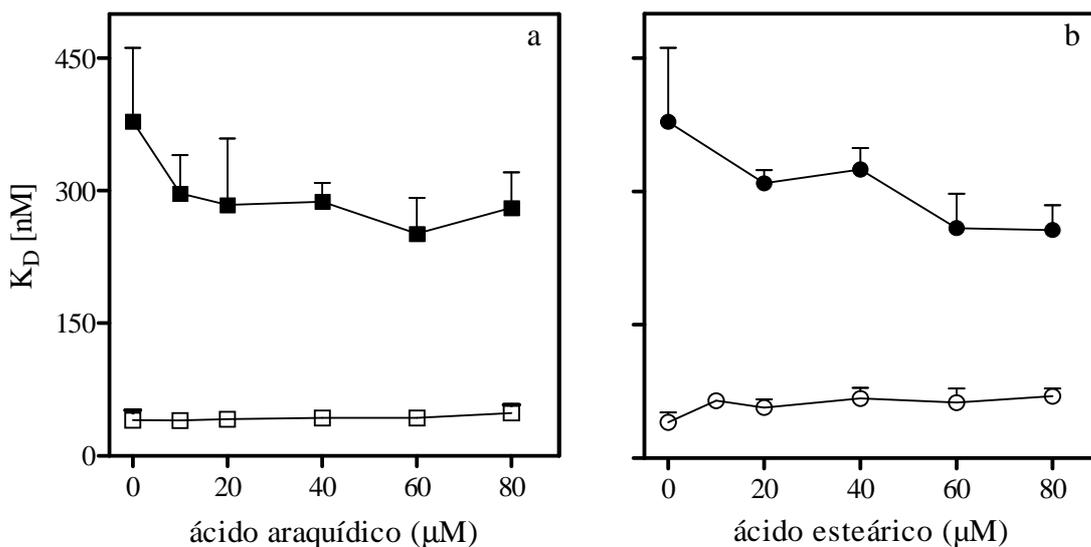


Figura 20. Efecto de la presencia de concentraciones crecientes de AGL saturados sobre el K_D de CrV. Membranas ricas en AChR previamente incubadas con ácido araquídico (cuadrado) o ácido esteárico (círculo) a distintas concentraciones fueron tituladas con la sonda CrV en ausencia (símbolos llenos) o presencia (símbolos vacíos) de Carb 1 mM. A partir de las curvas de titulación se obtuvieron los valores de K_D para los distintos tratamientos. Cada valor corresponde al promedio de cuatro o más experimentos independientes.

Observando los efectos diferenciales entre los AGL *cis*-insaturados y los AGL saturados, se procedió a estudiar si esta diferencia se podía relacionar con la doble ligadura del ácido graso. Para tal fin, se estudió un tercer tipo de ácido graso, con isomería *trans*, el ácido eláico (*trans*-18:1). Mientras que una doble ligadura con isomería *cis* induce una torsión de unos 30° en la dirección de la cadena hidrocarbonada del ácido graso, la doble ligadura *trans* no altera la dirección de la cadena, presentando una conformación semejante a la de un AGL saturado. La Figura 21 muestra que el AChR en presencia del ácido eláidico se comporta igual a lo observado con los AGL saturados, no alterando los valores de K_D de CrV calculados tanto en presencia como en ausencia de agonista.

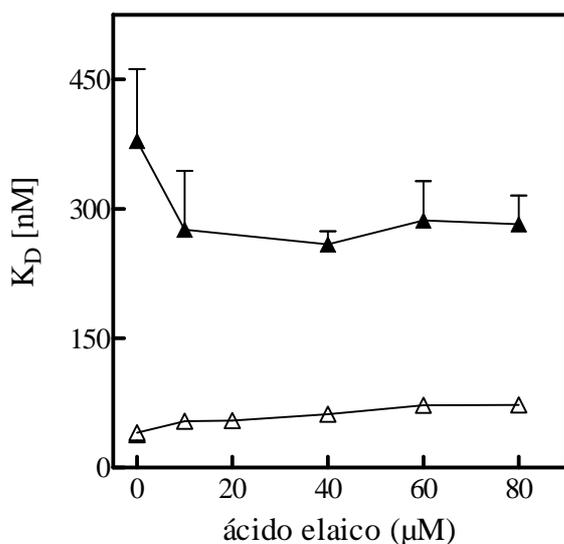


Figura 21. Efecto de AGL *trans*-insaturados sobre el K_D de CrV. Membranas ricas en AChR previamente incubadas con distintas concentraciones de ácido eláico fueron tituladas con la sonda CrV. A partir de las curvas de titulación se obtuvieron los valores de K_D en ausencia (símbolos llenos) o presencia (símbolos vacíos) de Carb 1 mM. Cada valor corresponde al promedio de cuatro o más experimentos independientes.

A continuación se quiso verificar si los distintos efectos observados sobre la conformación del AChR causados por la presencia de AGL en la membrana de *Torpedo* estaban relacionados con las características estructurales de las cadenas acílicas que los componen y no con una distinta partición de los mismos en la membrana plasmática. La magnitud de la incorporación de los distintos ácidos grasos a las membranas ricas en AChR fue extensamente estudiada por Antollini & Barrantes (2002) usando la sonda fluorescente ADIFAB (*acrylodan-derivatized intestinal fatty acid-binding protein*). Los valores del coeficiente de partición calculado para los distintos AGL permitieron clasificarlos en tres clases de acuerdo con su hidrofobicidad:

1. Ácidos grasos altamente hidrofóbicos (como por ejemplo 20:0 y 18:0).
2. Ácidos grasos medianamente hidrofóbicos (como por ejemplo *cis*-18:1 y *trans*-18:1).
3. Ácidos grasos de carácter hidrofílico (como por ejemplo los ácidos *cis*-insaturados 18:2, 18:3, 20:4 y 22:6)

En este trabajo de Tesis se estudiaron ácidos grasos pertenecientes a estos tres grupos mencionados y se observaron efectos totalmente independientes a esta clasificación. Por ejemplo, el ácido graso 20:0, que posee un alto coeficiente de partición en membrana (alta

hidrofobicidad), no parece ejercer efecto alguno sobre las conformaciones del AChR a las concentraciones ensayadas. Más aún, ácidos grasos con coeficientes de partición semejantes, como los ácidos oleico y eláidico (*cis* y *trans* 18:1, respectivamente) mostraron distintos efectos sobre las conformaciones del AChR. Por lo tanto, las modificaciones ejercidas por los distintos ácidos grasos sobre la conformación del AChR no estarían relacionadas con su grado de partición en la membrana.

4- La acción conjunta de ácidos grasos libres y esteroides afectan ambos estados conformacionales del AChR.

Llamó la atención el hecho de que si bien tanto esteroides como ácidos grasos libres se localizan en los mismos sitios a nivel de la interfase lípido-AChR, los esteroides sólo influyen sobre el estado R, mientras que los AGL *cis*-insaturados alteran ambos estados, el R y el D. Con la intención de avanzar en la comprensión de este comportamiento diferencial de ambas moléculas, se procedió a investigar el efecto conjunto de las mismas sobre la conformación del AChR. Para tal fin, membranas ricas en AChR de *Torpedo californica* fueron incubadas con un primer tipo de molécula (esteroide o AGL) a concentración de saturación (de acuerdo con lo presentado en el capítulo I). Luego, las membranas fueron incubadas con un segundo tipo de molécula, nuevamente hasta alcanzar la concentración de saturación. Una vez que se arribó a esta última condición, las membranas fueron tituladas con la sonda CrV y los valores de K_D calculados para cada condición (Figura 22). Los valores de K_D obtenidos indican que el orden de agregado de las moléculas no afecta el resultado final obtenido, llegando el AChR a un mismo estado conformacional tanto en ausencia como en presencia de agonista. Más interesante aún, los valores de K_D obtenidos en membranas tratadas con hidrocortisona y ácido oleico (indistintamente del orden agregado), y en presencia de agonista, fueron similares a los obtenidos en membranas incubadas únicamente

con ácido oleico, en presencia de agonista. Estos resultados estarían indicando que la presencia de AGL *cis*-insaturados, y no la de esteroides u otros AGL, es la que condicionaría la llegada del AChR a su estado desensibilizado. Una característica diferencial entre los ácidos grasos *cis*-insaturados por un lado y los *trans*-insaturados y saturados por el otro, es la diferente perturbación que inducen a nivel de una bicapa lipídica (Antollini & Barrantes, 2002).

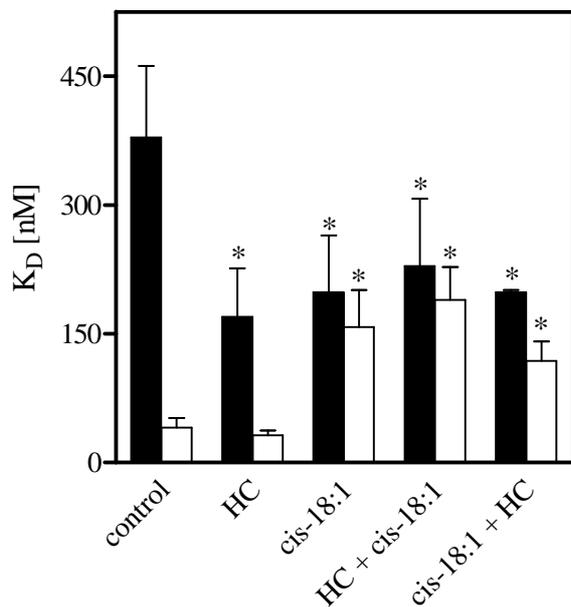


Figura 22. Efecto conjunto del ácido oleico (*cis*-18:1) e hidrocortisona (HC) sobre el K_D de CrV. Membranas ricas en AChR de *T. californica* fueron incubadas en presencia de: HC (600 μ M); 18:1c (60 μ M); HC (600 μ M) + 18:1c (60 μ M); 18:1c (60 μ M) + HC (600 μ M), y tituladas con la sonda CrV en ausencia o presencia de Carb 1 mM (barras negras y barras blancas, respectivamente). Cada valor de K_D corresponde al promedio de cuatro o más experimentos independientes. *, diferencia significativa con respecto al control ($p < 0,05$)

5- La polaridad de membrana condiciona la transición del AChR al estado D.

