



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS

DOCTOR EN BIOQUIMICA

“Caracterización del mecanismo de endocitosis del AChR expresado en células CHO-K1/A5 y su modulación por el colesterol”

María Virginia Borroni

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2008

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Francisco José Barrantes

PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente de la Universidad Nacional del Sur y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 9 de noviembre de 2004 y el 1 de diciembre de 2008, bajo la dirección del Dr. Francisco J. Barrantes.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

1 de diciembre de 2008.

María Virginia Borroni

AGRADECIMIENTOS

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

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

A mi mamá, mi hermana, mis abuelos y a todos los integrantes de la flia. Arias, por que con su cariño y apoyo facilitaron el desarrollo de ésta vocación.

A la abuela, por incentivar me siempre e inspirarme para seguir el camino de la ciencia.

A Gonzalo y a Paz, por su paciencia y sobre todo por ponerle color a mis días.

A todos los que con su ayuda hicieron posible este trabajo.

Virginia

Resumen

El receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) es un canal iónico de la familia de canales iónicos activados por ligando (LGIC) que está presente en el sistema nervioso central y en la unión neuromuscular (UNM). Su estabilidad en la membrana celular es importante, ya que determina el nivel de respuesta colinérgica y puede ser alterada ante diversas situaciones fisiológicas y patológicas.

Se ha propuesto que la endocitosis del AChR es el mecanismo más importante de neuromodulación de la UNM y de sinapsis centrales, tanto en condiciones fisiológicas como en diversas patologías. En este trabajo estudiamos la endocitosis del AChR heterológamente expresado en células CHO-K1. Demostramos que la unión del antagonista competitivo α -bungarotoxina (α BTX) o el entrecruzamiento con anticuerpos induce la internalización de los AChR de la superficie celular. Este proceso ocurre en dos etapas: primero los complejos AChR- α BTX son secuestrados en un compartimiento tubular conectado con la superficie, como lo demuestra la diferente accesibilidad de la α BTX fluorescente unida al AChR a sondas de alto y bajo peso molecular. Subsecuentemente el AChR es internalizado a través de un mecanismo independiente de clatrina, de dinamina y de caveolina. La desorganización de la actina inhibe estos dos procesos, lo que indica que ambos requieren la integridad del citoesqueleto.

La función del AChR depende de la composición de los lípidos que lo rodean en la membrana y entre éstos el colesterol (Col) parece ser necesario para mantener la estructura del AChR (revisión en Barrantes, 2007). El Col también es necesario para la formación y estabilización de los agregados del AChR en la membrana de células C2C12. Debido a la importancia de este lípido sobre distintos aspectos del AChR estudiamos su influencia en la estabilidad del receptor en la membrana de las células CHO-K1/A5. Descubrimos que la depleción de Col (Col⁻) mediada por ciclodextrinas acelera la internalización del AChR en una forma dependiente de la dosis (Borroni et al., 2007). Experimentos realizados con una proteína dominante negativa de dinamina (dinK44A-HA) y una forma truncada de Eps15 (Eps15 95 Δ 295) indicaron que la internalización del

AChR en células Col⁻ es independiente de clatrina y de dinamina. El bloqueo de la funcionalidad de la GTPasa Arf6 por la expresión de una versión dominante negativa de dicha proteína (Arf6 T27N-HA) demostró que la depleción de Col vuelve la internalización del AChR sensible a la actividad de Arf6. La inhibición de la formación de ácido fosfatídico con alcoholes primarios también disminuyó la endocitosis del AChR en células Col⁻ indicando la importancia de este lípido. Al igual que en células con niveles normales de Col, la internalización del AChR en células Col⁻ depende de la actividad de la pequeña GTPasa Rac1. Sin embargo, ni el secuestro del PI4,5P₂ a través de la sobreexpresión de la proteína de fusión del dominio PH de la fosfolipasa C δ , PH-PLC δ -GFP, ni la desorganización del citoesqueleto a través de agentes farmacológicos afectaron la internalización del AChR en condiciones de depleción de Col celular. Estos resultados resaltan la importancia del Col como modulador de la estabilidad del AChR en la membrana.

Abstract

The nicotinic acetylcholine receptor (AChR) is an integral membrane protein belonging to the superfamily of the ligand-gated ion channel. present at the neuromuscular junction and central nervous synapses. Its stability at the cell membrane is important in determining cholinergic responses and can be altered under pathological conditions.

El receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) es una proteína integral de membrana de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (LGIC). Está presente en el sistema nervioso central y en la unión neuromuscular (UNM). Su estabilidad en la membrana celular es importante, ya que determina el nivel de respuesta colinérgica y puede ser alterada ante diversas situaciones fisiológicas y patológicas.

Endocytosis of the AChR is proposed to be a major mechanism of neuromodulation at neuromuscular junctions and in the pathology of synapses in the central nervous system. Here we have studied the endocytosis of AChR heterologously in CHO-K1 fibroblasts. Binding of the competitive antagonist α -bungarotoxin (α BTX) or antibody-mediated crosslinking induces the internalization of cell-surface AChR to late endosomes. Internalization occurs via sequestration of AChR- α BTX complexes in narrow, tubular, surface-connected compartments, as indicated by differential surface-accessibility of fluorescently-tagged α BTX-AChR complexes to small and large molecules. Internalization takes place by a clathrin and caveolin-independent pathway, and does not require the function of dynamin. However the integrity of the actin cytoskeleton is required for AChR sequestration and internalization since perturbation of actin polymerization inhibits these processes. This pathway resembles a recently elucidated dynamin-independent internalization mechanism employed for down-regulation of long-term resident plasma membrane proteins, and may provide insights into AChR dynamics at ligand-gated synapses and in pathological conditions such as the autoimmune disease myasthenia gravis.

Proper function of the AChR depends on the composition of surrounding lipids, and among these, cholesterol (Chol) appears to be necessary for ion translocation and formation and maintenance of AChR clusters (reviewed by Barrantes, 2007). Here we study the modulation of surface AChR stability by Chol. We demonstrate that Chol depletion (Chol⁻) accelerates AChR internalization (Borroni et al., 2007) in a dose dependent manner. Experiments with a dominant negative mutant of dynamin (dynK44A-HA) or a truncated form of Eps15 (Eps15 95Δ295) indicated that receptor internalization in Chol⁻ cells is clathrin⁻ and dynamin⁻independent. A dominant negative (Arf6 T27N-HA) or a constitutive active mutant (Arf6Q67L-HA) of the GTPase Arf6 showed that Chol⁻ routes AChR to an Arf6⁻dependent pathway which does not operate at normal Chol levels. Transient expression of the dominant negative form of Rac1, Rac1N17, showed that the endocytic pathway also requires this small GTPase. Inhibition of phosphatidic acid production by PLD also decreases the endocytosis of AChR in Chol⁻ cells. Neither the PI(4,5)P₂ sequestration by overexpression of PH-PLCδ-GFP nor pharmacological disruption of the actin cytoskeleton affected the accelerated AChR endocytosis. These results highlight the importance of Chol in modulating AChR endocytosis and thus contributing to the maintenance of functional receptor levels at cell membrana.

PREFACIO	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	V
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	4
La comunicación celular	5
La sinapsis y sus componentes	5
Estructura del AChR.....	7
<i>El AChR y el colesterol</i>	9
<i>Formación de la unión neuromuscular</i>	10
<i>Dinámica del AChR en la UNM</i>	11
Mecanismos endocíticos	12
<i>Endocitosis mediada por clatrina</i>	14
Clatrina y proteínas ensambladoras	14
Dinamina.....	16
Eps15 y Epsina.....	17
Reclutamiento de proteínas a internalizar.....	17
<i>Endocitosis independiente de clatrina</i>	18
Vías dependientes de dinamina.....	18
Endocitosis mediada por caveola	18
Endocitosis regulada por RhoA	20
Vías independientes de dinamina.....	20
Endocitosis regulada por cdc42.....	20
Endocitosis regulada por Arf6.....	21
Reclutamiento de proteínas a internalizar.....	21
Mecanismos basados en proteínas.....	21
Mecanismos basados en lípidos.....	22
Compartimentos endocíticos.....	23
Rol de los lípidos en la endocitosis.....	25
<i>Fosfoinosítidos</i>	25
<i>Colesterol</i>	26
Citoesqueleto y endocitosis	27
Pequeñas proteínas con actividad GTPasa.....	29
<i>GTPasas de la familia Rho</i>	30
<i>GTPasas de la familia Rab</i>	30
<i>GTPasas de la familia Arf</i>	31
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Materiales.....	33

Cultivo celular y transfección de células	33
Derivatización de α BTX con sondas fluorescentes	34
Microscopia de fluorescencia	34
Microscopia Confocal	35
Análisis cuantitativo de imágenes.....	35
Marcación de AChR en células vivas	35
Depleción de colesterol.....	36
<i>Tratamiento con metil-β-ciclodextrina (MβCDx):</i>	36
<i>Tratamiento con nistatina:</i>	37
<i>Determinación del contenido de colesterol en la membrana celular</i>	37
Accesibilidad de AChR marcado con b-Cy3 α BTX a moléculas de bajo peso molecular (extinción de fluorescencia con KI).....	38
Accesibilidad de AChR marcado con Cy3- α BTX-biotina a moléculas de alto peso molecular (estreptavidina-Cy5)	39
Experimentos de colocalización	39
Inhibición de dinamina	40
Disrupción del citoesqueleto:.....	40
Efecto de Arf6 sobre la internalización del AChR	41
Efecto de Rac1 sobre la internalización del AChR.....	42
Inhibición de la formación de ácido fosfatídico	42
Reciclado del AChR	43
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ENDOCITOSIS DEL ACHR EN CÉLULAS CHO-K1/A5	45
Resultados.....	46
<i>αBTX induce la internalización del AChR en células CHO-K1/ A5</i>	46
<i>Determinación de la cinética de internalización del AChR</i>	50
<i>Reciclado del AChR</i>	55
<i>Colocalización con marcadores de organelas celulares</i>	56
<i>Inhibición de dinamina</i>	60
<i>Inhibición de Arf6</i>	63
<i>Influencia del citoesqueleto</i>	64
Discusión	68
CAPÍTULO II: MECANISMO DE ENDOCITOSIS DEL ACHR Y SU MODULACIÓN POR EL COLESTEROL	76
Resultados.....	77
<i>El tratamiento con MβCDx cambia la distribución celular del AChR</i>	77
<i>El tratamiento con MβCDx disminuye los niveles de AChR y colesterol de la superficie celular en una forma dependiente de la dosis</i>	79
<i>La depleción de colesterol acelera la velocidad de endocitosis del AChR</i>	81
<i>La nistatina también acelera la internalización del AChR</i>	84

<i>El AChR es transportado a una población distinta de endosomas</i>	85
<i>La internalización del AChR inducida por la depleción de colesterol es independiente del citoesqueleto de actina</i>	86
<i>La internalización del AChR inducida por la depleción de colesterol procede en forma independiente de dinamina y de clatrina.....</i>	93
<i>La endocitosis del AChR inducida por MβCDx es dependiente de Arf6.....</i>	94
<i>La endocitosis del AChR inducida por MβCDx es dependiente de Rac1.....</i>	97
<i>La endocitosis del AChR inducida por MβCDx es dependiente de la actividad de la PLD.....</i>	98
Discusión	101

Abreviaturas

α BTX = α -bungarotoxina.
ACh = acetilcolina.
ANHT dominio homólogo de la región N-terminal de AP180.
AChR = receptor de acetilcolina nicotínico.
AMPA = ácido γ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxanolpropiónico.
AP = proteínas ensambladoras o adaptadoras.
Arf6 = factor de ADP-ribosilación 6.
ATP = adenosina trifosfato.
BFA = brefeldina A.
CCD = dispositivo de cargas interconectadas.
CCP = huecos de clatrina.
CCV = vesícula recubierta de clatrina.
CHX = cicloheximida.
CIE = endocitosis independiente de clatrina.
CME = endocitosis mediada por clatrina.
Col = colesterol.
C-terminal = carboxilo-terminal.
CtxB = subunidad B de la toxina colérica.
Cy = cianina.
D.E. = desvío estandar.
DMSO = dimetilsulfóxido.
EE = endosoma temprano.
EEA1 = antígeno de endosomas tempranos 1.
EGFR = receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EPS 15 = sustrato 15 del receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EH = dominio homólogo de Eps15.
ENTH = dominio homólogo a la región N terminal de epsina.
ERC = compartimiento de reciclaje endocítico.
din = dinamina.
fPEG-Col = fluoresceína polietilenglicol colesterol.
FRAP = recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueado.
°C = grados centígrados.
GalT = galactosil transferasa
GAP = proteína activadora de GTPasa.
GABA = ácido γ -aminobutírico.
GDI = proteínas inhibitoras de la disociación del GDP.
GEF = factores de intercambio de nucleótidos.
GED = dominio efector de GTPasa.
GFP = proteína fluorescente verde.
GPI-AP = proteínas ancladas por glicosil fosfatidil inositol.

GTP = guanosina trifosfato.
h = hora.
hs = horas.
Lamp1 = proteína asociada a membranas de lisosomas
LE = endosoma tardío.
LGIC = canales iónicos activados por ligandos.
 μM = micromolar.
M1 = segmento transmembranal M1.
M2 = segmento transmembranal M2.
M3 = segmento transmembranal M3.
M4 = segmento transmembranal M4.
M1 = medio 1.
min = minutos.
mM = milimolar.
M β CDx = metil- β -ciclodextrina.
MHC-I moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.
MVB = cuerpo multivesicular.
N.A. = apertura numérica.
nm = nanometros.
MuSK = receptor de tirosina quinasa específico de músculo.
NMDA = N-metil-D-aspartato.
NPF = asparragina-prolina-fenilalanina.
N-terminal = amino terminal.
N-Wasp = proteína neural del síndrome de Wiskott-Aldrich.
PA = ácido fosfatídico.
Paks = quinasas activadas por p21.
PF = paraformaldehído.
PI_{4,5}P₂ = fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.
PI_{3,5}P₂ = fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato.
PIP5K = fosfatidil inositol 4 fosfato 5 quinasa.
PH = dominio homólogo de plekstrina.
PKC = protein quinasa C.
PRD = dominio rico en prolina/arginina.
Rac1 = sustrato de toxina botulínica C3 relacionado con Ras.
SA = estreptavidina.
SE = endosoma de selección.
SNC = sistema nervioso central.
5HT₃ = 5 hidroxitriptamina 3A.
Tfr = transferrina.
TGN = red trans Golgi.
UNM = unión neuromuscular.

Introducción

La comunicación celular

Todos los organismos están expuestos a cambios en el medio ambiente que los rodea; la posibilidad de adaptarse a esos cambios es lo que les garantiza la supervivencia. Las células deben poseer entonces la capacidad de intercambiar información con el medio ambiente y con otras células. Para esto es necesario que cuenten con sistemas de recepción, generación, transmisión y respuesta para una multitud de señales que las comuniquen e interrelacionen funcionalmente entre sí. La comunicación celular puede establecerse de distintas formas (Figura 1) que incluyen: a) conexión directa a través de uniones estrechas ("*gap junctions*") que permiten el intercambio de sustancias de bajo peso molecular entre los citoplasmas de células adyacentes; b) contactos célula-célula: la señal permanece anclada a la membrana de la célula emisora mientras interactúa con la célula receptora a través de moléculas de adhesión celular; c) liberación por parte de una célula emisora de señales químicas como hormonas, neurotransmisores y factores tróficos que actúan sobre una célula blanco en la que encuentran receptores específicos. La célula blanco puede ser la misma célula emisora (comunicación autócrina), células vecinas (comunicación parácrina) o células lejanas (comunicación endocrina).

La sinapsis y sus componentes

En el sistema nervioso la comunicación se lleva a cabo en regiones especializadas denominadas sinapsis. En la sinapsis se encuentran todos los elementos básicos necesarios para la comunicación: un terminal presináptico que actúa como emisor de un mensaje y un terminal postsináptico que actúa como receptor. Existen dos tipos de sinapsis que difieren en su estructura y en la forma en que transmiten el impulso nervioso:

-Sinapsis eléctricas: transmiten y sincronizan mensajes eléctricos en forma rápida. Morfológicamente corresponden a las uniones estrechas en las que las membranas plasmáticas de los terminales presináptico y postsináptico están ubicadas a una distancia de 2 a 3 nm y se encuentran conectadas por canales. Estos canales, al

adoptar la configuración abierta permiten el libre flujo de iones desde el citoplasma del terminal presináptico hacia el citoplasma del terminal postsináptico, transmitiendo en forma prácticamente instantánea los cambios eléctricos de una célula a otra.

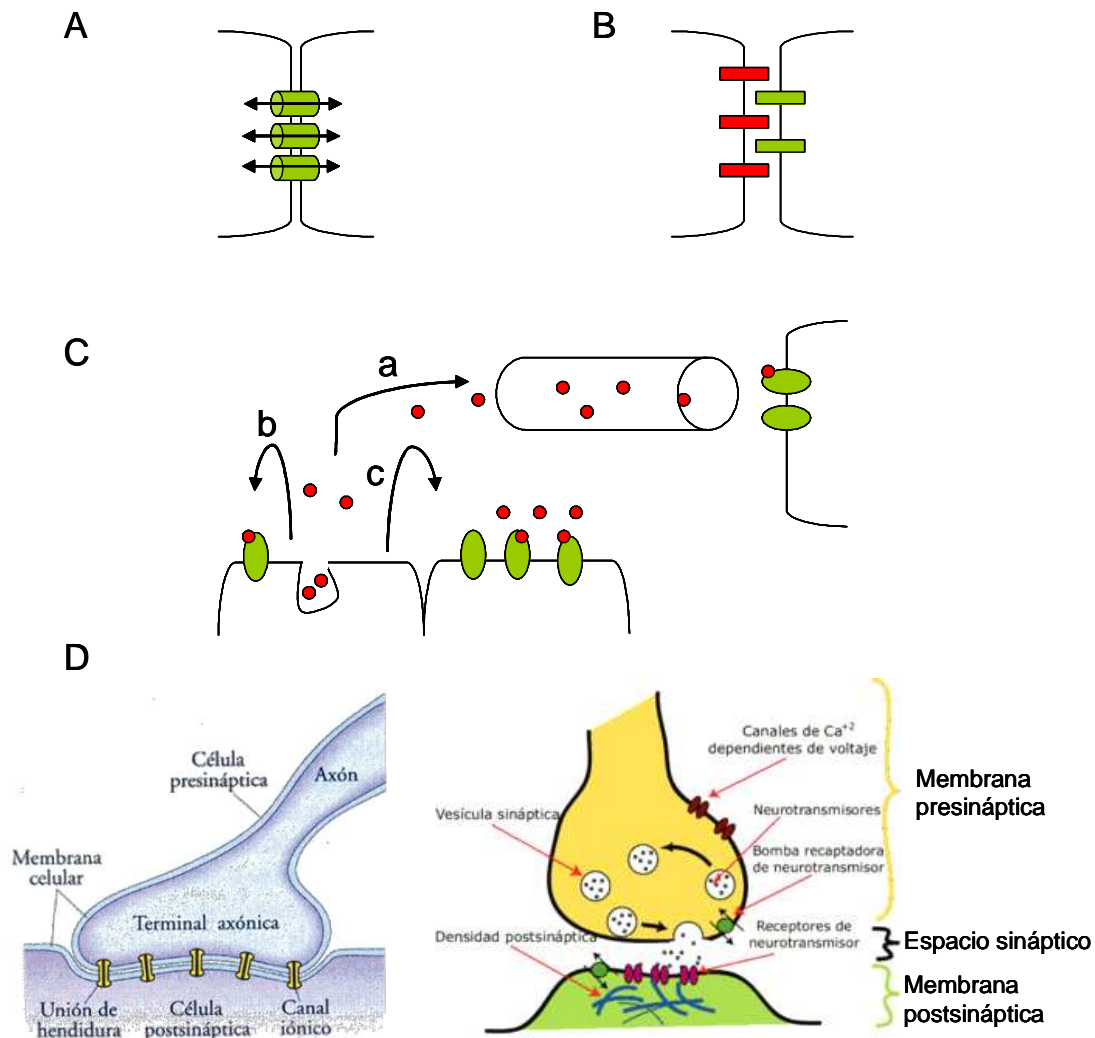


Figura 1. Mecanismos de comunicación celular. A) las uniones gap permiten el paso uni o bidireccional de solutos entre dos células a una distancia de ~2 nm. B) contacto célula-célula: se conectan dos células a través de moléculas específicas de adhesión. C) comunicación a través de mensajeros químicos, a) endócrina, b) autócrina o c) parácrina. D) Esquema de una sinapsis eléctrica y una sinapsis química.

-Sinapsis químicas: en este caso el mensaje transmitido está codificado en una sustancia química llamada neurotransmisor. Las membranas de los terminales presináptico y postsináptico están engrosadas y las separa un espacio intercelular de 20-30 nm de ancho, la hendidura sináptica. Ante la llegada de un estímulo, el terminal presináptico libera el neurotransmisor al espacio sináptico desde donde difunde hasta

encontrarse con su receptor en el terminal postsináptico. La unión del neurotransmisor al receptor produce la respuesta.

Numerosas sustancias de distinta naturaleza química actúan como neurotransmisores, entre las que se incluyen: ésteres como acetilcolina (ACh) , aminas como dopamina, noradrenalina y serotonina, aminoácidos como glicina, ácido γ -aminobutírico (GABA) y glutamato, péptidos como las encefalinas y endorfinas y las purinas como adenosina.

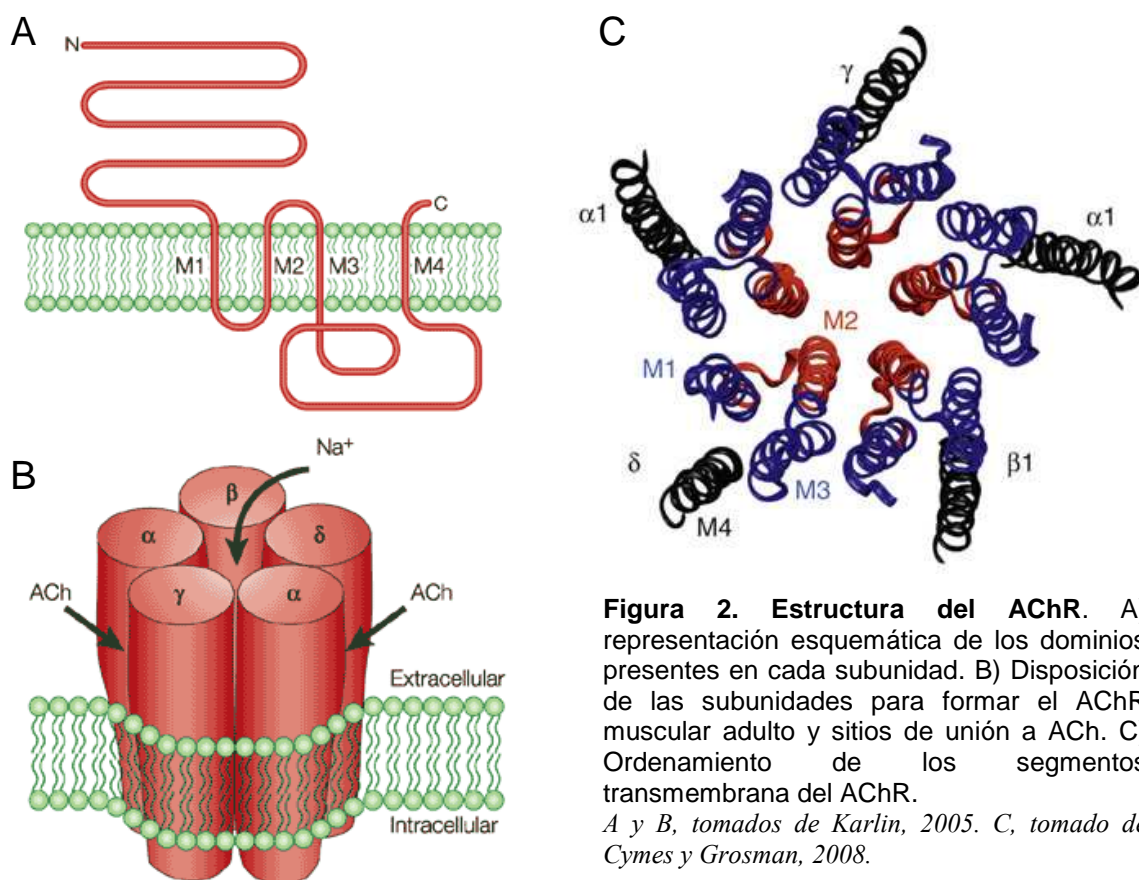
Los receptores de neurotransmisores funcionan como transductores de la señal química. Hay dos tipos principales de receptores, metabotrópicos e ionotrópicos, que difieren en su estructura y en su tiempo de respuesta. Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y producen segundos mensajeros por lo que su tiempo de respuesta es más lento (min a hs). Entre ellos se encuentran los receptores metabotrópicos del glutamato, de GABA-B, de serotonina y receptores muscarínicos de ACh. Los receptores ionotrópicos, en cambio, producen una respuesta rápida (del orden de los msec) al abrir o cerrar canales iónicos. Es el caso de la superfamilia de receptores activados por ligando ("LGIC") formada por familias de receptores relacionados estructuralmente. Entre ellos se encuentran los receptores ionotrópicos de glutamato, AMPA, NMDA y kainato, los receptores activados por ATP, y los receptores de GABA-A, de glicina, de serotonina 5-HT₃ y el receptor de ACh nicotínico (AChR). A este último grupo también se los conoce como familia de receptores de lazo de cistina 'Cys-loop'. Estos receptores comparten en su estructura la presencia de un lazo de trece aminoácidos formado por la unión de dos residuos de cisteína a través de un puente disulfuro (1). El AChR es el receptor mejor caracterizado dentro de esta familia y se ha convertido en el prototipo de LGIC (2).

Estructura del AChR

El AChR es una proteína integral de membrana formada por 5 subunidades con alta homología. Se expresa en la unión neuromuscular (UNM) y en el sistema nervioso central (SNC). En el SNC existen 14 subtipos de receptor identificados a la fecha,

constituidos por subunidades α y no α , así como homopentámeros formados por subunidades α solamente (3). Los AChR neuronales son permeables al Ca^{2+} y se cree que actúan principalmente modulando la liberación de neurotransmisores (4). El AChR muscular es un heteropentámero formado por cuatro subunidades diferentes acopladas en estequiometría $\alpha 2\beta\gamma\delta$ (receptor embrionario) o $\alpha 2\beta\epsilon\delta$ (receptor adulto).

La estructura del AChR puede dividirse en tres dominios: un dominio extracelular, un dominio transmembrana que forma el canal y un dominio citoplasmático. Cada subunidad contiene los extremos amino- y carboxi- terminal extracelulares, siendo más largo el extremo amino. Posee además cuatro segmentos transmembrana (M1–M4) conectados por segmentos citoplasmáticos de diversas longitudes (Figura 2A). El AChR de tipo muscular posee dos sitios de unión de ligandos (agonistas y antagonistas competitivos) que se encuentran en las interfaces de la subunidades α - γ/ϵ y α - δ (Figura 2B).



Tres anillos concéntricos pueden distinguirse en la región transmembrana del AChR (5,6). Los segmentos M2 de todas las subunidades delinean las paredes del canal y forman el anillo interno; M1 y M3 constituyen el anillo medio, y los segmentos M4 forman el anillo externo, el cual está en contacto con los lípidos de la membrana (Figura 2C). La unión de la ACh al AChR induce un cambio conformacional que se transmite al resto de la estructura de la proteína y abre el canal central a través del cual circulan cationes. Esta entrada de cationes produce la despolarización de la membrana postsináptica.

El AChR y el colesterol

La función del AChR depende del ambiente lipídico que lo rodea y de las interacciones lípido–proteicas que pueda establecer. Se ha postulado que estas interacciones son necesarias para estabilizar la estructura secundaria requerida para la función del canal iónico (7). Entre los lípidos, el colesterol (Col) ha mostrado ser esencial para preservar y modular la función del AChR (5–11). Este efecto del Col podría deberse a la unión específica del Col al AChR (12), o a la modulación que el Col ejerce sobre las propiedades biofísicas de la membrana (13). Muchos trabajos han identificado sitios de unión de Col al AChR (12) y recientemente se ha determinado por simulaciones que en ausencia de Col la estructura del AChR colapsa (14).

Además de los efectos ejercidos sobre la funcionalidad del canal iónico, el Col también regula los procesos de ensamblado, tráfico, inserción y estabilidad en la membrana del AChR en diversos tipos celulares. Niveles adecuados de Col son necesarios para la estabilidad en la membrana del AChR neuronal de tipo $\alpha 7$ en espinas somáticas de neuronas ciliares (15). En células musculares C2C12, se demostró la importancia del Col en la formación y estabilidad de los agregados de AChR en la superficie celular (16–19). Este mismo fenómeno se observó en células CHO–K1/A5, en donde el AChR forma agregados del orden de los nanómetros, cuya distribución depende del contenido de Col en la membrana (20). En estas mismas células también se demostró que la depleción crónica de Col, detiene el tráfico exocítico del AChR en el aparato de Golgi (21).

Formación de la unión neuromuscular

En la membrana postsináptica de la UNM adulta el AChR forma agrupamientos con elevada densidad de receptores (22). La diferenciación de la UNM es un proceso coordinado entre las terminales nerviosas y la fibra muscular (Figura 3,(23). En una primera etapa, el AChR es agregado en la membrana de la región central de la célula muscular, independientemente de la actividad de la terminal nerviosa (24). Para la formación de estos agregados, que sirven como guía para la formación de la sinapsis, es necesaria la actividad del receptor de la tirosina quinasa específico de músculo (MuSK-R) y la presencia de rapsina.

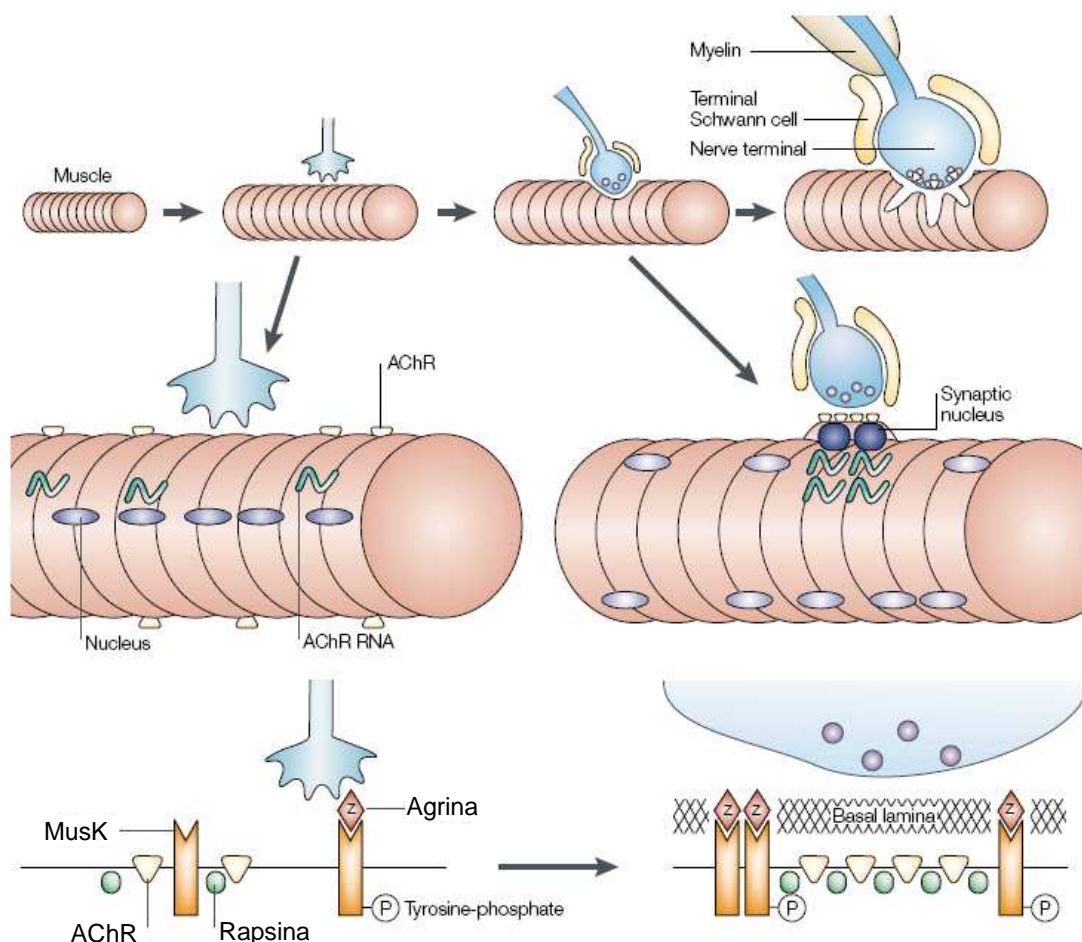


Figura 3. Agregación del AChR durante el desarrollo de la UNM. El axón de la neurona motora hace contacto con el miofibrilo en las áreas en donde se pre-agrega el AChR. La liberación de ACh estabiliza este contacto sináptico aumentando la estabilidad de los AChR en esta zona. Agrina por su parte, induce la agregación de los receptores a través de la activación de MusK y la intervención de rapsina. Asimismo, aumenta la síntesis de las subunidades de AChR por parte de los núcleos subsinápticos. Estos efectos locales llevan a la formación de agregados de AChR en la zona sináptica. Tomado de Sanes y Lichtman, 2001.

Subsecuentemente, la liberación de ACh por la terminal nerviosa motora genera potenciales postsinápticos que regulan positivamente la estabilización y localización de los contactos sinápticos. Asimismo, la ACh promueve la dispersión de los AChR no sinápticos (25,26). Por último, la liberación de agrina por parte de la terminal nerviosa aumenta la activación de MusK y la acumulación y estabilidad de los AChR en la sinapsis, contrarrestando el efecto de la ACh (27–30). La activación de MusK por su parte, desencadena una cascada de señales que reorganizan el citoesqueleto de actina (31). La interacción de los AChRs con el citoesqueleto de actina favorece la agregación y restringe la difusión de los receptores en la membrana (32,33).

Recientemente se ha propuesto que la asociación del AChR con dominios lipídicos ricos en Col y esfingolípidos también regularía la formación y estabilidad de los agregados de AChR (18,19). Se observó que la depleción de Col reduce el número de agregados del orden de micrones del AChR en miotubos e induce la fragmentación de los agregados preexistentes (18,19,34).

Dinámica del AChR en la UNM

El mantenimiento de un número adecuado de AChRs en la membrana postsináptica de la UNM adulta es necesario para el correcto funcionamiento del mecanismo de contracción muscular. Esto resulta evidente en la enfermedad autoinmune miastenia gravis, en donde la disminución del número de AChR en la membrana de la célula muscular provoca los síntomas de debilidad muscular característicos de esta enfermedad (35).

En la UNM adulta, la estabilidad del AChR en la membrana depende de la actividad sináptica. Por ejemplo, luego de la denervación del músculo, la vida media del AChR disminuye de 2 semanas a 1–3 días (36–40) mientras que el bloqueo del receptor con α bungarotoxina (α BTX) o curare la disminuye a algunas horas (41). Esta pérdida de AChR puede prevenirse por la estimulación directa del músculo o restaurando la actividad sináptica (39,41,42).

El AChR internalizado puede degradarse o volver a la membrana de nuevo en un proceso conocido como reciclaje (43,44). Estos AChR reciclados se reinsertan en la

membrana y son internalizados más rápidamente que los AChR preexistentes. El bloqueo de la actividad también modula los AChR reciclados, en este caso disminuyendo su inserción en la membrana postsináptica. Esta modulación podría estar mediada por el ingreso de Ca^{2+} asociado a la actividad del AChR (43,44).

En células C2C12, el AChR tiene una vida media más corta, aproximadamente 6 hs y su estabilidad es modulada por la unión de ligandos (45). Sin embargo, en estas células el AChR no recicla, sugiriendo que este proceso requiere algún factor neural, todavía no identificado. La inserción de nuevos receptores es entonces, el mecanismo principal que compensa la internalización, para mantener el número de AChR en la membrana en ausencia de inervación (43,44).