A continuación se realizaron estudios dirigidos a determinar si existe una relación entre los estados conformacionales del AChR y el estado físico de los lípidos del microambiente lipídico del AChR. Para ello se estudió cómo afectan a las propiedades físicas de la membrana la presencia de esteroides y AGL, correlacionando estos resultados con los valores de K_D obtenidos.

Las membranas ricas en AChR de *T. californica* fueron incubadas con esteroides o distintos AGL a concentraciones finales de 600 μ M y 60 μ M, respectivamente. Luego se

agregó la sonda Laurdan (0,6 μM), la cual es sensible a la polaridad y la dinámica molecular del ambiente lipídico, debido a un proceso de relajación molecular que experimenta en presencia de dipolos (Parasassi et al., 1990; 1991). Dado que los principales dipolos que detecta la sonda son las moléculas de agua, cambios en los espectros de emisión de Laurdan dependen principalmente del grado de penetración de éstas en la membrana, hecho directamente relacionado con el empaquetamiento lipídico. Esta característica que posee la sonda la convierte en una herramienta útil para estudiar cambios en el orden de una membrana biológica. A partir de los espectros de emisión de esta sonda fluorescente se calcula un valor de polarización generalizada (*GP*) que relaciona dos máximos característicos de emisión (uno correspondiente a la fase gel y otro a la fase líquido-cristalina, fases lipídicas con muy diferente polaridad de membrana) (Parasassi et al., 1990; 1991). De esta manera, se calcularon dos tipos de valores de *GP* a partir del espectro de emisión de Laurdan, obtenidos por excitación directa, o a través del proceso de FRET (usando la fluorescencia intrínseca del AChR como donante), dando así información sobre el orden lipídico de la totalidad de la membrana, o del micro-ambiente lipídico inmediato al AChR, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. K_D de CrV y GP de Laurdan en membranas ricas en AChR de *T. californica* en presencia de distintos AGL o esteroides y a distintas temperaturas.^a

Temperatura	Tratamiento	CrV K_D (nM)		Laurdan GP^{**}	
		En ausencia de agonista	En presencia de agonista	Excitación directa	FRET
25 °C	control	378,6 ± 83,1	40,5 ± 11,2	0,37 ± 0,01	0,41 ± 0,01
	+ <i>cis</i> -18:1	198,3 ± 64,9*	157,7 ± 43,3*	0,18 ± 0,01*	0,24 ± 0,00*
	+ <i>trans</i> -18:1	270,3 ± 50,5	70,8 ± 4,0	0,34 ± 0,01	0,39 ± 0,00
	+ 20:0	251,4 ± 40,5	42,9 ± 2,0	0,38 ± 0,00	0,41 ± 0,00
	+ HC	169,5 ± 56,6*	31,6 ± 5,5	0,36 ± 0,01	0,41 ± 0,00
	+ <i>cis</i> -18:1 + HC	198,3 ± 2,7*	118,4 ± 22,6*	0,17 ± 0,01*	0,23 ± 0,01*
	+ HC + <i>cis</i> -18:1	228,9 ± 78,4*	189,2 ± 38,5*	0,17 ± 0,01*	0,23 ± 0,01*
42 °C	control	379,4 ± 93,4	242,2 ± 75,4*	0,10 ± 0,01*	0,17 ± 0,01*

^a El número de experimentos independientes es mayor a cuatro en todas las determinaciones.

*, Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0,001$).

***, GP varía de 0,6 a -0,3 (de estado gel a estado líquido cristalino, respectivamente).

El ácido graso oleico (*cis*-insaturado) disminuye el valor de GP respecto al control tanto en la membrana en general, como en el micro-ambiente lipídico del AChR, indicando así un aumento en la polaridad de la membrana. En tanto, el ácido graso eláidico (*trans*-insaturado) y el esteroide hidrocortisona no produjeron ningún cambio en los valores de GP , indicando que no afectan significativamente la polaridad de la misma. El ácido araquídico (ácido graso saturado) produjo un leve incremento en la polaridad de la membrana. El análisis del efecto conjunto de hidrocortisona y ácido oleico, independientemente del orden de agregado, y reproduciendo las mismas condiciones ensayadas en los experimentos con la sonda CrV, mostró que la membrana incrementa su polaridad de manera similar a lo observado en membranas incubadas sólo con el ácido oleico. Así, de las distintas moléculas ensayadas, el ácido oleico sería la única que por un lado produce un incremento en la polaridad de la membrana, perturbando el orden lipídico, y por otro lado afecta al estado D del AChR. Esto estaría indicando un nexo entre el estado biofísico de la membrana y la capacidad del AChR para alcanzar ciertos estados conformacionales.

Con el objetivo de profundizar en este concepto, se estudió cómo afectan los cambios en la polaridad de la membrana a los estados conformacionales del AChR, sin el agregado de moléculas exógenas sino por incremento de la temperatura (de 25°C a 42°C). Los resultados mostraron que a 42°C se produjo un aumento importante de la polaridad de membrana junto con un significativo aumento del K_D en presencia de agonista respecto al control (25°C). En ausencia de agonista no se observaron diferencias del K_D de CrV con respecto al control (ver Tabla 3).

La Figura 23 muestra un análisis más detallado del efecto de la temperatura sobre los cambios conformacionales del AChR. El K_D de la sonda CrV en presencia de agonista aumentó en función de la temperatura en forma directa (a mayor temperatura, mayor es el valor de K_D obtenido). Se comprobó que la magnitud de este aumento fue proporcional al grado de cambio en el orden de la membrana. Igual a lo visto a 42°C, en ausencia de agonista, el K_D de la sonda CrV se mantuvo constante a las distintas temperaturas estudiadas.

De esta manera, una perturbación en la membrana (tanto por el agregado de moléculas exógenas como por incremento de la temperatura) impide que el AChR pueda lograr llegar al estado D en presencia de agonista. En contraste, el estado R no parece ser afectado por la polaridad de la membrana, indicando que el estado biofísico de la membrana no influiría de manera directa el estado R del AChR.

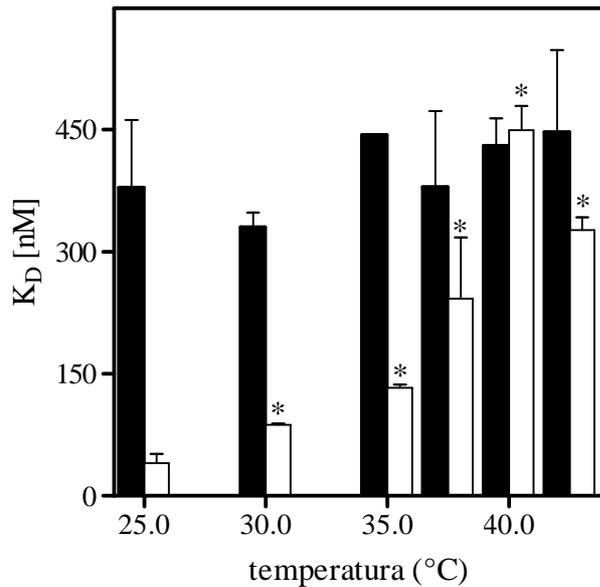


Figura 23. Efecto de la temperatura en la variación del K_D de CrV. Membranas ricas en AChR de *T. californica*, incubadas a distintas temperaturas (25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 39,5°C y 42°C), fueron tituladas con CrV en ausencia (barras negras) o presencia (barras blancas) de Carb 1 mM. Cada valor de K_D corresponde al promedio de tres o más experimentos independientes. *, diferencia significativa respecto al control ($p < 0,01$)

6- Efecto de ácidos grasos endógenos en la conformación del AChR.

En el capítulo anterior se demostró que en membranas de *T. californica* ricas en AChR sometidas a la acción de PLA₂ los ácidos grasos endógenos, generados pueden localizarse en la interfase lípido-AChR, en los mismos sitios que lo hacen los ácidos grasos agregados en forma exógena. Para determinar el efecto que los ácidos grasos endógenos ejercen sobre el equilibrio conformacional, membranas de *T. californica* fueron incubadas en presencia de PLA₂ a distintos tiempos con la finalidad de obtener un estudio en función de concentraciones crecientes de ácido graso liberado. A una fracción de las membranas tratadas con PLA₂ se la tituló con la sonda fluorescente CrV, mientras que a otra fracción se la incubó con la sonda Laurdan.

Los experimentos de titulación con CrV demostraron que, en presencia de agonista, el K_D aumentaba en función del tiempo de incubación con PLA₂ (Figura 24). Por otro lado, en ausencia de agonista, el valor de K_D no se vio afectado por la acción de PLA₂.

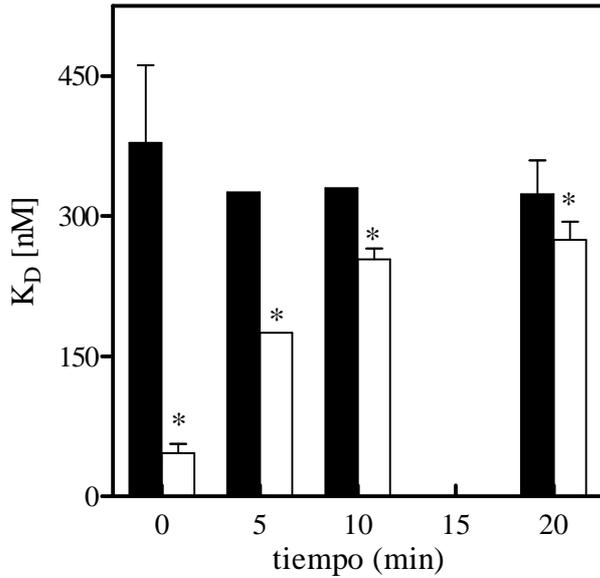


Figura 24. K_D de CrV calculado en membranas ricas en AChR tratadas con PLA_2 . Las membranas ricas en AChR de *T. californica* fueron incubadas con PLA_2 a distintos tiempos (0, 5, 10 y 20 min). Posteriormente, las distintas membranas fueron tituladas con concentraciones crecientes de CrV en ausencia (barras negras) y en presencia (barras blancas) de carbamilcolina 1 mM. Cada valor de K_D corresponde al promedio de por lo menos cuatro experimentos independientes. *, diferencia significativa respecto al control.