Pese a conocerse la cinética de internalización y reciclado del AChR en diversos sistemas, poco se sabe del mecanismo por el cual están ocurriendo estos procesos. Existen en las células diversos mecanismos de internalización, que contribuyen a la regulación de la dinámica y composición de la membrana celular. En la sinapsis, por ejemplo, la magnitud de la respuesta dependerá de la cantidad de neurotransmisor liberada y del número de receptores disponibles para ser activados en la membrana postsináptica. Los factores que determinen el número de receptores presentes en la superficie celular, serán entonces fundamentales para precisar el nivel de la respuesta.

En muchos casos este proceso es regulado por la unión del neurotransmisor al receptor quien después de activarlo induce su internalización. Esta endocitosis inducida por el ligando se ha observado en el caso del receptor de GABA, del receptor de glutamato en sus dos subtipos –AMPA y NMDA– del receptor de la glicina, y como se explicara anteriormente, del AChR. Se cree que este proceso contribuye a la plasticidad sináptica, expresión celular del aprendizaje y la memoria.

Mecanismos endocíticos

El proceso por el cual las células internalizan moléculas, macromoléculas o partículas se denomina endocitosis (Figura 3). La endocitosis puede ocurrir por diversos mecanismos que se dividen en dos grandes categorías: fagocitosis y pinocitosis. La

fagocitosis es la internalización de partículas de gran tamaño ($> 200 \mu\text{m}$) como bacterias o restos celulares y ocurre en células especializadas como macrófagos, monocitos y neutrófilos (46). La pinocitosis, en cambio, es la internalización de partículas más pequeñas ($< 200 \mu\text{m}$), ocurre en todas las células e incluye varios mecanismos diferentes: macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina (CME), endocitosis independiente de caveola y endocitosis independiente de clatrina y de caveola.

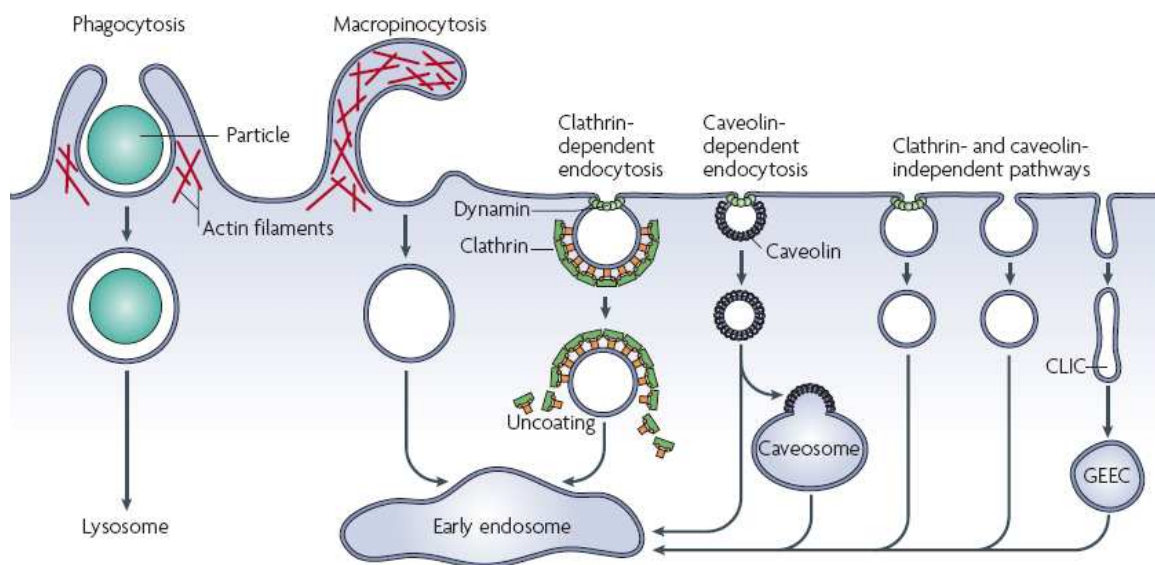


Figura 3. Mecanismos de entrada de material a la célula. Partículas grandes como las bacterias, por ejemplo, pueden ser tomadas por la célula por el mecanismo de fagocitosis, mientras que la mayor parte del fluido es incorporado por pinocitosis. Las moléculas más pequeñas son captadas por endocitosis, la cual comprende las vías dependiente de clatrina e independiente de clatrina. Dentro de este último grupo han sido descritos diversos mecanismos con distintos requerimientos moleculares. El material internalizado es transportado a los endosomas tempranos a través de vesículas (vesículas recubiertas de clatrina o caveolina) o túbulos (transportadores independientes de clatrina y dinamina, CLIC) derivados de la membrana plasmática. Algunas vías pueden pasar primero por compartimentos intermedios como el caveosoma o el compartimento endosomal enriquecido en GPI-AP (GEEC). Tomado de Mayor y Pagano, 2007.

Para facilitar su descripción y estudio, Mayor y Pagano (2007) propusieron clasificar los distintos mecanismos endocíticos en base a su dependencia respecto a clatrina, luego en base al mecanismo utilizado para el desprendimiento de las vesículas de la membrana y por último a algún componente molecular indispensable y característico del camino, como la necesidad de una GTPasa (Figura 4). De esta forma sencilla, quedan evidenciados los requerimientos moleculares de cada mecanismo.

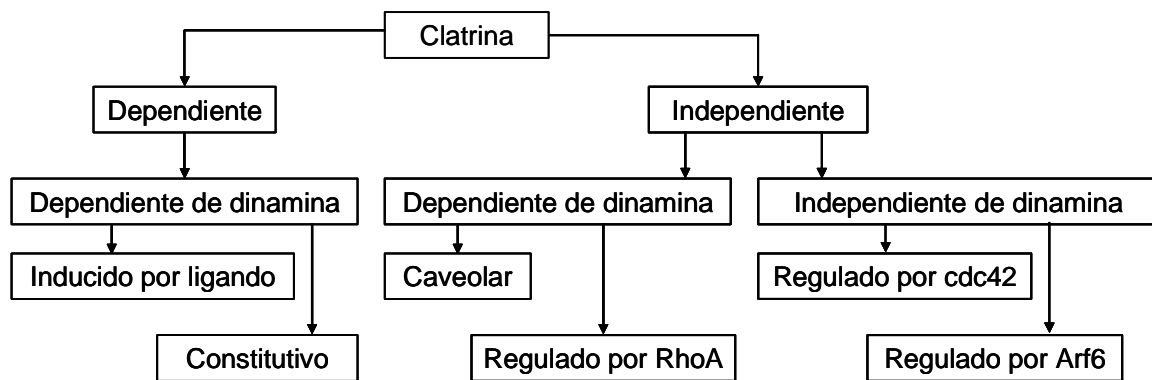


Figura 4. Esquema de clasificación de las distintas vías endocíticas. *Adaptado de Mayor y Pagano 2007.*

Endocitosis mediada por clatrina

Es la ruta mejor caracterizada y permite a las células internalizar biomoléculas y nutrientes a través de receptores específicos que poseen señales de internalización que son reconocidas por la maquinaria endocítica. CME involucra la concentración de receptores de alta afinidad y sus ligandos unidos, en regiones de la membrana plasmática que están curvadas hacia el citosol y recubiertas por clatrina, los ‘huecos de clatrina’ o CCP. Estas regiones se invaginan y finalmente se desprenden de la membrana para dar lugar a una vesícula endocítica recubierta de clatrina (CCV) que contiene los complejos ligando–receptor. Luego esta vesícula pierde el recubrimiento de clatrina (Figura 5A). Si bien los principales componentes de los CCP son clatrina y las proteínas ensambladoras (AP) hay un gran número de proteínas accesorias que están involucradas en las distintas etapas de la formación de vesículas, como por ejemplo dinamina, Eps15, epsina, sinaptojanina y amfifisinas (47–49). La mayoría de ellas son proteínas de alto peso molecular con múltiples dominios para establecer las interacciones proteína–proteína o lípido–proteína necesarias para la coordinación temporal y espacial de la CME.

Clatrina y proteínas ensambladoras

La clatrina es una proteína formada por tres cadenas pesadas que forman una estructura de tres brazos denominada *triskelion* (Figura 5B). Cada cadena pesada está a

su vez fuertemente asociada a una cadena liviana (50,51). En condiciones de baja concentración de sales y alta concentración de calcio los *triskeliones* de clatrina se autoensamblan en una red poligonal cerrada. Para que este ensamblaje ocurra *in vivo* es necesaria la presencia de AP. Se han identificado dos clases de AP, los complejos AP heteropentaméricos (AP1-5) y la AP monomérica, AP180 (50-54)

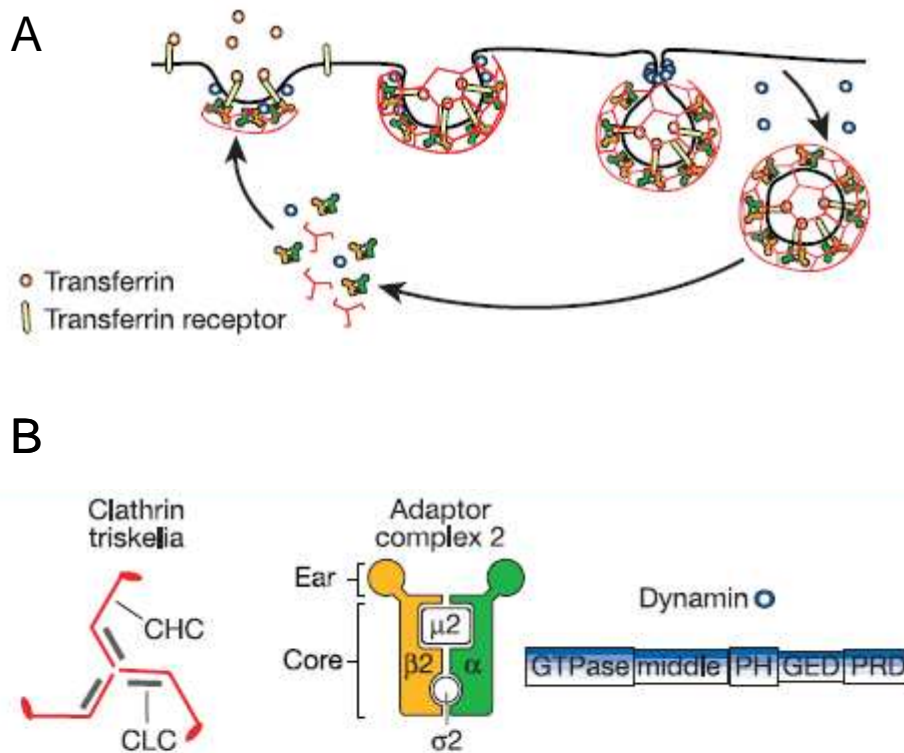


Figura 5. Endocitosis mediada por clatrina. A) Estructura de los principales componentes de CME, clatrina, AP2 y dinamina. B) Ciclo de formación de una CCV. Tomado de Conner y Schmid, 2003.

En la membrana plasmática la formación de vesículas endocíticas recubiertas de clatrina está mediada por AP2. La estructura de este complejo consiste en dos subunidades relacionadas, α y $\beta 2$ adaptinas, una subunidad media, $\mu 2$, y una subunidad pequeña $\sigma 2$ (Figura 5B). La subunidad α -adaptina especifica la ubicación en la membrana plasmática de AP2, así como el reclutamiento de moléculas accesorias reguladoras. La subunidad $\beta 2$ interactúa con clatrina y estimula su ensamblaje. La subunidad $\mu 2$ une motivos de tirosina en los dominios citoplasmáticos de los receptores que van a ser internalizados, para concentrarlos en los CCP. Por último la

subunidad $\sigma 2$ pareciera tener un papel estructural, estabilizando el complejo. Un gran número de proteínas que unen clatrina o AP2 han sido identificadas e involucradas en la formación de CCV. En esta estructura el adaptador el AP2 juega un papel central: interacciona con el receptor a internalizar y con clatrina, reclutando luego, ya sea directa o indirectamente, muchas de estas proteínas accesorias (55).

La AP180 (específica de neuronas) o su homóloga ubicua, CALM, se unen directamente a clatrina y estimulan su ensamblaje en estructuras de tamaño uniforme. Debido a que exhiben una potente capacidad ensambladora, se cree que son necesarias para un ensamblado eficiente de clatrina *in vivo* (56–58).

Dinamina

Una vez reclutado el receptor a internalizar en los CCP, éstos se invaginan hasta separarse de la membrana que la originó. Este proceso de separación se denomina fisión y puede ocurrir como consecuencia directa del aumento de la curvatura e invaginación de la membrana o por un mecanismo diferente como la acción de la proteína dinamina. La dinamina es una GTPasa de 100kDa que participa en la formación de vesículas en diferentes rutas endocíticas. Posee distintos dominios (Figura 5B) que permiten: la unión a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI4,5P₂), dominio homólogo de pleckstrina (PH), su autoensamblado (el dominio efector de GTPasa, GED y los dominios GTPasa y medio) y la interacción con otras proteínas endocíticas (dominio rico en prolina/arginina, PRD). La secuencia de dinamina incluso incluye su propia proteína activadora de GTPasa (GAP) dentro del dominio GED (59). En las últimas etapas de la formación de CCV, varias moléculas de dinamina se autoensamblarían en forma de collar alrededor del ‘cuello’ de la futura vesícula. Este proceso de autoensamblado incrementa la actividad GTPasa (60) de dinamina. La hidrólisis de GTP, por su parte, induce los cambios conformacionales necesarios para su activación (61). Finalmente, la activación de la dinamina resulta en la separación de la vesícula de la membrana plasmática. Es por esto que la sobreexpresión de la mutante dinK44A, que tiene reducida su actividad GTPasa, inhibe la vía de CME (62).

Existen varios modelos sobre el mecanismo preciso por el cual la dinamina induce la fisión de las vesículas de la membrana: por un lado podría actuar como un enzima mecánica (63) ya sea constriñendo el cuello de la vesícula naciente hasta separarla (60,64,65) o empujando la vesícula hacia el citoplasma (66). Sin embargo, otros autores piensan que la dinamina actuaría igual que cualquier otra GTPasa, es decir como una molécula reguladora que recluta y/o activa efectores necesarios para la fisión de las vesículas (67–69).

Eps15 y Epsina

La Eps15 posee tres dominios que se asocian constitutivamente con la subunidad α -adaptina y se denominan EH (homólogos de Eps15) (70,71). Por microscopía electrónica se ha observado que Eps15 decora los bordes de los CCP en formación (72). El papel de la Eps15 sería reclutar otras proteínas y localizarlas en la vesícula naciente (73). Su función se llevaría a cabo en los primeros pasos de CME, ya que se ha observado que no es un componente de CCV maduras purificadas de cerebro (73).

La epsina (*Eps15-interacting protein*) es una proteína que posee en su región N terminal el dominio homólogo de la región N-terminal de epsina (ENTH) que une $PI4,5P_2$ (74,75). También se une a la subunidad α de AP-2, y a los dominios EH de Eps15 a través de tres motivos NPF (Asn-Pro-Phe). Estudios con membranas modelo indican que la epsina se inserta en la bicapa lipídica generando una curvatura que facilitaría la formación de vesículas (76). La epsina también posee sitios para interactuar con clatrina y, al igual que AP180, promueve el ensamblaje de clatrina *in vitro* (74).

Reclutamiento de proteínas a internalizar

Las proteínas que van a ser internalizadas a través de CME son reconocidas por los adaptadores, porque exponen motivos peptídicos cortos presentes en sus dominios citoplasmáticos (77). El motivo más común consiste en una secuencia de 4 aminoácidos con la forma $Yxx\phi$ (donde Y es tirosina, ϕ es un residuo hidrofóbico y x es cualquier aminoácido) que es reconocida por la subunidad μ de AP2 (78). Esta señal se encuentra por ejemplo en el receptor de transferrina o en el de LDL.

Otra clase de señal de internalización son los motivos dileucina, que también se asocian directamente con AP2 en la interfase entre la subunidad α y σ (79). Señales de este tipo encontramos en el dominio citoplasmático del receptor de AMPA, GABAA y 1β adrenérgico. La mayoría de las proteínas que poseen este motivo experimentan endocitosis dependiente de ligando, lo que sugiere que este motivo básico de unión a AP2 es usado en forma preferencial para la internalización regulada.

Por último, otro motivo que promueve la internalización son los residuos de serina fosforilados. Esto ocurre como consecuencia de la unión de un ligando al receptor y la activación de la maquinaria de ubiquitinación. Muchos GPCR poseen como señal de endocitosis dominios ricos en serina fosforilada. Esto ocurre con muchos receptores con actividad tirosina quinasa que se ubiquitinan e internalizan luego de la unión del ligando (80–83).

Endocitosis independiente de clatrina

Vías dependientes de dinamina

Endocitosis mediada por caveola

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática en forma de frasco de 50–80 nm de diámetro, formadas por la proteína caveolina ((84). Están presentes en muchos tipos celulares y demarcan dominios ricos en Col y esfingolípidos, en donde se concentran diversas moléculas de señalización y transportadores (85). La forma y organización estructural de las caveolas está determinada por caveolina, una proteína dimérica que une Col, se inserta como un lazo en la hemicapa interna de la membrana plasmática y se auto asocia para formar las caveolas (Figura 6). La depleción de Col, la sobreexpresión de mutantes negativas de caveolina y la anulación de los genes de caveolina en ratón destruyen las caveolas, demostrando la importancia de la caveolina y del Col en la formación de estas estructuras (86–88).

Experimentos de recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueado (FRAP), así como el seguimiento de caveolas a través de la expresión de caveolina-GFP demostraron que las caveolas son estructuras muy estables en la membrana plasmática (89–91). Sin embargo su internalización puede ser estimulada por esteroides,

glicosíngolípidos (92) y ligandos que unen receptores ubicados en caveolas como por ejemplo albúmina-gp60 (93) o patógenos como el virus SV40 (94,95). Todos estos agentes, aunque diferentes en su naturaleza, estimulan mecanismos comunes que involucran a la dinamina (96,97), Src quinasas, proteína quinasa C (PKC) y el reclutamiento de actina (95,98). La fosforilación en residuos tirosina de caveolina parece ser indispensable para la internalización de las caveolas (95).

Como unidad estructural, las caveolas son mantenidas luego de endocitadas (99). Una vez desprendidas de la membrana pueden fusionarse con el caveosoma (compartimento de pH neutro, sin marcadores de endosomas, pero con componentes internalizados por caveolas) o con los endosomas tempranos, pudiendo luego reciclarse hacia la membrana plasmática para su reutilización (100). En ninguna etapa de este camino se pierde la unión estrecha entre moléculas de caveolina, por lo que se mantiene la estructura caveolar (99).

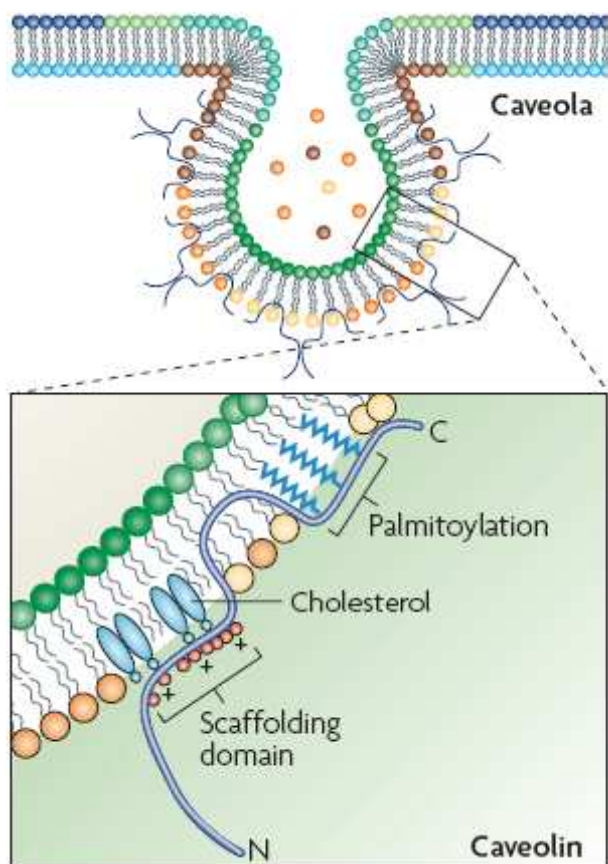


Figura 6. Estructura de caveola.

En el esquema se muestra como la caveolina se inserta en la membrana, con el dominio N- y C-terminal hacia el citoplasma y un dominio en forma de horquilla, embebido en la membrana. El dominio de andamiaje (*scaffolding domain*) estaría relacionado con la interacción con el Col. El dominio C terminal tiene varias palmitoilaciones que favorecen la inserción en la bicapa lipídica.

Tomado de Parton y Simons, 2007.

Endocitosis regulada por RhoA

Esta vía fue descrita para la internalización de la cadena β del receptor de interleuquina 2 (IL2R- β), aunque también es utilizada por otras proteínas de células del sistema inmune y fibroblastos. Luego de la unión del ligando, IL2R- β particiona en membranas resistentes al tratamiento con detergentes, la versión bioquímica de los dominios lipídicos ricos en Col y esfingolípidos presentes en la membrana plasmática. Recientemente se descubrió la participación en esta vía del sustrato de toxina botulínica C3 relacionado con Ras (Rac1) y sus efectores, las quinasas activadas por p21 (Paks) (101). Rac1 puede controlar la polimerización de actina a través de la activación de Paks (102). En particular, el grupo I de Paks (Pak1, Pak2 y Pak3) son poderosos moduladores del citoesqueleto ya que fosforilan diversos sustratos relacionados con la dinámica de actina (103,104). Rac1 estimularía a Pak1 y Pak2 las cuales fosforilarían a la cortactina. Esto permitiría una mejor interacción entre cortactina con N-Wasp (proteína neural del síndrome de Wiskott-Aldrich) aumentando la polimerización de actina en los sitios de endocitosis independiente de clatrina (CIE) mediada por RhoA (101). Paks no están involucradas en CME, lo que indicaría que la regulación del citoesqueleto es diferente para cada mecanismo.

Vías independientes de dinamina

Endocitosis regulada por cdc42

La importancia de cdc42 en endocitosis fue identificada a través del estudio del efecto de la expresión de versiones dominantes negativas de cdc42 o del tratamiento con la toxina B de *Clostridium difficile* (un inhibidor de la familia de Rho GTPasas), sobre la endocitosis de proteínas ancladas a membrana por glicosil fosfatil inositol (GPI-AP) (105,106). La activación de cdc42, en el contexto de la internalización de GPI-AP y fase fluida, es sensible a los niveles de Col en la membrana y está acoplada al reclutamiento de la maquinaria de polimerización de actina (107,108).

El primer transportador que puede detectarse en esta vía se forma a través de largas y amplias invaginaciones de membrana (105), lo que permite que grandes volúmenes de fluido se internalicen en una sola vesícula. Esta vía representa el principal

mecanismo de internalización de fase fluida en muchos tipos celulares (105). También es utilizado por la subunidad B de la toxina colérica (CtxB), por la proteína vegetal ricina (109,110) y por la toxina vacuolante de *Helicobacter pylori*, VacA (111). Muchos de estos ligandos pueden ingresar a la célula a través de otras vías endocíticas, por ejemplo CtxB puede internalizarse a través de caveolas y/o de CME, lo mismo ocurre con la proteína prionica PrP^c, una GPI-AP (112-114). Esto puede deberse a la asociación lateral de estas proteínas con moléculas que estén destinadas en principio a otras vías (107,115).

Endocitosis regulada por Arf6

El factor de ADP-ribosilación 6 (Arf6) ha sido identificado como un regulador clave en la endocitosis independiente de clatrina y dinamina de diversas proteínas como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), β -integrinas, carboxipeptidasa E y E-caderina (116,117). La Arf6 estimula el remodelado de actina, la generación de PI4,5P₂ por la activación de la enzima fosfatidil inositol 4 fosfato 5 quinasa (PIP5K) y ha sido también involucrada en la dinámica de endosomas ya que influencia la velocidad de reciclaje de varios componentes de la membrana (118,119). Es de notar sin embargo que los efectos de Arf6 parecen ser específicos de cada tipo celular. Así por ejemplo la sobreexpresión de una versión de Arf6 constitutivamente activa en células HELA estimula la internalización de GPI-AP (118,120), mientras que esto no ocurre en células CHO (121). Las proteínas internalizadas por esta vía pueden reciclar a la membrana plasmática a través de una organela específica, el compartimiento de reciclaje tubular que contiene Arf6 (119). Alternativamente los endosomas provenientes de esta vía pueden fusionarse con endosomas tempranos marcados con Rab5 y EEA1 para luego ser transportados a endosomas tardíos y lisosomas (118).

Reclutamiento de proteínas a internalizar

Mecanismos basados en proteínas

Estudios realizados con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) han sugerido que la ubiquitinación podría ser importante en determinar si una proteína

es internalizada por CME o CIE (122). Así cuando el EGFR se ubiquitina, es guiado a la vía dependiente de caveola. También se cree que mecanismos de selección basados en interacción con proteínas operan en la vía dependiente de RhoA y Arf6. Se han encontrado secuencias específicas de internalización en el receptor de citoquinas γ c, internalizado por la vía dependiente de RhoA (123), y en la carboxipeptidasa E, internalizada por la vía dependiente de Arf6 (116). Sin embargo, muchas proteínas internalizadas por estas vías no poseen estas secuencias, ni se han identificado adaptadores, por lo que deben existir otros mecanismos de reclutamiento.

Mecanismos basados en lípidos

En ausencia de adaptadores proteicos y sin un dominio citoplasmático que pueda contener señales de internalización para asociarse a otras proteínas, como es el caso de las proteínas ancladas a membrana, deben existir otros mecanismos para determinar la ruta endocítica a seguir. Uno de estos posibles mecanismos es la agrupación dependiente de lípidos en nano-agregados, que es lo que se observa como señal de reclutamiento en el caso de las GPI-AP, para ser internalizadas por la vía dependiente de cdc42 (107). Cuando se generan agregados de mayor tamaño, por ejemplo a través del entrecruzamiento con anticuerpos, estas proteínas son internalizadas a través de la vía dependiente de caveola (124,125).

Un caso similar se observa con la subunidad B de la toxina colérica, la Ctx B, que puede ser internalizada por las vías dependientes de clatrina, caveola o cdc42, lo que sugeriría que está organizada en múltiples formas en la membrana (Mayor y Pagano, 2007). Se ha observado que no está agregada cuando se localiza en CCP, mientras que sí lo está en otras regiones de la membrana (126). Asimismo, el sialogangliósido GM1, receptor de la CTx B, tampoco está distribuido uniformemente en la membrana, sino que se encuentra concentrado en invaginaciones sin recubrimiento (84).

Estas observaciones sugieren que los nanoagregados lipídicos podrían coalescer para formar dominios endocíticos activos (127), regulados por una vía específica o bien cada vía tendría preferencia por dominios de un determinado tamaño (128). La

existencia en la membrana de distintos tipos de dominios (129), serviría entonces para seleccionar y dirigir las moléculas a internalizar a una determinada ruta endocítica.

Compartimentos endocíticos

Cualquiera que sea la ruta de endocitosis, las vesículas formadas en la membrana plasmática se fusionarán con los endosomas tempranos para transitar por los distintos compartimentos endocíticos. Los principales compartimentos que pueden identificarse son: endosomas tempranos (EE), endosomas tardíos (LE) y lisosomas (Figura 7).

Los EE son la primera estación en la vía endocítica. Su función es la redistribución y reciclado de moléculas provenientes de las distintas vías endocíticas. Los EE pueden dividirse en dos compartimentos separados: los endosomas de selección (SE) y el compartimento endocítico de reciclaje (ERC).

Los SE se encuentran localizados en la periferia de la célula, tienen una morfología tubulovesicular y un pH ligeramente ácido (130). La porción vesicular tiene un diámetro de 250–400 nm, los túbulos en cambio, de 50–60 nm y varios micrones de largo. Como consecuencia, la mayor parte del volumen está en la porción vesicular mientras que la mayor parte de la superficie se halla en la región tubular. Esta distribución se utiliza para la selección y separación de las moléculas destinadas a ser degradadas (se localizan en la región vesicular) de las que van a reciclar a la membrana plasmática (se localizan en la región tubular). Los SE pueden formar cuerpos multivesiculares (MVB) o vesículas transportadoras endosomales involucradas en el tránsito hacia los LE.

Los SE aceptan material desde la membrana plasmática durante un tiempo limitado, luego del cual se movilizan a través de microtúbulos hacia el centro de la célula, se acidifican, adquieren hidrolasas ácidas y empiezan a mostrar propiedades de LE. Este proceso se denomina maduración y permite enviar material soluble a los LE sin necesidad de contar con un mecanismo que lo concentre. Durante la maduración las moléculas que van a ser recicladas son removidas de los SE a través de túbulos

angostos. Como consecuencia, si no hay una señal específica de selección, una proteína de membrana que ha sido internalizada en SE será transportada con la mayoría de la membrana al ERC. También existe una vía directa de reciclado desde los SE a la membrana plasmática.

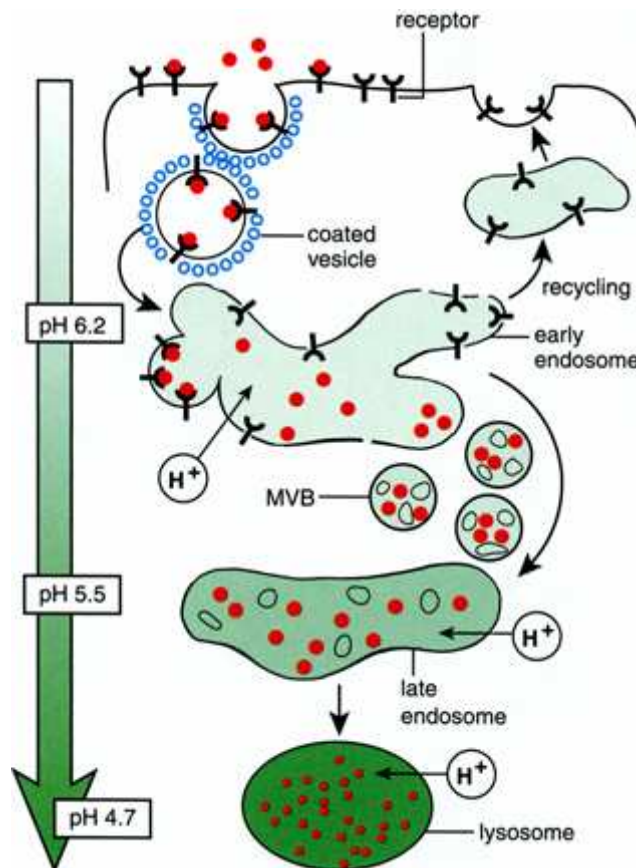


Figura 7. Compartimientos endocíticos. Las moléculas endocitadas se dirigen a los endosomas tempranos desde donde pueden seguir la vía degradativa a los lisosomas o volver a la membrana, ya sea directamente o a través de su paso por los endosomas de reciclaje. A medida que se avanza en la ruta endosomal disminuye el pH de las organelas.

Tomado de Ikonen, 2008.

Los MVB se forman por la invaginación y desprendimiento de vesículas hacia el interior de los SE. Estas vesículas intraluminales pueden funcionar como sitios temporales de almacenamiento de proteínas o como un dispositivo para entregar material a los lisosomas para su degradación. La principal señal para destinar proteínas a los MVBs es la adición covalente de un residuo de ubiquitina, el que es reconocido por los receptores de selección de ubiquitina. Este reconocimiento segrega a la proteína en dominios especializados de la membrana endosomal que evitan que la proteína sea reciclada y contienen la maquinaria para formar los MVB.

El ERC es una colección de túbulos con diámetros de 50–70 nm extensamente interconectados y asociados con los microtúbulos (130). Es un compartimiento estable

por lo que para la salida de moléculas desde el ERC se requieren intermediarios de transporte (vesículas o túbulos), aunque no se ha identificado con claridad la maquinaria que los produce. Existen dos destinos posibles desde el ERC, la membrana plasmática y la red trans-Golgi (TGN).

Los LE tienen un tamaño similar a los SE pero poseen un perfil de vesículas internas y están cerca del centro de la célula. Son organelas que contienen un medio ácido y poseen Rab7. Las membranas de los LE están enriquecidas en ácido lisobisfosfatídico. Los LE reciben material de los SE y del TGN y lo destinan a los lisosomas o de vuelta al TGN. La selección en los LE involucra la invaginación de vesículas al interior de la organela (para transporte a los lisosomas) o la formación de vesículas de transporte (para el regreso al TGN).

Los lisosomas son el último compartimiento en la vía endocítica. Son organelas dinámicas que reciben y degradan material proveniente de la vía exocítica, endocítica, autofágica y fagocítica. Su morfología es heterogénea, con un diámetro de 200–500 nm. Están concentrados cerca del centro organizador de microtúbulos, son ácidos y contienen gran cantidad de enzimas hidrolasas ácidas. Los lisosomas se fusionan con los LE para generar organelas híbridas en donde se digiere el material endocitado y de las cuales se regeneran los lisosomas (131).

Rol de los lípidos en la endocitosis

Fosfoinosítidos

El anillo inosítido es un sustrato muy versátil que puede ser modificado en distintas posiciones. Los distintos fosfoinosítidos se sintetizan en la cara citosólica de las membranas celulares en donde reclutan y/o activan proteínas efectoras. Los niveles de estos lípidos pueden cambiar en forma rápida y localizada por acción de fosfatasa y quinasas específicas, posibilitando la regulación espacial y temporal de distintos procesos (132). Fosfoinosítidos específicos están localizados en distintos compartimientos celulares, así, el PI4,5P₂ está concentrado en la membrana plasmática, PI3P en endosomas tempranos y PI3,5P₂ en endosomas tardíos (133,134), lo que

sugiere que cada uno de ellos está implicado en la regulación de distintas etapas de la endocitosis.

PI3P se encuentra enriquecido en las membranas endosomales y funciona reclutando efectores como el antígeno de endosomas tempranos 1 (EEA1), rabaptina-5 y rabenosin-5 esenciales para la fusión homo y heterotípica de los endosomas tempranos (135,136).

PI4,5P₂ forma dominios en la membrana plasmática que funcionarían como marcadores del sitio en donde se forman los CCP y por lo tanto donde se reclutan las proteínas de la maquinaria endocítica (137). Es importante en las etapas de formación, separación de la membrana y desprendimiento de la cobertura de clatrina de la CCV. Proteínas como AP2, epsina, CALM/AP180, dinamina y sinaptojanina, unen PI4,5P₂ a través de dominios específicos como el dominio PH, dominio homólogo de la región N-terminal de AP180 (ANHT) o dominio ENHT (138). La depleción aguda de PI4,5P₂ produce una desaparición masiva de CCP y por consiguiente bloquea la endocitosis de transferrina, confirmando su importancia en la CME (139). Otra función importante del PI4,5P₂ es la regulación de la polimerización del citoesqueleto de actina (140). PI4,5P₂ se une a proteínas como CapZ y gelsolina disociándolas de los extremos de los filamentos de actina, lo que permite su crecimiento. También produce la separación de los monómeros de G-actina de las proteínas unidoras de monómeros de actina, lo que aumenta la nucleación y consecuente polimerización de actina. Por último PI4,5P₂ promueve el entrecruzamiento de los filamentos de actina lo que los estabiliza (141).