Paralelamente al estudio de los estados conformacionales del AChR a distintos tiempos de hidrólisis de los lípidos de la membrana, se obtuvieron los valores de GP , también en función del tiempo de incubación con PLA_2 , utilizando membranas marcadas con Laurdan (Figura 25). A medida que aumentó la hidrólisis de la membrana se produjo un concomitante incremento en los valores de GP . Dicho incremento se correlaciona con el aumento observado de los valores de K_D de CrV en presencia de agonista (Tabla 3).

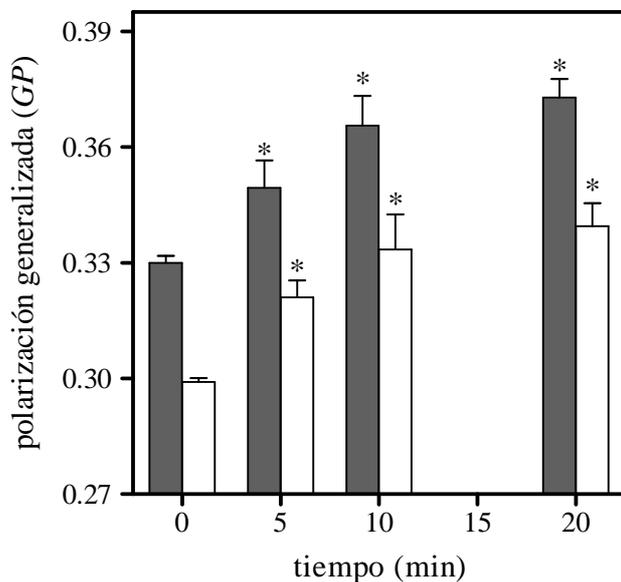


Figura 25. GP de Laurdan de membranas ricas en AChR tratadas con PLA_2 . Las membranas ricas en AChR de *T. californica* fueron tratadas con PLA_2 a distintos tiempos (0, 5, 10 y 20 min). Posteriormente, las distintas membranas fueron incubadas con la sonda Laurdan (0,6 μM) y el GP calculado. Cada valor de GP corresponde al promedio de por lo menos cuatro experimentos independientes. *, diferencia significativa respecto al control.

7- Estudio de cambios conformacionales de las porciones transmembrana del AChR inducidos por la presencia de ácidos grasos y esteroides.

Los resultados obtenidos hasta este punto de la Tesis indican que la presencia de AGL (*cis*-insaturados) y esteroides, en ausencia de agonista, inducen un cambio conformacional global del AChR que lo retira de su estado de reposo y activable. Con el objetivo de obtener evidencias complementarias del cambio conformacional del AChR inducido por la presencia de esteroides y AGL realizamos estudios de extinción de fluorescencia con AChR purificado de membranas de *T. californica* y marcado con la sonda fluorescente maleimido-pireno (ver Materiales y Métodos), sonda lipofílica que reacciona específicamente con grupos sulfhidrilos. Estudios realizados por Narayanaswasmi et al. (1993), combinando tal marcación covalente con la extinción de la fluorescencia mediante sondas lipídicas spin-marcadas, determinaron la disposición espacial del aducto de pireno en la membrana, localizándolo en la porción transmembrana M4 de la subunidad γ del AChR, en una posición superficial cercana a la interfase lípido-agua. Estudios ulteriores de nuestro laboratorio corroboraron y extendieron estas observaciones (Barrantes et al., 2000b).

Posteriormente a la marcación del AChR con la sonda maleimido-pireno se realizó un gel de poliacrilamida que se visualizó con luz UV, comprobándose que la marca fluorescente estaba efectivamente en la subunidad γ del AChR (ver Materiales y Métodos). Como esta sonda fluorescente sólo se une a los grupos sulfhidrilos libres (no a aquéllos que están formando puentes disulfuro), y debido a que durante la marcación se usaron condiciones no reductoras, es de esperar que la marcación ocurra sólo a nivel TM. Por tanto, para corroborar que la sonda fluorescente unida al AChR se encuentre efectivamente unida a un segmento TM del AChR, se realizó una titulación con acrilamida, un extintor de fluorescencia hidrosoluble ya probado en su eficacia en estudios del AChR en membranas nativas (Barrantes, 1978). Cuando la muestra se excitó a 290 nm (excitación del AChR), la

intensidad de fluorescencia de los triptofanos disminuyó en función de la concentración de acrilamida. Al excitar la muestra a 345 nm (excitación directa del pireno), la fluorescencia del pireno se mantuvo constante (Figura 26). Este resultado indica que mientras una gran parte de la fluorescencia intrínseca del AChR es accesible al extintor hidrosoluble acrilamida, hecho lógico considerando que el AChR tiene una porción importante de su masa del lado extracelular (conteniendo 31 de los 51 triptofanos totales de la proteína), la sonda pireno unida al AChR no sería accesible al extintor, verificándose su posición transmembranal.

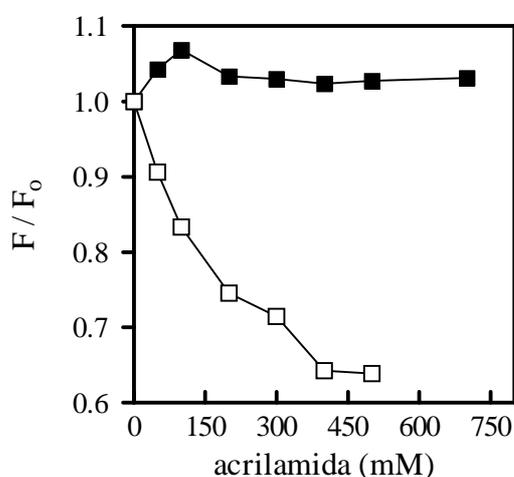


Figura 26. Extinción de la fluorescencia intrínseca del AChR y de la sonda fluorescente maleimido-pireno por acrilamida. El AChR reconstituido y marcado con maleimido-pireno fue titulado con concentraciones crecientes de acrilamida y se midió la fluorescencia del pireno (excitación a 345 nm y emisión a 375 nm, ■) y de los triptófanos del receptor (excitación a 290 nm y emisión a 330 nm, □) luego de cada agregado.

En otra serie de experimentos realizados sobre el AChR marcado con maleimido-pireno, se estudió la extinción de fluorescencia con el ácido esteárico marcado en el carbono 5 con un grupo nitróxido (ácido graso spin-marcado; 5-SLFA, *5-spin label fatty acid*). Al incorporarse a la membrana el ácido graso exógeno, la posición del grupo nitróxido en el interior de la bicapa es relativamente estable. Así, su poder como extintor de fluorescencia va a depender de la localización de la sonda fluorescente. El AChR purificado y marcado con maleimido-pireno fue previamente incubado con hidrocortisona (600 μ M) o con los distintos AGL utilizados previamente (60 μ M). Luego se realizó la titulación con ácido esteárico spin-marcado y se determinó la fluorescencia del pireno luego de cada agregado. A partir de los

espectros de fluorescencia obtenidos se calcularon las constantes de extinción de Stern-Volmer (K_{sv}) para cada tratamiento (Figura 27).

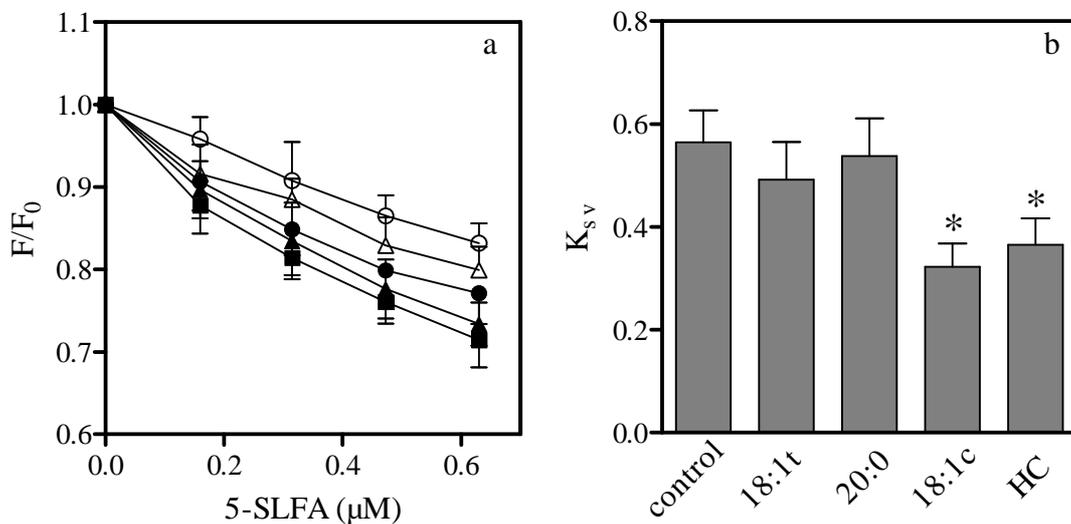


Figura 27. a) Extinción de la fluorescencia del pireno por 5-SLFA. El AChR reconstituido y marcado con maleimido-pireno fue previamente incubado con: control (■); *trans*-18:1 (60 μM , ●); 20:0 (60 μM , ▲); *cis*-18:1 (60 μM , ○); HC (600 μM , △). Posteriormente se realizó la titulación con concentraciones creciente de ácido esteárico spin-marcado (5-SLFA) y la fluorescencia del pireno fue evaluada luego de cada concentración agregada. b) Constantes de Stern-Volmer obtenidas a partir de las curvas de extinción de fluorescencia (F_0/F). Cada valor corresponde al promedio de al menos tres experimentos independientes. *, diferencia significativa respecto al control.

Se obtuvieron diferencias en cuanto a la variación de la K_{sv} según cuál haya sido la molécula exógena adicionada a las membranas. La presencia de hidrocortisona o de ácidos grasos con isomería *cis* causó cambios en la constante K_{sv} sugiriendo que el agregado de un esteroide o un ácido graso *cis*-insaturado modificaría la posición de la sonda pireno; es decir, ocasionaría un movimiento del segmento transmembrana del AChR. Por otro lado, la K_{sv} se mantuvo constante en el caso de los ácidos grasos *trans*-insaturados y los ácidos grasos saturados, indicando que la presencia de la sonda pireno no cambió su posición con respecto al ácido graso spin-marcado. Estos resultados indicarían además que si ocurren cambios en la

topografía de los segmentos TM del AChR como respuesta a perturbaciones del estado físico de la membrana, éstos no suceden a la altura en la que se localiza el grupo nitróxido, por lo que no pueden ser detectados. Además, de ocurrir estos cambios conformacionales, seguirían una secuencia diferente a la detectada por presencia de los esteroides y ácidos grasos libres, ya que estos sí pudieron ser detectados.

DISCUSION

En esta segunda parte del presente trabajo de Tesis se estudiaron los cambios conformacionales del AChR causados por esteroides y ácidos grasos, dos tipos de moléculas de características altamente hidrofóbicas. En la primera parte de esta Tesis se mostró que ambos tipos de moléculas se localizan en la membrana, compartiendo los mismos sitios en la interfase lípido-AChR. Sin embargo, la relación entre la presencia de estos tipos de moléculas en la bicapa, y la inhibición funcional del AChR no es clara. Como se mencionó en la Introducción, la funcionalidad del receptor (tanto el pasaje de iones a través del poro, como la transición del estado conformacional R al estado conformacional final D) es altamente sensible a la composición de los lípidos de su micro-ambiente. Se han propuesto modelos especulativos, donde la fluidez de la membrana poseería un papel en la funcionalidad del receptor (Criado et al., 1984; Baenziger et al., 2000), modulando además la proporción de los estados R y D del AChR (daCosta et al., 2004).

Con la intención de poder esclarecer la interacción entre los distintos esteroides y AGL (saturados e insaturados con isomería *cis* y *trans*) con la funcionalidad del AChR, se realizó un estudio de los posibles cambios conformacionales del AChR inducidos por la presencia de estas moléculas exógenas, utilizando la sonda fluorescente CrV. Esta sonda muestra afinidades distintas por los estados conformacionales del AChR. Lurtz & Pedersen (1999) indicaron que a concentraciones de agonista que producen la desensibilización del AChR, el K_D de la sonda CrV por el AChR disminuye un orden de magnitud, haciendo manifiesto el cambio conformacional que sufre el AChR hacia un estado desensibilizado de alta afinidad por la sonda en presencia de agonista (Figuras 16 a y b).

Cuando se incubaron las membranas ricas en AChR con distintos esteroides (cortisona e hidrocortisona) en ausencia de agonista, los valores de K_D disminuyeron, acercándose a los valores observados en membranas control expuestas a altas concentraciones de agonista (AChR en estado D; Figuras 17 y 18). Este resultado claramente indica que los esteroides inducen un cambio conformacional del AChR.

Los AGL ejercieron distintos efectos sobre el equilibrio conformacional del AChR, dependiendo de sus características estructurales (Figuras 19, 20 a y b y 21). De todos los ácidos grasos estudiados, sólo los AGL insaturados con isomería *cis* causaron un cambio conformacional del AChR, dirigiéndolo hacia un estado D. Además, estos AGL con isomería *cis* impidieron que el AChR pudiese alcanzar el estado conformacional D en presencia de agonista. Una diferencia clave entre los distintos AGL insaturados estudiados reside en el efecto que su doble ligadura ejerce sobre la estructura de su cadena hidrocarbonada: la isomería *cis* produce un torcimiento de la cadena acílica, mientras que la isomería *trans* no, razón por la cual el arreglo espacial de los AGL *trans* y los AGL saturados es similar (Prasad, 1996). Esta distinta conformación se manifestó claramente cuando, utilizando la sonda Laurdan, se estudió cómo los distintos tipos de ácidos grasos perturban la polaridad de membranas. Sólo los AGL *cis*-insaturados produjeron un aumento de la polaridad de las membranas ricas en AChR.

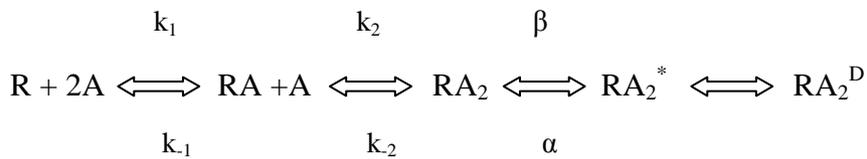
La falta de transición hacia el estado D del AChR producida por el agregado de AGL *cis*-insaturados también fue evidenciada en los ensayos de titulación con CrV en los que se varió la temperatura (Figura 23) o se digirió la membrana con una fosfolipasa (Figura 24). Al incrementar la temperatura, se produce un aumento en el desorden de la membrana (Tabla 3). El principal efecto fue observado cuando los experimentos se realizaron en presencia de agonista: la K_D aumentó en forma significativa, indicando claramente que en estas condiciones experimentales el AChR no puede realizar el cambio conformacional hacia el

estado D. En la segunda serie de experimentos, cuando las membranas se sometieron a la acción de PLA₂ (Figura 24), que disminuye la polaridad de la membrana (Figura 25), se observaron efectos similares.

En sistemas modelo puros, los valores de *GP* pueden tomar valores de 0,6 a -0,3 (desde una fase gel pura a una fase líquido-cristalina pura) (Parasassi et al., 1990). En membranas biológicas, como consecuencia de una composición más compleja, este cambio es mucho más estrecho. En este sentido, las variaciones de *GP* observadas en presencia de ácidos grasos *cis*-insaturados, o por la acción de PLA₂, o por un incremento de la temperatura (Tabla 3), realmente evidencian un cambio importante en la polaridad de la membrana (cambios de *GP* de similar magnitud se han informado en trabajos previos, como por ejemplo: Levi et al., 1997; Ravichandra et al., 1999; Triscioglio et al., 2002; Vest et al., 2006). La molécula de Laurdan posee una gran sensibilidad por el estado de fase de la membrana, mostrando una respuesta espectroscópica sumamente conveniente para evaluar la polaridad y la dinámica molecular de los dipolos a través del proceso de relajación dipolar (Parasassi et al., 1990, 1991). De esta manera, la medición de la polaridad de membrana posibilita obtener información dinámica en mediciones en estado estático (“*steady-state*”). Sin embargo, es importante considerar que para obtener una caracterización más completa de los parámetros biofísicos de una membrana debe realizarse otro tipo de mediciones complementarias (anisotropía en estado estático y resuelta en el tiempo entre otras).

La unión de agonista regula los cambios conformacionales del AChR de apertura y desensibilización, posiblemente a través de varios estados intermedios (Andeeva, 2006). Este trabajo de Tesis se focalizó sólo en los estados R y D, que representan los estados inicial y final, respectivamente, de una serie de conformaciones del AChR que van desde un estado conformacional de reposo, de baja afinidad, asociado a un canal no conductivo, cerrado (R), hasta un estado conformacional no conductivo de alta afinidad por el agonista (D), pasando

por estado(s) conductivo(s) transitorio(s). Estos cambios se pueden representar por un modelo secuencial lineal del equilibrio del AChR (Colquhoun & Sakmann 1985; Sine & Steinbach, 1987; Sine et al.; 1990),



donde R representa al AChR en estado de reposo, A al agonista y RA, RA₂, y RA₂^{*} al AChR con una molécula de agonista, con dos moléculas de agonista y con dos moléculas de agonista en estado activo pasajero, respectivamente. RA₂^D representa al AChR con dos moléculas de agonista en estado D. k₁ y k₂ representan las constantes microscópicas de asociación del agonista, mientras que las correspondientes constantes de disociación están representadas por k₋₁ y k₋₂, respectivamente. Las velocidades de apertura y cierre del canal están representados por β y α, respectivamente. Este equilibrio alostérico puede ser modificado por distintas condiciones endógenas o exógenas (como mutaciones puntuales o exposición a ciertas moléculas, respectivamente). A partir de este modelo lineal simple, se han ido incorporando conformaciones intermedias del AChR que ayudan a explicar el gatillado del AChR. Así, Dilger & Liu (1992) proponen que cada estado del AChR está asociado a un estado desensibilizado. Si se consideran los grados de ligamen (receptor libre, monoligado y biligado), el esquema cinético total es sumamente complejo; afortunadamente, el peso relativo de algunos de estos pasos es poco significativo y usualmente el diagrama lineal secuencial arriba mencionado responde adecuadamente a las necesidades de modelado cinético.

En este trabajo se muestra que la sola presencia de AGL *cis*-insaturados o esteroides lleva al AChR fuera de su estado de reposo, sin llegar a un estado desensibilizado completo, probablemente permaneciendo en uno de estos estados desensibilizados intermedios. Ambas moléculas, a pesar de ocasionar efectos similares sobre el estado conformacional del AChR, ejercen distintos efectos en la polaridad de la membrana. Mientras que los ácidos grasos *cis*-insaturados producen un incremento en la polaridad de la membrana, ácidos grasos *trans*-insaturados, saturados y esteroides no la afectan en forma significativa. Estos resultados indican que sería la presencia de estas moléculas hidrofóbicas en la interfase lípido-proteína la responsable de los cambios conformacionales del AChR, que lo llevarían a ese estado desensibilizado intermedio. Así, es probable que contactos directos entre las moléculas exógenas y las porciones TM del AChR dirijan al receptor fuera de su estado R, inhibiendo su función.