Colesterol

De todas las membranas de las células eucariotas, la membrana plasmática tiene el mayor contenido de Col libre. El Col tiene una tendencia intrínseca de interactuar íntimamente con los esfingolípidos, y de esta interacción podría resultar la formación en la membrana de dominios ordenados denominados 'balsas lipídicas' (142-144). Se cree que estas balsas sirven como plataformas para seleccionar y agrupar moléculas de señalización (145). En el caso de la endocitosis, el Col es necesario para la mayoría de las vías endocíticas. Cuando se depletan las células de Col, desaparecen las caveolas, se

achatan los CCP inhibiéndose la internalización de transferrina y reduciéndose también la internalización de las GPI-AP a través de la vía dependiente de cdc42 y del IL2R a través de la vía dependiente de RhoA. El Col también interviene a nivel endosomal en la segregación de proteínas, por ejemplo, las GPI-AP son selectivamente retenidas en el ERC en un proceso dependiente de Col (146). Si bien no se ha definido el rol preciso del Col en las distintas vías endocíticas, se piensa que podría conformar sitios específicos en la membrana (ya sea como parte de las balsas lipídicas o independientemente de estas) en donde se reclutan proteínas y/o sería necesario para la formación de la curvatura en la membrana plasmática (83,147).

Citoesqueleto y endocitosis

El citoesqueleto de actina es esencial para la endocitosis en levaduras (148), sin embargo, en células de mamífero el tratamiento con drogas que disrumpen actina tiene efectos variables sobre la endocitosis (149,150). Aún así muchas proteínas accesorias involucradas en los procesos endocíticos interactúan o modulan el citoesqueleto de actina (151) lo que sugiere que éste tiene algún rol en la endocitosis. Existe evidencia que muestra la polimerización de actina localizada en sitios de endocitosis mediada por clatrina (152), por caveolina (153), por cdc42 (154), macropinocitosis (152) y fagocitosis (155). El tratamiento con drogas que inhiben la polimerización de actina, reduce el tráfico de CtxB al aparato de Golgi (156), y bloquea la endocitosis del receptor de folato por la vía dependiente de cdc42 (108).

Se ha involucrado al citoesqueleto de actina en varias etapas del proceso de endocitosis. El citoesqueleto cortical que se encuentra debajo de la membrana plasmática podría localizar la maquinaria endocítica en ciertos dominios. Esto podría lograrse ya sea, funcionando como una barrera física a la libre difusión de los componentes de la maquinaria endocítica o directamente anclando parte de esta maquinaria, las cuales funcionarían entonces como parantes para formar los complejos endocíticos funcionales. La observación de que los CCP se forman en sitios específicos

de la membrana y tienen un movimiento lateral restringido respalda este modelo (157–160).

Una segunda posibilidad es que el citoesqueleto subcortical funcione como una barrera para la formación y el movimiento de vesículas endocíticas. Sería necesario entonces, remover esta red rígida de actina para permitir los procesos de internalización. Esto podría lograrse fácilmente incrementando la dinámica de la actina cortical localmente. Un acoplamiento espacial y temporal entre el recambio de actina y la señalización que lleva a la endocitosis restringiría la disolución del citoesqueleto a los sitios de endocitosis. Apoyando esta idea se ha observado que la rigidización del citoesqueleto subcortical inhibe el tráfico de membranas (161) y que en la vecindad de los CCP y caveolas no hay actina (149). Sin embargo, muchos estudios sugieren que el citoesqueleto no juega solamente un rol negativo. Por ejemplo, cuando se despolimeriza la actina la endocitosis es inhibida en la superficie apical de las células epiteliales, mientras que cuando se la estabiliza con jasplakinolide no se observa ningún efecto (162,163).

Un tercer mecanismo está basado en la idea de que la creación de estructura nuevas de actina, puede estar activamente relacionada con eventos de fisión de vesículas. La polimerización de actina daría la fuerza y vectorialidad necesarias para este proceso. Así, se ha observado que la CME queda detenida en la etapa de de CCP invaginados, cuando se inhibe la polimerización de actina en células A431 con latrunculina A (164,165) y que el alejamiento de la membrana de CCV está acompañado por un incremento transitorio en la asociación de actina con estas estructuras (166).

Por último, el citoesqueleto de actina estaría involucrado en los pasos siguientes a la formación de vesículas. El citoesqueleto y sus componentes asociados podrían ayudar al movimiento de las vesículas recién desprendidas de la membrana a través del citosol. Esto también requeriría la generación de fuerza a través de la polimerización de actina. Apoyando esta idea de propulsión se ha observado la asociación de cometas de actina a endosomas y pinosomas en el citoplasma (166–168), y en lisosomas y edosomas en sistemas *in vitro* (167,169).

Pequeñas proteínas con actividad GTPasa

Las pequeñas proteínas con actividad GTPasa son una superfamilia de proteínas G monoméricas con masas moleculares de entre 20–40 KDa estructuralmente clasificada en 5 familias: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran. Funcionan como interruptores moleculares, ciclando entre un estado inactivo, en el que se encuentran unidas a GDP, y un estado activo, en el que se hallan unidas a GTP (Figura 8, (170)). El intercambio de GDP por GTP está regulado por dos grupos de moléculas de señalización: los factores de intercambio de nucleótidos (GEF), que catalizan la estimulación de las GTPasas y las proteínas GAP que estimulan la hidrólisis del GTP unido a las GTPasas facilitando su inactivación. Además de este tipo de regulación, la actividad de las GTPasas de las familias Rho y Rab está controlada por las proteínas inhibidoras de la disociación del GDP (GDI). Los GDI inhiben la disociación de GDP basal y estimulada por los GEF, manteniendo las GTPasas inactivas y solubles en el citosol. Así, para ser activadas las GTPasas de las familias Rho y Rab deben primero ser liberadas del GDI, para que luego actúen los GEF (Figura 8). Tienen relevancia en los procesos de endocitosis, las GTPasa de las familias Rho, Rab y Arf por lo que serán brevemente descritas.

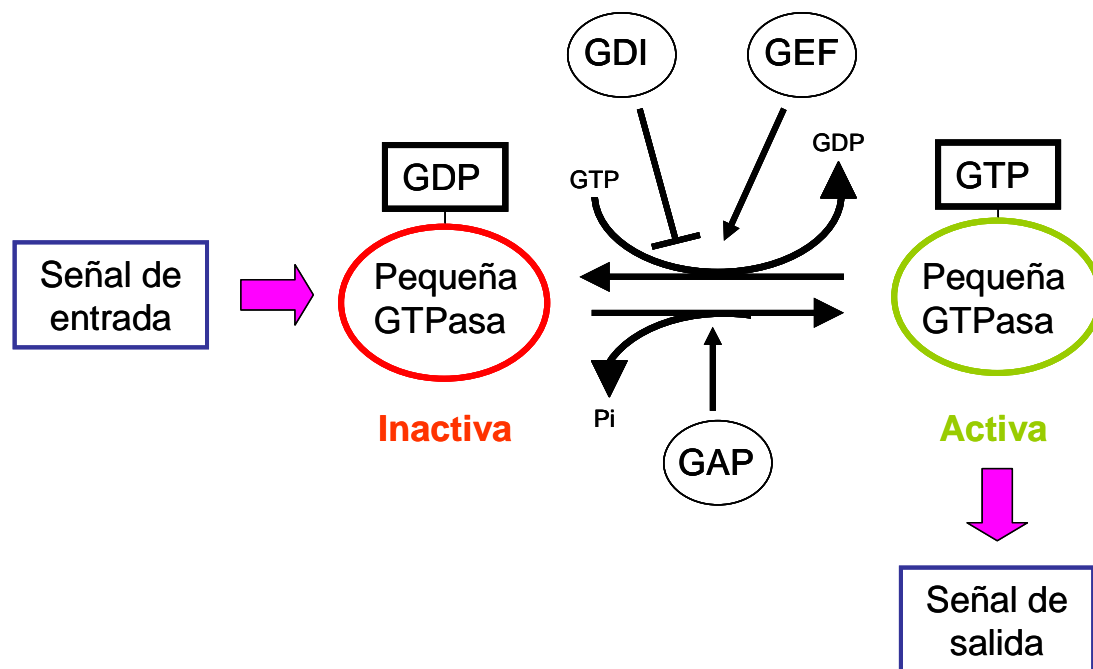


Figura 8. Esquema del ciclo de activación de las pequeñas GTPasas

GTPasas de la familia Rho

Los miembros más estudiados de esta familia son Rho, Rac y cdc42. La primera función atribuida a estas GTPasas fue el control de la polimerización del citoesqueleto de actina. Se demostró que la activación de RhoA induce la formación de fibras de estrés y adhesiones focales (102), Rac promueve el ensamblaje de los filamentos de actina en la periferia celular para generar lamelipodios y ondulaciones de membrana (102) y cdc42 provoca la aparición de filopodios, unas estructuras elongadas, ricas en actina que se proyectan desde la membrana plasmática al medio circundante (171,172). La regulación del citoesqueleto de actina por las GTPasas Rho es un proceso fundamental para que la célula pueda llevar a cabo otras funciones como el establecimiento de la morfología y la polaridad celular o procesos de migración (173,174).

Las GTPasas Rho también participan en la regulación de distintos mecanismos endocíticos. Por ejemplo, las GPI-AP son endocitadas por un mecanismo dependiente de cdc42, RhoA regula la internalización del IL2-R, RhoG participa en la internalización de vesículas caveosomales y la internalización de la ATPasa de la enfermedad de Menkes es inhibida por una mutante dominante negativa de Rac1. Las formas constitutivamente activas de Rac y RhoA también inhiben la endocitosis dependiente de clatrina. En muchos de estos procesos interviene la capacidad de estas GTPasas de reclutar y modular localmente el citoesqueleto de actina.

GTPasas de la familia Rab

En células de mamífero se conocen cerca de 50 proteínas Rab, incluyendo sus isoformas, cuya función principal es la regulación del tráfico intracelular de vesículas. Intervienen en las etapas de direccionamiento, fijación y fusión de las vesículas (endocíticas y exocíticas). El ciclo de activación/inactivación de las proteínas Rab está coordinado con el movimiento de las mismas entre el citosol y la membrana a través de la asociación/disociación al GDI. Cada proteína Rab cumple su función en una organela específica, así por ejemplo (175-177) Rab5 y Rab4 están presentes en los EE y regulan los primeros pasos del proceso endocítico, mediando la fusión homotípica entre EE y el

reciclado directo a la membrana, respectivamente (178–180). Rab 11 estaría involucrada en el reciclado de moléculas desde el ERC a la membrana (181) y Rab7 en el tráfico hacia los LE (182).

GTPasas de la familia Arf

Existen tres clases de proteínas Arf. La clase I, incluye Arf1, Arf2 y Arf3; la clase II, incluye Arf4 y Arf5 y clase III incluye a Arf6. Las Arfs clase I y II se ubican en la membrana del aparato de Golgi, mientras que Arf6 en la membrana plasmática (183). Todas las Arf están miristoiladas en su extremo N-terminal, y esta modificación es importante para la asociación con la membrana y la función de estas proteínas. Las Arfs actúan en las membranas reclutando proteínas de recubrimiento citosólicas que facilitan la formación de vesículas, activando enzimas modificadoras de lípidos y modificando la estructura del citoesqueleto de actina.

Arf6 colocaliza y activa la PIP5K para generar PI4,5P₂ (184). Asimismo actúa como activadora de la fosfolipasa D (185,186), una enzima que cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina para formar ácido fosfatídico (PA), un lípido fusogénico y que también activa la PI5K. La generación de PI4,5P₂ a través de estas dos vías, mediaría los cambios en el citoesqueleto a nivel de la actina provocados por Arf6, ya que PI4,5P₂ puede reclutar e influenciar la actividad de muchas proteínas unidoras de actina. Otro posible mecanismo que podría actuar sinérgicamente con la generación de PI4,5P₂ es la activación de Rac1. Se ha obtenido evidencia directa de que Arf6–GTP activa Rac1 (187,188) y se requiere Arf6 para el ondulamiento y la generación de protusiones en la membrana inducidas por Rac1.

En endocitosis, Arf6 está involucrada en una vía independiente de clatrina que comprende la internalización y el reciclaje de vesículas desde un compartimento endosomal diferente al ERC (189). Este tipo de reciclado depende de la capacidad de las GAPs de inactivar Arf6. Así cuando se expresa una mutante constitutivamente activa de Arf6, se acumulan en la célula endosomas ricos en PI4,5P₂ y actina (118,185).

Objetivos

Vista la importancia de mantener los niveles de AChR en la superficie celular y la falta de conocimiento sobre el mecanismo de endocitosis del AChR, en este trabajo de tesis nos hemos propuesto:

- ✓ Caracterizar el mecanismo de endocitosis del AChR en las células CHO-K1/A5, y
- ✓ Estudiar la modulación del mecanismo de endocitosis del AChR por el Col.

Materiales y Métodos

Materiales

Todos los reactivos químicos son de Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA), excepto los que se mencionan a continuación. Los fluoróforos Cy3 y Cy5 se obtuvieron de Amersham Pharmacia Biotech (USA); Alexa fluor– α BTX, Alexa fluor–anticuerpos secundarios y *Lisotracker* se compraron en Molecular Probes (Eugene, OR). El anticuerpo mAb210 fue una donación del Dr. J. Lindstrom, Univ. de Pennsylvania Med. Center (USA). El plásmido que codifica para dinamina K44A–HA (din K44A–HA) lo proveyó el Dr. S. Schmid, Scripps Research Institute, Ca. Los plásmidos para Arf6 T27N–HA y Arf6 Q67L–HA se obtuvieron a través del Dr. T. Kirchhausen, Harvard Medical School, Ma, USA. Los plásmidos para Rab5–GFP y Rab7–GFP fueron donados por el Dr. J. Bonifacino, NIH, Bethesda, Md, USA. La Lipofectamina se compró en Gibco BRL (Life Technologies, Bs. As., Argentina). Los plásmidos que codifican para din K44A–GFP, GPI–GFP y caveolina–GFP (cav–GFP), así como Cy5–Tfr son del Laboratorio del Dr S. Mayor, NCBS, Bangalore, India. El fPEG–Col (fluoresceína polietilén glicol colesterol) lo donó el Dr. T. Kobayashi, de la Graduate School of Science, Universidad de Kyoto, Kyoto, Japón.

Cultivo celular y transfección de células

Las células CHO–K1/A5 (190)), son una línea celular derivada de las células CHO–K1, que expresan en forma estable el AChR muscular adulto. Las mismas se cultivaron en medio Ham's F12 con suero fetal bovino 10%, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomina y 40 μ g/ml de G418 como antibiótico de selección.

Para transfectar las células se utilizó Lipofectamina (Invitrogen, USA) o Fugene6 (Roche, USA). Ambos son reactivos compuestos por lípidos catiónicos que complejan el ADN plasmídico para que pueda ingresar a la célula. Las células fueron transfectadas un día después de repicadas a alta densidad (50–70 % de confluencia), utilizando en general 1 μ g de ADN plasmídico por cápsula. Se las utilizó para los experimentos luego de 12– 18 hs desde el momento de la transfección. Estas condiciones fueron elegidas por ofrecer la máxima eficiencia de transfección con la mínima citotoxicidad.

Derivatización de α BTX con sondas fluorescentes

Se disolvió α BTX en PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 pH 7,5) hasta una concentración de 125 μM . Para la reacción de conjugación se utilizó la sonda fluorescente 10 veces más concentrada que la α BTX y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h con agitación. La α BTX marcada se separó luego del excedente de sonda sin reaccionar por medio de una columna de Sephadex G-25. Para estimar la eficiencia de la reacción de conjugación se calculó la relación sonda fluorescente/proteína mediante la lectura de la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorbción de la sonda ($\lambda_{\text{AbsCy3}} = 550 \text{ nm}$) y a 280nm. Para los experimentos se utilizaron los conjugados en los cuales esta relación era menor o igual a 1.

La conjugación con biotina se realizó incubando una alícuota de Cy3- α BTX con un ester N-hidroxisuccinimida-biotina en una relación molar 1:5 durante 30 min a temperatura ambiente. El exceso de biotina se separó mediante diálisis contra PBS realizada a 4°C durante 18 hs.

Para determinar la especificidad de la α BTX derivatizada, se marcaron las células durante 1 h a 4°C con Cy3- α BTX-biotina y un exceso de α BTX sin marcar. Posteriormente se lavaron con M1 frío para remover el exceso de reactivos y luego se fotografiaron. Se cuantificó la fluorescencia (ver Análisis cuantitativo de imágenes), obteniéndose un valor de aproximadamente 10 %, similar a la autofluorescencia de las células (ver Marcación de AChR en células vivas).

Microscopia de fluorescencia

Para examinar y fotografiar las células se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E-600 acoplado con una cámara digital CCD (*charge-coupled device: dispositivo de cargas interconectadas*) SBIG modelo ST-7 (765×510 píxeles, Santa Bárbara, CA, USA). La misma es operada con el software CCDOPS (SBIG Astronomical Instruments, versión 5.02). Se utilizaron objetivos de inmersión de 40x (1.0 N.A.) o 60x (1.4 N.A.) y los filtros de excitación, emisión y dicroicos apropiados para cada longitud de onda. De

esta manera se obtuvieron imágenes de 16 bits que se exportaron para su posterior análisis en formato tiff.

En algunos experimentos se utilizó un microscopio invertido Nikon TE 300, con un objetivo 60 X (1.4 N.A.) equipado con una cámara digital MicroMax con un sensor TEK512 B (Roper Scientific, USA). Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Metamorph (Universal Imaging, USA).

Microscopia Confocal

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS-SP2.

Análisis cuantitativo de imágenes

Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (NIH) o Metamorph (Universal Imaging, USA). Se definió manualmente como región de interés (ROI) el perímetro de cada célula y se cuantificó la fluorescencia promedio. Estas medidas se hicieron en células elegidas al azar en la imagen de contraste de fase. A cada valor de intensidad de fluorescencia así obtenido se le sustrajo un valor de fondo local, determinado por el promedio de la intensidad de fluorescencia de cinco regiones del campo libres de células de cada preparado.

Para armar las figuras, se utilizaron los programas Adobe Photoshop 7.0 y Corel Draw 11.

Marcación de AChR en células vivas

Para marcar el AChR de la superficie celular, se incubaron las células con concentraciones saturantes de Alexa⁴⁸⁸- α BTX, Cy3- α BTX, Alexa⁵⁹⁴- α BTX u otra sonda fluorescente para detectar el AChR durante 1 h a 4°C y se lavaron con Medio 1 frío ("M1": 140 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM KCl, pH 7.4). Para las diferentes sondas se determinó la concentración saturante, incubando las células durante 1 h a 4°C con concentraciones crecientes de las mismas. Luego se midió la intensidad de fluorescencia por microscopia de fluorescencia (ver ejemplo en Figura 1).

Las concentraciones saturantes así obtenidas se encontraron entre ~ 0.1 y 1 μ M y la autofluorescencia de las células (medida en células incubadas sin sonda fluorescente)

no superó el 10 % en ningún caso. Para arrestar la síntesis de proteínas se incubaron las células durante 6 hs con 200 µg/ml cicloheximida (CHX) antes de realizar los experimentos.

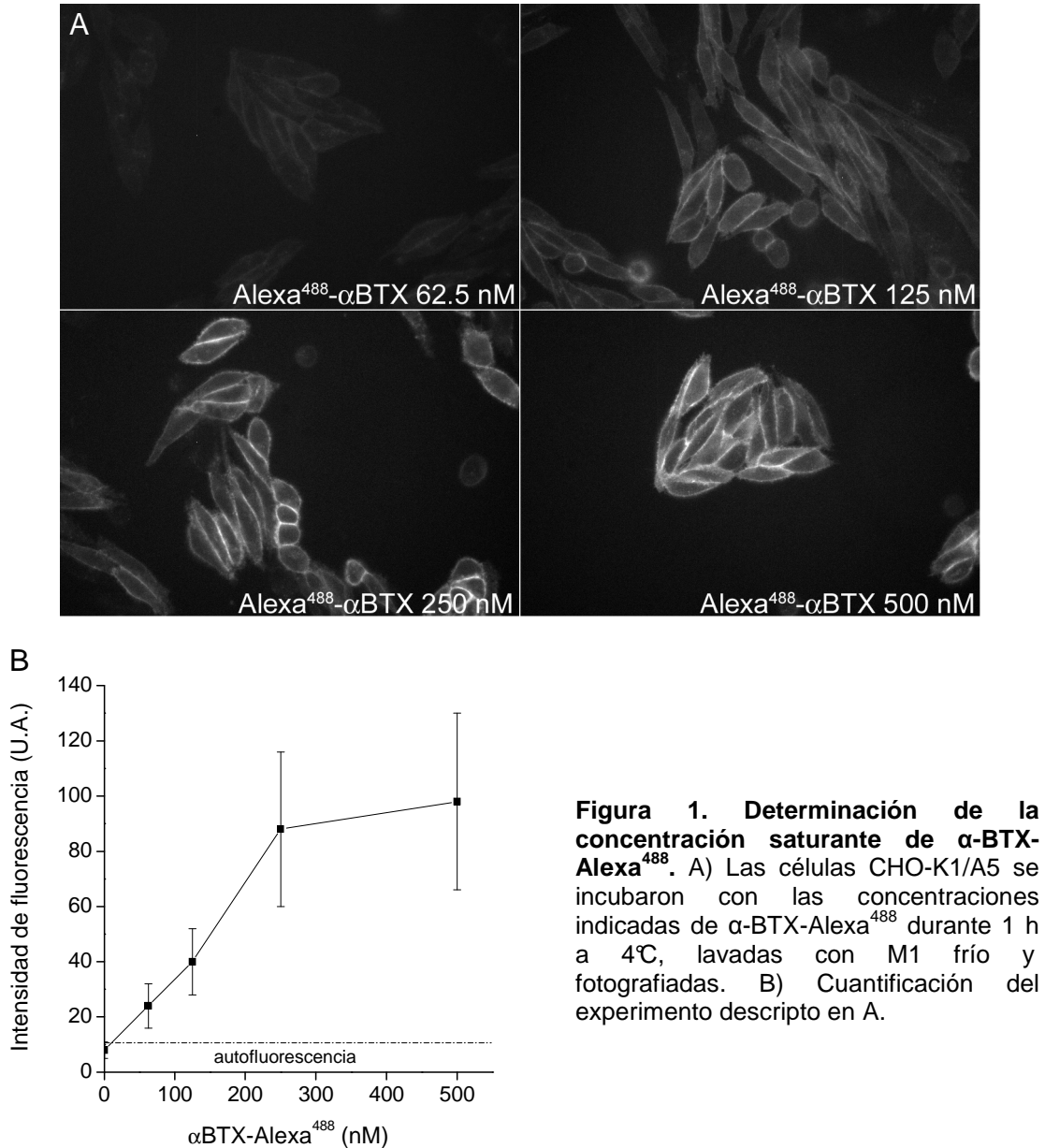


Figura 1. Determinación de la concentración saturante de α-BTX-Alexa⁴⁸⁸. A) Las células CHO-K1/A5 se incubaron con las concentraciones indicadas de α-BTX-Alexa⁴⁸⁸ durante 1 h a 4°C, lavadas con M1 frío y fotografiadas. B) Cuantificación del experimento descrito en A.

Depleción de colesterol

Con la finalidad de depletar las células de colesterol se utilizaron dos tratamientos diferentes:

Tratamiento con metil-β-ciclodextrina (MβCDx): las células CHO-K1/A5 se incubaron a 37°C durante 30 min en presencia de distintas concentraciones (0, 5, 10 y

15 mM) de metil- β -ciclodextrina (M β CDx) disuelta en M1. Al finalizar la incubación las células se marcaron a 4°C durante 1 h con α BTX fluorescente y se lavaron con M1 frío para fotografiarlas. Como tratamiento estándar se utilizó una concentración de M β CDx de 15 mM, porque presentaba el máximo efecto sobre la internalización del AChR con la mínima citotoxicidad.

Para determinar el efecto de un determinado tratamiento sobre la internalización del AChR en presencia de M β CDx, las células fueron marcadas a 4°C durante 1 h con α BTX fluorescente y luego tratadas con M β CDx. Al final del tratamiento se contabilizó el número de células que presentaban endosomas, considerándose 100 % al número de células que presentan endosomas al ser incubadas con M β CDx sola.

Tratamiento con nistatina: las células se incubaron con 0, 25 y 50 μ g/ml de nistatina disuelta en DMSO durante distintos tiempos (0 a 30 min) a 37°C. Al final de la incubación las células fueron marcadas con α BTX-Alexa488 por 1 h a 4°C, lavadas con M1 frío y fotografiadas. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de α BTX-Alexa⁴⁸⁸ en superficie.

Determinación del contenido de colesterol en la membrana celular

Luego de realizados los tratamientos descriptos arriba, se estimó el contenido de Col de la membrana celular mediante microscopia de fluorescencia con la sonda fPEG-Col. Luego del tratamiento, las células se incubaron durante 10 min a 4°C con 0.5 μ M de fPEG-Col, se lavaron con M1 frío y se fotografiaron. Se determinó entonces la intensidad de fluorescencia proveniente de la membrana plasmática.

La sonda fPEG-Col, es un derivado soluble y fluorescente del Col que ha sido utilizado para visualizar éste lípido en la membrana plasmática de células CHO. (Sato et al., 2004) Tiene además la propiedad de incorporarse preferentemente a membranas ricas en colesterol, lo que permite utilizarlo como un sensor de colesterol (191). La cantidad de fPEG-Col incorporada por la membrana celular, es entonces proporcional al contenido de colesterol de dicha membrana, y el valor puede inferirse de la intensidad de fluorescencia medida.

Accesibilidad de AChR marcado con b-Cy3 α BTX a moléculas de bajo peso molecular (extinción de fluorescencia con KI)

Con el fin de evaluar la velocidad de internalización del AChR, las células CHO-K1/A5 se marcaron con Cy3- α BTX-biotina por 1 h a 4°C, se lavaron con M1 frío y se incubaron a 37°C durante distintos tiempos (0, 1, 2, 4, 6 y 12 hs). Luego de cumplido el tiempo de incubación, se fotografiaron antes e inmediatamente después de agregarles una solución de KI 200 mM. Se eligió esta concentración de KI por ser la menor concentración que extingue adecuadamente la fluorescencia de Cy3- α BTX-biotina de la superficie celular, sin afectar la fluorescencia internalizada (ver párrafos siguientes). Con las imágenes obtenidas, se calculó la eficiencia de extinción de fluorescencia con la siguiente fórmula:

$$E(\%) = 100 \times (1 - F_{KI}/F), \text{ donde } F \text{ y } F_{KI} \text{ son las intensidades de fluorescencia}$$

antes y después de agregar el KI. El porcentaje de extinción de fluorescencia (% de E) así obtenido se normalizó respecto del de las células marcadas a 4°C y no incubadas a 37°C. Este valor fue de aproximadamente 80% a las dos concentraciones de KI probadas (Figura 2).

También medimos el porcentaje de E de la fluorescencia proveniente de Cy5-Tfr internalizada. Para ello, incubamos las células durante media hora a 37 °C con Cy5-Tfr, y al final de la incubación la Cy5-Tfr unida a la superficie celular se remueve lavando con buffer ascorbato. De esta forma sólo tendremos la señal proveniente de la Cy5-Tfr internalizada por las células, que no debería ser extinguida por el tratamiento con KI. Como se observa en la Figura 2, el porcentaje de E de Cy5-Tfr es de aproximadamente 5 % a las dos concentraciones de KI probadas. Asimismo, concentraciones equivalentes de KCl, no produjeron extinción de fluorescencia, ni de Cy5-Tfr internalizada, ni de Cy3- α BTX-biotina en superficie (Figura 2). Estos datos experimentales validan la eficacia de esta técnica.

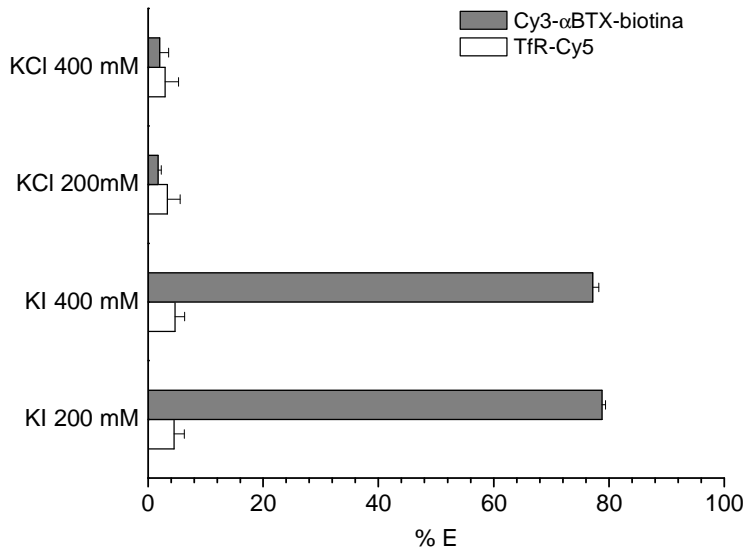


Figura 2. Las células CHO-K1 A5 se incubaron a 37°C en medio completo con el agregado de Cy5-Tfr, luego se lavaron durante 10 min con buffer ascorbato y se marcaron a 4°C con Cy3-αBTX-biotina. Al final de la incubación las células fueron fotografiadas antes e inmediatamente después de agregar la solución indicada en cada caso. Con las imágenes se calculó el porcentaje de extinción de fluorescencia para cada sonda.

Accesibilidad de AChR marcado con Cy3-αBTX-biotina a moléculas de alto peso molecular (estreptavidina-Cy5)

Para determinar la proporción de AChR secuestrado en un compartimento conectado con la superficie celular las células fueron marcadas con Cy3-αBTX-biotina durante 1 h a 4°C, lavadas con M1 y llevadas a 37°C en medio completo durante distintos períodos (desde 0 a 12 hs). Después del tiempo indicado las células se marcaron con Cy5-SA durante 1 h a 4°C, se lavaron con M1 y se fotografiaron. Se midió la intensidad de fluorescencia de Cy3-αBTX-biotina y SA-Cy5, y se calculó para cada célula la relación Cy5/Cy3. La relación Cy5/Cy3 a distintos tiempos está relacionada con la accesibilidad de la biotina presente en la sonda Cy3-αBTX-biotina a la Cy5-SA. Se consideró la relación Cy5/Cy3 de las células marcadas a 4°C y no incubadas a 37°C como aquella que representa el 100 % de accesibilidad.

Experimentos de colocalización

Las células CHO-K1/A5 fueron incubadas con Cy3-αBTX durante 1 h a 4°C, lavadas con M1 frío y llevadas a 37°C en medio completo durante distintos tiempos (0-12hs). Como marcador de la vía dependiente de clatrina se utilizó Cy5-Tfr, como marcador de internalización de fase fluida se utilizó FITC-Dextran. Estas sondas se agregaron al medio de incubación de las células 5 o 20 min antes de que el tiempo de incubación terminara. Luego las células se lavaron durante 10 min con buffer ascorbato

(140 mM ascorbato de sodio, 65 mM ácido ascórbico, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 4,5) para remover la Tfr unida a la superficie celular y fotografiadas.

El estudio de la colocalización del AChR con caveolina, Rab5, Rab7, Golgi y GPI-AP, se realizó en las células CHO K1/A5 transfectadas con plásmidos que codifican para caveolina-GFP, Rab5-GFP, Rab7-GFP, GalT-GFP o GPI-GFP, marcadas a 4°C durante 1 h con Cy3- α BTX, luego incubadas a 37°C en medio completo durante distintos tiempos y fotografiadas. El mismo procedimiento se realizó en el caso de los experimentos de colocalización en presencia de M β CDx, excepto que el tiempo de incubación a 37°C fue entre 0 y 30 min. Como marcador de lisosomas se utilizó *Lisotracker*.

Inhibición de dinamina

Las células se transfectaron en forma transitoria con plásmidos que codifican para una mutante negativa de din, din K44A-GFP y din K44A-HA, o para la versión salvaje, din-GFP. Doce horas después de la transfección se determinó la accesibilidad a moléculas de alto y bajo peso molecular como se describió anteriormente, así como también la internalización del AChR en presencia de M β CDx. Como control positivo de la inhibición de din se midió la endocitosis de Tfr en las células transfectadas. Para ello se agregó durante los últimos 30 min de incubación Cy5-Tfr.

Disrupción del citoesqueleto:

Como agentes despolimerizantes de los filamentos de actina se utilizaron citocalasina D (cito D) y latrunculina A (lat A). Como agente estabilizador de los filamentos de actina se utilizó jasplakinolide (jas). La efectividad de estos tratamientos se corroboró observando los cambios producidos en la morfología celular, así como también en la estructura de los filamentos de actina marcados con rodamina-faloidina.

Con este fin, se marcaron las células con Cy3- α BTX-biotina durante 1 h a 4°C y luego se llevaron a 37°C durante 0, 2 y 4 hs en medio completo con 2,5 ó 5 μ M de cito D, o una cantidad equivalente del solvente DMSO. Veinte minutos antes del final de la incubación se agregó Alexa⁴⁸⁸-Tfr para evaluar la especificidad del tratamiento. Luego

de la incubación se lavaron las células durante 10 min con buffer ascorbato, se marcaron con Cy5-SA durante 1 h a 4°C y se fotografiaron. Se calculó la relación Cy5/Cy3 para cada condición, considerándose la relación Cy5/Cy3 de las células no incubadas a 37°C como 100%.

Para el tratamiento con jas, las células se marcaron con α BTX-biotina durante 1 h a 4°C y incubándose luego a 37°C por 0 ó 2 hs con 1 μ M jas, o cantidades equivalentes del solvente DMSO. Al final de la incubación las células fueron marcadas con Alexa⁴⁸⁸-SA durante 1 h a 4°C y fotografiadas. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en superficie de la Alexa⁴⁸⁸-SA en cada célula y se normalizaron los valores respecto a la intensidad obtenida en las células no incubadas a 37°C.

Para evaluar el papel del citoesqueleto en las células tratadas con M β CDx, las mismas se marcaron a 4°C con α BTX-biotina durante 1 h y luego se incubaron durante 30 min a 37°C en presencia de M β CDx, con o sin el agregado de 8 μ M lat A, 2,5 μ M cito D ó 1 μ M jas. Al final de la incubación las células se marcaron con Alexa⁴⁸⁸-SA durante 1 h a 4°C, y se fijaron durante 40 min con paraformaldehído (PF) al 2 % a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizaron con Triton X-100 0.01% durante 20 min y se marcaron con rodamina-faloidina durante 30 min. Finalmente las células se fotografiaron y se cuantificó la fluorescencia en superficie de la Alexa⁴⁸⁸-SA, como se describió en el párrafo anterior.

Efecto de Arf6 sobre la internalización del AChR

Las células fueron transfectadas en forma transiente con plásmidos que codifican para una mutante negativa (Arf6 T27N-HA) o una mutante activa (Arf6 Q67L-HA) de Arf6. Doce horas después de la transfección las células se utilizaron para evaluar el efecto de las mutantes de Arf6 sobre la internalización del AChR.

Las células fueron marcadas con α BTX-biotina durante 1 h a 4°C, e incubadas a 37°C por 0 ó 6 hs en medio completo. Al final de la incubación las células fueron marcadas con Cy5-SA por 1 h a 4°C, lavadas, fijadas y permeabilizadas como se describió anteriormente. Luego, fueron incubadas con anticuerpo de ratón anti-HA

durante 1 h seguido de anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Alexa⁴⁸⁸ durante 1 h más. Por último las células fueron fotografiadas y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de Cy5-SA en la superficie celular en células transfectadas y no transfectadas.

En el caso de los estudios de la internalización del AChR inducida por M β CDx, las células fueron marcadas con Alexa⁶⁴⁷- α BTX durante 1 h a 4°C y tratadas con M β CDx como se explicó anteriormente. Al final del tratamiento se procedió a la detección del antígeno HA como se indicó arriba. Finalmente las células fueron fotografiadas y se cuantificó el número de células transfectadas y no transfectadas que presentaban endosomas con AChR.

Tratamiento con brefeldina A

Las células se marcaron a 4°C con α BTX-biotina durante 1 h y luego se incubaron durante 30 min a 37°C en presencia de M β CDx, con o sin el agregado de 2,5 μ g/ml de brefeldina A (BFA). Al final de la incubación las células fueron marcadas con Alexa⁴⁸⁸-SA durante 1 h a 4°C y fotografiadas. Se cuantificó la fluorescencia en superficie de la Alexa⁴⁸⁸-SA, como se describió anteriormente.