Estudios estructurales mediante microscopía crioelectrónica (Miyasawa et al., 2003) confirmaron los hallazgos esenciales de estudios previos de marcación del AChR con distintos lípidos fotoactivables (Blanton & Cohen, 1992, 1994), demostrando que los segmentos transmembrana M4 están en íntimo contacto con la bicapa lipídica en toda su extensión. Si bien los segmentos M4 se encuentran alejados tanto del lumen del canal como del sitio de unión al agonista, estudios funcionales muestran que mutaciones en residuos localizados en los segmentos M4 de distintas subunidades alteran las constantes de equilibrio del AChR (Lee et. al., 1994; Ortiz- Miranda et al., 1997; Tamamizu et al., 1999; Bouzat et al., 2000; Garbus et al., 2001). Estos resultados sugieren que los residuos localizados en M4 están involucrados en algún paso del gatillado del AChR. Mitra et al. (2004) han postularon que luego de la unión del agonista, los segmentos M4 se mueven en forma sincrónica, inmediatamente luego del movimiento de los dominios extracelulares de las subunidades α y de los conectores M2-M3, pero antes del movimiento del segmento M2 de la subunidad δ .

Tal hipótesis fue verificada experimentalmente *in silico*, llevando a la postulación que el anillo externo de segmentos M4 transmitiría los efectos ejercidos por los lípidos vecinales al anillo del poro, M2 (Xu et al., 2005). Auerbach (2005) imagina el gatillado del AChR como una secuencia de movimientos de segmentos rígidos cortos más que como un movimiento suave y continuo que une los estados cerrado y abierto, especulando de esta forma que el gatillado del AChR está gobernado por movimientos Brownianos de partes discretas (segmentos aminoacídicos cortos).

Sobre esta base estructural del AChR, con las limitaciones que impone la resolución alcanzable hasta la fecha, surge como un punto destacable de esta Tesis la hipótesis acerca del papel que podrían ejercer ciertas moléculas exógenas, como los esteroides y algunos ácidos grasos, en la interfase lípido-proteína. Esta hipótesis contempla la posibilidad de que tales moléculas alteren las interacciones lípido-AChR (en sus dominios TM), y de que estos dominios participen del movimiento secuencial que lleva al AChR *in toto* a adoptar una conformación de estado desensibilizado. Esta hipótesis estaría apoyada por los experimentos de extinción de fluorescencia con el AChR purificado y marcado con la sonda maleimido-pireno, que muestran que en presencia de esteroides o ácidos grasos *cis*-insaturados el segmento γ M4 del AChR cambia su posición en la bicapa lipídica (Figuras 27 a y b). Dado que la perturbación dentro de la membrana se mantiene mientras estén presentes las moléculas exógenas, una vez que la conformación del AChR es alterada, ya no puede volver al estado R. Ryan et al. (2001), por el método de espectroscopía infrarroja diferencial, demostraron que distintas porciones del AChR se interconvierten entre los estados R y D en forma independiente una de otra, mientras que la unión de NCI podría dirigir al AChR a estados intermedios.

Los AGL *cis*-insaturados causan un segundo efecto sobre el AChR en su membrana nativa, impidiendo que la proteína alcance el estado D en presencia de agonista. Se demostró

que distintas condiciones experimentales asociadas con cambios en el estado biofísico de la membrana (presencia de AGL *cis*-insaturados exógenos, pre-tratamiento de membranas con PLA₂, o incremento de la temperatura) tienden a modificar el equilibrio cerrado ⇔ abierto ⇔ desensibilizado de una forma similar. Este segundo efecto no parece depender de la presencia específica de moléculas exógenas o perturbadoras en la interfase lípido-proteína, sino más bien afectar en forma genérica el estado biofísico de la biomembrana. Los efectos del agregado secuencial de esteroides y ácidos grasos *cis*-insaturados verifican esta hipótesis. Los esteroides en ausencia de agonista dirigen al AChR fuera de su estado R, y no modifican el estado D en presencia de agonista. Sin embargo, un subsecuente agregado de ácido graso *cis*-insaturado, en ausencia de agonista, no produce más cambios, mientras que en presencia de agonista, el AChR no alcanza el estado D, efecto que es producido por el ácido graso *cis*-insaturado (Figura 19). Por otro lado, el impedimento del AChR para llegar al estado D por perturbación de los parámetros biofísicos de la membrana, podría resultar en un aumento de la función del AChR, al desplazar el equilibrio conformacional hacia las formas R del AChR. Experimentos previos de este laboratorio mostraron que la temperatura ejerce una importante influencia en los cambios conformacionales asociados con las transiciones entre los estados cerrado y abierto del AChR, los cuales son reflejados en modificaciones de la conductancia iónica (Zanello et al., 1996).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis hemos acreditado acabadamente la localización de distintos esteroides y AGL en el micro-entorno lipídico del AChR. Más aún, dicha localización no fue afectada cuando las porciones extra-membrana del AChR fueron hidrolizadas. Dichos compuestos, que actúan como NCI del AChR, comparten los mismos sitios de localización. A su vez, fue posible comprobar que los AGL generados endógenamente poseen la capacidad de localizarse en tales sitios, pudiéndose así especular con una regulación del AChR por parte de moléculas endógenas. Sorpresivamente, se determinó que la disponibilidad de dichos sitios depende del estado conformacional del AChR al comprobarse que en estado D están incapacitados para localizarse en el micro-entorno lipídico del receptor. Además, se determinó que dichos compuestos afectan el equilibrio conformacional del AChR, dado que esteroides en general y AGL *cis*-insaturados desplazan dicho equilibrio hacia el estado D, pudiéndose determinar de forma precisa que ambos grupos de compuestos inducen un cambio conformacional del AChR a nivel del segmento transmembrana γ M4. A su vez fue posible comprobar la gran sensibilidad del AChR a la fluidez de membrana, ya que una perturbación de la misma (aumento o disminución), imposibilita al AChR de arribar a un estado D completo. De esta forma, AGL *cis*-insaturados poseen una capacidad adicional de modular al AChR.

Los distintos efectos que las moléculas exógenas y que los cambios biofísicos en la membrana causan sobre la conformación del AChR pueden ser analizados a partir de las recientes propuestas que describen los procesos de activación y desensibilización del AChR como distintas entidades moleculares y que involucran el re-arreglo de distintos segmentos de la molécula (Purohit & Grosman, 2006). De esta forma, mientras que moléculas exógenas localizadas en la interfase lípido-proteína probablemente modifican la activación del AChR,

dirigiéndolo hacia un estado D intermediario, los cambios en el estado biofísico de la membrana (en particular cambios en el orden y la polaridad de la membrana) podrían perturbar la tasa de desensibilización.

Así, el contacto directo de estas moléculas exógenas con los segmentos TM podría remover al AChR de su estado R, causando su inhibición funcional. Además, la relación entre el estado físico de la membrana y el estado conformacional del AChR podría explicar por qué el equilibrio de activación del AChR está afectado por cambios en su micro-ambiente lipídico.

La conclusión general de este trabajo de Tesis es la existencia de dos niveles de modulación del AChR por lípidos, ambos directamente relacionados con los estados conformacionales del AChR. En el primer nivel de modulación, la mera presencia de un compuesto hidrófobo (AGL *cis*-insaturado o esteroide) puede remover en forma directa al AChR de su conformación de reposo, probablemente por el desplazamiento de los lípidos esenciales de la interfase lípido-AChR. Al ser el AChR una proteína alostérica, en la que la unión de dos moléculas de agonista y el mecanismo de gatillado del canal iónico están mediados por cambios conformacionales, es posible considerar una modulación a nivel de sitios distintos a los de unión de los neurotransmisores y del poro del canal iónico. La información estructural actualmente disponible sobre la región transmembrana del AChR sustenta la hipótesis de que los sitios no-anulares corresponderían a grietas entre las distintas hélices α transmembrana. En el segundo nivel de modulación se postula que si el inhibidor induce una perturbación de la fluidez de membrana, el AChR será incapaz de llegar al estado desensibilizado inducido por agonista. Dicha hipótesis está sustentada por los cambios en la orientación de los segmentos TM más expuestos a lípidos (Xu et al., 2005; Antollini et al., 2005), y por la naturaleza alostérica del AChR. Estos movimientos localizados se extenderían hacia cambios conformacionales globales del AChR.