Efecto de Rac1 sobre la internalización del AChR

Las células se transfectaron en forma transiente con un plásmido que codifica para una mutante negativa (Rac N17-HA) de Rac1. Doce horas después de la transfección fueron utilizadas para evaluar el efecto de la mutante de Rac1 sobre la internalización del AChR en presencia de M β CDx. Para ello, las células fueron marcadas con Alexa⁶⁴⁷- α BTX durante 1 h a 4°C y tratadas con M β CDx como se explicó anteriormente. Al final del tratamiento se procedió a la detección del antígeno HA como se indicó arriba. Finalmente las células fueron fotografiadas y se cuantificó el número de células transfectadas y no transfectadas que presentaban endosomas con AChR.

Inhibición de la formación de ácido fosfatídico

Los alcoholes primarios, como el 1-butanol, pueden derivar la formación de ácido fosfatídico por la fosfolipasa D (PLD) hacia la formación de los correspondientes

fosfatidilalcoholes (moléculas inactivas). Es por ello que los alcoholes primarios son ampliamente usados en el estudio de las funciones celulares en las que se hayan implicados enzimas PLD o sus productos. Los alcoholes ramificados como el isopropanol no son sustrato en estas reacciones por lo que sirven como control.

Con el fin de evaluar el efecto de la inhibición de ácido fosfatídico sobre la internalización del AChR, se marcaron las células con α BTX-biotina durante 1 h a 4°C y luego se incubaron durante 30 min a 37°C con M1, M1 + 0.3 % 1-butanol, M1 + 0.3 % isopropanol, 15 mM M β CDx, 15 mM M β CDx + 0.3 % 1-butanol, 15 mM M β CDx+ 0.3% isopropanol. Al final de la incubación las células fueron marcadas con Alexa⁴⁸⁸-SA por 1 h a 4°C y luego fotografiadas. Se cuantificó en cada caso la fluorescencia en membrana, normalizándose contra la fluorescencia proveniente de células marcadas con α BTX-biotina y Alexa⁴⁸⁸- SA, pero no incubadas a 37°C. Las células tratadas con M1, M1 + 0.3 % 1-butanol o M1 + 0.3 % isopropanol no mostraron diferencias significativas respecto a las células control.

Reciclado del AChR

Para determinar si el AChR es reciclado en las células CHO-K1/A5, desarrollamos un protocolo de marcación con α BTX-biotina y estreptavidinas de distinto color. Las células fueron marcadas por 1 h a 4°C con concentraciones saturantes de α BTX-biotina (rojo en la Figura 2), y luego incubadas a 37°C durante 3 hs para permitir la internalización del AChR. Al final de la incubación las células fueron marcadas con Cy5-SA (azul en la Figura 2) por 1 h a 4°C e incubadas nuevamente a 37°C durante 0 (derecha en la Figura 2) ó 2 hs (izquierda en la Figura 2). Al finalizar esta incubación las células fueron marcadas con Alexa⁴⁸⁸-SA (verde en la Figura 2) por 1 h a 4°C, y fotografiadas. Con este protocolo, los AChR presentes en la superficie celular al inicio de la etapa de reciclado del experimento se marcan en azul, y los AChR que reciclen (es decir los AChR- α BTX que se internalizaron durante las primeras 2 hs de incubación a 37°C y vuelven a la membrana durante las segundas 2 hs de incubación a 37 °C) se marcan verde. Los AChR recién sintetizados que se inserten en la membrana en los

períodos de incubación a 37°C no interfieren con el experimento ya que no están marcados con α BTX-biotina.

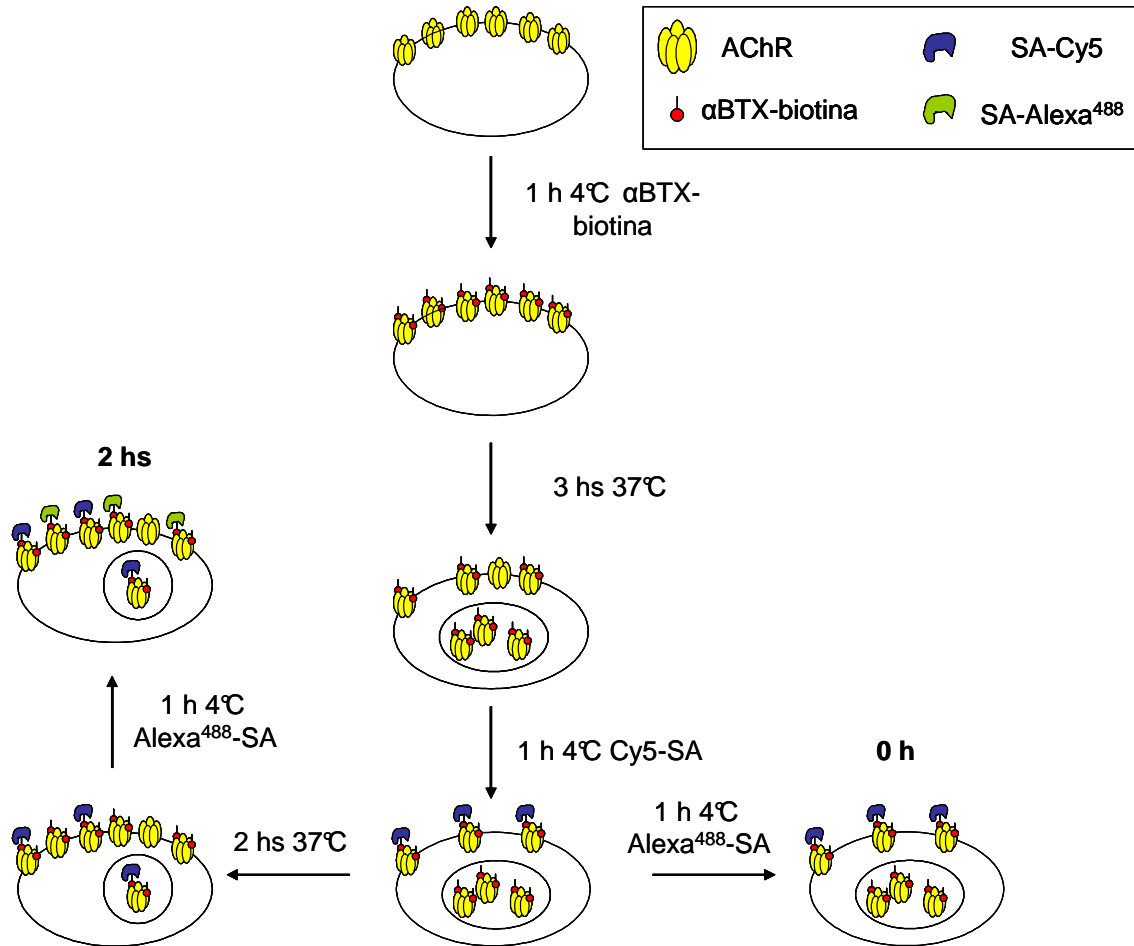


Figura 3. Esquema de un experimento de reciclado.

***Capítulo I: Caracterización del mecanismo de endocitosis
del AChR en células CHO-K1/A5***

Resultados

En este Capítulo de esta Tesis doctoral se caracterizó el mecanismo de internalización del AChR muscular adulto. Con tal propósito se realizaron estudios de biología celular y de microscopía de fluorescencia de campo ancho y confocal, recurriéndose a herramientas de biología molecular (uso de mutantes y proteínas conjugadas con proteínas fluorescentes, etc.) y farmacológicas (uso de toxinas y drogas inhibitorias de la polimerización del citoesqueleto).

α BTX induce la internalización del AChR en células CHO-K1/A5

La línea celular CHO-K1/A5 expresa en forma heteróloga y estable el AChR muscular adulto ($\alpha 2\beta\gamma\delta$) de ratón (190). Los niveles de AChR en la superficie celular pueden ser detectados mediante la unión de derivados fluorescentes del antagonista competitivo α bungarotoxina (α BTX), o a través de la unión de anticuerpos específicos (mAb210).

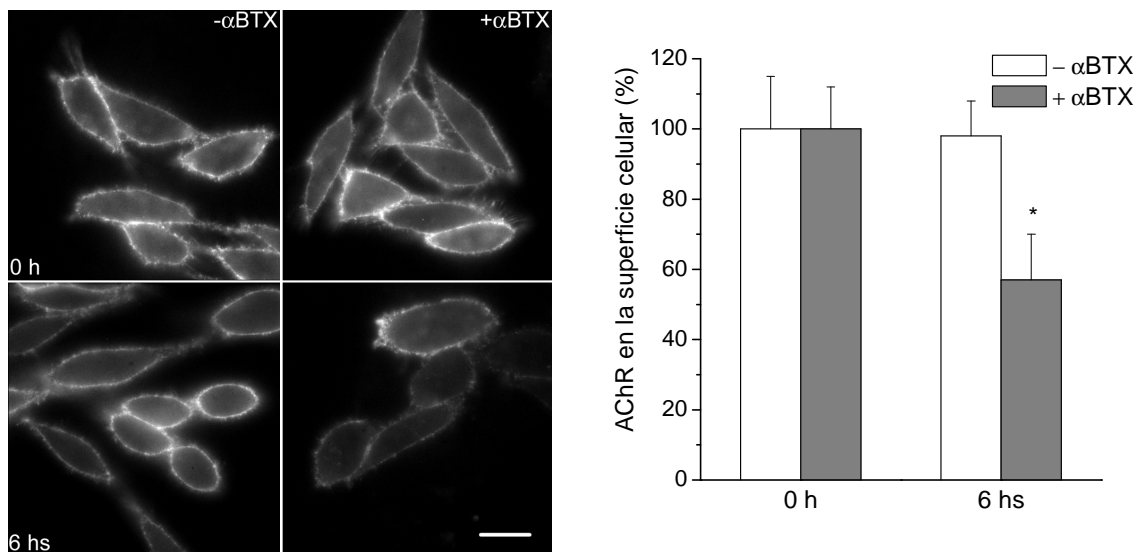


Figura 1. La incubación con α BTX induce la internalización del AChR. Células CHO-K1/A5 fueron incubadas en ausencia ($-\alpha$ BTX) o presencia ($+\alpha$ BTX) de α BTX-Cy3-biotina durante 6 h a 37 °C. Al final de la incubación los niveles de AChR remanentes en la superficie celular fueron cuantificados a través de la unión de SA fluorescente (n=4). * $p < 0.001$. Escala

Para determinar si la unión de α BTX afecta la internalización del AChR, medimos los niveles de receptor remanentes en la superficie celular luego de una incubación de 6 hs a 37°C en presencia o ausencia de α BTX. En ausencia de α BTX, los niveles de AChR en la superficie celular no varían (Figura 1A, imágenes $-\alpha$ BTX y

barras blancas en el gráfico, Figura 1B). Por el contrario, la incubación de células CHO-K1/A5 con concentraciones saturantes de α BTX provoca una disminución de aproximadamente 40% de los niveles de AChR de superficie (Figura 1, imágenes + α BTX (A) y barras grises en el gráfico (B)).

Luego intentamos determinar si la unión de la α BTX puede también modular los niveles de AChRs a los que no se unió. Para ello, se marcaron las células con concentraciones no saturantes de Alexa⁴⁸⁸- α BTX (verde), se lavaron, y luego se mantuvieron por 2 hs a 4°C ó 37°C respectivamente. Tras esta incubación marcamos las células a 4°C con toxina fluorescente roja, Alexa⁵⁴⁶- α BTX. Este diseño experimental permite distinguir si sólo son internalizados los AChR de la superficie celular que unieron inicialmente Alexa⁴⁸⁸- α BTX: la unión de la toxina Alexa⁵⁴⁶- α BTX debería ser de igual magnitud en las células incubadas a 4°C ó 37°C. Si por el contrario, los AChR que no unieron Alexa⁴⁸⁸- α BTX también son internalizados junto con los receptores que sí unieron la toxina, la marca correspondiente a Alexa⁵⁴⁶- α BTX debería disminuir en las células incubadas a 37°C en relación a la de las incubadas a 4°C.

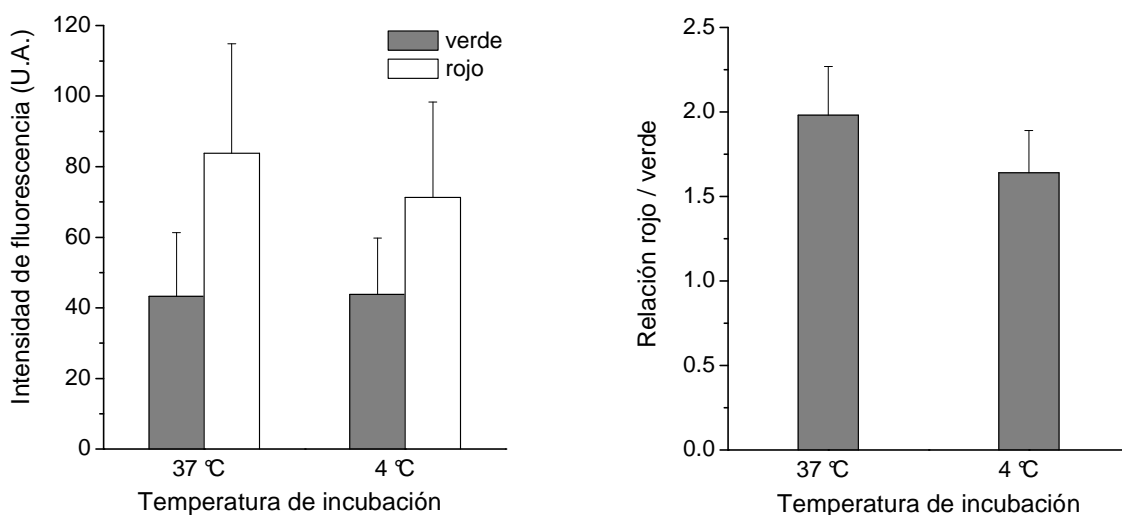


Figura 2. La α BTX no modula la internalización de los AChR a los que no se unió. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas por 1 h a 4 °C con concentraciones no saturantes de Alexa⁴⁸⁸- α BTX, y luego incubadas por 2 hs a 4 °C o 37 °C. Al final de esta incubación las células fueron marcadas a 4 °C por 1 h con Alexa⁵⁴⁶- α BTX y fotografiadas. Se cuantificó en cada célula la fluorescencia correspondiente a Alexa⁴⁸⁸- α BTX (verde) y Alexa⁵⁴⁶- α BTX (rojo) y se calculó la relación verde/rojo. Se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo.

La cuantificación de este tipo de experimentos es más precisa si se recurre al cociente de los valores de la fluorescencia roja y verde, respectivamente, ya que de esta forma nos independizamos de los diferentes niveles de expresión del AChR entre las células observadas. La Figura 2A demuestra la ausencia de variaciones en los niveles de fluorescencia de Alexa⁵⁴⁶- α BTX (roja) en las células expuestas inicialmente a la Alexa⁴⁸⁸- α BTX (verde), ni en la relación rojo/verde (Figura 2B). Esto sugiere que la α BTX no modula la internalización de los AChR a los que no se unió.

Los niveles de AChR en la superficie celular resultan de un balance entre los procesos de inserción, internalización y reciclado. Para inhibir temporariamente la biosíntesis de receptores, y en consecuencia su inserción en la membrana, se trataron las células con cicloheximida durante 6 hs. En esta situación y en ausencia de α BTX los niveles de AChR en la superficie celular no cambiaron (Figura 3). Este resultado, combinado con los de las Figuras 1, permite concluir que tanto la endocitosis constitutiva como la degradación del AChR son procesos muy lentos en este sistema celular.

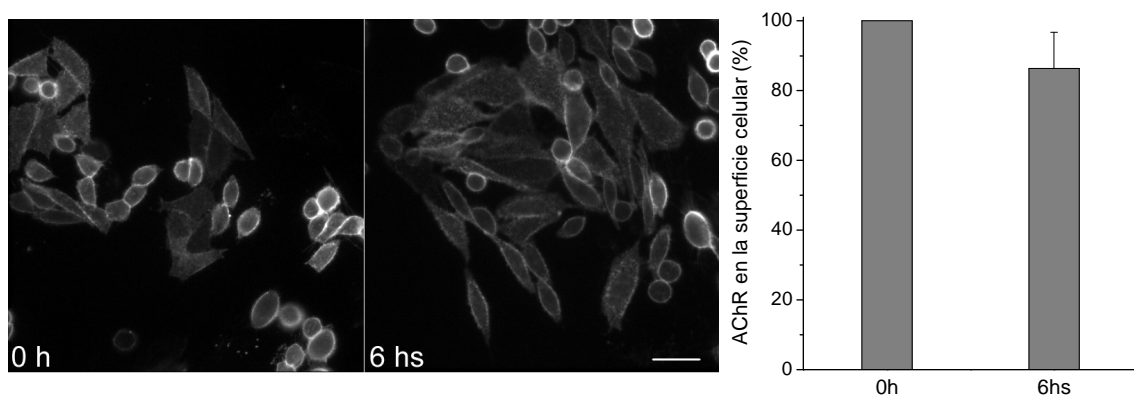


Figura 3. El AChR es muy estable en la superficie de las células CHO-K1/A5. Las células CHO-K1/A5 fueron incubadas con 200 μ g/ml de cicloheximida durante 0 ó 6 hs a 37 °C. Al final de la incubación los niveles del AChR remanentes en la superficie celular fueron cuantificados a través de la unión Alexa⁴⁸⁸- α BTX (n=3). Escala 50 μ m

Algunos anticuerpos dirigidos contra el AChR lo entrecruzan e inducen su internalización y consecuente degradación. Este proceso es conocido como “modulación antigénica” y contribuye a la pérdida del AChR observada en la UNM de pacientes con la enfermedad autoinmune *miastenia gravis* (192).

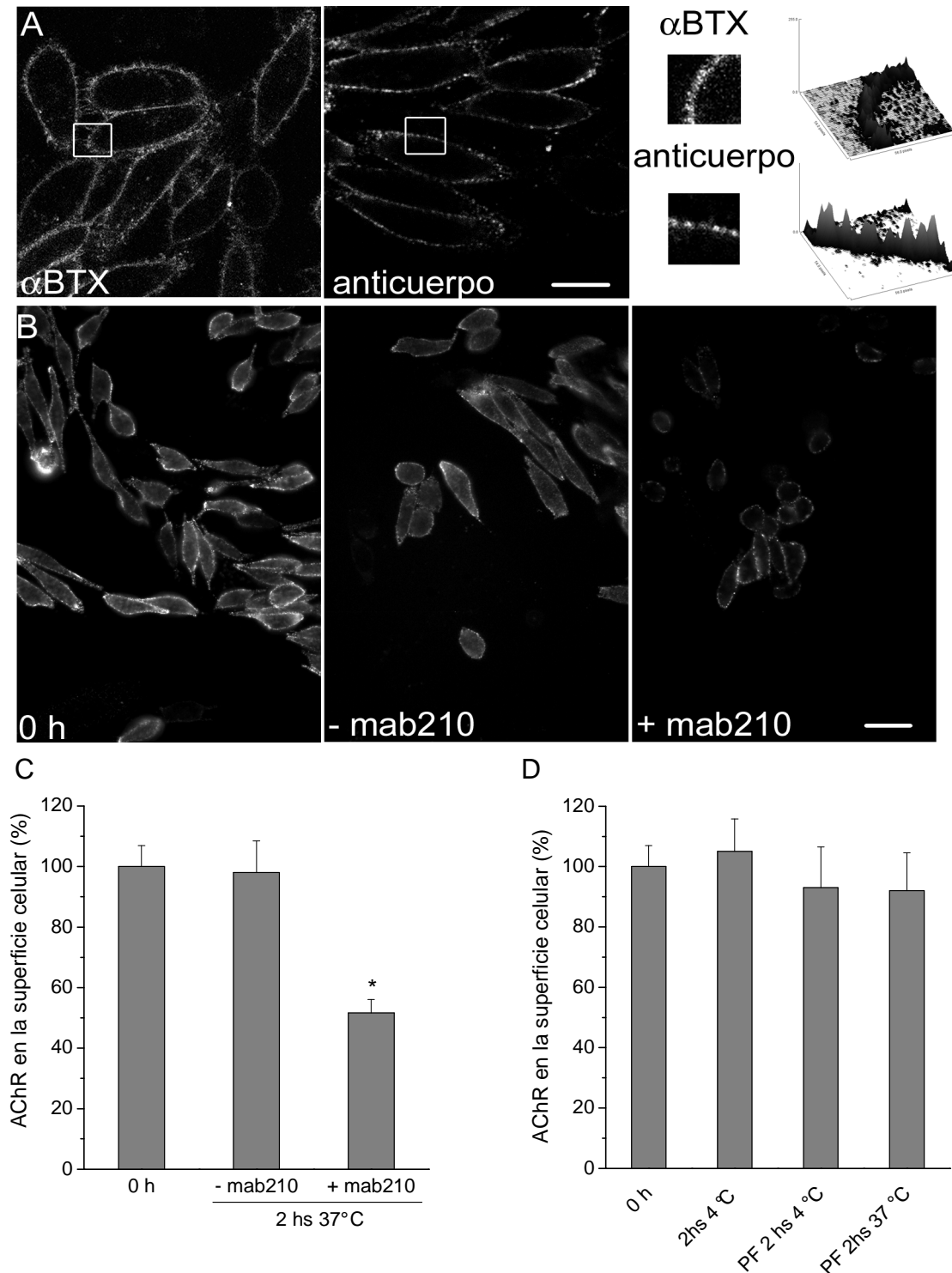


Figura 4. La unión de anticuerpos induce la internalización del AChR. A) Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas a 4°C con α BTX o anticuerpo mAb210 seguido de anticuerpo secundario. Gráfico de una región de la superficie celular donde se ve la distribución homogénea del AChR marcado con α BTX y la distribución en agregados cuando se marca con anticuerpos. Escala 20 μ m B) Las células CHO-K1/A5 fueron incubadas a 37 °C durante 2 hs y luego marcadas con mAb210 y anticuerpo secundario a 4°C (- mab210) o marcadas a 4°C con mAb210, luego incubadas a 37°C durante 0 (0h) ó 2 hs (+mab210) y finalmente marcadas a 4 °C con anticuerpo secundario. Escala 50 μ m C) Cuantificación de los experimentos descritos en B (n=4) *p<0.001. D) Cuantificación de los niveles de AChR en la superficie celular marcado con mAb210 e incubadas durante 0 ó 2 hs a 4°C, o fijadas con PF e incubadas durante 2hs a 4°C ó 37°C. Al final de la incubación las células fueron marcadas con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸ (n=3).

Para investigar si el AChR expresado en células CHO-K1/A5 responde a la modulación por anticuerpos, las células fueron tratadas con mAb210, un anticuerpo dirigido contra la región inmunogénica principal ubicada en la porción extracelular de las subunidades α . La unión del anticuerpo resulta en la formación de acúmulos ("*clusters*") del AChR, que se evidencian por la marcación puntiforme en contraste con la marcación homogénea observada con la tinción con α BTX fluorescente (Figura 2A). Asimismo el tratamiento con anticuerpos produjo una reducción en los niveles de AChR en la superficie celular de ~50 % (Figura 4B y cuantificación en C). Esta disminución se debió a un proceso celular activo (la internalización del AChR), y no al desprendimiento del anticuerpo debido al tiempo de incubación, ya que no se observó tal fenómeno al mantener las células a 4°C durante 2 hs, ni al fijarlas con paraformaldehído (PF) e incubándolas luego a 37°C (Figura 4D).

Estas observaciones sugieren que la modulación por anticuerpos de los niveles de AChR en la superficie de las células CHO-K1/A5 es similar a la observada en sistemas en los cuales el AChR se expresa en forma nativa o endógena.

Determinación de la cinética de internalización del AChR

Cuando se marcan las células CHO-K1/A5 con α BTX acoplada a algún fluoróforo durante 1 h a 4°C, la fluorescencia observada proviene sólo de la superficie celular, ya que a esta temperatura los procesos de tráfico celulares están retardados. La posterior incubación a 37°C restaura los procesos de tráfico bloqueados, permitiendo entonces 'seguir' al AChR durante su internalización.

La sonda Cy3- α BTX-biotina (preparada en nuestro laboratorio, ver Materiales y Métodos) ofrece dos posibilidades de detección, por un lado la fluorescencia del fluoróforo Cy3 y por otro la capacidad de unir estreptavidina (SA) fluorescente a través de la biotina. Esto nos permitió evaluar la cinética de internalización del AChR a través de dos tipos de ensayo: la unión de Cy5-SA a la

biotina de la sonda Cy3- α BTX-biotina, y la extinción (E) de la fluorescencia de la superficie celular por KI.

En el primero de los ensayos, se marcaron inicialmente las células a 4°C con Cy3- α BTX-biotina por 1 h. Tal como se vio anteriormente, bajo estas condiciones el ligando fluorescente permanece en superficie. Seguidamente, las células se incuban a 37°C por tiempos variables (Figuras 5 y 6) y finalmente se tiñen con Cy5-SA a 4°C. Esta segunda sonda sólo se unirá a la biotina presente en la membrana plasmática. Con este diseño experimental, la fluorescencia proveniente del fluoróforo Cy3 corresponde a los AChR presentes en la superficie celular al inicio del experimento, y la fluorescencia proveniente del fluoróforo Cy5 corresponde a los AChR remanentes en la membrana plasmática al final del experimento. Así, al calcular la relación de intensidades de fluorescencia entre Cy5 y Cy3, se estima la fracción de AChR internalizada a un determinado tiempo en cada célula.

El KI es un extintor de fluorescencia que opera por un mecanismo colisional, es decir que al colisionar con el fluoróforo en estado excitado provoca que éste retorne a su estado basal sin emitir un fotón. De esto resulta una disminución o extinción de la fluorescencia. Por otro lado, debido a su naturaleza iónica, el KI no puede atravesar la membrana plasmática, por lo que actúa únicamente sobre los fluoróforos presente en la superficie celular. Esto permite calcular el porcentaje de internalización del AChR marcado con una sonda fluorescente (en este caso Cy3- α BTX-biotina) a distintos tiempos a través del cálculo del porcentaje de extinción de fluorescencia (% de E). A medida que los complejos del AChR con la Cy3- α BTX-biotina se internalizan el % de E disminuye, ya que la marca fluorescente se vuelve inaccesible al KI presente en el medio.

Los dos métodos descriptos precedentemente nos permiten determinar, además, si existen diferencias en la accesibilidad del AChR a sondas con pesos moleculares diferentes, tal como se describirá a continuación.

Para determinar la cinética de internalización del AChR, marcamos células CHO-K1/A5 a 4°C con Cy3- α BTX-biotina y luego las incubamos a 37°C durante distintos períodos (entre 0 hs y 12 hs). Al final de cada incubación las células fueron marcadas con Cy5-SA por 1 h a 4°C y fotografiadas antes y después de agregar el agente extintor KI. Se calculó a cada tiempo el % de E y la relación Cy5/Cy3. Como se observa en la Figura 5, la mayoría de los AChRs permanecen en la superficie celular aún tras 2 hs de incubación a 37°C. A mayores tiempos una fracción de los AChRs es internalizada, encontrándose en estructuras con morfología de endosomas. La presencia del AChR en estas estructuras se incrementa en función del tiempo.

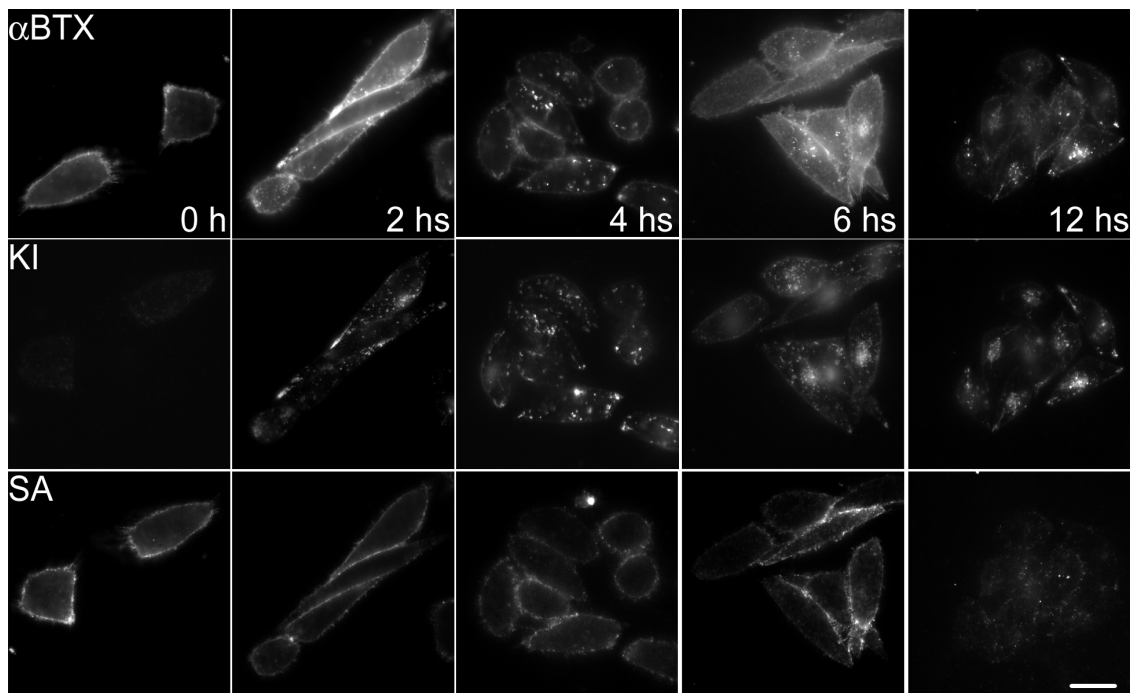


Figura 5. Cinética de internalización del AChR. Las células fueron marcadas por 1 h a 4 °C con Cy3- α BTX-biotina, incubadas a 37 °C durante los tiempos indicados en cada columna y luego marcadas a 4 °C con Cy5-SA. La fila α BTX corresponde a imágenes de fluorescencia de la sonda Cy3- α BTX-biotina, la fila SA corresponde a imágenes de fluorescencia de la sonda Cy5-SA. La fila KI corresponde a imágenes tomadas inmediatamente después de agregar KI 200mM. Escala 20 μ m.

Luego de la incubación a 4°C, todos los AChR marcados son accesibles tanto al compuesto extintor de bajo peso molecular, el KI, como al de alto peso molecular (ca. 53.000 Da) la Cy5-SA. Luego de 2 hs, menos del 50% de los AChRs marcados con Cy3- α BTX-biotina son accesibles a la marcación con Cy5-SA,

mientras que aproximadamente el 90% de los receptores siguen siendo accesibles al KI (Figuras 4 y 5A). Al incubar durante 4 hs adicionales, se observa una pérdida significativa de accesibilidad a ambas sondas, KI y Cy5-SA: ~30% de los receptores se vuelven inaccesibles al KI y ~50% al Cy5-SA luego de 6 hs de incubación a 37°C (Figura 5 y 6A). Después de 12 hs el 60% de los AChRs se vuelven inaccesibles a ambos agentes extintores (Figura 6B). Sin embargo, a tal tiempo se observa una disminución de la marca total de Cy3- α BTX-biotina (Figura 6B), lo cual refleja la degradación del AChR. Esto determina imprecisiones en la cuantificación del *pool* intracelular de AChRs a tiempos tan largos.

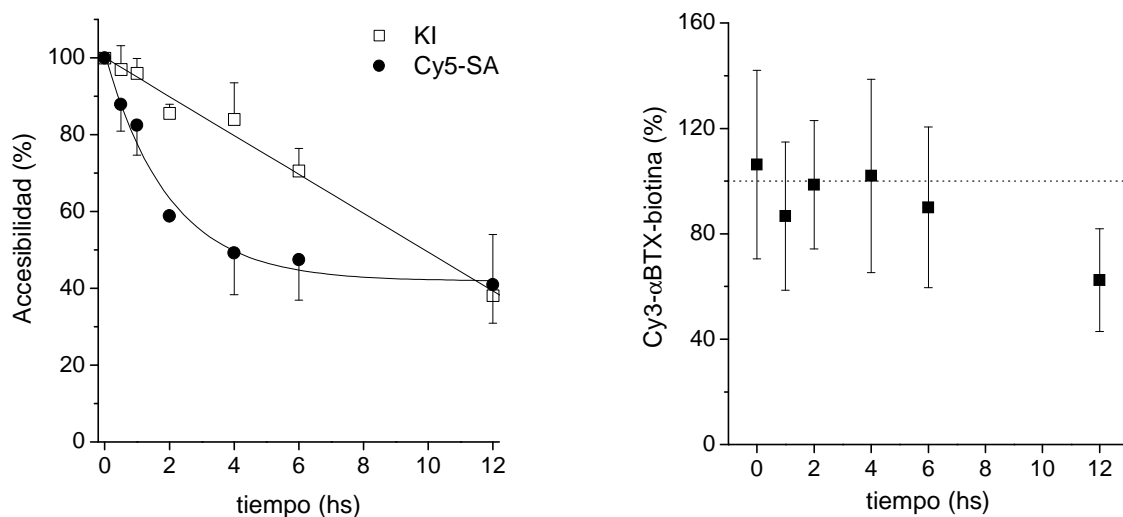


Figura 6. Cinética de internalización, secuestro y degradación del AChR. A) Las células fueron marcadas por 1 h a 4 °C con Cy3- α BTX-biotina, incubadas a 37 °C durante distintos tiempos y luego marcadas a 4 °C con Cy5-SA. Finalmente, se fotografiaron antes e inmediatamente después de agregar KI 200mM. Se calculó para cada célula la relación Cy5/Cy3 y el % de E, normalizándose estos valores respecto a los obtenidos para células no incubadas a 37 °C. Los resultados se expresaron como la media \pm s.d. de por lo menos 3 experimentos distintos. B) Cuantificación de la fluorescencia proveniente de la sonda Cy3- α BTX-biotina.

La diferencia en la accesibilidad del AChR marcado con α BTX a sondas de alto y bajo peso molecular sugiere que, luego de una incubación a 37°C, el AChR evoluciona de un estado de completa accesibilidad a un estado conectado con la superficie celular pero secuestrado, cuya transición es sensible a la temperatura. La velocidad de desaparición del AChR de la superficie celular (ya sea por secuestro o internalización) puede obtenerse del cambio de la relación Cy5/Cy3 a

través del tiempo. Este cambio puede ajustarse con una exponencial simple con valor de $t_{1/2}=2.0 \pm 0.4$ h. Estos resultados difieren de los obtenidos con el ensayo de KI, que se ajustan mejor con una recta (Figura 6), de cuya pendiente se deduce que la internalización del AChR procede con una constante de tiempo de 5.4 ± 0.7 % h⁻¹.

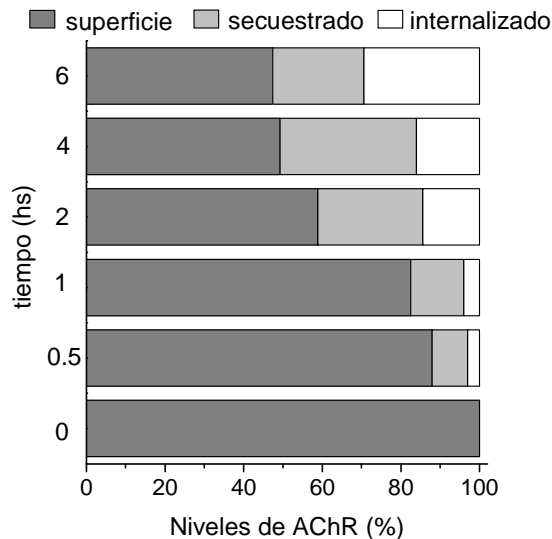


Figura 7. Cambios en los niveles de AChR en superficie, secuestrado e internalizado. Con los datos del % de accesibilidad a SA y % de E normalizados respecto al tiempo 0 h se calcularon los niveles de AChR secuestrado como la resta entre ambos valores. El AChR internalizado corresponde al % de E. Como a los tiempos graficados la degradación del AChR no es significativa, asumimos que el resto de los AChR corresponden a los receptores presentes en la superficie celular.

La diferencia entre el porcentaje de E y el de accesibilidad a SA-Cy5 representa el porcentaje de AChRs secuestrados (Figura 7). Este se incrementa en función del tiempo, pero su aumento ocurre antes que el del porcentaje de AChR internalizado. Esto sugiere que el proceso de secuestro ocurre antes que la internalización del AChR.

Si inspeccionamos la distribución de la fluorescencia de Cy3- α BTX-biotina en las células marcadas a 4°C y luego incubadas durante 0 ó 2 hs a 37°C observamos que la mayor parte de la marca se encuentra en la superficie (Figuras y 6, 2 hs; Figura 8 imagen Cy3- α BTX-biotina), y puede ser extinguida con KI (Figuras 5 y 6, 2 hs; Figura 8 imagen KI). Sin embargo, comparado con el tiempo 0 hs, luego de 2 hs a 37°C una fracción significativa de la Cy3- α BTX-biotina (coloreada rojo en la Figura 8, panel inferior) que fue extinguida por KI no puede ser marcada con Cy5-SA (coloreada verde en la Figura 8, panel inferior, y también ver flechas en las imágenes superpuestas en el inserto). Las regiones marcadas

con Cy3- α BTX-biotina y despobladas de Cy5-SA pueden ser resueltas como pequeños puntos de un tamaño cercano a la resolución óptica del microscopio empleado (300 nm).

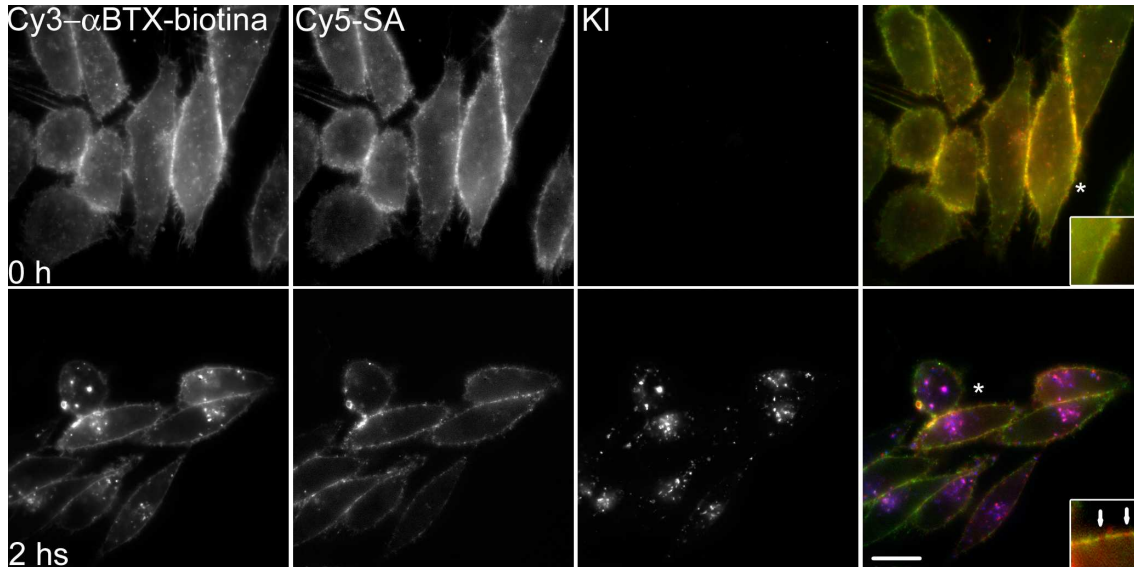


Figura 8. EL AChR es secuestrado en estructuras conectadas con la superficie celular no accesibles a SA. Las células fueron marcadas por 1 h a 4 °C con Cy3- α BTX-biotina, incubadas a 37 °C por 0 y 2 hs y luego marcadas a 4 °C con Cy5-SA. Se fotografiaron antes e inmediatamente después de agregar KI 200 mM. En la imagen superpuesta el rojo corresponde a Cy3- α BTX-biotina, el verde a Cy5-SA, y el azul a la imagen de KI. Las flechas indican regiones de la membrana marcadas con Cy3- α BTX-biotina, accesibles a KI, pero no a Cy5-SA. Escala 20 μ m

Reciclado del AChR

Muchas proteínas, como por ejemplo el receptor de Tfr, retornan a la superficie celular luego de ser internalizadas, en un proceso denominado reciclaje. Para determinar si el AChR recicla, diseñamos un experimento con dos SA marcadas con fluoróforos de diferente color (ver Materiales y Métodos). Marcamos luego el AChR con α BTX-biotina, mantuvimos las células a 37°C para permitir el secuestro/internalización del AChR de superficie, y bloqueamos los AChR remanentes con SA-Cy5 (rojo). Inmediatamente después marcamos con SA-Alexa⁴⁸⁸ (tiempo 0 h) o incubamos durante 3 hs más a 37°C para evaluar si aparecen en la superficie celular nuevos sitios de unión a SA-Alexa⁴⁸⁸ (verde). De observarse, estos sitios indicarían la presencia de AChRs reciclados, que se manifiestan como un incremento en los niveles de marcación con SA-Alexa⁴⁸⁸

respecto a las células correspondientes al tiempo 0 h. Como se observa en la Figura 9, la marca de SA-Alexa⁴⁸⁸ sólo alcanza al 10% durante la incubación de 3 hs a 37°C, lo cual indica que el AChR no recicla en forma significativa, o si lo hace, su reciclado procede en forma secuestrada, no accesible a la SA-Alexa⁴⁸⁸.

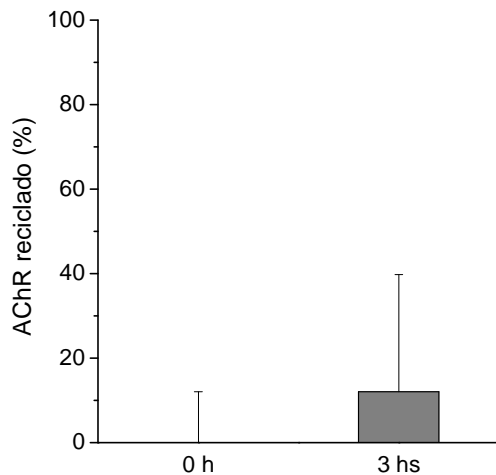


Figura 9. Reciclado del AChR. Las células fueron marcadas con α BTX-biotina por 1 h a 4 °C, incubadas durante 2 hs a 37 °C y marcadas con Cy5-SA. Luego de esta incubación, las células fueron llevadas a 37 °C durante 0h (0h) o 2 hs (2hs). Al final de este periodo fueron marcadas con SA-Alexa⁴⁸⁸ y fotografiadas. Se cuantificó la fluorescencia proveniente de la Alexa⁴⁸⁸-SA, normalizándose respecto a la fluorescencia de la SA-Alexa⁴⁸⁸ de las células incubadas durante 0h.

Colocalización con marcadores de organelas celulares

Para estudiar la ruta que sigue el AChR luego de internalizado, evaluamos la cinética de colocalización del receptor marcado con α BTX y diferentes marcadores de organelas endocíticas.

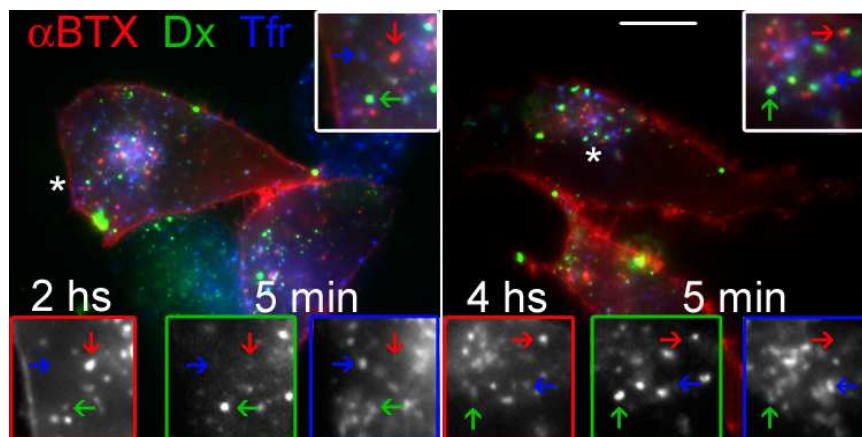


Figura 10. Los endosomas que contienen AChR no colocalizan con endosomas que contienen Tfr ni Dx. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con Cy3- α BTX (rojo) durante 1 h a 4 °C, e incubadas durante 2 o 4 hs a 37 °C. Cinco minutos antes de que terminara este periodo se agregó al medio de incubación Cy5-Tfr (azul) y FITC-Dx (verde). Luego se lavaron con buffer ascorbato para remover la Tfr unida a la superficie celular y se fotografiaron. Se muestran imágenes representativas superpuestas de células tratadas como se indicó. Los insertos muestran una ampliación de la región señalada con el asterisco. Las flechas indican endosomas del marcador correspondiente al color. Escala 20 μ m, inserto 10 μ m.

Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con Cy3- α BTX por 1 h a 4 °C, y luego incubadas a 37°C durante períodos entre 0 a 12 hs. Los endosomas formados inicialmente (2–4 hs) no colocalizaron con la transferrina (Tfr) internalizada, un marcador de la vía de endocitosis dependiente de clatrina y la vía de reciclado (Figura 10, Tfr).

Tampoco colocalizaron con endosomas conteniendo dextrano acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC-Dx) internalizado a tiempos cortos (Figura 10, Dx) ni con proteína fluorescente verde acoplada a GPI internalizada (GFP-GPI, Figura 11). Ambas sondas son marcadores de la vía de endocitosis dependiente de cdc42 (193).

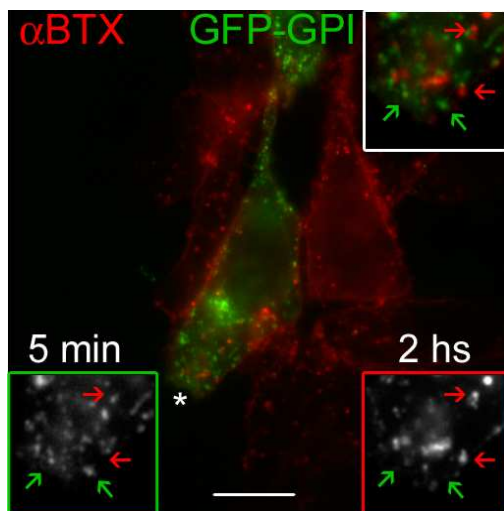
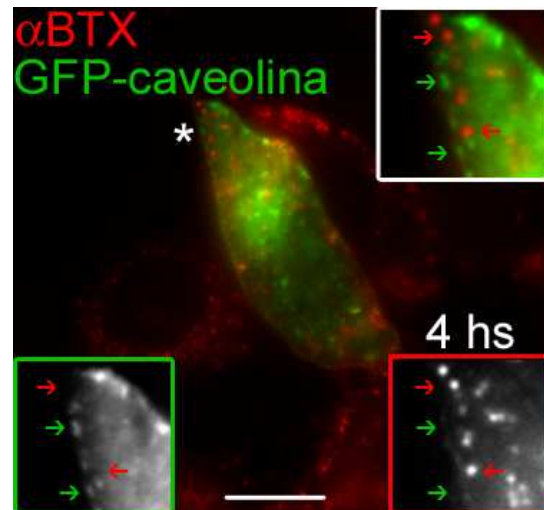


Figura 11. Los endosomas que contienen AChR no colocalizan con endosomas que contienen GFP-GPI. Las células CHO-K1/A5 fueron transfectadas con un plásmido que codifica para la proteína GFP-GPI y 18 hs después, utilizadas para los experimentos. Las células fueron marcadas con Cy3- α BTX (rojo) durante 1 h a 4 °C, e incubadas durante 2 hs a 37 °C. Cinco minutos antes de que terminara este periodo se agregó Cy5-anti-GFP (verde) al medio de incubación. Luego se trataron las células por 2 min con PI-PLC, y se fotografiaron. Se muestran imágenes representativas superpuestas de células tratadas como se indicó. Los insertos muestran una ampliación de la región señalada con el asterisco. Las flechas indican endosomas del marcador correspondiente al color. Escala 20 μ m, inserto 10 μ m.

Igualmente, no se observó colocalización con estructuras periféricas positivas para GFP-caveolina (Figura 12), marcadoras de la vía de endocitosis dependiente de caveolas (84). Esto permite concluir que los endosomas en los que el AChR ingresa a la célula son diferentes a los endosomas provenientes de las vías dependientes de clatrina, caveolina o cdc42.

Figura 12. Los endosomas que contienen AChR no colocan endosomas que contienen caveolina-GFP. Las células CHO-K1/A5 fueron transfectadas con un plásmido que codifica para GFP-caveolina (verde) y 18 hs después, utilizadas para los experimentos. Las células fueron marcadas con Cy3- α BTX (rojo) durante 1 h a 4 °C, incubadas durante 4 hs a 37 °C. y fotografiadas. Se muestran imágenes representativas superpuestas de células tratadas como se indicó. Los insertos muestran una ampliación de la región señalada con el asterisco. Las flechas indican endosomas del marcador correspondiente al color. Escala 20 μ m, inserto 10 μ m.



Una vez ingresado a la célula y luego de 6 hs de incubación a 37°C, el AChR colocaliza con galactosil transferasa marcada con proteína verde (GalT-GFP), una enzima marcadora del complejo de Golgi, sugiriendo su paso por esta organela (Figura 13).

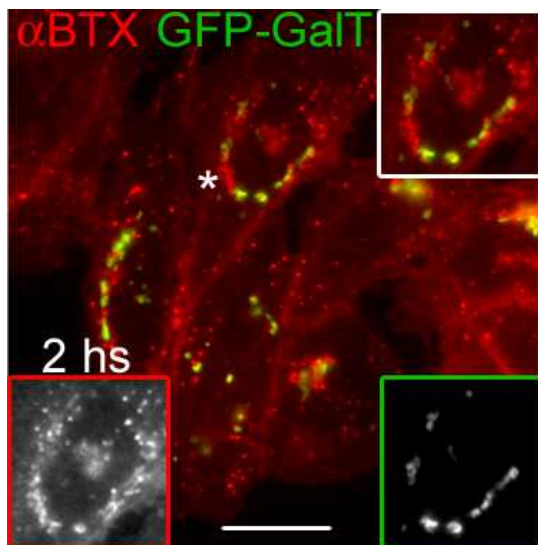


Figura 13. El AChR es transita por el complejo de Golgi. Las células CHO-K1/A5 fueron transfectadas con un plásmido que codifica para GFP-GalT (verde) y 18 hs después, utilizadas para los experimentos. Las células fueron marcadas con Cy3- α BTX (rojo) durante 1 h a 4 °C, incubadas durante 6 hs a 37 °C. y fotografiadas. Se muestran imágenes representativas superpuestas de células tratadas como se indicó. Los insertos muestran una ampliación de la región señalada con el asterisco. Escala 20 μ m, inserto 10 μ m.

A tiempos más largos de incubación, 12 h, una fracción significativa de los endosomas que contienen AChR es accesible a un pulso de 20 min con FITC dextran, pero no es accesible a un pulso de 5 min (Figura 13). Esto indicaría que el AChR se acumula en endosomas tardíos con capacidad para fusionarse con otros endosomas.

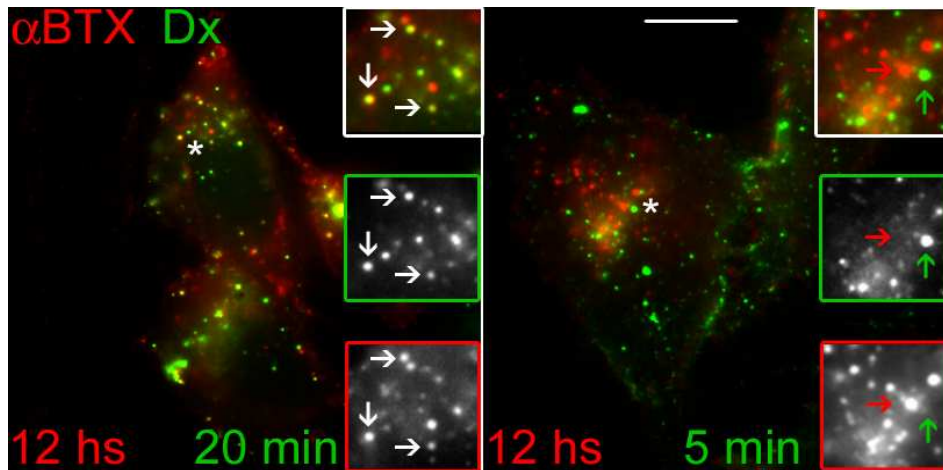


Figura 14. Los endosomas que contienen AChR colocalizan con endosomas que contienen Dx internalizado a tiempos largos. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con Cy3- α BTX (rojo) durante 1 h a 4 °C, e incubadas durante 12 hs a 37 °C. Veinte (imagen izquierda) o cinco (imagen derecha) minutos antes de que terminara este periodo se agregó al medio de incubación FITC-Dx (verde). Cumplidas las 12 hs, las células se fotografiaron. Se muestran imágenes representativas superpuestas de células tratadas como se indicó. Los insertos muestran una ampliación de la región señalada con el asterisco. Las flechas indican endosomas del marcador correspondiente al color, las flechas blancas indican colocalización. Escala 20 μ m, inserto 10 μ m.

Para caracterizar más detalladamente la naturaleza de los endosomas que contienen el AChR, estudiamos la colocalización con un marcador de endosomas tempranos, el antígeno de endosomas tempranos 1 (EEA1) y con un marcador de endosomas tardíos/lisosomas, la proteína asociada a membrana lisosomal 1 (Lamp1). Las células fueron marcadas con Cy3- α BTX durante 1 h a 4°C y luego incubadas durante 4 hs a 37°C para permitir la internalización del AChR. Al final de la incubación las células fueron fijadas, permeabilizadas con saponina 0.1 % (para la marcación con EEA1) y Triton X100 0.1% (para la marcación con Lamp1) e incubadas con anticuerpos anti-EEA1 y anti-Lamp1 durante 1 h a temperatura ambiente. Al final de esta incubación las células fueron marcadas con anticuerpos secundarios acoplados a Alexa⁴⁸⁸ y fotografiadas. Como se observa en la Figura 14, la permeabilización con ambos detergentes altera dramáticamente la morfología de los endosomas que contienen AChR, pero no afectó la marcación de endosomas marcados con EEA1 o Lamp1. Esta diferencia en la sensibilidad al detergente sugiere que la membrana de los endosomas que contienen AChR tiene una composición lipídica diferente.

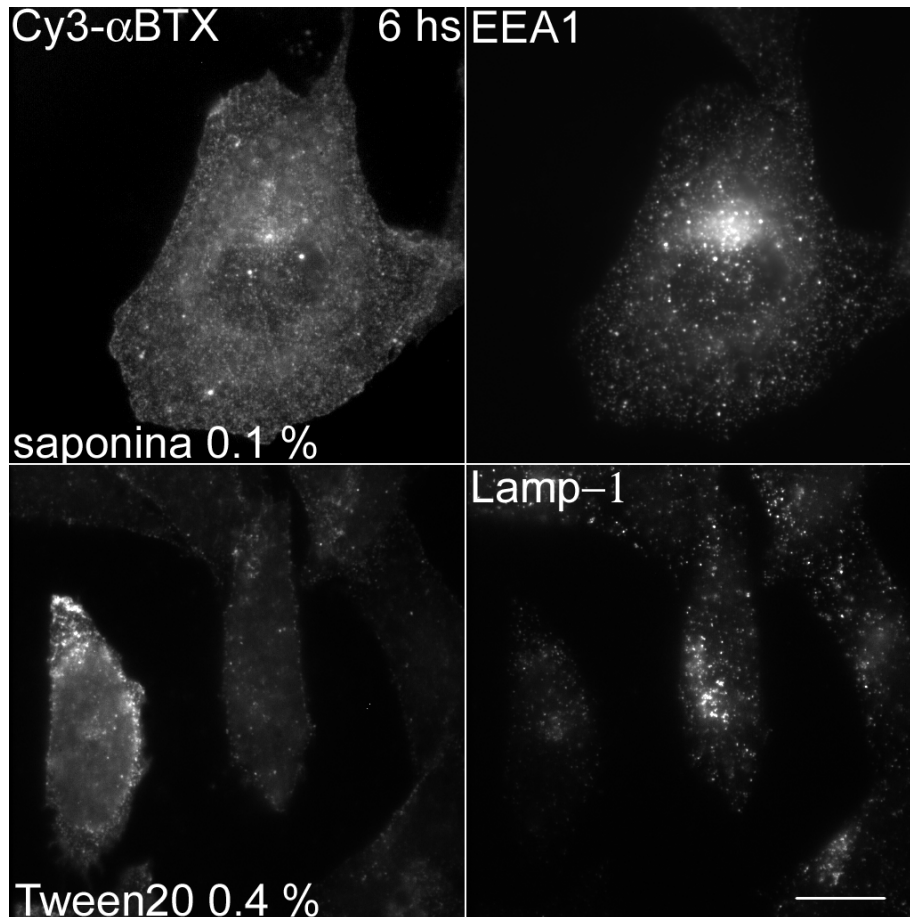


Figura 15. Los endosomas que contienen AChR son sensibles a la permeabilización con detergentes. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con Cy3- α BTX durante 1 h a 4 $^{\circ}$ C, e incubadas durante 6 hs a 37 $^{\circ}$ C. Cumplido este periodo, se fijaron con PF 2 % durante 15 min y se permeabilizaron con el método indicado en cada fila durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se marcaron con anticuerpos anti-EEA1 (panel superior) o anti-Lamp-1 (panel inferior) durante 1 h y con anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸. Se muestran imágenes representativas de células tratadas. Escala 20 μ m.

Inhibición de dinamina

La dinamina (din) es una GTPasa de 100 kD de peso molecular que interviene en la fisión de vesículas en la membrana plasmática (ver *Introducción*). Se ha observado que algunos receptores ionotrópicos relacionados estructuralmente con el AChR, como el receptor de GABA o el de la glicina, son internalizados a través de un mecanismo dependiente de din (194–197). Para investigar la influencia de la actividad de din en la internalización del AChR, transfectamos células en forma pasajera con un plásmido que codifica para una mutante negativa de din, acoplada a una GFP, dinK44A–GFP (62). Esta mutante es

deficiente en actividad GTPasa y por lo tanto, al sobreexpresarse en la célula, compite con la din endógena por los efectores, resultando en un fenotipo negativo.

Como control utilizamos las células no transfectadas presentes en el mismo portaobjeto y células transfectadas con un plásmido que codifica para la versión salvaje de din, también acoplada a GFP (din-GFP). Este último control nos permite poner en evidencia cualquier efecto asociado a la sobreexpresión de proteínas.

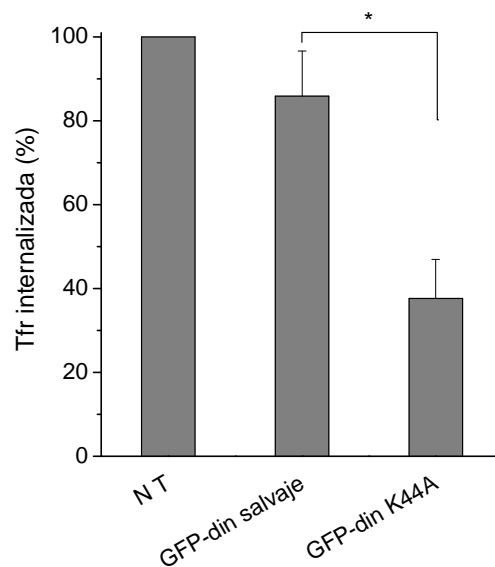


Figura 16. La sobreexpresión de dinK44A inhibe la endocitosis de Cy5-Tfr. Las células CHO-K1/A5 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para GFP-din salvaje o GFP-din K44A, y 18 hs después, utilizadas para los experimentos. Las células fueron procesadas para medir la accesibilidad del AChR a KI a las 12 hs. Treinta minutos antes de terminada la incubación a 37 °C, se adicionó al medio Cy5-Tfr. Luego se lavaron con buffer ascorbato, para remover la Tfr unida a la superficie celular y se fotografiaron. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la sonda Cy5-Tfr en células transfectadas (identificadas por la fluorescencia de GFP), normalizándose este valor respecto al obtenido en células no transfectadas (N T) presentes en el mismo preparado. * $p < 0.005$

Para comprobar la inhibición de din por la sobreexpresión de dinK44A, medimos los niveles de internalización de Cy5-Tfr, luego de 30 min. Como se observa en la Figura 16, la sobreexpresión de dinK44A inhibió en ~50% la internalización de Cy5-Tfr, mientras que la de dinamina salvaje no tuvo efecto significativo sobre este proceso endocítico. Esto corrobora la efectividad de la mutante dominante negativa dinK44A como inhibidor de la función de din y la inocuidad de la transfección.

Si observamos la internalización del AChR en células transfectadas con dinK44A, no observamos diferencias respecto de las células no transfectadas (Figura 17A, panel superior, Cy3- α BTX), mientras que dinK44A sí inhibe la internalización de Tfr (Figura 17A, panel superior, Cy5-Tfr). Esto se refleja en la accesibilidad al KI, que no muestra diferencias significativas entre células no transfectadas, trasfectadas con din salvaje o con dinK44A (Figura 17B, KI).

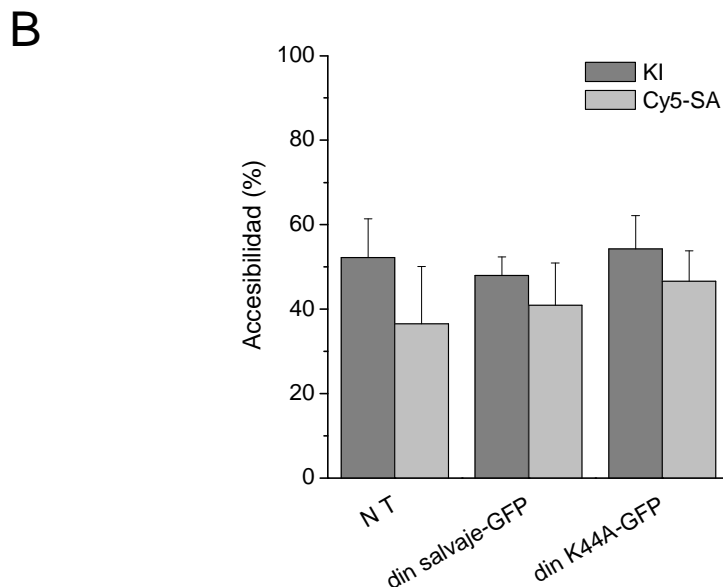
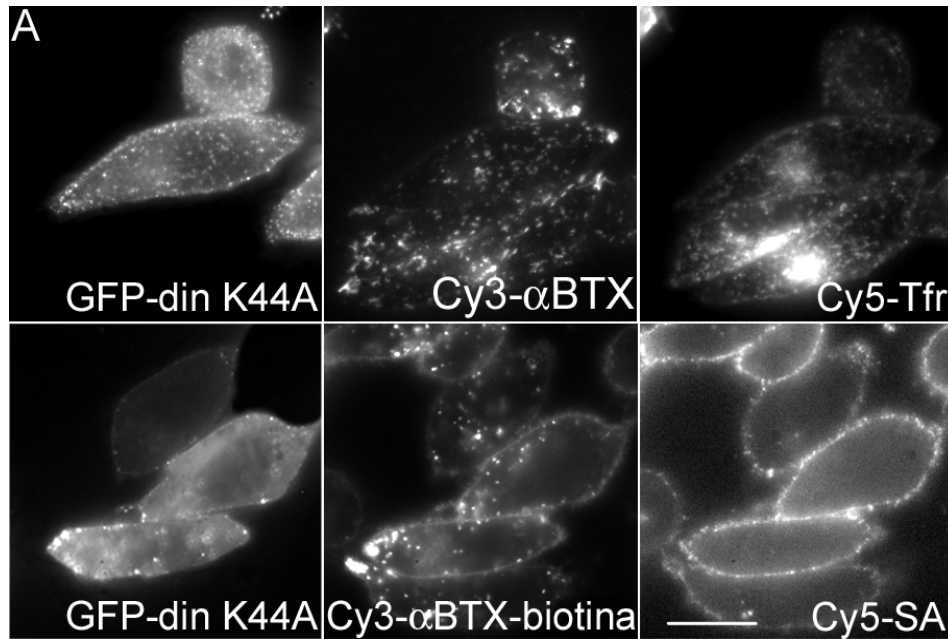


Figura 17. La sobreexpresión de dinK44A no afecta la endocitosis del AChR. A) Las células CHO-K1/A5 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para GFP-din salvaje o GFP-din K44A, y 18 hs después, utilizadas para los experimentos. Fueron marcadas por 1 h a 4 °C con Cy3- α BTX-biotina, incubadas a 37 °C por 12 hs y luego marcadas a 4 °C con Cy5-SA. Se fotografiaron antes e inmediatamente después de agregar KI 200 mM. **B)** Para cada célula se calculó la accesibilidad a Cy5-SA y a KI, normalizándose estos valores respecto a los obtenidos para células no incubadas a 37 °C.

Tampoco se observó un efecto sobre el secuestro del AChR; las células no transfectadas muestran niveles de tinción con Cy5-SA similares a los de las células transfectadas con dinK44A (Figura 16A, panel inferior, Cy5-SA). Consecuentemente, no se observan diferencias significativas en el porcentaje de accesibilidad a Cy5-SA en células no transfectadas, din salvaje, y dinK44A (Figura 17B, Cy5-SA). Estos experimentos sugieren que la endocitosis del AChR en células CHO-K1/A5 es independiente de dinamina.

Inhibición de Arf6

Arf6 es una pequeña GTPasa de la familia de proteínas Arf que está involucrada en una vía de endocitosis independiente de clatrina y de dinamina (ver Introducción). Por este motivo decidimos estudiar si la internalización del AChR depende de la actividad de Arf6. Para ello transfectamos las células en forma pasajera con un plásmido que codifica para una mutante negativa (Arf6 T27N-HA) o una mutante constitutivamente activa (Arf6Q67L-HA) de Arf6 y evaluamos los niveles de internalización del receptor a las 6 hs de incubación.

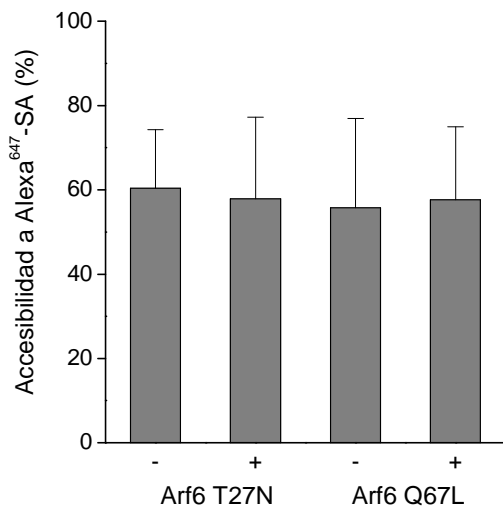


Figura 18. La internalización del AChR es independiente de la actividad de Arf6. Las células CHO-K1/A5 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para Arf6 T27N-HA y Arf6Q67L-HA, y 18 hs después, utilizadas para los experimentos. Fueron marcadas por 1 h a 4 °C con α BTX-biotina, incubadas a 37 °C por 6 hs y luego marcadas a 4 °C con Alexa⁶⁴⁷-SA. Luego se fijaron con PF 2 % por 15 min y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.01 % por 10 min y marcadas con anticuerpos anti-HA y anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸. Para cada célula se calculó la accesibilidad a Alexa⁶⁴⁷-SA, normalizándose estos valores respecto a los obtenidos para células no incubadas a 37 °C.

Las células transfectadas con la mutante dominante negativa (Figura 18, Arf6T27N+) muestran los mismos niveles de tinción con Alexa⁶⁴⁷-SA que las células no transfectadas (Figura 18, Arf6T27N-). Tampoco se observaron

diferencias entre las células transfectadas con la mutante constitutivamente activa y las no transfectadas (comparar Figura 18, Arf6Q67L+ con Arf6Q67L-). Estos experimentos indican que la internalización del AChR no depende de la actividad de Arf6.

Influencia del citoesqueleto

Muchos procesos endocíticos independientes de clatrina y dinamina reclutan la maquinaria de polimerización de actina para asistir en la endocitosis (128). Es por ello que investigamos el papel del citoesqueleto de actina en la endocitosis del AChR. Para tal fin utilizamos un inhibidor de la polimerización de actina, la citocalasina D y un agente promotor de la polimerización de actina, el jasplakinolide. Las citocalasinas se unen al extremo (+) de los filamentos de actina y bloquean la adición de monómeros, impidiendo de esta forma su elongación. Los inhibidores de la polimerización de actina tienen efectos variables sobre la endocitosis mediada por clatrina en células de mamífero, a diferencia de las levaduras en donde todos los procesos endocíticos son dependientes de actina (Fujimoto et al., 2000; Lamaze et al., 1997). El tratamiento con citocalasina D no afectó la internalización de Tfr a ninguna de las concentraciones ni tiempos ensayados (Figura 19A, Alexa⁴⁸⁸-Tfr).

Se infiere por ende que en estas células la endocitosis por la vía dependiente de clatrina procede aún en condiciones en las que se ha perdido la integridad del citoesqueleto. Esta serie de experimentos también pone en evidencia que aunque el cambio en la morfología celular es dramático (Figura 19) las células mantienen su viabilidad y pueden realizar procesos endocíticos.

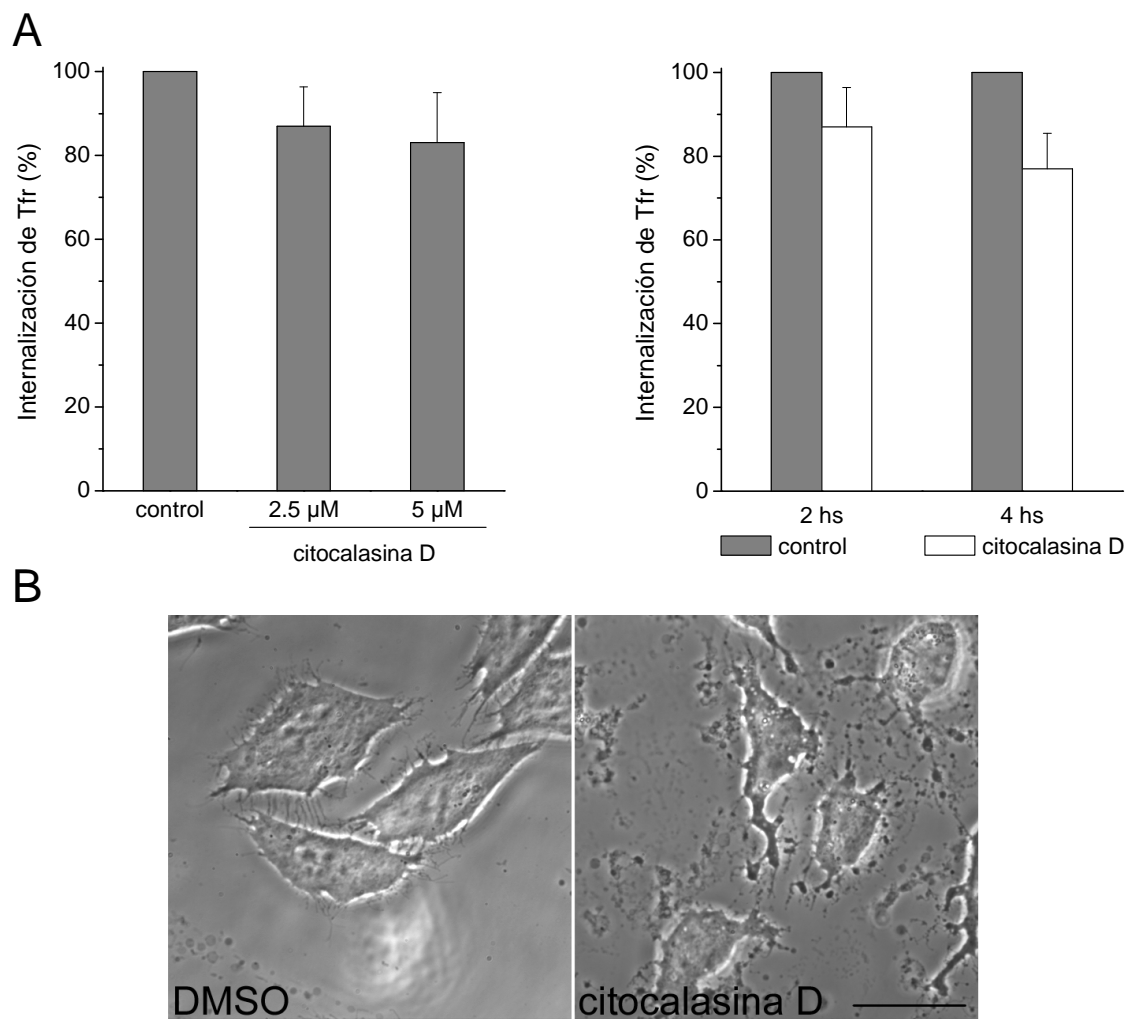


Figura 19. El tratamiento con citocalasina D no afecta la endocitosis de Tfr. A) Las células CHO-K1/A5 fueron procesadas para medir la accesibilidad del AChR a Cy5-SA en presencia de DMSO (control), 2,5 o 5 μM de citocalasina D. El tratamiento con 2,5 μM de citocalasina D se realizó durante 2 o 4 hs. Treinta minutos antes de terminada la incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$, se adicionó al medio Alexa⁴⁸⁸-Tfr. Luego se lavaron las células con buffer ascorbato, para remover la Tfr unida a la superficie y se fotografiaron. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la sonda Alexa⁴⁸⁸-Tfr en células tratadas, normalizándose este valor respecto al obtenido en células incubadas con el vehículo DMSO (control). **B)** Imágenes de contraste de fase de células tratadas durante 2 hs a 37 $^{\circ}\text{C}$ con 2,5 μM de citocalasina D o el vehículo DMSO. Escala 20 μm .