REFERENCIAS

- Addona, G. H., Sandermann, H. Jr., Kloczewiak, M. A., Husain, S. S., & Miller, K. W. (1998) Where does cholesterol act during activation of the nicotinic acetylcholine receptor? *Biochim. Biophys. Acta* **1370**, 299-309
- Andreasen, T. J., & McNamee, M. G. (1980) Inhibition of ion permeability control properties of acetylcholine receptor from *Torpedo californica* by long-chain fatty acids. *Biochemistry* **30**, 4719-4726
- Andreeva, I. E., Nirthanan, S., Cohen, J. B., & Pedersen, S. E. (2006) Site specificity of agonist-induced opening and desensitization of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **45**, 195-204
- Antollini, S. S., & Barrantes, F. J. (1998) Disclosure of discrete sites for phospholipids and sterols at the protein-lipid interface in native acetylcholine receptor-rich membrane. *Biochemistry* **37**, 16653-16662
- Antollini, S. S., & 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 de Romanelli, I., Gutiérrez-Merino, C., Sotomayor, P., & 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
- Arias, H. R., Bhumireddy, P., Spitzmaul, G., Trudell, J. R., & Bouzat, C. (2006) Molecular mechanisms and binding site location for the noncompetitive antagonist crystal violet on the nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* **45**, 2014-2026

- Auerbach, A. (2005) Gating of the acetylcholine receptor channels: Brownian motion across a broad transition state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 1408-1412
- Baenziger, J. E., Morris, M. L., Darsaut, T. E., & Ryan, S. E. (2000) Effect of the membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 777-784
- Barrantes, F. J. (1978) Agonist-mediated changes of the acetylcholine receptor in its membrane environment. *J. Mol. Biol.* **124**, 1- 26
- Barrantes, F. J. (1979) Endogenous chemical receptors: some physical aspects. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**, 287-321
- Barrantes, F. J. (1980) Altered physical state of the membrane-bound acetylcholine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **65**, 49-53
- Barrantes, F. J. (1982) Interactions of the membrane-bound acetylcholine receptors with the non-receptor peripheral peptide. *Neuroreceptors* Edit Hucho, Walter de Gruyter. Berlin, New York, 1982
- Barrantes, F. J. (2002) Lipid matters: nicotinic acetylcholine receptor-lipid interactions. *Mol Membr. Biol.* **19**, 277-284
- Barrantes, F. J. (2003) Modulation of the nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and the middle rings of the transmembrane domains. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **6**, 620-632
- Barrantes, F. J. (2004) Structural basis for lipid modulation of the 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**, 72-80

- Barrantes, F. J., Aztiria, E., Rauschemberger, M. B., & Vasconsuelo, A. (2000a) The neuronal nicotinic acetylcholine receptor in some hereditary epilepsies. *Neurochem. Res.* **25**, 583-590
- Barrantes, F. J., Antollini, S. S., Blanton, M. P., & Prieto, M. (2000b) Topography of the nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 37333-37339
- Barrantes, F. J., Antollini, S. S., Bouzat, C. B., Garbus, I., & Massol, R. H. (2000c) Nongenomic effects of steroids on the nicotinic acetylcholine receptor. *Kidney Int.* **57**, 1382-1389
- Bencherif, M., & Lukas, R. J. (1993) Cytochalasin modulation of the nicotinic cholinergic receptor expression and muscarinic receptor function in human TE671/RD cells: a possible functional role of the cytoskeleton. *J. Neurochem.* **66**, 852-864
- Bertrand, D., Valera, S., Bertrand, S., Ballivet, M., & Rungger, D. (1991) Steroids inhibit nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroreport.* **2**, 277-280
- Betz, H. (1990) Ligand-gated ion channels in the brain: the amino receptor superfamily. *Neuron.* **5**, 383-392
- Blanton, M. P., & Cohen, J. B. (1992) Mapping the lipid-exposed regions in the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **31**, 3738-3750
- Blanton, M. P., & Cohen, J. B. (1994) Identifying the lipid-protein interface of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry* **33**, 2859-2872
- Blanton, M. P., & Wang, H. H. (1991) Localization of the regions of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor labeled with an aryl azide derivative of phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta* **1067**, 1-8

- Blanton, M. P., Dangott, L. J., Raja, S. K., Lala, A. K., & Cohen, J. B. (1998) Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel with the uncharged photoactivable compound 3H-diazofluorene. *J. Biol. Chem.* **273**, 8659-8668
- Blanton, M. P., Xie, Y., Dangott, L. J., & Cohen, J. B. (1999) The steroid promegestone is a noncompetitive antagonist of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor that interacts with the lipid-protein interface. *Mol Pharmacol.* **55**, 269-278
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917
- Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., & Heurteaux, C. (2002) Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* **109**, 231-241
- Bouzat, C., & Barrantes, F. J. (1993a) Hydrocortisone and 11-desoxycortisone modify acetylcholine receptor channel gating. *Neuroreport* **4**, 143-146
- Bouzat, C., & Barrantes, F. J. (1993b) Effects of long-chain fatty acids on the channel activity of the nicotinic acetylcholine receptor. *Receptors and Channels* **1**, 251-258
- Bouzat, C., & Barrantes, F. J. (1996) Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoids hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade. *J. Biol. Chem.* **271**, 25835-25841
- Bouzat, C., Barrantes, F., & Sine, S. (2000) Nicotinic receptor fourth transmembrane domain: hydrogen bonding by conserved threonine contributes to channel gating kinetics. *J. Gen. Physiol.* **115**, 663-672
- Bouzat, C., Gumilar, F., Esandi C., & Sine, S. M. (2002) Subunit-selective contribution to channel gating of the M4 domain of the nicotinic receptor. *Biophys. J.* **82**, 1920-1929
- Bouzat, C., Gumilar, F., Spitzmaul, G., Wang, H. L., Rayes, D., Hansen, S. B., Taylor, P., & Sine, S. M. (2004) Coupling of the agonist binding to channel gating in an Ach-binding protein linked to an ion channel. *Nature* **430**, 896-900

- Bouzat, C., Roccamo, A. M., Garbus, I., & Barrantes, F. J. (1998) Mutations at the lipid-exposed residues of the acetylcholine receptor affects its gating kinetics. *Mol. Pharmacol.* **54**, 146-153
- Brannigan, G., Héning, J., Law, R., Eckenhoff, R., & Klein, M. L. (2008) Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 14418-14423
- Brejc, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B., & Sixma, T.K. (2001) Crystal structure of an Ach-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269-276
- Buckler, K. J., & Honore, E. (2005) The lipid-activated two-pore domain K⁺ channel TREK-1 is resistant to hypoxia: implication for ischaemic neuroprotection *J. Physiol.* **562**, 213-222
- Ceccarelli, B., & Hurbult, W. P. (1980) Ca²⁺-dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* **87**, 297-303
- Changeux, J. P. (1990) The TiPS lecture. The nicotinic acetylcholine receptor : an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 485-492
- Changeux, J. P. (1993) Chemical signaling in the brain. *Sci. Am.* **269**, 58-62
- Chattopadhyay, A., & McNamee, M.G. (1991) Average membrane penetration depth of tryptophan residues of the nicotinic acetylcholine receptor parallax method. *Biochemistry* **30**, 7159-7164
- Colledge, M., & Froehner, S. C. (1997) Tyrosine phosphorylation of nicotinic acetylcholine receptor Grb2 binding. *J. Neurosci.* **17**, 5038-5045
- Colquhoun, D., & Sakmann, B. (1985) Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J. Physiol.* **369**, 501-557

- Corradi, J., Spitzmaul, G., De Rosa, M. J., Costabel, M., & Bouzat, C. (2007) Role of pairwise interactions between M1 and M2 domains of the nicotinic receptor in channel gating. *Biophys. J.* **92**, 76-86
- Corringer, P. J., Bertrand, S., Galzi, J. L., Devillers-Thiéry, A., Changeux, J. P., & Bertrand, D. (1999) Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **22**, 831-843
- Corringer, P. J., Le Noveré, N., & Changeux, P. J. (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 431-458
- Criado, M., Eibl, H., & Barrantes, F. J. (1984) Functional properties of the acetylcholine receptor incorporated ion model lipid membranes. Differential effects of chain length and head group of phospholipids on receptor affinity states and receptor-mediated ion translocation. *J. Biol. Chem.* **259**, 9188-9198
- Criado, M., Vaz, W. L., Barrantes, F. J., & Jovin, T. M. (1982) Translational diffusion of acetylcholine receptor (monomeric and dimeric forms) of *Torpedo marmorata* reconstituted into phospholipid bilayers studied by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **21**, 5750-5755
- daCosta, C. J., Ogrel, A. A., McCardy, E. A., Blanton, M. P., & Baenziger, J. E. (2002) Lipid-protein interactions at the nicotinic acetylcholine receptor. A functional coupling between nicotinic receptors and phosphatidic acid-containing lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **277**, 201-208
- daCosta, C. J., Wagg, I. D., McKay, M. E., & Baenziger, J. E. (2004) Phosphatidic and phosphatidylserine have distinct structural and functional interactions with the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **279**, 14967-14974
- Dilger, J. P., & Liu, Y. (1992) Desensitization of acetylcholine receptors in BC3H-1 cells. *Pflugers Arch.* **420**, 479-485

- Dreger, M., Krauss, M., Hermann, A., & Hucho, F. (1997) Interactions of the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane segments with the lipid bilayer in the native receptor-rich membranes. *Biochemistry* **36**, 839-847
- Duxbury, D. F. (1993) The photochemistry and photophysics of triphenylmethane dyes in solid and liquid media. *Chem. Rev.* **93**, 381-433
- Ellena, J. F., Blazing, M. A., & McNamee, M. G. (1983) Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor. *Biochemistry* **22**, 5523-5535
- Elliot, J., Blanchard, W. W., Miller, J., Strader, C. D., Hartig, P., Moore, H-P., Racs, J., & Raftery, M. (1980) *Biochem. J.* **185**, 667-677
- Finner- Moore, J., & Stroud, R. M. (1984) Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 155-159
- Fong, T. M., & McNamee, M. G. (1986) Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry* **25**, 830-840
- Fong, T. M., & McNamee, M. G. (1987) Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry* **26**, 3871-3880
- Galzi, J.L., Devillers-Thiéry, A., Hussy, N., Bertrand, S., Changeux, J. P., & Bertrand, D. (1992) Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* **359**, 500-505
- Garbus, I., Bouzat, C., & Barrantes, F. J. (2001) Steroids differentially inhibit the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroreport* **12**, 227-231
- Garbus, I., Roccamo, A. M., & Barrantes, F. J. (2002) Identification of threonine 422 in the transmembrane domain alpha M4 of the nicotinic acetylcholine receptor as a possible site of interaction with hydrocortisone. *Neuropharmacology* **43**, 65-73