Sin embargo, la citocalasina D disminuyó significativamente los niveles de AChR secuestrado, lo que se manifestó como un aumento en la marcación con Cy5-SA (Figura 20A) y por lo tanto en la accesibilidad a esta sonda (Figura 20B).

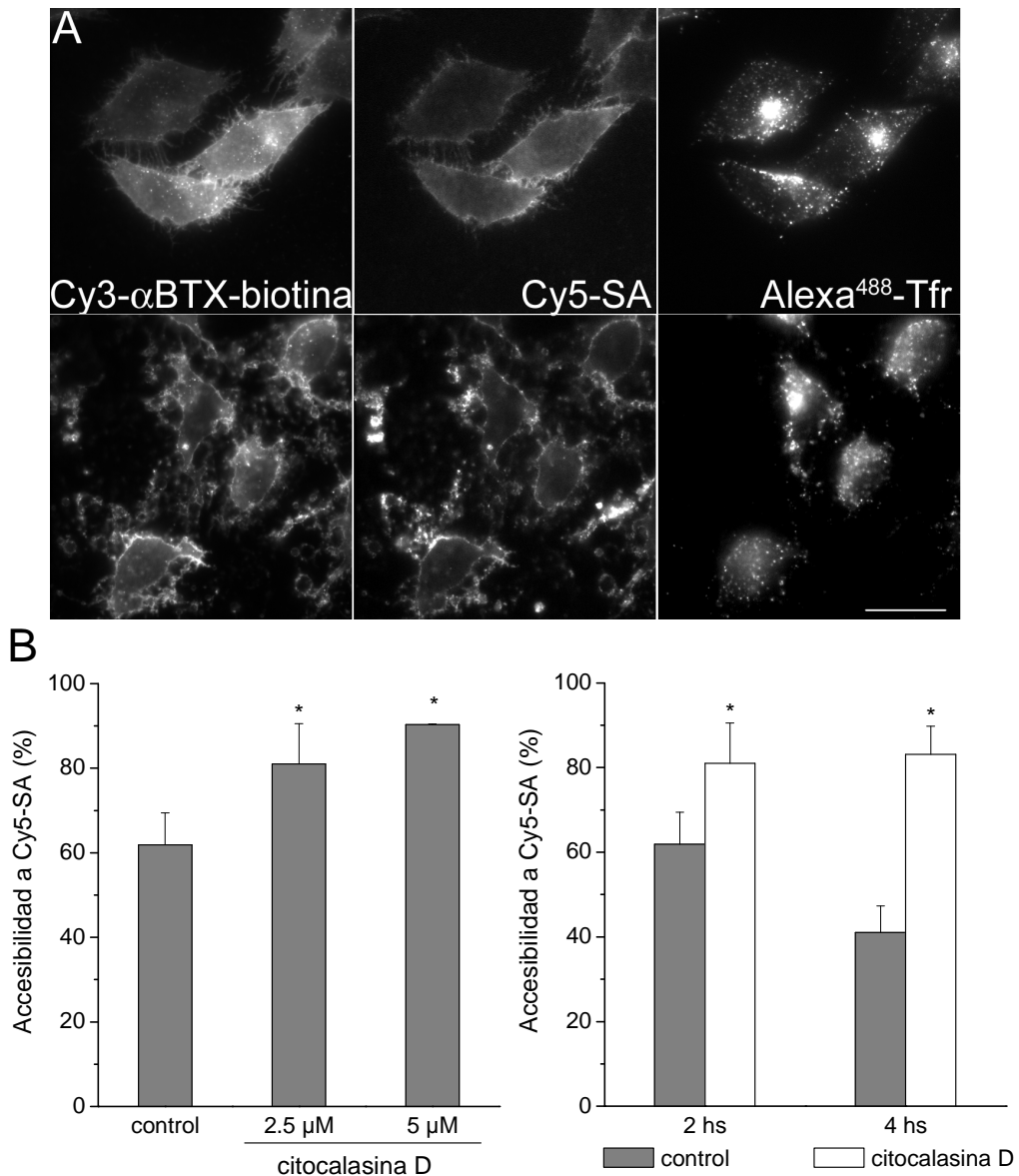


Figura 20. El tratamiento con citocalasina D inhibe la endocitosis del AChR. A) Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas por 1 h a 4 °C con Cy3- α BTX-biotina e incubadas a 37 °C durante 2 hs en presencia de DMSO (control) o 2, 5 μ M de citocalasina D. Treinta minutos antes de que terminar la incubación se agregó al medio Alexa⁴⁸⁸-Tfr. Luego se lavaron con buffer ascorbato, se marcaron a 4 °C con Cy5-SA y se fotografiaron. B) Las células CHO-K1/A5 fueron procesadas para medir la accesibilidad del AChR a Cy5-SA en presencia de DMSO (control), 2,5 o 5 μ M de citocalasina D. El tratamiento con 2,5 μ M de citocalasina D se realizó durante 2 o 4 hs. Para cada célula se calculó la accesibilidad a Cy5-SA, normalizándose estos valores respecto a los obtenidos para células no incubadas a 37 °C. Escala 20 μ m. * $p < 0.01$, # $p < 0.001$.

Este comportamiento se observó tanto a las 2 hs como a las 4 hs y con las dos concentraciones de citocalasina D empleadas (2.5 μ M y 5 μ M). Además, mientras que en las células control el AChR ya se encuentra en endosomas a las 2

hs de incubación a 37°C (Figura 20A, panel superior Cy3- α BTX-biotina), las células tratadas con citocalasina D aparecen desprovistas de estas estructuras (Figura 20A, panel inferior). Estas observaciones sugieren que la internalización del AChR también es afectada por la despolimerización de actina.

Para corroborar que el secuestro del AChR depende de la integridad del citoesqueleto, estudiamos este proceso en presencia de jasplakinolide. Esta droga desorganiza el citoesqueleto pero a través de un mecanismo de acción diferente al de la citocalasina D. El jasplakinolide induce la polimerización desorganizada y desregulada de la actina en masas amorfas. Esto trae como consecuencia la disminución del remodelado de las fibras de *stress*, y su posterior desaparición, ya que se consumen los monómeros de actina libres (Buba et al., 1998). El jasplakinolide también inhibió el secuestro del AChR (Figura 21), demostrando que este proceso es dependiente de la integridad del citoesqueleto.

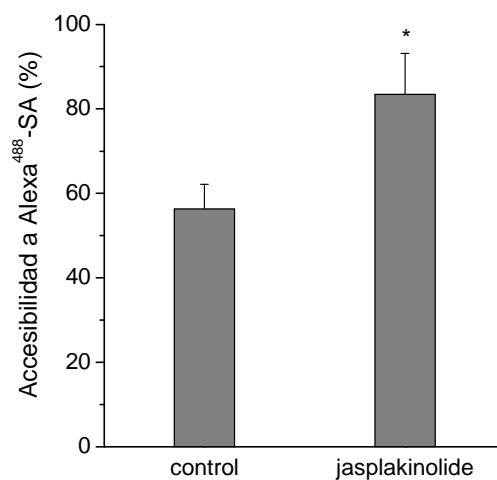


Figura 21. El tratamiento con jasplakinolide inhibe la endocitosis del AChR. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas por 1 h a 4 °C con α BTX-biotina e incubadas a 37 °C durante 2 hs en presencia de DMSO (control) o 1 μ M de jasplakinolide. Al final de la incubación, se marcaron a 4 °C con Alexa⁴⁸⁸-SA y se fotografiaron. Para cada célula se calculó la accesibilidad a Alexa⁴⁸⁸-SA, normalizándose estos valores respecto a los obtenidos para células no incubadas a 37 °C. * $p < 0,01$.

Discusión

Se ha observado que cuando se bloquea la transmisión neuromuscular en la sinapsis adulta con α BTX o curare, el AChR difunde de los macro-agregados ("clusters" de varios micrones de longitud) y es internalizado, lo que resulta en una reducción de su vida media. La estimulación del músculo revierte este proceso evidenciando que depende de la actividad sináptica (41). Se estima que estas alteraciones en los niveles de AChR en la UNM serían equivalentes a los procesos de potenciación o depresión de largo plazo que ocurren en las sinapsis del sistema nervioso central (41). También se ha encontrado que la velocidad de endocitosis del AChR se incrementa en miotubos incubados en presencia continua de agonistas colinérgicos (45), y por el entrecruzamiento con anticuerpos en células musculares humanas (192) y en la línea celular BC3H-1 (198). Sin embargo, poco se sabe sobre el mecanismo endocítico que llevan a estas alteraciones de los niveles de AChR en la superficie celular.

En este trabajo utilizamos la línea celular CHO-K1/A5 desarrollada en el laboratorio, que expresa en forma heteróloga y estable al AChR muscular adulto ($\alpha 2\beta\gamma\delta$) de ratón (190), para caracterizar el mecanismo por el cual el AChR es internalizado. Estas células expresan niveles de AChR en la superficie celular adecuados para ser detectados por microscopia de fluorescencia, y además, son fáciles de cultivar, crecen con rapidez y son aptas para experimentos de transfección transitoria. Estas cualidades las convierten en un sistema sencillo y versátil para estudios de biología celular. Por otro lado, no poseen otras proteínas asociadas al AChR en células musculares, como rapsina o MusK (ambas necesarias para formar los macro-agregados de AChR en el músculo adulto). Estas células constituyen entonces un modelo útil para estudiar la dinámica celular del AChR en ausencia de inervación, de proteínas no receptoras y de factores propios de la célula muscular.

La velocidad de internalización constitutiva del AChR en las células CHO-K1/A5 es muy lenta, como se pone en evidencia en los resultados de la Figura 3. Aún después de 6 hs de incubación a 37 °C con CHX, no se observaron cambios en los niveles del receptor en la superficie celular. No podemos descartar la posibilidad de que el AChR sea internalizado y reciclado con la misma velocidad, por la imposibilidad de marcar el receptor presente en la superficie sin perturbarlo (ver más adelante).

Un resultado sumamente importante de esta Tesis fue la observación que la unión del antagonista competitivo α BTX o el entrecruzamiento con anticuerpos acelera la internalización del AChR (Figuras 1 y 4). El hecho que el AChR expresado heterológamente en las células CHO-K1/A5 responda de manera similar a la modulación por ligandos y por anticuerpos, tal como lo hace en sistemas en donde está expresado en forma endógena (41,45,192,198), sugiere que esta modulación es una propiedad intrínseca del receptor y que no depende de sus proteínas accesorias (rapsina, agrina, MusK, etc). En el caso de la inducción de la internalización por α BTX, este fenómeno podría obedecer al bloqueo del canal, ya que los AChR que no unieron toxina no se internalizan, tal como muestra la Figura 2. Este bloqueo podría inducir un cambio conformacional por medio del cual el AChR expondría señales de internalización antes ocluídas. Mecanismos similares se han propuesto para la internalización de otros receptores (199,200).

La remoción acelerada del AChR de la superficie celular es uno de los mecanismos fisiopatológicos observados en la enfermedad autoinmune miastenia gravis, en donde la internalización del receptor se acelera luego de la unión a anticuerpos ((9,35). En consecuencia, los anticuerpos de pacientes miasténicos causan la modulación antigénica del AChR muscular in vivo e in vitro (201). Nuestros experimentos muestran que los anticuerpos monoclonales contra el AChR muscular adulto también inducen su internalización en las células CHO.

Se sabe que el entrecruzamiento que producen los anticuerpos es lo que estimula la internalización acelerada del AChR en miastenia experimental inducida

(201), ya que esta no ocurre cuando se unen fragmentos Fab monovalentes. Posiblemente los agregados de mayor tamaño que se forman cuando se marca el AChR con anticuerpos (Figura 4A y (20) sean menos estables en la membrana que los agrupamientos más pequeños presentes antes del tratamiento (11) y aumentar su afinidad por la maquinaria endocítica necesaria para internalizarlo.

Los ensayos empleados en este trabajo nos permitieron disecar la desaparición del AChR de la superficie celular en dos etapas diferentes: secuestro e internalización (202). De esta forma, el AChR marcado con Cy3- α BTX-biotina parece evolucionar primero a un compartimiento conectado con la superficie celular, pero no accesible a moléculas de alto peso molecular, para luego ser internalizado. Esto explicaría porqué la pérdida de accesibilidad a SA ocurre más rápidamente que la pérdida de accesibilidad a KI en los primeros tiempos de incubación a 37°C (Figuras 5, 6 y 7). La observación de regiones marcadas con Cy3- α BTX-biotina en la membrana de las células incubadas a 37°C, cuya fluorescencia es extinguida por KI (lo cual indica su continuidad con el espacio extracelular), pero que no unían Cy5-SA, ofreció una prueba de la existencia de este compartimiento (Figura 8). Evidencia más directa provino de estudios realizados mediante microscopía de reflexión total de fluorescencia ("TIRF") de células CHO-K1/A5 vivas, los cuales mostraron la presencia del AChR en túbulos conectados con la superficie celular, que luego ingresaban a la célula (202). Estas estructuras corresponderían al compartimiento en el que el AChR es secuestrado.

A tiempos más largos (6 h-12 h), la variación en la relación Cy5/Cy3 se reduce mientras el porcentaje de E sigue disminuyendo, lo que podría explicarse si se considera que la internalización del AChR a estos tiempos ocurre principalmente desde los sitios donde está secuestrado. Esto queda evidenciado más claramente cuando se observa el cambio en el porcentaje de AChR secuestrado (obtenido de la diferencia entre el porcentaje de accesibilidad a KI y a SA a cada tiempo) en función del tiempo (Figura 7). Aquí se manifiesta una reducción en el porcentaje de AChR secuestrado mientras se incrementa el del

AChR internalizado, pero prácticamente no hay cambios en el AChR en superficie, hecho que es consistente con el modelo propuesto (Figura 7).

Una vez que el AChR es secuestrado/internalizado, no vuelve a ser accesible a la SA, como lo demuestran las Figuras 5, 6 y 7. El reciclado del AChR ha sido observado en la UNM de ratón in vivo (43,44), pero no en cultivo de células C2C12 (44,45), o células musculares de ratón (203), ni tampoco en sinapsis bloqueadas crónicamente con curare (44). Estos resultados implican que es necesaria la actividad sináptica o algún factor neural para que los receptores internalizados puedan reciclar (44), por lo que es esperable que en las células CHO-K1/A5 no se observe el reciclado del AChR (Figura 9). Sin embargo, ha sido posible detectar una pequeña fracción de AChR en endosomas de reciclaje marcados con Rab11-GFP a todos los tiempos estudiados (Kumari et al., 2008), lo que sugeriría que el receptor puede volver a la superficie a través de esta vía. La imposibilidad de detectar a este grupo de AChRs reciclados (Figura 9) indica que representan un porcentaje muy bajo del total de receptores presentes en la superficie celular, de lo cual podemos inferir que este proceso no contribuye significativamente a mantener los niveles de AChR en la membrana en condiciones de bloqueo por α BTX. Alternativamente, los AChR podrían regresar a la superficie celular como AChR secuestrados, no accesibles a la marcación con SA.

El proceso de secuestro e internalización del AChR ocurre mediante un mecanismo que requiere la integridad del citoesqueleto, ya que es inhibido selectivamente por el tratamiento con citocalasina D o jasplakinolide (Figuras 19, 20 y 21). Es probable que sea necesario el reclutamiento de la maquinaria de remodelado del citoesqueleto de actina a los sitios de secuestro, para generar la fuerza requerida para deformar la membrana y formar los túbulos. Mecanismos de secuestro similares se han observado para β -VLDL y otras lipoproteínas agregadas, las cuales son internalizadas a través de receptores de desechos celulares ("*scavenger*") en macrófagos (204,205). En estas estructuras tubulares conectadas con la superficie, el β -VLDL sufre procesos degradativos (204). Siendo que la

velocidad de internalización del AChR es lenta, el secuestro del mismo podría ser un mecanismo para alejarlo de señales moduladoras presentes en el espacio sináptico de la UNM, hasta que sea internalizado.

El hecho que la integridad del citoesqueleto sea indispensable para la internalización y secuestro del AChR, nos llevó a investigar la función en este proceso de las pequeñas GTPasas de la familia Rho (ver Introducción), dentro del marco de un proyecto de colaboración del Dr. Barrantes con el Dr. Mayor en el *National Center for Biological Studies (NCBS, Bangalore, India)*. Uno de los hallazgos más interesantes de estos estudios fue que la unión de la α BTX al AChR activa a Rac1. El bloqueo de la actividad de esta proteína (ya sea con la toxina B o mediante transfección con una mutante dominante negativa) inhibe la endocitosis del AChR (202). Entre las funciones de Rac1 está la modulación de la dinámica de la actina, la cual es necesaria para el secuestro/internalización del AChR. En paralelo se observó que la autofosforilación de Src es también necesaria para la endocitosis del AChR. Un mecanismo similar se observó recientemente en la internalización de moléculas coestimuladoras del sistema inmune CD80/CD86 inducida por la proteína del HIV, Nef (206,207). En este proceso se requiere la fosforilación de Src para activar Rac1 a través de un intercambiador de nucleótidos de guanina, Tiam1. Tanto el CD80/CD86 como el AChR son proteínas con una vida media prolongada en la membrana plasmática de los sistemas celulares estudiados. El mecanismo por el cual estas moléculas son internalizadas sería entonces de relevancia general para remodelar el contenido de la membrana plasmática.

El secuestro e internalización del AChR procede de igual forma aun cuando se inhiba la función de la dinamina, lo que fue probado mediante la expresión de una mutante dominante negativa de esta proteína (Figuras 16 y 17) y mediante la inhibición con ARN de interferencia (202). Estos resultados sugieren que el mecanismo de endocitosis del AChR no depende de la función de dinamina para desprender las vesículas de la membrana. Existen en la célula diversos mecanismos endocíticos que no requieren la función de dinamina (ver

Introducción). La independencia de dinamina y la falta de colocalización de los endosomas que contienen AChR con aquéllos de internalización de la caveolina-GFP (Figura 12) y con endosomas que contienen Tfr internalizada (Figura 10), indican que el mecanismo por el cual es internalizado el AChR es independiente de clatrina y de caveolina. Consistente con estos resultados, observamos que la endocitosis del AChR no se inhibe con la sobreexpresión de una versión truncada de la proteína Eps15, necesaria en la vía de endocitosis dependiente de clatrina (Kumari et al., 2008).

Algunos autores han mostrado la colocalización del AChR con caveolina (208) en microtubos. Esta discrepancia con nuestros resultados podría explicarse basándonos en el tipo celular y el grado de organización del AChR. Mientras en las células CHO-K1/A5 el AChR se encuentra formando nano-agregados (20,209) las observaciones de Trinidad y Cohen (208) fueron llevadas a cabo en microtubos C2C12 en una etapa de diferenciación en la cual el AChR está organizado como macroagregados de varios micrómetros de largo. Es decir, la endocitosis del AChR en agregados maduros podría proceder a través de un mecanismo dependiente de caveolina. Es de recalcar sin embargo que la colocalización de estos agregados con caveolina ha sido posteriormente cuestionada (18).

La internalización del AChR tampoco procede por las vías independientes de clatrina y de dinamina descritas en la literatura (ver Introducción). Los endosomas que contienen AChR no colocalizan con GFP-GPI internalizada (Figura 11), ni la sobreexpresión de una mutante negativa de cdc42 (16) inhibe la internalización del AChR, lo cual indica que el mismo no ingresa a la célula por un mecanismo dependiente de cdc42.

El bloqueo de la función de Arf6 a través de la sobreexpresión de una versión de esta proteína dominante negativa tampoco inhibe la internalización del AChR (Figura 18), por lo que esta tampoco procedería por la vía dependiente de Arf6.

Por último, la respuesta a la depleción de colesterol es diferente en el caso de la internalización del AChR, respecto a otros mecanismos endocíticos conocidos (209). Mientras la endocitosis del AChR se ve acelerada cuando disminuyen los niveles de colesterol en la membrana, la endocitosis dependiente de clatrina, caveolina y cdc42 se ven severamente inhibidas. Todos estos resultados indicarían que el AChR es endocitado a través de un mecanismo diferente de los descritos hasta el momento (69,128).

Una vez internalizados, los complejos α BTX-AChR son transportados inicialmente a través de endosomas tempranos marcados con EEA1 (202) y desde allí a endosomas tardíos, identificables por el antígeno marcador Lamp1 en su membrana y por su carga (FITC-Dx) (Figura 14). Esta secuencia se desprende del seguimiento de la cinética de colocación del AChR con EEA1 y Lamp1 (202). La acumulación del AChR en endosomas tardíos junto con la lenta cinética de degradación del mismo (Figura 6), indicarían que el transporte del receptor desde los endosomas tardíos a los lisosomas es más lento que el transporte desde los endosomas tempranos a los endosomas tardíos. El paso del AChR por el complejo de Golgi (Figura 13) podría ser una consecuencia de este hecho.

La diferente sensibilidad a los métodos de permeabilización de los endosomas que contienen AChR respecto a los endosomas marcados con EEA1 (Figura 15), sugiere que la membrana de los primeros tiene una composición diferente a la de los segundos. Esto podría estar relacionado con la localización del AChR en dominios lipídicos de la membrana plasmática de composición específica. Desde estos dominios el receptor sería internalizado originando los endosomas que lo contienen. Esta observación, junto con la falta de colocación del AChR con endosomas tempranos provenientes de otras rutas endocíticas, refuerza la idea de que estos endosomas se generan en la membrana por un mecanismo diferente. Este mecanismo excluiría a los ligandos más característicos internalizados por otras vías de endocitosis.

La vía de endocitosis inducida por la unión de la α BTX al AChR difiere de la utilizada por otros receptores de neurotransmisores como los receptores del GABA_A, de la glicina, o del AMPA y el NMDA, los cuales son internalizados por la vía dependiente de clatrina (195–197,210). Es importante señalar que todos estos receptores están localizados en sinapsis del SNC, mientras que el AChR muscular estudiado en esta Tesis se encuentra ubicado en sinapsis periféricas. La velocidad de internalización de estos receptores centrales en respuesta a la actividad es muy rápida en comparación con la del AChR muscular. Así, nosotros calculamos un $t_{1/2} = 2.0 \pm 0.4$ hs para el AChR muscular adulto unido a α BTX expresado en células CHO, mientras que en miotubos estimulados con nicotina es de ~ 4 hs(45), y en la UNM bloqueada con α BTX in vivo es de 12 hs (41). Estos valores difieren de aquéllos de los receptores de sistema nervioso central: el AMPA-R en cultivo de neuronas tiene un $t_{1/2} = 9.3 \pm 2.3$ min(194), y disminuye a 3.1 minutos cuando se lo estimula con su ligando, AMPA (200). En el caso del NMDA-R, se internaliza un 20% luego de 30 min (211), mientras que cuando se lo activa, disminuye un 25% en 15 min. El receptor de GABA_A, en cambio, desaparece de la superficie celular en 40 min cuando es expresado en células HEK (197). Es posible entonces que las sinapsis periféricas regulen su fuerza –es decir la disponibilidad de AChR– a través de mecanismos diferentes que las sinapsis centrales.

En conclusión, en este Capítulo determinamos que la unión de la α BTX al AChR induce su internalización a través de un mecanismo que ocurre en dos etapas: 1) secuestro y 2) internalización del receptor. Este proceso es independiente de clatrina, de dinamina, de caveolina y de Arf6, pero depende de la integridad del citoesqueleto. La unión de la α BTX al AChR induce la activación de Src, la cual lleva a su vez a la activación de Rac1. Esta última probablemente modula el estado del citoesqueleto en aquellos sitios donde se lleva a cabo la internalización del AChR.

***Capítulo II: Mecanismo de endocitosis del AChR y su
modulación por el colesterol***

Resultados

La función y estabilidad del AChR depende de la composición de los lípidos que lo rodean en la membrana y entre éstos el colesterol (Col) parece ser necesario para mantener la estructura del AChR (11). El Col es necesario para la formación y estabilización de los macro-agregados de AChR en la membrana de células C2C12. Debido a la importancia de este lípido sobre éstos aspectos del AChR en este Capítulo estudiamos su influencia en la estabilidad del receptor en la membrana de las células CHO-K1/A5.

El tratamiento con M β CDx cambia la distribución celular del AChR

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos solubles en agua, pero con una cavidad hidrofóbica que puede encapsular o incluir moléculas apolares, normalmente insolubles en medios acuosos (212). Debido a esta propiedad han sido utilizados como transportadores de compuestos hidrofóbicos y esteroides en particular. Las CDx existen como hexámeros (α CDx), heptámeros (β CDx) u octómeros (γ CDx), en donde el grado de polimerización determina el tamaño de la cavidad y por lo tanto la afinidad de la misma por distintos compuestos (213,214). Las β CDx tienen la mayor afinidad por la inclusión de colesterol (Col) y son las más eficientes en extraerlo de las membranas celulares (215). Entre ellas los derivados más solubles como la metil- β -CDx (M β CDx) o la 2 hidroxipropil- β CDx, son las más usadas en el área de la biología celular para remover o aumentar los niveles de Col en la membrana plasmática de diversos tipos celulares (215) entre ellos las células CHO.

Cuando se tratan células CHO-K1/A5 con 15 mM M β CDx durante 30 min a 37°C y luego se marcan con Alexa⁴⁸⁸- α BTX a 4°C, se observa una marcada disminución de la intensidad de fluorescencia sugiriendo la presencia de un menor número de AChR en la membrana celular (Figura 1A, superficie, M β CDx). Para explorar la causa de esta disminución realizamos otra serie de experimentos en los que las células fueron primero marcadas y luego tratadas con M β CDx. En

células control (células incubadas 30 min a 37°C con buffer M1), la fluorescencia correspondiente a los complejos α BTX-AChR se encuentra en la superficie celular, indicando que en el periodo estudiado la internalización del AChR no es significativa (Figura 1A, total, M1). En cambio, en las células tratadas con M β CDx, además de la reducción en la fluorescencia de la superficie se observa la aparición de estructuras puntiformes en el interior de la célula, posiblemente endosomas (Figura 1A, total, M β CDx) que contienen AChR.

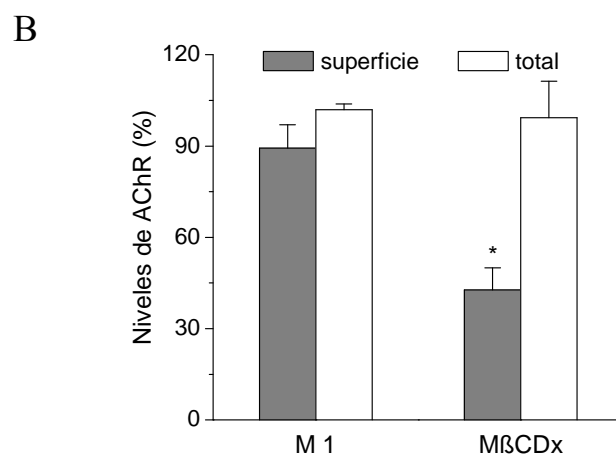
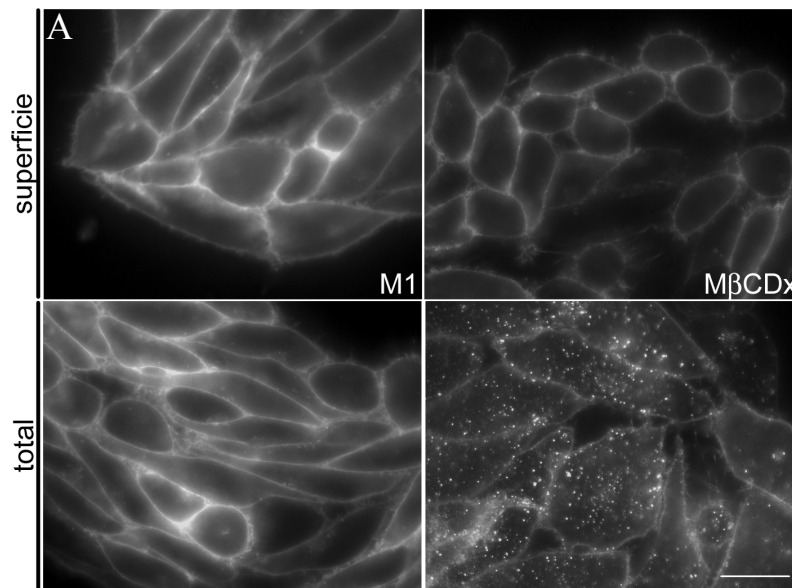


Figura 1. El tratamiento con M β CDx provoca una redistribución del AChR. A) Superficie. Las células CHO-K1/A5 fueron incubadas durante 30 min a 37°C con M β CDx o M1, luego marcadas por 1 h a 4°C con Alexa⁴⁸⁸- α BTX y fotografiadas. Total. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas por 1 h a 4°C con Alexa⁴⁸⁸- α BTX, incubadas durante 30 min a 37°C con M β CDx o M1, y luego fotografiadas. Escala 30 μ m B) Cuantificación de los experimentos descritos en A. Las barras representan la media más el D.E. * $p < 0.001$ $n=4$.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de intensidad de fluorescencia total (fluorescencia de superficie más fluorescencia interna) entre las células tratadas y controles, lo que indica que la depleción de Col mediada por M β CDx redistribuye el AChR de la superficie a un compartimiento interno y que el AChR no es degradado durante este período (Figura 1B).

Para evaluar la especificidad del efecto de la depleción de Col sobre el AChR, estudiamos los cambios en los niveles de superficie del receptor de transferrina (TfR), una proteína constitutiva de las células CHO-K1/A5. Cuando las células son tratadas con 15 mM M β CDx durante 30 min a 37°C y luego incubadas con Cy5-Tf a 4°C, encontramos que los niveles del TfR en la superficie celular no disminuyen sino que por el contrario aumentan (Figura 2), como está descrito en la literatura (147,216). Es decir, la depleción de Col disminuye los niveles de AChR en la superficie celular pero no los de los TfRs, sugiriendo un efecto específico sobre el AChR.

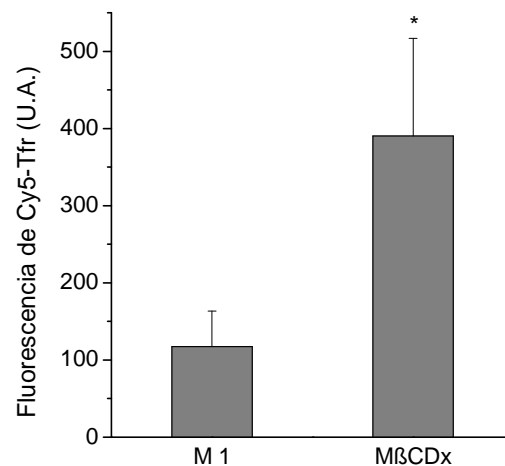
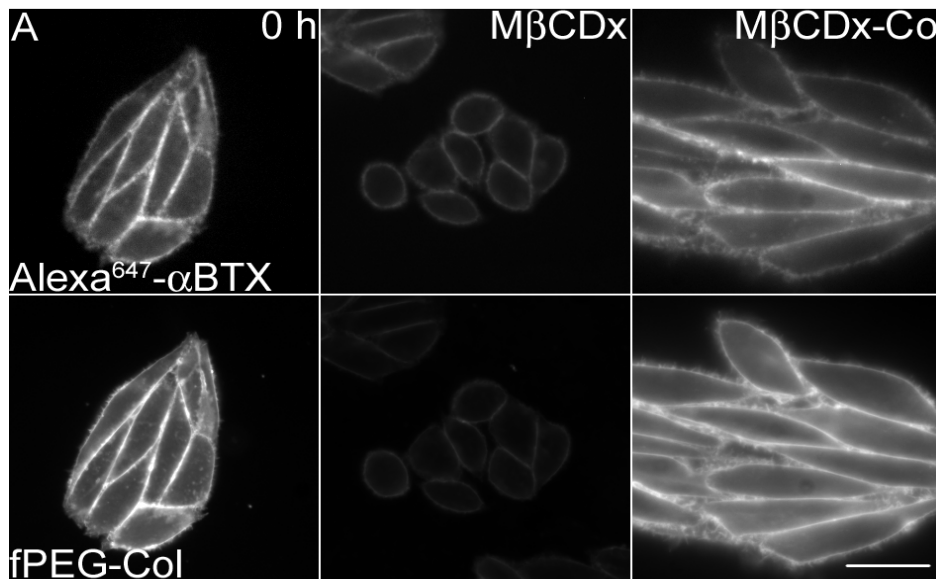


Figura 2. El tratamiento con M β CDx inhibe la internalización de TfR. Las células CHO-K1/A5 se incubaron durante 30 min a 37°C con M1 o M β CDx, luego se marcaron con Cy5-Tf por 1 h a 4°C y se fotografiaron. Se cuantificó la fluorescencia correspondiente a la sonda Cy5-Tf en cada célula. Las barras expresan la media más D.E., *p<0.01, n=3.

El tratamiento con M β CDx disminuye los niveles de AChR y colesterol de la superficie celular en una forma dependiente de la dosis

Para caracterizar el efecto del tratamiento con M β CDx sobre el AChR en más detalle, medimos los niveles de AChR remanentes en la superficie celular luego de incubar las células con distintas concentraciones de M β CDx (0, 5, 10 y 15 mM) y

con M β CDx saturada con Col (15 mM). Al final del tratamiento las células fueron marcadas a 4°C con Alexa⁶⁴⁷- α BTX y, para corroborar la eficacia de la depleción de Col, con fPEG-Col. El fPEG-Col es un derivado soluble y fluorescente del Col utilizado para cuantificar por microscopia de fluorescencia los niveles de Col celulares (ver Materiales y Métodos).