- Görne-Tschelnokow, U., Strecker, A., Kaduk, C., Naumann, D., & Hucho, F. (1994) The transmembrane domains of the nicotinic acetylcholine receptor contain alpha-helical and beta structure. *EMBO J.* **13**, 338-341
- Gutierrez-Merino, C., Bonini de Romanelli, I. C., Pietrasanta, L. I., & Barrantes, F. J. (1995) Preferential distribution of the fluorescent phospholipid probes NBD phosphatidylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry* **34**, 4846-4855
- Hamouda, A. K., Chiara, D. C., Sauls, D., Cohen, J. B., & Blanton, M. P. (2006) Cholesterol interacts with the transmembrane alpha-helices M1, M3, and M4 of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor: photolabeling studies using [3H]Azidocholesterol. *Biochemistry.* **45**, 976-986
- Hamouda, A. K., Sanghvi, M., Chiara, D. C., Cohen, D. C., & Blanton, M. P. (2007) Identifying the lipid-protein interface of the alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: hydrophobic photolabeling studies with 3-(trifluoromethyl)-3-(m[125I]iodophenyl)diazirine. *Biochemistry* **46**, 13837-13846
- Hartig, P. R., & Raftery, M. A. (1979) Preparation of right-side-out, acetylcholine receptor enriched intact vesicles from *Torpedo californica* electroplaque membranes. *Biochemistry* **18**, 1146-1150
- Heuser, J. E., & Reese, T. S. (1981) Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* **88**, 564-580
- Hucho, F., Tsetlin, V. I., & Machold, J. (1996) The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* **239**, 539-557
- Jones, O. T., & McNamee, M. G. (1988) Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **27**, 2364-2374

- Karlin, A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 102-114
- Krauss, M., Korr, D., Herrmann, A., & Hucho, F. (2000) Binding properties of agonist and antagonist to distinct allosteric states of the nicotinic acetylcholine receptor are incompatible with a concerted model. *J. Biol. Chem.* **275**, 30196-30201
- Kuo, Y. P., Xu, L., Eaton, J. B., Zaho, L., & Lukas, R. J. (2005) Roles for nicotinic acetylcholine receptor subunit large cytoplasmic loop sequences in receptor expression and function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 455-466
- Lakowicz, R. L. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY.
- Lasalde, J. A., Tamamizu, S., Butler, D.H., Vibat, C. R., Hung, B., & McNamee, M. G. (1996) Tryptophan substitutions at the lipid-exposed transmembrane segment M4 of *Torpedo californica* acetylcholine receptor govern channel gating. *Biochemistry* **35**, 14139-14148
- Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., & Lazdunski, M. (2000) Polyunsaturated fatty acids are potent protectors. *EMBO J.* **19**, 1784-1793
- Lee, A. G. (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 62-87
- Lee, A. G., East, J. M., McWhirter, J., Rooney, E. K., & Simmonds, A. C. (1982) Interaction of fatty acids with the calcium-magnesium ion dependent adenosinetriphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* **21**, 6441-6446
- Lee, A. G., East, J. M., Jones, O. T., McWhirter, J., Rooney, E. K., & Simmonds, A. (1983) Binding of dansyl propanolol to the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **732**, 441-454

- Lee, Y. H., Li, L., Lasalde, J., Rojas, L., McNamee, M. G., Ortiz-Miranda, S. I., & Pappone, P. (1994) Mutations in the M4 domain of *Torpedo californica* acetylcholine receptor dramatically alter ion channel function. *Biophys. J.* **66**, 646-653
- Leite, J. F., Blanton, M. P., Shahgholi, M., Dougherty, D. A., & Lester, H. A. (2003) Conformation-dependent hydrophobic photolabeling of the nicotinic receptor: electrophysiology-coordinated photochemistry and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13054-13059
- Levi, M., Wilson, P., Nguyen, S., Iorio, E., Saporita, O., & Parasassi, T. (1997) In K562 and HL60 cells membrane ageing during cell growth is associated with changes in cholesterol concentration. *Mech. Ageing Dev.* **97**, 109-119
- Lindstrom, J. (1997) Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol. Neurobiol.* **15**, 193-222
- Lindstrom, J. (2003) Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N.Y. Acad. Sci.* **998**, 41-52
- Lindstrom, J., Merlie, J. P., & Yogeewaram, G. (1979) Biochemical properties of acetylcholine receptor subunits from *Torpedo californica*. *Biochemistry* **18**, 4465-4470
- Liu, X., Xu, Y., Li, H., Wang, X., Jiang, H., & Barrantes, F. J. (2008) Mechanics of channel gating of the nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e19.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Lurtz, M. M., & Pedersen, S. E. (1999) Aminotriarylmethane dyes are high-affinity noncompetitive antagonist of the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* **55**, 159-167

- Mantipragada, S. B., Horváth, L. I., Arias, H. R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Barrantes, F. J., & Marsh, D. (2003) Lipid-protein interactions and the effect of local anesthetics in the acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry* **42**, 9167-9175
- Marsh, D., & Barrantes, F. J. (1978) Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4329-4333
- Matthews-Bellinger, J., & Salpeter, M. M. (1978) Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. *J. Physiol.* **279**, 197-213
- Méthot, N., Ritchie, B. D., Blanton, M. P., & Baenziger, J. E. (2001) Structure of the pore-forming transmembrane domain of a ligand-gated ion channel. *J. Biol. Chem.* **276**, 23726-23732
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., & Unwin, N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955
- Mukhtasimova, N., & Sine, S. M. (2007) An intersubunit trigger in the muscle nicotinic receptor. *J. Neurosci.* **27**, 4110
- Narayanaswami, V., Kim, J., & McNamee, M. G. (1993) Protein-lipid interactions and *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor function. 1. Spatial disposition of cysteine residues in the gamma subunit analyzed by fluorescence-quenching and energy-transfer measurements. *Biochemistry* **32**, 12413-12419
- Nurowska, E., & Ruzzier, F. (2002) Modulation of acetylcholine receptor channel kinetics by hydrocortisone. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**, 14-20
- Ochoa, E. L., Chattopadhyay, A., and McNamee, M. G. (1989) Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanism and effect of modulators. *Cell Mol. Neurobiol.* **9**, 141-178

- Ordway, R. W., Singer, J. J., & Walsh, J. V. Jr. (1991) Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.* **14**, 96-100
- Ortells, M. O. (1997) Prediction of the secondary structure of the nicotinic acetylcholine receptor non transmembrane regions. *Proteins* **29**, 391-398
- Ortells, M. O., & Lunt, G. G. (1995) Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* **18**, 121-127
- Ortells, M. O., & Lunt, G. G. (1996) A mixed helix-sheet model of the transmembrane region of the nicotinic acetylcholine receptor. *Protein Eng.* **9**, 51-59
- Ortells, M.O., Barrantes, G. E., Wood, C., Lunt, G. G., & Barrantes, F. J. (1997) Molecular modeling of the nicotinic acetylcholine receptor transmembrana region in the open state. *Protein Eng.* **10**, 511-517
- Ortiz-Miranda, S. I., Lasalde, J. A., Pappone, P. A., & McNamee, M. G. (1997) Mutations in the M4 domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor alter channel opening and closing. *J. Membr. Biol.* **158**, 17-30
- Parasassi, T., De Stasio, G., d'Ubaldo, A., & Gratton, E. (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **57**, 1179-1186
- Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., & Gratton, E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **60**, 179-189
- Petrou, S., Ordway, R. W., Kirber, M. T., Dopico, A. M., Hamilton, J. A., Walsh, J. V. Jr., & Singer, J. J. (1995) Direct effects of fatty acids and other charged lipids on ion channel activity in smooth muscle cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **52**, 173-178
- Prasad, R. (1996) *Manual of Membrane Lipids* (Prasad, R. ed) pp. 1-15, Springer-Verlag, Berlin, Germany

- Prince, R. J., & Sine, S. M. (1998) Epibatidine binds with unique site state selectivity to muscle nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 7843-7849
- Purohit, P., & Auerbach, A. (2007) Acetylcholine receptor gating: movement in the alpha-subunit extracellular domain. *J. Gen. Physiol.* **130**, 569-579
- Purohit, Y., & Grosman, C. (2006) Estimating binding affinities of the nicotinic receptor for low-efficacy ligands using mixtures of agonist and two-dimensional concentration response relationships. *J. Gen Physiol.* **127**, 719-735
- Raftery, M. A., Hunkapiller, M. W., Strader, C. D., & Hood, L. E. (1980) Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* **208**,1454-1457
- Ravichandra, B., & Joshi, P. G. (1999) Gangliosides asymmetrically alter the membrane order in cultured PC-12 cells. *Biophys. Chem.* **76**, 117-132
- Reynolds J. A., & Karlin, A. (1978) Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* **17**, 2035-2038
- Rooney, M. W., Lange, Y., & Kauffman, J. W. (1984) Acyl chain organization and protein secondary structure in cholesterol-modified erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* **259**, 8281-8285
- Rouser G., Fkeischer, A. & Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494–496
- Ryan, S. E., Blanton, M. P., & Baenziger, J. E. (2001) A conformational intermediate between the resting and desensitized states of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 4796-4803
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandram, J., Reale, V., Glencorse, T. A., Seeburg, P. H., &

- Banard, E. A. (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **328**, 221-227
- Shoop, R. D., Yamada, N., & Berg, D. K. (2000) Cytoskeletal links of neuronal acetylcholine receptors containing alpha 7 subunits. *J. Neurosci.* **20**, 4021-4029
 - Simmonds, A. C., East, J. M., Jones, O. T., Rooney, E. K., McWhirter, J., & Lee, A. G. (1982) Annular and non-annular binding sites on the (Ca²⁺ Mg²⁺)-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* **693**, 398-406
 - Sine, M. S., Shen, X-M., Wang, H-L, Lee, W-Y., Tsujino, A., Brengmann, J., Bre, N., Vajsar, J., & Engel, A. G. (2002) Naturally occurring mutations at the acetylcholine receptor binding site independently alter Ach binding and channel gating. *J. Gen Physiol.* **120**, 483-496
 - Sine, S. M., & Steinbach, J. H. (1987) Activation of acetylcholine receptors on clonal mammalian BC3H-1 cells by high concentrations of agonist. *J. Physiol.* **385**, 325-359
 - Sine, S. M., Claudio, T., & 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
 - Sunshine, C., & McNamee, M. G. (1994) Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity. *Biochim. Biophys. Acta* **1191**, 59-64
 - Tamamizu, S., Guzman, G. R., Santiago, J., Rojas, L. V., McNamee, M. G., & Lasalde-Dominicci, J. A. (2000) *Biochemistry* **39**, 4666-4673
 - Tamamizu, S., Lee, Y., Hung, B., McNamee, M. G., & Lasalde-Dominicci, J. A. (1999) Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the alpha M4 transmembrane domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *J. Membr. Biol.* **170**, 157-164

- Trisciuglio, D., Krasnowska, E., Maggi, A., Pozzi, R., Parasassi, T., & Saporà, O. (2002) Phototoxic effect of fluoroquinolones on two human cell lines. *Toxicol. in Vitro* **16**, 449-456
- Unwin, N. (1989) The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* **3**, 665-676
- Unwin, N. (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9Å resolution. *J. Mol. Biol.* **229**, 1101-1124
- Unwin, N. (2003) Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* **555**, 91-95
- Unwin, N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J. Mol. Biol.* **346**, 967-989
- Valera, S., Ballivet, M., & Bertrand, D. (1992) Progesterone modulates neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 9949-9953
- Vest, R., Wallis, R., Jensen, L. B., Haws, A. C., Callister, J., Brimhall, B., Judd, A. M., & Bell, J. D. (2006) Use of steady-state Laurdan fluorescence to detect changes in liquid ordered phases in human erythrocyte membranes. *J. Membr. Biol.* **211**, 15-25
- Villar, M. T., Artigues, A., Ferragut, J. A., & Gonzalez-Ros, J. M. (1988) Phospholipase A₂ hydrolysis of membrane phospholipids causes structural alteration of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **938**, 35-43
- Wang, H. L., Auerbach, A., Bren, N., Ohno K., Engel, A.G., & Sine, S.M. (1997) Mutation in the M1 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit decreases the rate of agonist dissociation. *J. Gen. Physiol* **109**, 757-766
- Wang, H. L., Milone, M., Ohno, K., Shen, X. M., Tsujino, A., Batocchi, A. P., Tonali, P., Brengman, J., Engel, A. G., & Sine, S. M. (1999) Acetylcholine receptor M3 domain: stereochemical and volume contributions to channel gating. *Nat. Neurosci* **2**, 226-233

- Weber, G. (1952) Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method. *Biochem. J.* **51**, 145-155
- Wenz, J. J., & Barrantes, F. J. (2003) Steroid structural requirements for stabilizing or disrupting lipid domains. *Biochemistry* **42**, 14267-14276
- Xu, Y., Barrantes, F. J., Luo, X., Chen, K., Shen, J., & Jiang, H. (2005) Blocking of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel by chlorpromazine, a noncompetitive inhibitor. A molecular dynamics simulation study. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1291-1299
- Yu, X.M., & Hall, Z. W. (1994a) The role of the cytoplasmic domains of individual subunits of the acetylcholine receptor in 43kDa protein-induced clustering in COS cells. *J. Neurosci.* **14**, 785-795
- Yu, X. M., & Hall, Z. W. (1994b) A sequence in the main cytoplasmic loop of the alpha subunit is required for assembly of mouse muscle acetylcholine receptor. *Neuron.* **13**, 247-255
- Zanello, L. P., Aztiria, E., Antollini, S., & Barrantes, F. J. (1996) Nicotinic acetylcholine receptor channels are influenced by the physical state of their membrane environment. *Biophys. J.* **70**, 2155-2164
- Zigmond, M. J., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L., & Squiere, L. R (1999) *Fundamental neuroscience*. Academic Press, San Diego, California, U.S.A.
- Zimmermann, H. (1979) Vesicle recycling and transmitter release. *Neuroscience* **4**, 1773-1804

BUFFER

- Buffer sodio fosfato: 10 mM Na Pi, pH 7,4
- Buffer de homogenización: Na Pi 10 mM, NaCl 0,4 M, EDTA 5 nM, EGTA 5 mM, PMSF 3 mM, NaN₃ 0.02%, pH 7,4
- Buffer de fluorescencia: NaCl 150 mM, MgCl₂ 0.25 mM, HEPES 20 mM , pH 7,4
- Buffer de resuspensión: Na Pi 10 mM, NaCl 0.4 M, EDTA 5 nM, EGTA 5 mM, PMSF 3 mM, NaN₃ 0,02%, sacarosa 30 %, pH 7,4
- Buffer sacarosa: Na Pi 10 mM, NaCl 0.4 M, EDTA 5 nM, pH 7,4 sacarosa 35 % - 39 % - 50 %, pH 7,4
- Buffer proteinasa K: Buffer Na Pi 10 mM , 1 mM CaCl₂, pH 8
- Buffer de hidrólisis PLA₂: Buffer Na Pi 10 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KCl 35 mM, pH 8,0
- Buffer inhibición PLA₂: Buffer Na Pi 10 mM , 3 mM EGTA, pH 7,4
- Buffer de solubilización: Buffer Na Pi 10 mM, pH 7,4, colato sódico 1%
- Buffer de diálisis: 100 mM Na Cl, 10 mM Tris-HCL, 0,1 mM EDTA, 0.02% NaN₃, pH = 7,8
- Buffer hidrocloreuro de cistamina: 20 mg / mL en buffer Na Pi 0,1 M, pH 7,4
- Buffer DTT: 1,4 g de ditioneitol (DTT) en Buffer Na Pi
- Buffer de elución: 250 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.02% NaN₃, 5mM fosfato, 0.5% colato, 10 mM de carbamilcolina, pH 7,8
- Buffer de almacenaje de columna: 5,74 mL de ácido acético concentrado, 5 mL de NaN₃ al 4% y 0.5 g de iodoacetamina, llevar a 1000mL
- DTNB solución stock: 39.6 mg en 10 mL en agua desionizada, pH = 7
- Solución decolorante: 11,5 mL de metanol, 18,75 mL de ácido acético glacial, agua destilada c.s.p. 250 mL
- Solución Coomassie blue: 0,05 % de Coomassie blue brillant, 25 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial, 65 mL de agua destilada

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS ORIGINADAS EN ESTA TESIS

PUBLICACIONES

1. “Conformation-sensitive steroid and fatty acid sites in transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor”. Fernández Nievas, G.A.; Barrantes, F.J.; Antollini, S.S. (2007) *Biochemistry* **46**,3503-12.

2. “Modulation of nicotinic acetylcholine receptor conformational state by free fatty acids and steroids”. Fernández Nievas, G.A.; Barrantes, F.J.; Antollini, S.S. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 21478-21486

COMUNICACIONES A CONGRESOS

“Interacciones de esteroides con membranas nativas de *T. californica* ricas en receptor de acetilcolina nicotínico”. G. Fernández Nievas, F. J. Barrantes y S. S. Antollini. Congreso conjunto de sociedades biomédicas, 16-20 de noviembre 2004, Mar del Plata, buenos Aires, República Argentina. Poster: 752. PUBLICADO EN: *Medicina* 2004 Vol. 64 (supl. II), pp 288.

“Estudios a nivel molecular de la interacción entre el receptor de acetilcolina nicotínico y compuestos altamente hidrofóbicos en membranas de *T. californica*.” G. Fernández Nievas, F. J. Barrantes y S. S. Antollini. III Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Comunicación oral C-35. 17-19 de agosto de 2005.

“Adaptación conformacional del receptor de acetilcolina nicotínico a su entorno lipídico”
Antollini, S.S., Fernández Nievas, G.A., Barrantes, F.J. III Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Comunicación oral C-36. 17-19 de agosto de 2005.

“Interactions between highly hydrophobic molecules and the acetylcholine receptor in native system”. G. Fernández Nievas, S. S. Antollini. Congreso conjunto de Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology; Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular y Sociedad Argentina de Neuroquímica. 3-6 de diciembre de 2005, Pinamar, Buenos Aires, República Argentina. Poster NR-P6. PUBLICADO EN: Biocell, 29 (2005).

“Conformational rearrangement of the nicotinic acetylcholine receptor induced by its lipid environment” Antollini, S.S., Fernández Nievas, G.A., Barrantes, F.J. Congreso conjunto de Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology; Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular y Sociedad Argentina de Neuroquímica. 3-6 de diciembre de 2005, Pinamar, Buenos Aires, República Argentina.

“Señal lipídica inductora de cambios conformacionales del receptor de acetilcolina nicotínico. Estudio de un mecanismo de acción” Antollini, Silvia S.; Fernández Nievas, G.A.; Barrantes, F.J. 2º Workshop Argentino de Química Medicinal Profesor. Dr. Esteban A. Jáuregui. 11 y 12 de septiembre de 2006. San Luis, Argentina.

“Different conformational changes of AChR induced by steroids and free fatty acids”
Fernández Nievas, G.A; Antollini S.S.; Barrantes F.J. XLII Reunión annual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, SAIB. 12 al 15 de noviembre de 2006. Rosario, Argentina.

“Estudio del mecanismo de acción de inhibidores no competitivos de baja afinidad del receptor de acetilcolina nicotínico” Fernández Nievas, G.A.; Antollini, S.S.; Barrantes F.J. I Reunión Latinoamericana de Química Medicinal. 22-25 de abril de 2007, Montevideo, Uruguay.

“Conformational equilibrium changes of AChR induced by steroids and free fatty acids” Fernández Nievas, G.A.; Antollini, S.S.; Barrantes F.J. 6TH International Conference of Biological Physics. 27-31 de agosto de 2007, Montevideo, Uruguay.

“Modulation of nicotinic acetylcholine receptor conformational state by free fatty acids and steroids” Fernández Nievas, G.A.; Antollini, S.S.; Barrantes F.J. XIII International symposium on cholinergic mechanism. 16-20 de agosto de 2008. Foz do Iguazu, Brasil.