B

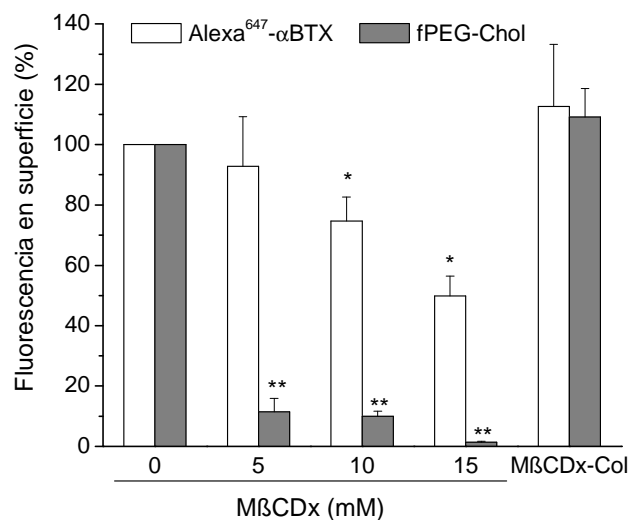


Figura 3. El efecto de la M β CDx es dependiente de la dosis. A) Las células CHO-K1/A5 se trataron con 15 mM M β CDx o M β CDx-Col por 30 min a 37°C, luego se marcaron con Alexa⁶⁴⁷- α BTX (panel superior) y fPEG-Col (panel inferior) por 1 h a 4°C y se fotografiaron. Escala 30 μ m B) Las células CHO-K1/A5 se trataron con concentraciones crecientes de M β CDx o M β CDx-Col por 30 min a 37°C, luego se marcaron con Alexa⁶⁴⁷- α BTX (panel superior) y fPEG-Col (panel inferior) por 1 h a 4°C y se fotografiaron. Se cuantificó la fluorescencia proveniente de cada sonda en cada célula normalizándose este valor respecto al obtenido en células no incubadas a 37°C. Las barras representan la media más D.E., *p < 0.001 **p < 0.0001, n=3.

Como se puede observar en la Figura 3, la M β CDx disminuye los niveles de AChR en la superficie celular en una forma dependiente de la dosis, observándose una disminución de la intensidad de fluorescencia de superficie del 50 % con 15 mM M β CDx. A concentraciones más altas o tiempos más prolongados las células se redondean e incluso pueden perder su viabilidad (209).

Por el contrario cuando las células fueron enriquecidas en Col por medio del tratamiento con 15 mM M β CDx-Col, los niveles de AChR en la superficie celular aumentaron (Figura 3A, M β CDx-Col y 3B, barras grises). El fPEG-Col muestra el mismo comportamiento que el AChR frente al tratamiento con M β CDx; las células tratadas exhiben una gran disminución de la fluorescencia del fPEG-Col en superficie, mientras que las tratadas con M β CDx-Col presentan un aumento en esta señal (Figura 3).

La depleción de colesterol acelera la velocidad de endocitosis del AChR

Para determinar la cinética con la que la M β CDx acelera la internalización del AChR, realizamos un experimento de doble marcación: las células fueron marcadas primero a 4°C con Alexa⁵⁹⁴- α BTX (roja) y luego llevadas a 37°C en presencia de M β CDx o M1, por 0, 15 ó 30 min.

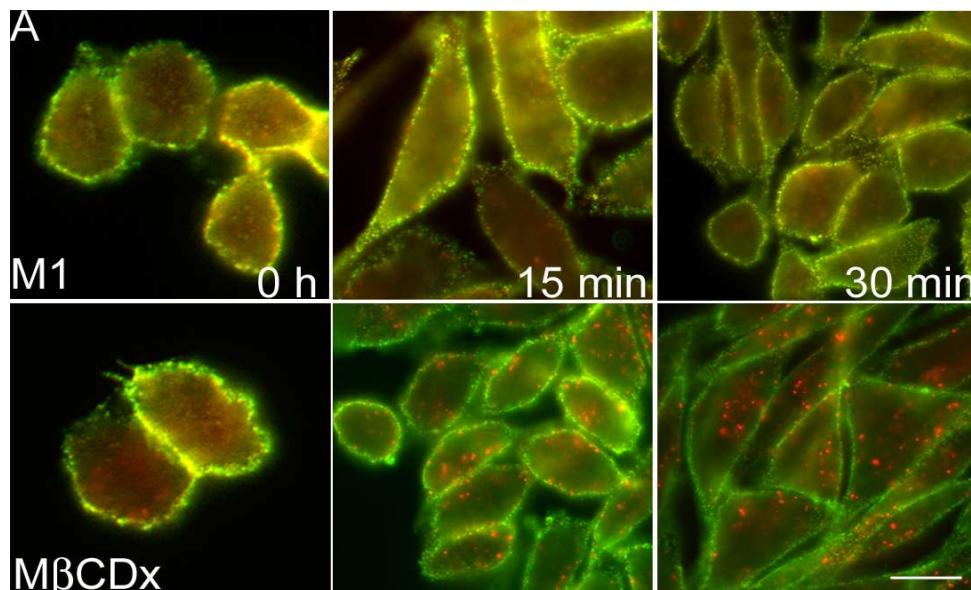


Figura 4. El tratamiento con M β CDx acelera la endocitosis del AChR. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con Alexa⁵⁴⁶- α BTX por 1 h a 4°C, luego incubadas a 37°C por 0, 15 ó 30 min con M1 (panel superior) o 15 mM M β CDx (panel inferior). Al final de la incubación, las células fueron marcadas con mab210 y anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸, y fotografiadas. Escala 20 μ m.

Para determinar los AChR remanentes en la superficie celular luego de la incubación, las células fueron marcadas con mAb210 (un anticuerpo contra el sector extracelular de la subunidad α del AChR) a 4°C, y luego con un anticuerpo secundario marcado con Alexa⁴⁸⁸ (verde).

En las células control se observa una gran superposición entre las dos marcas (amarillo en la Figura 4, M1) indicando que la mayoría del AChR permanece en la superficie celular en los períodos estudiados. En cambio en las células tratadas con M β CDx se observa la presencia de estructuras rojas dentro de la célula junto con una pérdida de colocalización de las dos marcas (Figura 4, M β CDx). La localización intracelular de estas estructuras puede inferirse por la ausencia de marcación con anticuerpo. Este resultado fue confirmado por microscopía confocal (Figura 5).

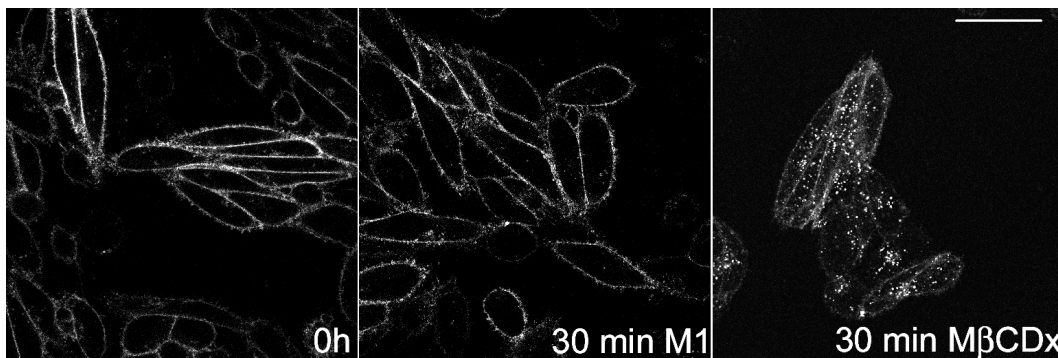


Figura 5. El tratamiento con M β CDx redistribuye el AChR a un compartimiento intracelular. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas por 1 h a 4°C con Alexa⁴⁸⁸- α BTX, incubadas durante 30 min a 37°C con M1 o M β CDx, y luego fotografiadas en un microscopio confocal. Escala 50 μ m.

Como la marca roja corresponde a los AChR presentes en la superficie celular al inicio del experimento y la marca verde corresponde a los AChR presentes en la superficie celular al final del experimento, la velocidad de internalización del AChR puede calcularse de la variación en función del tiempo de la relación verde/rojo (Figura 6 A). El $t_{1/2}$ del AChR disminuyó de 2 hs en células control hasta 0,5 hs en las células tratadas con M β CDx (Figura 6B), confirmando la aceleración en la cinética de endocitosis del AChR debida a la depleción de Col.

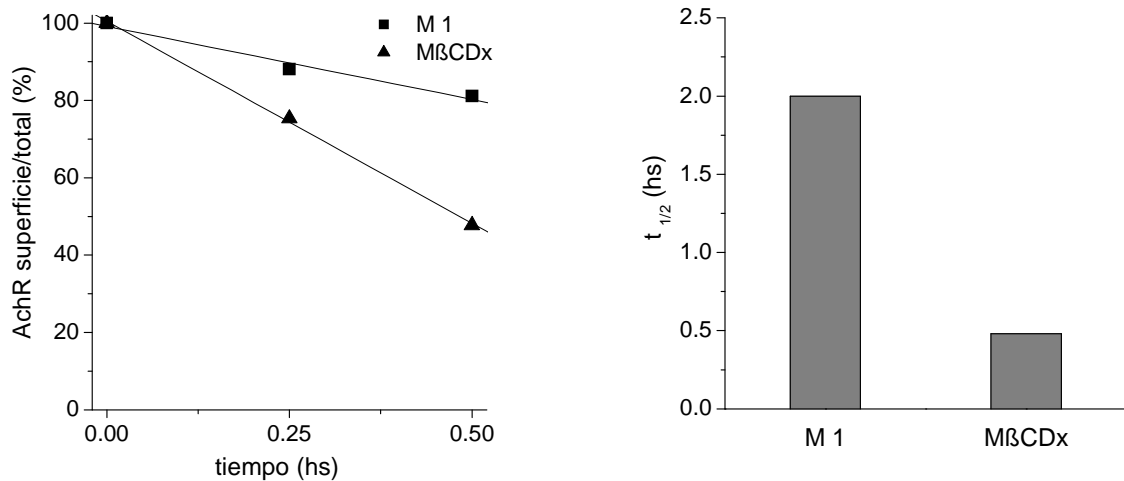


Figura 6. El tratamiento con MβCDx acelera la endocitosis del AChR. A) Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con Alexa⁵⁴⁶-αBTX por 1 h a 4°C, luego incubadas a 37°C por 0, 15 ó 30 min con M1 o 15 mM MβCDx. Al final de la incubación, las células fueron marcadas con mAb210 y anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸, y fotografiadas. Se cuantificó en cada célula la fluorescencia correspondiente a Alexa⁵⁴⁶ y a Alexa⁴⁸⁸, y se calculó la relación entre ambas, normalizándose este valor respecto al obtenido en células no incubadas a 37°C. B) Los datos graficados fueron ajustados con una recta de la que se obtuvo el t_{1/2} para cada condición. r² (MβCDx) =0.999; r² (M1)=0.976.

También observamos este fenómeno cuando inducimos la internalización del AChR con anticuerpos (Figura 7). Al efecto de aceleración de la internalización por la unión del anticuerpo (comparar cinética de internalización M1, Figura 6, y M1, Figura 7), se suma el ejercido por la MβCDx. Esto indicaría que la acción de la MβCDx es independiente del ligando al que está unido el AChR.

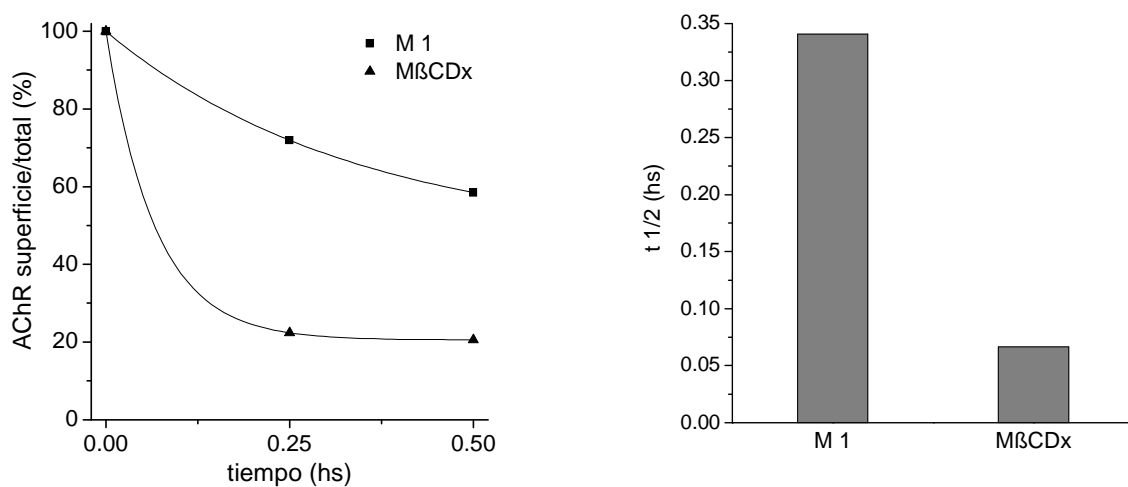


Figura 7. El tratamiento con MβCDx acelera la endocitosis del AChR inducida por anticuerpos. A) Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas y tratadas como se explicara en la Figura 6. B) Los datos graficados fueron ajustados con una exponencial simple de la que se obtuvo el t_{1/2} para cada condición.

La nistatina también acelera la internalización del AChR

Se ha sugerido que el tratamiento con M β CDx ejerce efectos en la organización de la membrana celular no relacionados con la depleción de Col (217). Para demostrar que la aceleración de la endocitosis observada está relacionada con la falta de Col y no con otros efectos secundarios del tratamiento con M β CDx, incubamos las células con nistatina. Este compuesto es frecuentemente usado como sustituto de la M β CDx cuando se quiere determinar la dependencia de un determinado proceso celular de los niveles del Col. Sin embargo estas dos drogas tienen un mecanismo de acción muy diferente: mientras la M β CDx remueve el Col de las membranas, la nistatina se une a él y forma complejos, secuestrándolo, pero sin sacarlo de la membrana (218)

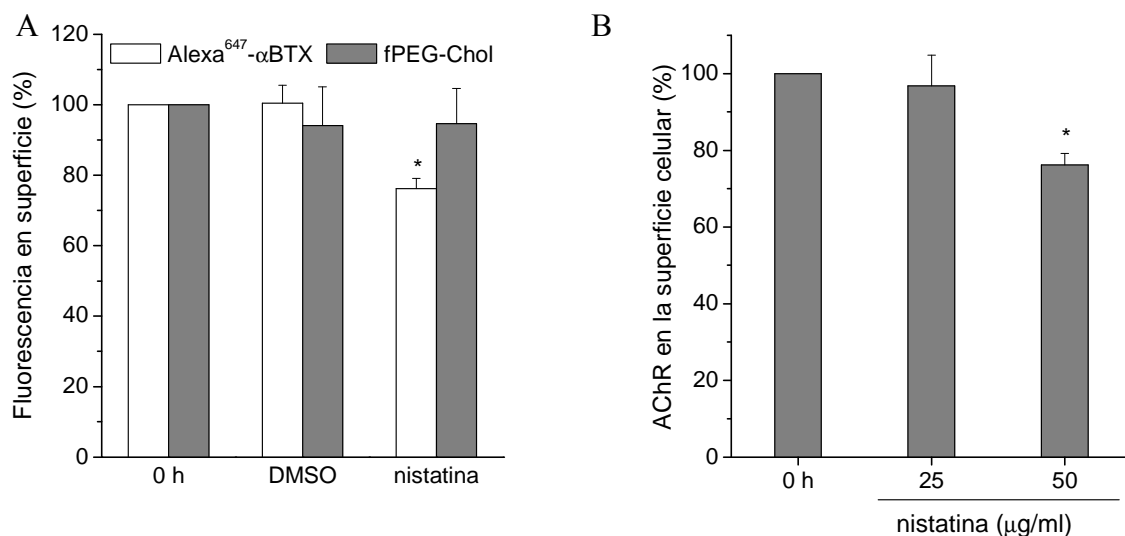


Figura 8. El tratamiento con nistatina también acelera la endocitosis del AChR. A) Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con αBTX-biotina por 1 h a 4°C, luego incubadas a 37°C por 30 min con M1 más DMSO o 50 μg/ml de nistatina. Al final de la incubación, las células fueron marcadas con Alexa⁶⁴⁷-SA y fPEG-Col, y fotografiadas. Se cuantificó en cada célula la fluorescencia correspondiente a Alexa⁶⁴⁷ y a fluoresceína, normalizándose este valor respecto al obtenido en células no incubadas a 37°C (0 h). B) Las células CHO-K1/A5 se procesaron como en A, pero en este caso se probaron dos concentraciones de nistatina, 25 y 50 μg/ml. Las barras representan la media más D.E., *p< 0.01, n=3.

Cuando las células son tratadas con 50 μg/ml nistatina por 30 min a 37°C, una disminución del ~25 % en los AChR presentes en la superficie celular fue observada (Figura 8A, barras blancas). Los niveles de fPEG-Col, como era de esperar, no fueron afectados por el tratamiento con nistatina (Figura 8A, barras

grises). Concentraciones menores de nistatina (25 µg/ml), no tuvieron efecto sobre los niveles de AChR en superficie (Figura 8B). Estos experimentos indican que el Col es necesario para la estabilidad del AChR en la superficie celular y que su remoción, efectuada con MβCDx, es más eficaz en inducir la internalización del AChR que la formación de complejos con nistatina.

El AChR es transportado a una población distinta de endosomas

Para determinar el destino intracelular del AChR realizamos experimentos de colocalización con diversos marcadores de organelas endocíticas. Para estudiar la colocalización con endosomas de reciclado las células fueron marcadas con Alexa⁴⁸⁸-αBTX a 4°C, y luego llevadas a 37°C en presencia de 15 mM MβCDx y Cy5-Tfr. Como se ve en la Figura 9, en el periodo estudiado la Cy5-Tfr ocupa una posición central en la célula característica del compartimiento endosomal de reciclaje (146). En cambio la fluorescencia correspondiente a los complejos αBTX-AChR se presenta en forma de vesículas endocíticas. La ausencia de colocalización de estas dos marcas indica que el AChR no es transportado a endosomas de reciclado.

Para evaluar la colocalización con endosomas tempranos y tardíos, transfectamos células con plásmidos que codifican para GFP-Rab5 y GFP-Rab7, respectivamente. Dieciocho horas luego de la transfección las células fueron marcadas con Alexa⁶⁴⁷-αBTX por 1 h a 4°C, y tratadas con MβCDx 15 mM CDx por 30 min a 37°C. No se observó colocalización entre los endosomas marcados por GFP-Rab5 o GFP-Rab7 y los endosomas que contenían αBTX-AChR (Figura 9).

Tampoco se observó colocalización entre los endosomas de AChR marcados con Alexa⁶⁴⁷-αBTX y el LisotrackerTM (un marcador de lisosomas) tras la depleción de Col, lo que indica que el AChR no es transportado a los lisosomas para su degradación. Esto es consistente con la ausencia de cambios en la fluorescencia total correspondiente al AChR marcado en células tratadas con MβCDx respecto a las células control (ver Figura 9). La falta de colocalización con estos marcadores

sugeriría que el AChR es transportado a una subpoblación muy específica de endosomas.

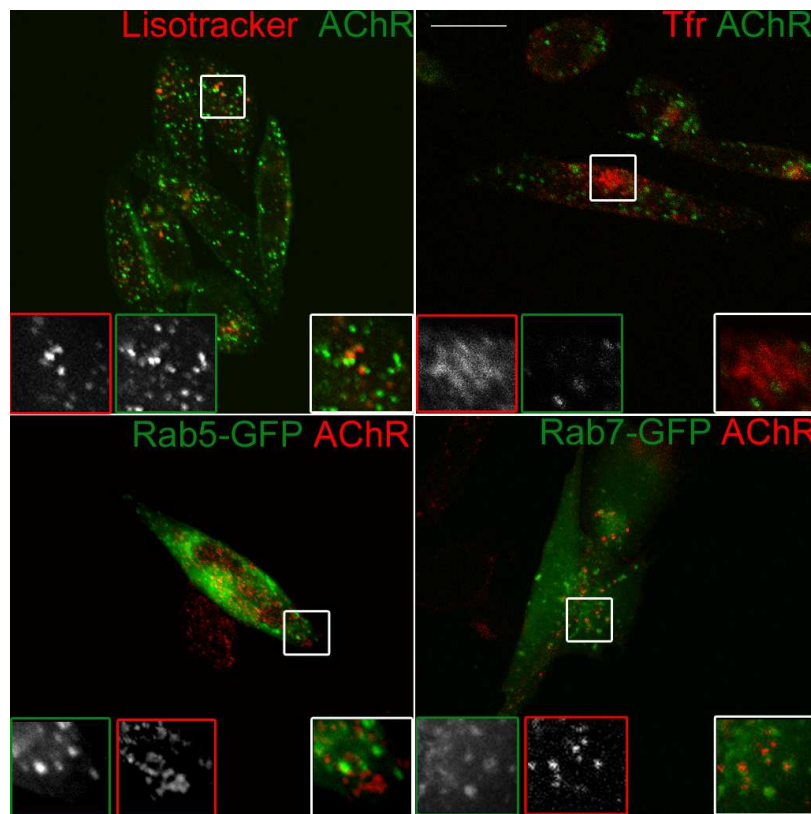


Figura 9. Los endosomas que contienen AChR no colocalizan con marcadores de organelas celulares. Panel superior: las células CHO-K1/A5 se marcaron a 4°C con Alexa⁴⁸⁸- α BTX y luego se incubaron con M β CDx por 30 min a 37°C con el agregado de lisotracker o Cy5-Tfr. Al final de la incubación las células fueron lavadas y fotografiadas en un microscopio confocal. Panel inferior: las células CHO-K1/A5 se transfectaron con plásmidos que codifican para Rab5-GFP o Rab7-GFP. Doce horas después de la transfección se utilizaron para los experimentos. Las células se marcaron a 4°C con Alexa⁶⁴⁷- α BTX y luego se incubaron con M β CDx por 30 min a 37°C. Al final de la incubación las células fueron lavadas y fotografiadas en un microscopio confocal. Escala: 20 μ m, inserto 10 μ m.

La internalización del AChR inducida por la depleción de colesterol es independiente del citoesqueleto de actina

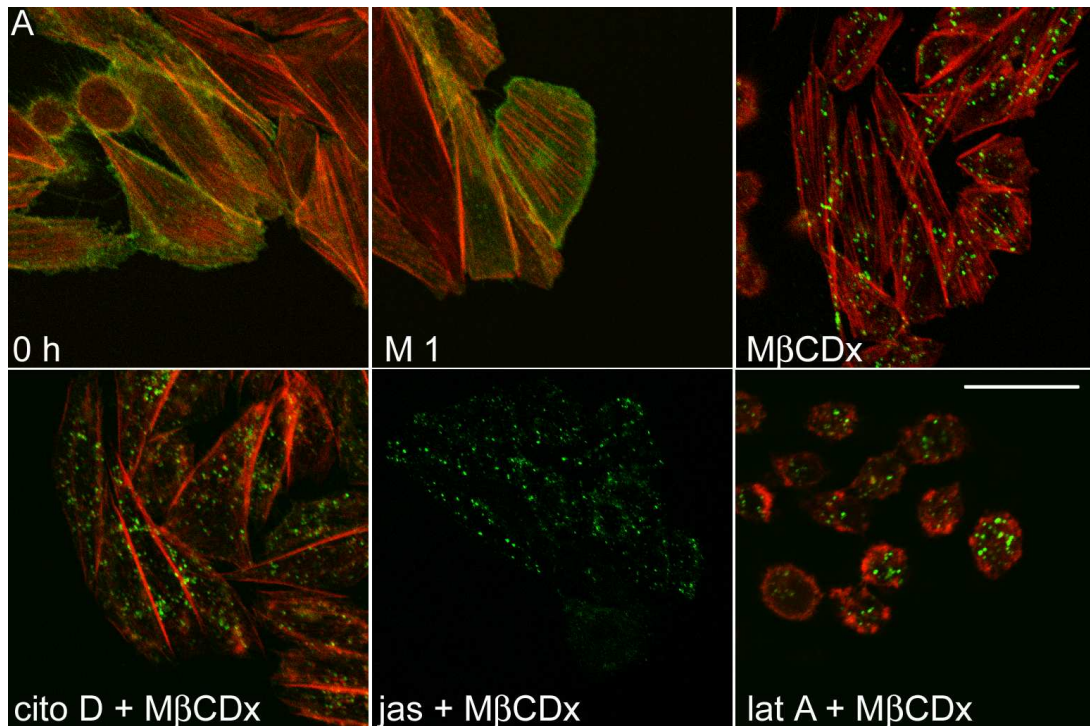
Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la endocitosis del AChR en las células CHO-K1/A5 depende de la integridad del citoesqueleto (ver Capítulo I). También se ha demostrado que los nano-agregados de AChR (<50 nm de diámetro) están distribuidos al azar en la superficie de las células CHO-K1/A5, pero adquieren orden –una organización de largo rango (dentro de 0.5–2.5 μ m de radio)– luego de la depleción de Col (20). Esto podría estar relacionado con un aumento de la estabilidad del citoesqueleto de actina ubicado

por debajo de la membrana plasmática, provocado por el tratamiento con M β CDx (219). Este aumento de estabilidad esta acompañado con un mayor recambio del citoesqueleto citoplasmático y una redistribución de PI(4,5)P₂ (219) Estas observaciones nos llevaron a especular que la actina cortical podía estar involucrada en la aceleración de la endocitosis del AChR debida a la depleción de Col. Para evaluar esta posibilidad coincubamos las células con M β CDx (15 mM, 30 min a 37 °C) y toxinas que alteran la polimerización de actina, latrunculina A (lat A 12,5 μ M), citocalasina D (cito D 2,5 μ M) (220,221), y jasplakinolide (jas 1 μ M), (222).

Cuando se marcan las células con faloidina-rodamina, una sonda que se une a la actina, las células control (incubadas con M1 + DMSO, solvente usado para disolver las drogas) exhiben el patrón característico de fluorescencia de un citoesqueleto íntegro. Esto es, fibras de actina alineadas con la membrana celular (fibras de stress) y sin acúmulos (Figura 10A, DMSO). La fluorescencia correspondiente al AChR marcado con Alexa⁶⁴⁷- α BTX fue observada solamente en la superficie celular.

Luego del tratamiento con M β CDx, la marca de Alexa⁶⁴⁷- α BTX se distribuyó en forma de endosomas dentro de la célula sin relación alguna con las fibras de actina. No se observaron cambios evidentes en la estructura de los filamentos de actina respecto de las células control (Figura 10A, M β CDx) al nivel de resolución empleado. Sin embargo, la adición en el medio de la citocalasina D o la latrunculina A, provocó una desorganización de las fibras de stress, hecho que se evidenció porque la marca de actina se volvió puntiforme (Figura 10A, cito D+M β CDx y latA+ M β CDx); la latrunculina A fue más eficiente que la citocalasina D, en lograr este efecto.

Las células tratadas con jasplakinolide no se marcaron con faloidina-rodamina ya que estas dos moléculas se unen al mismo sitio sobre las fibras de actina (Figura 10A, jas+ M β CDx). Esto es una evidencia de que esta droga está ocupando su sitio de acción y corrobora la eficacia del tratamiento.



B

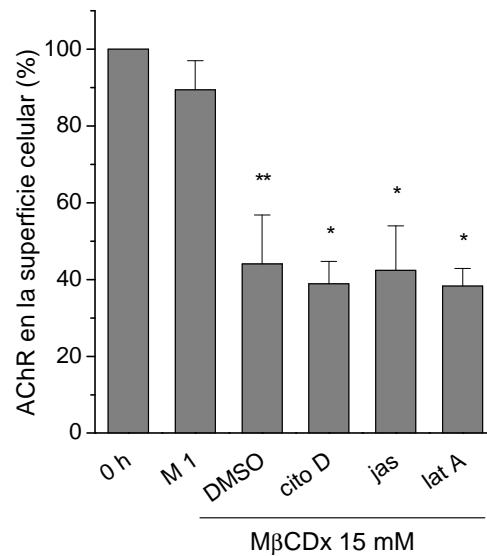


Figura 10. La endocitosis del AChR inducida por MβCDx es independiente del citoesqueleto. A) Las células CHO-K1/A5 se marcaron con Alexa⁴⁸⁸-αBTX por 1 h a 4°C, y se incubaron a 37°C por 30 min con M1 más DMSO, o MβCDx más el agregado de citocalasina D (cito D 2,5 μM), jasplakinolide (jas 1 μM) o latrunculina A (lat A 12,5 μM). Al final de la incubación las células se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con faloidina-rrodamina durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se lavaron y fotografiaron en un microscopio confocal. Escala 30 μm B) Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con αBTX-biotina por 1 h a 4°C, luego incubadas a 37°C por 30 min con M1 más DMSO, o MβCDx más el agregado de cito D, jas o lat A como se explicara en A. Al final de la incubación, las células fueron marcadas con Alexa⁴⁸⁸-SA y fotografiadas. Se cuantificó en cada célula la fluorescencia correspondiente a Alexa⁴⁸⁸, normalizándose este valor respecto al obtenido en células no incubadas a 37°C (0 h). Las barras representan la media más D.E., *p< 0.001, **p<0.025, n=3.

La morfología celular fue drásticamente alterada como resultado de estos cambios en la organización de la actina. Las células adquirieron forma estrellada, consistente en un cuerpo central con prolongaciones de la membrana adheridas al vidrio. Sin embargo, no hubo cambios en la velocidad de internalización del AChR (Figura 10A y B). Las células tratadas con M β CDx junto con lat A, cito D o jas muestran el mismo patrón de internalización que las células tratadas con M β CDx sola (Figura 10A), y además tienen la misma reducción en los niveles de superficie del AChR (Figura 10B), indicando que la internalización del AChR inducida por la depleción de Col es independiente de la integridad del citoesqueleto.

La depleción del Col también provoca una redistribución del PI(4,5)P₂, de la membrana al citosol (223). Este lípido es un importante coordinador en diversas etapas de las distintas vías endocíticas (ver Introducción) y su secuestro mimetiza los efectos del tratamiento con M β CDx sobre el citoesqueleto (219,224,225). Cabe la posibilidad entonces que la redistribución del PI(4,5)P₂, provocada por la depleción de Col esté involucrada en la aceleración de la endocitosis del AChR observada cuando se tratan las células con M β CDx.

Si esto fuera así, el secuestro del PI(4,5)P₂ debería acelerar la internalización del AChR en células con niveles normales de Col. Para evaluar esta posibilidad, transfectamos las células CHO-K1/A5 con el dominio PH de la fosfolipasa C₈ acoplado a la proteína fluorescente verde GFP (PH-PLC₈-GFP). Los dominios PH son dominios estructurales presentes en distintas proteínas que tienen la capacidad de unir fosfoinosítidos. En particular el PH-PLC₈-GFP ha sido utilizado para visualizar estos lípidos y sus cambios de localización en respuesta a diferentes señales. Además, la sobreexpresión de este dominio funciona como un agente secuestrador del PI(4,5)P₂, informando entonces sobre el requerimiento de este lípido en los procesos celulares (226–228).

Al transfectar las células con el PH-PLC₈-GFP, observamos que la fluorescencia del PH-PLC₈-GFP se localizaba principalmente en la membrana plasmática. Esto obedece, sin duda, a que la membrana de superficie constituye el

reservorio de mayor concentración de PI(4,5)P₂. Además, las células transfectadas con el PH-PLC_δ-GFP no mostraron diferencias en cuanto a la internalización del AChR cuando fueron marcadas con Alexa⁶⁴⁷-αBTX e incubadas durante distintos tiempos a 37°C (Figura 11).

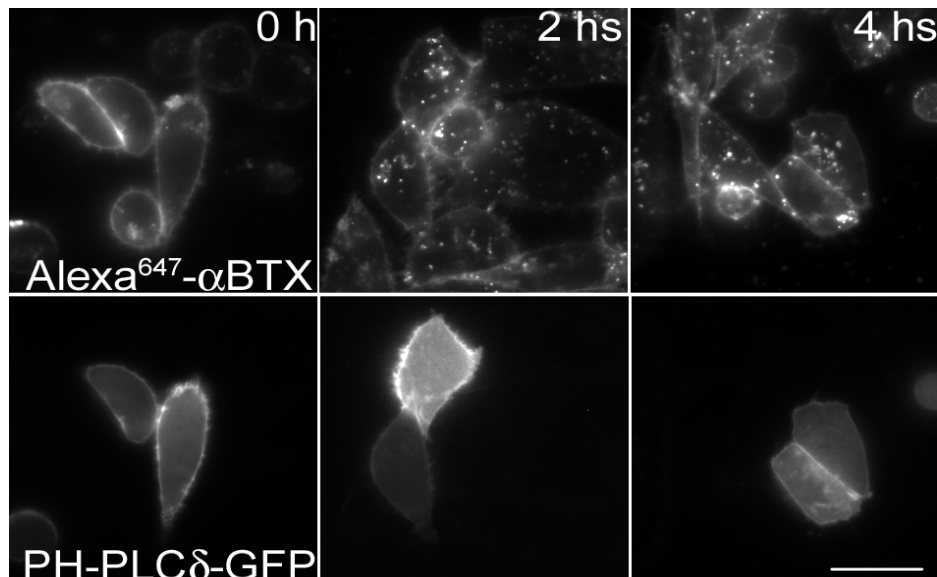


Figura 11. La sobreexpresión del dominio PH-PLC_δ-GFP no altera la endocitosis del AChR. Las células CHO-K1/A5 se transfectaron con el plásmido que codifica para el dominio PH-PLC_δ-GFP y doce horas después de la transfección se utilizaron para los experimentos. Las células se marcaron a 4°C con Alexa⁶⁴⁷-αBTX y luego se incubaron a 37°C durante 0, 2 ó 4 hs. Al final de la incubación las células fueron lavadas y fotografiadas. Se identificaron las células transfectadas por la fluorescencia de la sonda GFP. Escala 50 μm.

Tampoco se observaron diferencias entre las células transfectadas y no transfectadas en la internalización del AChR cuando tratamos las células con MβCDx durante 30 min (Figura 12). Esto corrobora que la internalización del AChR no requiere PI(4,5)P₂.

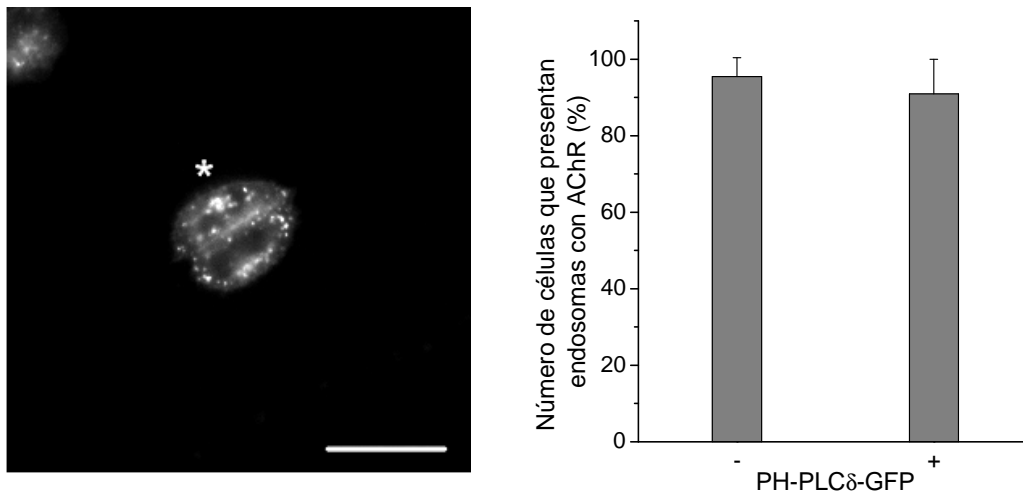


Figura 12. La sobreexpresión del dominio PH-PLC δ -GFP no altera la endocitosis del AChR en presencia de M β CDx. Las células CHO-K1/A5 se transfectoron como se indica en la Figura 11. Las células se marcaron a 4°C con Ale xa⁶⁴⁷- α BTX, luego se incubaron a 37°C durante 30 min con M β CDx y al final de la incubación se fotografiaron. Se identificaron las células transfectadas (marcada con * en la figura) por la fluorescencia de la sonda GFP. Se cuantificó en cada preparado el número de células transfectadas (PH-PLC δ -GFP +) y no transfectadas (PH-PLC δ -GFP -) que presentan endosomas con AChR, normalizándose este valor respecto al número de células evaluadas. Escala: 50 μ m. Las barras representan la media más D.E., n=3.

La presencia en las células musculares de proteínas accesorias al AChR, como la rapsina, aumenta la vida media del receptor en la membrana. Sin embargo, como se explicara en el Capítulo I, las células CHO carecen de estas proteínas. La rapsina se encuentra asociada en estequiometría 1:1 con el AChR y lo estabiliza sirviendo como puente entre el AChR y el citoesqueleto (229,230). Para investigar si la ausencia de rapsina es lo que confiere la sensibilidad de la internalización del AChR a los niveles de Col, transfectamos en forma transiente las células CHO-K1/A5 con un plásmido que codifica para rapsina-GFP. Como muestra la Figura 13, la rapsina-GFP se expresa en la superficie celular y colocaliza con el AChR. Además, en un número muy reducido de células se observa que la presencia de rapsina-GFP, induce la formación de agregados pequeños de AChR (Figura 13).

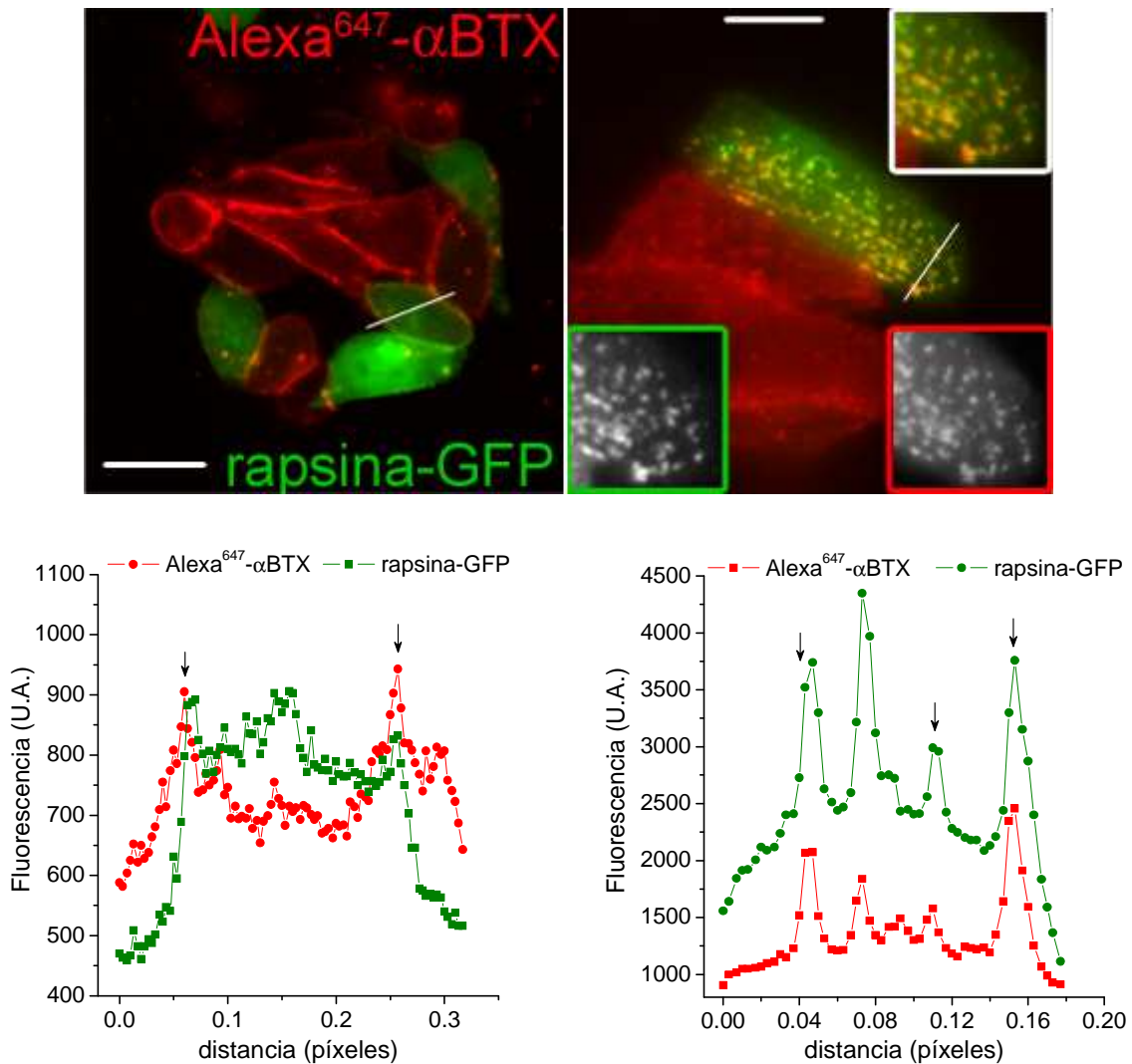


Figura 13. La rapsina-GFP llega a la superficie celular en células CHO-K1/A5. Las células CHO-K1/A5 se transfectoraron con un plásmido que codifica para rapsina-GFP, 18 hs después se marcaron a 4°C con Alexa⁶⁴⁷-αBTX y se fotografiaron. Panel superior; imágenes de células CHO-K1/A5 en donde se observa la fluorescencia proveniente de rapsina-GFP en la membrana (derecha) y formando agrupamientos con el AChR (izquierda). Abajo: perfil de intensidades de fluorescencia correspondiente a rapsina-GFP (verde) y Alexa⁶⁴⁷-αBTX (rojo) proveniente de la línea dibujada en las fotos. Las flechas indican la membrana (gáfico derecha) y los agrupamientos (izquierda). Escala: 50 μm (izquierda), 20 μm (derecha).

Cuando estudiamos la internalización del AChR en condiciones de depleción de Col, observamos que las células transfectadas con rapsina-GFP (marcada con un asterisco en la Figura 14), muestran el mismo patrón de endocitosis que las células no transfectadas (Figura 14). Además, la presencia de rapsina-GFP no modificó el número de células que internalizan el AChR cuando se las trata con MβCDx. Estos resultados indican que la endocitosis del AChR inducida por la depleción de Col no está vinculada a la presencia de la rapsina-GFP.

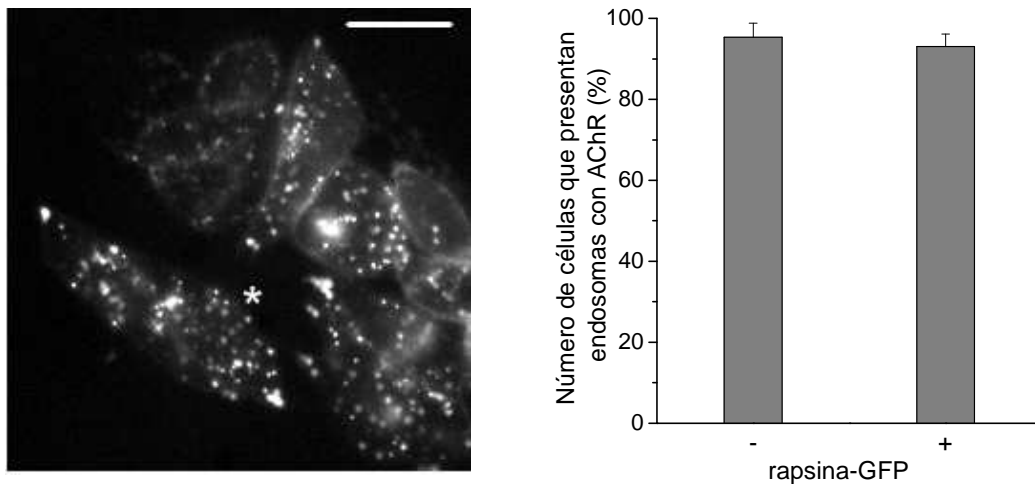


Figura 14. La rapsina-GFP no modifica la internalización del AChR en presencia de M β CDx. Las células CHO-K1/A5 se transfectoron con un plásmido que codifica para rapsina-GFP, doce horas después se marcaron a 4°C con Alexa⁶⁴⁷- α BTX, luego se incubaron a 37°C durante 30 min con M β CDx y al final de la incubación se fotografiaron. Se identificaron las células transfectadas (marcada con * en la figura) por la fluorescencia de la sonda GFP. Se cuantificó en cada preparado el número de células transfectadas (rapsina-GFP+) y no transfectadas (rapsina-GFP-) que presentan endosomas con AChR, normalizándose este valor respecto al número de células evaluadas. Escala: 50 μ m. Las barras representan la media más D.E., n=3.

La internalización del AChR inducida por la depleción de colesterol procede en forma independiente de dinamina y de clatrina

La internalización del AChR procede en forma independiente de dinamina y de clatrina cuando los niveles de Col celular son normales (Capítulo I). Para determinar el mecanismo que opera cuando se depletan las células de Col transfectamos las células CHO-K1/A5 en forma pasajera con los plásmidos que codifican para una mutante dominante negativa de dinamina (dinK44A-HA) y una forma truncada de Eps15 (EGFP-Eps15 Δ 95-295). Esta última bloquea la entrada de material a la célula a través de la vía de endocitosis dependiente de clatrina (70). Dieciocho horas después de la transfección las células fueron marcadas con Alexa⁶⁴⁷- α BTX a 4°C, y tratadas con M β CDx. Las células transfectadas fueron identificadas por la fluorescencia de la EGFP en el caso de EGFP-Eps15 Δ 95-295 y por inmunofluorescencia con un anticuerpo dirigido contra el antígeno HA para el caso de dinK44A-HA. Como se muestra en la Figura 15, ni la sobreexpresión de Eps15 Δ 95-295-EGFP ni la de dinK44A-HA afectó la internalización del AChR inducida por la depleción de Col. Estos resultados indican que la internalización

del AChR procede por un mecanismo independiente de clatrina y de dinamina, tanto con niveles normales de Col celular (Capítulo I), como cuando se depletan las células de Col.

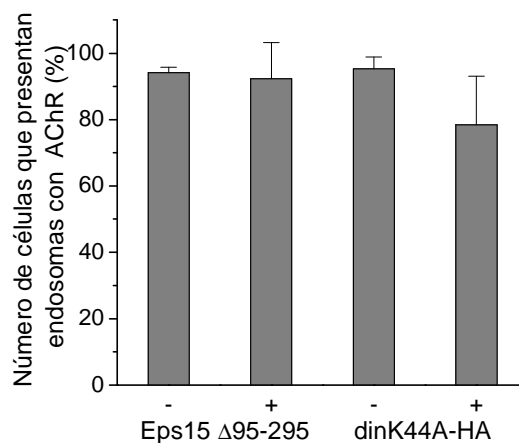
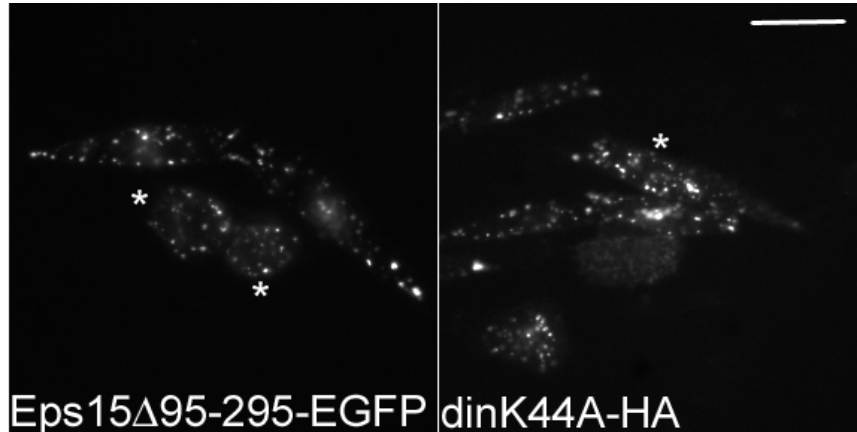


Figura 15. La internalización del AChR inducida por la depleción de Col es independiente de clatrina y de dinamina. Las células CHO-K1/A5 se transfectoraron con plásmidos que codifican para Eps15Δ95-295-EGFP (izquierda) o dinK44A-HA (derecha), 18 hs después se marcaron a 4°C con Alexa⁶⁴⁷-αBTX y luego se incubaron a 37°C durante 30 min con MβCDx. Al final de la incubación las células transfectoradas con Eps15Δ95-295-EGFP se fotografiaron. Las células transfectoradas con dinK44A-HA se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con anticuerpo anti HA seguido de anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸. El * indica las células transfectoradas. Se cuantificó en cada preparado el número de células transfectoradas (Eps15Δ95-295-EGFP + o dinK44A-HA +) y no transfectoradas (Eps15Δ95-295-EGFP - o dinK44A-HA -) que presentan endosomas con AChR, normalizándose este valor respecto al número de células evaluadas. Escala 50 μm. Las barras representan la media más D.E., n=3.

La endocitosis del AChR inducida por MβCDx es dependiente de Arf6

La Arf6 es una pequeña GTPasa de la familia de proteínas Arf (ver Introducción). Se localiza en la membrana plasmática, donde regula el tráfico de membrana por un mecanismo independiente de dinamina (Donaldson, 2005). Esta

función de la enzima Arf6 nos llevo a estudiar si esta proteína afectaba la internalización del AChR en condiciones de depleción de Col. Para ello transfectamos las células en forma transiente con plásmidos que codifican una mutante negativa (Arf6 T27N-HA) o una mutante constitutivamente activa (Arf6 Q67L-HA) de Arf6, y sometidas al tratamiento con M β CDx.

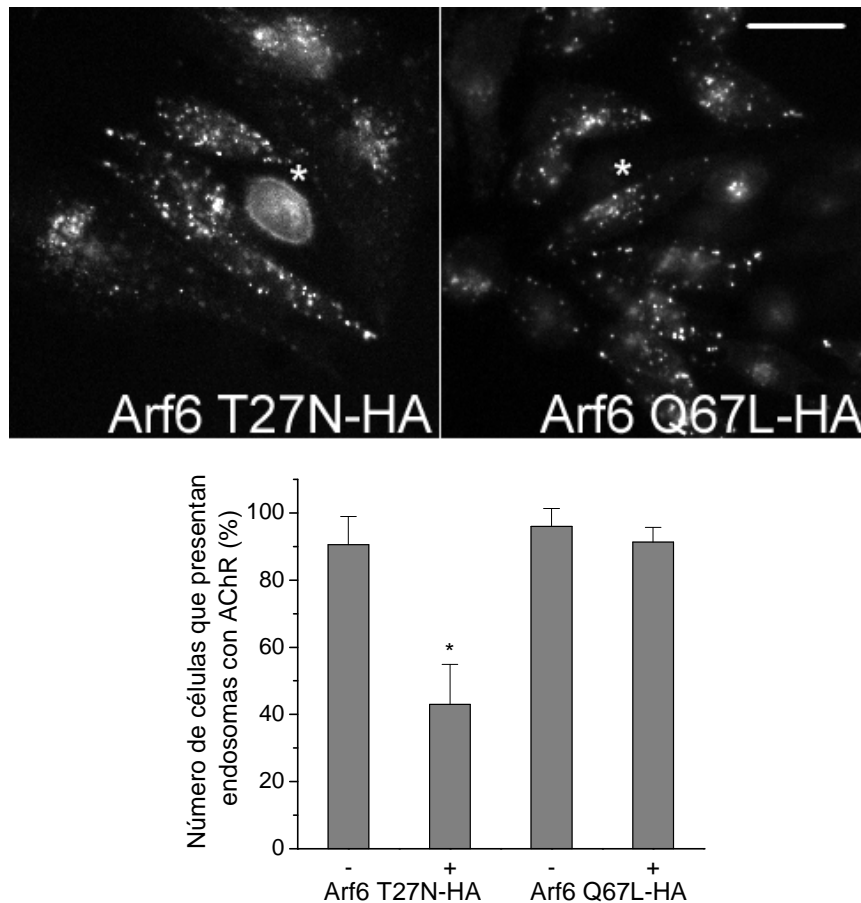


Figura 16. La internalización del AChR inducida por la depleción de Col depende de Arf6. Las células CHO-K1/A5 se transfectaron con plásmidos que codifican para Arf6T27N-HA (izquierda) o Arf6Q67L-HA (derecha), 18 hs después se marcaron a 4°C con Alexa⁶⁴⁷- α BTX y luego se incubaron a 37°C durante 30 min con M β CDx. Al final de la incubación las células se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con anticuerpo anti HA seguido de anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸. El * indica las células transfectadas. Se cuantificó en cada preparado el número de células transfectadas (Arf6T27N-HA+ o Arf6Q67L-HA+) y no transfectadas (Arf6T27N-HA - o Arf6Q67L-HA -) que presentan endosomas con AChR, normalizándose este valor respecto al número de células evaluadas. Escala 50 μ m. Las barras representan la media más D.E., n=3. *p<0.01

La sobreexpresión de la mutante dominante negativa de Arf6 (Arf6 T27N-HA) inhibió claramente el aumento en la velocidad de internalización del AChR inducido por la depleción de Col. El número de células que presentaban

endosomas con α BTX-AChR se redujo aproximadamente en un 50%. Sin embargo las células transfectadas con la mutante constitutivamente activa de Arf6 (Arf6Q67L-HA) presentaron el mismo comportamiento que las células control, corroborando los resultados anteriores e indicando la ausencia de artefactos asociados a la sobreexpresión de proteínas (Figura 16).

Para evaluar el efecto de la inhibición de Arf6 en más detalle, realizamos un experimento de doble marcación. Las células transfectadas fueron marcadas con Alexa⁵⁶⁸- α BTX (rojo) a 4 °C y luego expuestas por 30 min a 37°C a M β CDx o M1, respectivamente. Al final de la incubación las células fueron marcadas con mAb210 anti-AChR y anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁶⁴⁷ (verde). Las células fueron luego fijadas, permeabilizadas y marcadas con anticuerpo anti-HA y anticuerpo secundario-Alexa⁴⁸⁸. De acuerdo con este protocolo, los cambios en la relación verde/rojo indican cuantitativamente el grado de internalización del AChR. En las células transfectadas con Arf6 T27N y tratadas con M β CDx, sólo el ~20% de los AChRs fueron internalizados, un valor similar al obtenido para las células control incubadas con M1 (Figura 17).

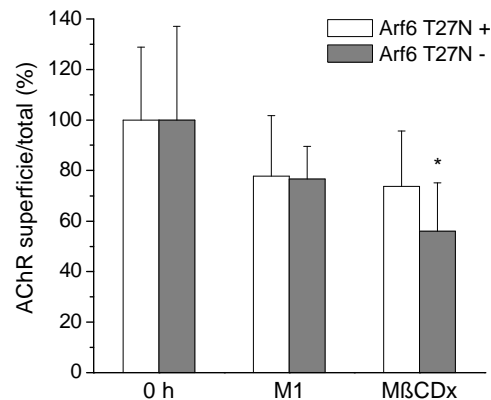


Figura 17. El bloqueo de la función de Arf6 inhibe la internalización del AChR inducida por la depleción de Col. Las células CHO-K1/A5 se transfectaron con un plásmido que codifica para Arf6T27N-HA, 18 hs después se marcaron a 4°C con Alexa⁵⁴⁶- α BTX y luego se incubaron a 37°C durante 30 min con M1 o M β CDx. Al final de la incubación las células se marcaron con mab210 y anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁶⁴⁷. Luego se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con anticuerpo anti HA seguido de anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸. Se cuantificó la fluorescencia proveniente de la Alexa⁵⁴⁶- α BTX (total) y del anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁶⁴⁷ (superficie) en las células transfectadas (Arf6T27N-HA +) y no transfectadas (Arf6T27N-HA-). Este valor se normalizó respecto al obtenido en células no incubadas a 37°C. Las barras representan la media más D.E., n=3. *p<0.025.

Esta serie de experimentos demuestran que en condiciones de depleción de Col la internalización del AChR es dependiente de la GTPasa Arf6. Esta dependencia no se observa en células con niveles normales de Col (no incubadas con M β CDx) en las que la transfección de Arf6T27N o Arf6Q67L no tiene efecto sobre la internalización del AChR aun luego de 6 hs de incubación (Capítulo I, Figura 18). Esto indicaría que la endocitosis del AChR se vuelve sensible a Arf6 en condiciones de bajos niveles de Col.

Consistente con estos resultados, el tratamiento con la droga brefeldina A (BFA) no inhibió la endocitosis del AChR en presencia de M β CDx (Figura 18). La BFA es un inhibidor selectivo de intercambiadores de nucleótidos de la familia Arf, a excepción de los de Arf6 (231).

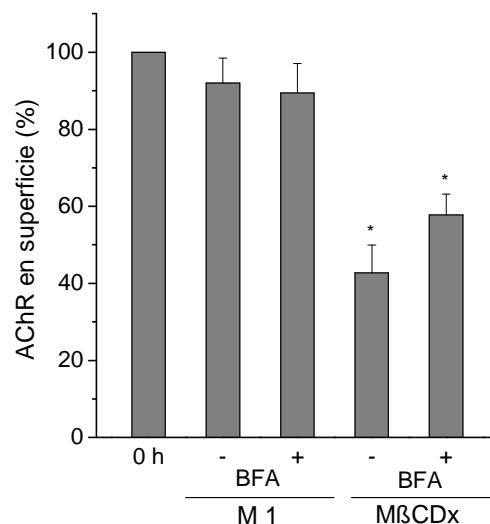


Figura 18. El tratamiento con brefeldina A no inhibe la internalización del AChR en presencia de M β CDx. Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con α BTX-biotina por 1 h a 4°C, luego incubadas a 37°C por 30 min con M1, con y sin el agregado de BFA (2.5 μ g/ml), o M β CDx con y sin BFA. Al final de la incubación, las células fueron marcadas con Alexa⁴⁸⁸-SA y fotografiadas. Se cuantificó en cada célula la fluorescencia correspondiente a Alexa⁴⁸⁸, normalizándose este valor respecto al obtenido en células no incubadas a 37°C (0 h). Las barras representan la media más D.E., * significativamente diferente de M1, $p < 0.001$, $n=3$.

La endocitosis del AChR inducida por M β CDx es dependiente de Rac1

Cuando los niveles de Col celular son normales la internalización del AChR depende de la activación de Rac1 (202). Rac1 es una pequeña GTPasa que está acoplada a la activación de Arf6 en muchos procesos celulares relacionados con la

reorganización de la actina y con el tráfico de membranas (188,232–234,234,235). Además, la localización y actividad de Rac1 están determinadas por los niveles celulares de Col (236), por lo cual nos propusimos investigar si ésta proteína estaba involucrada en la internalización del AChR en condiciones de depleción de Col. Para tal fin transfectamos células CHO-K1/A5 en forma transiente con una mutante negativa de Rac1, Rac1N17-HA, y ensayamos la internalización del AChR en presencia de M β CDx. Como se observa en la Figura 19, luego del tratamiento con M β CDx, existe una clara reducción del número de células que internalizan el AChR dentro de la población que expresa Rac1N17-HA. Estos resultados sugieren que es necesaria la actividad de Rac1 para la internalización del AChR en condiciones de depleción de Col.

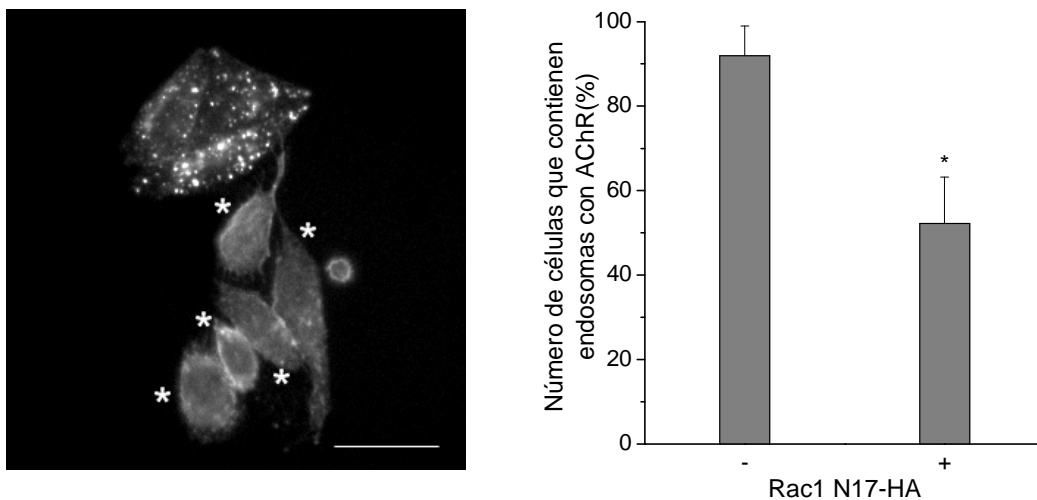


Figura 19. La internalización del AChR en presencia de M β CDx depende de la actividad de Rac1. Las células CHO-K1/A5 se transfectaron con un plásmido que codifica para Rac1N17-HA, 18 hs después se marcaron a 4°C con Alexa⁶⁴⁷- α BTX y luego se incubaron a 37°C durante 30 min con M β CDx. Al final de la incubación las células se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con anticuerpo anti HA seguido de anticuerpo secundario acoplado a Alexa⁴⁸⁸. El * indica las células transfectadas. Se cuantificó en cada preparado el número de células transfectadas (Rac1N17-HA +) y no transfectadas (Rac1N17-HA) que presentan endosomas con AChR, normalizándose este valor respecto al número de células evaluadas. Escala: 50 μ m. Las barras representan la media más D.E., n=3. *p<0.01

La endocitosis del AChR inducida por M β CDx es dependiente de la actividad de la PLD

La activación de Arf6 también lleva en muchos sistemas celulares a la activación de la fosfolipasa D (PLD). Uno de los productos de reacción de esta

enzima es el ácido fosfatídico, el cual ha sido involucrado el proceso de formación y fisión de vesículas (237,238).

Para estudiar si la formación de PA está involucrada en la internalización del AChR en presencia de M β CDx, utilizamos la incubación con alcoholes primarios, (en este caso 1-butanol), los cuales pueden desviar la formación de ácido fosfatídico por la fosfolipasa D (PLD) hacia la formación de los correspondientes fosfatidilalcoholes (moléculas inactivas). Los alcoholes ramificados como el isopropanol no son sustrato en estas reacciones por lo que sirven como control.

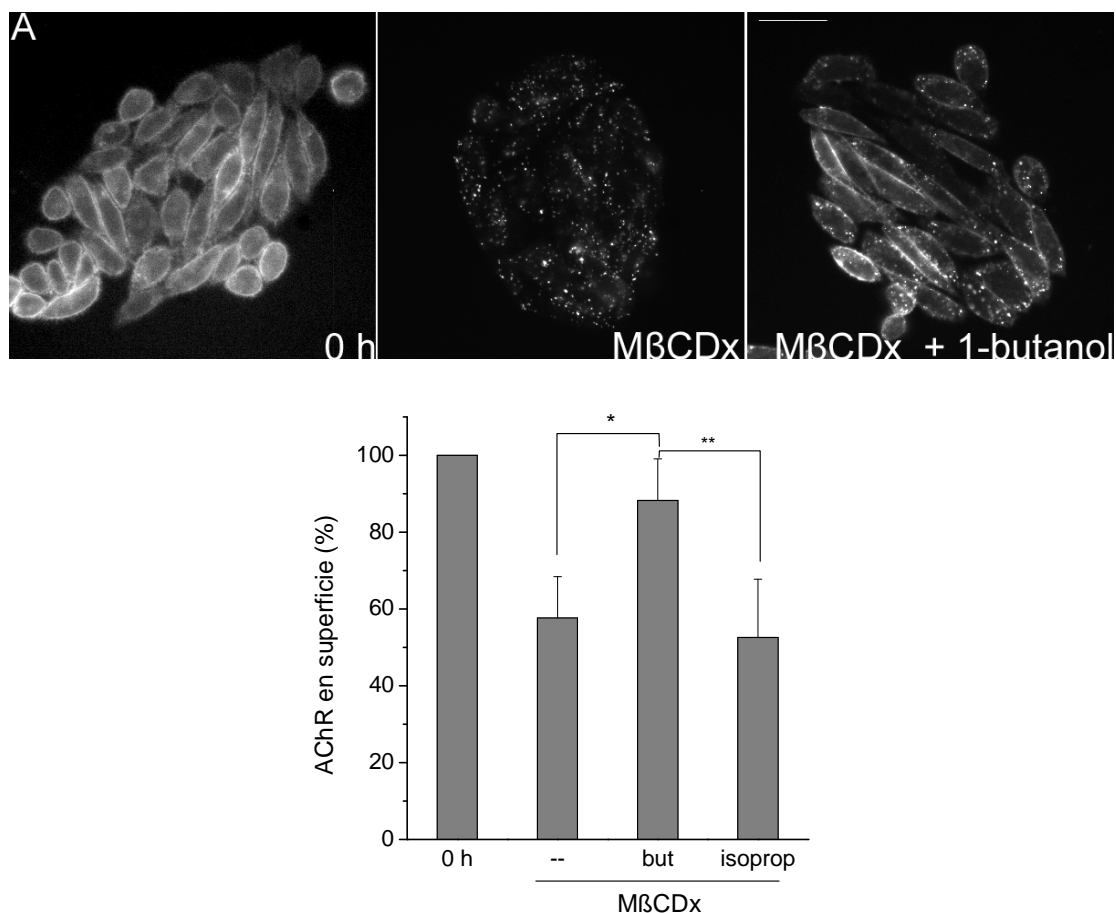


Figura 20. La endocitosis del AChR en presencia de M β CDx requiere la formación de ácido fosfatídico. A) Las células CHO-K1/A5 se marcaron con Alexa⁴⁸⁸- α BTX por 1 h a 4°C, y se incubaron a 37°C por 30 min con M β CDx o M β CDx más el agregado de 0.3 % 1-butanol. Al final de la incubación se fotografiaron. Escala 50 μ m B) Las células CHO-K1/A5 fueron marcadas con α BTX-biotina por 1 h a 4°C, luego incubadas a 37°C por 30 min con M β CDx, M β CDx más el agregado de 0.3 % 1-butanol (but) o M β CDx más el agregado de 0.3 % isopropanol. Al final de la incubación, las células fueron marcadas con Alexa⁴⁸⁸-SA y fotografiadas. Se cuantificó en cada célula la fluorescencia correspondiente a Alexa⁴⁸⁸, normalizándose este valor respecto al obtenido en células no incubadas a 37°C (0 h). Las barras representan la media más D.E., *p<0.01, **p<0.05, n=3.

Como muestra la Figura 20, la coincubación de las células CHO-K1 /A5 con M β CDx y 1-butanol inhibe la internalización del AChR. Sin embargo si en lugar de 1-butanol se utiliza isopropanol, ésto no ocurre. Estos resultados sugieren que la aceleración de la endocitosis del AChR observada cuando se depletan las células de Col, requiere ácido fosfatídico.

Discusión

En las células CHO-K1/A5, el AChRs es una proteína residente de membrana de larga vida que está organizada en forma de nano-agregados sensibles al Col (20). La depleción de Col tiene severas consecuencias sobre los distintos procesos endocíticos. La falta de Col inhibe la endocitosis a través de la vía dependiente de clatrina, de caveolina, de RhoA y de cdc42 (128). Sin embargo, en el caso del AChR expresado en células CHO-K1/A5 se observa el efecto contrario, se incrementa la velocidad de endocitosis (Figura 4 y 5), con la consecuente disminución de la vida media del receptor en la membrana (Figura 5). Este efecto es específico sobre el AChR ya que no se observó sobre otra proteína expresada en forma endógena en las células CHO-K1/A5, el receptor de Tfr (Figura 2). Pese a su acelerada internalización, el AChR no es degradado durante los tiempos estudiados, ya que no hay cambios en la intensidad de fluorescencia de la sonda α BTX unida al AChR (Figura 1). Tampoco se observa colocalización entre los endosomas con AChR y lisotracker, un marcador de lisosomas (Figura 9). Es decir que la depleción de Col redistribuye el AChR a un compartimento interno en donde es retenido (Figura 1 y 5). La falta de colocalización de este compartimento con los marcadores de endosomas tempranos, tardíos y de reciclado (Figura 9) sugiere que es una población específica de endosomas diferente.

A diferencia de lo que ocurre en condiciones normales de Col celular (Capítulo I), la internalización del AChR en condiciones de depleción de Col es independiente de la unión de ligandos. La marcación de las células con α BTX antes del tratamiento con M β CDx, no es necesaria para que se acelere la internalización del AChR (Figura 1). Además este fenómeno también se observa sobre AChRs marcados con anticuerpos, en donde a la aceleración de la internalización inducida por el anticuerpo se adiciona la de la depleción de Col (Figura 7). Diversos estudios han propuesto la necesidad de Col para mantener al AChR en una conformación

estable capaz de ser activada por ligandos (8,14,239). El AChR reconstituído sin Col, no puede llevar a cabo los cambios conformacionales inducidos por los agonistas además por simulaciones de dinámica molecular se postuló que cuando se saca el Col embebido en el AChR, la estructura del receptor colapsa (14). Si bien nosotros no determinamos cuán profundamente afecta la depleción de Col llevada a cabo con la M β CDx a la estructura del AChR, es posible que ocurran cambios conformacionales en el receptor. Estos cambios podrían funcionar como señal de internalización para remover de la superficie al AChR. En concordancia con este razonamiento, en nuestro laboratorio se ha observado que la funcionalidad a nivel de canal unitario del AChR en las células CHO-K1/A5, se ve alterada por el tratamiento con M β CDx. Hay una ganancia de función de los AChR remanentes en la superficie celular, que se refleja en un aumento del tiempo de estado abierto del receptor (209).

El tratamiento de las células CHO-K1/A5 con nistatina reduce los niveles de AChR pero su eficacia es menor que la de la M β CDx (Figura 8). Esto puede deberse a la diferencia en sus mecanismos de acción, mientras la M β CDx remueve el Col de la membrana (209), la nistatina lo compleja pero sin sacarlo físicamente, como lo demuestra la cuantificación de la fluorescencia proveniente de la sonda fPEG-Col (Figura 8). La menor capacidad de la nistatina en inducir la endocitosis del AChR sugiere que el *pool* de Col secuestrado por la nistatina es todavía capaz de equilibrarse con las moléculas de Col presentes en los nanoagregados de AChR (20) y por lo tanto las interacciones AChR-Col son mantenidas parcialmente. No podemos excluir la posibilidad que el secuestro del Col por la nistatina sea incompleto y por lo tanto no se desestabilize tanto al AChR.

Al igual que en las células con niveles normales de Col, la internalización del AChR en condiciones de depleción de Col procede por un mecanismo independiente de dinamina y de clatrina. Esto se evidencia en los experimentos en los que se sobreexpresa una mutante negativa de dinamina y una versión truncada

de una proteína necesaria para la internalización de proteínas por la vía dependiente de clatrina (Figura 15).

Los efectos de la depleción de Col sobre la membrana plasmática son diversos y complejos (240). Entre ellos se ha reportado que el tratamiento con M β CDx aumenta la estabilidad del citoesqueleto cortical de actina, y esto está relacionado con una redistribución del PI(4,5)P₂ (219). Sin embargo, la internalización del AChR en condiciones normales y de depleción de Col, no se ve afectada por la sobreexpresión del plásmido PH-PLC δ -GFP (Figura 11 y 12). Este plásmido enmascara el PI(4,5)P₂ de la membrana, imitando los efectos de la depleción de Col sobre el citoesqueleto. El hecho que no se hayan observado cambios en la internalización del AChR, indica que el mecanismo a través del cual la M β CDx acelera la internalización del AChR, no involucra al PI(4,5)P₂. Además, refuerza la idea que es la falta de Col y no sus efectos secundarios, lo que desestabiliza el AChR.

En las células CHO-K1/A5, el tratamiento con citocalasina D o jasplakinolide, inhibe el secuestro e internalización del AChR en condiciones de niveles de Col normales (Capítulo I, (202)). Sin embargo, cuando se reducen los niveles de Col celular, la internalización del AChR procede aún cuando el citoesqueleto está desorganizado. Ninguna de las drogas utilizadas para desorganizar el citoesqueleto logró disminuir la internalización del AChR ni cambiar la morfología de sus endosomas (Figura 10). Estos datos muestran que la depleción de Col provocaría un desacople entre la internalización del AChR y la dinámica del citoesqueleto.

El secuestro e internalización del AChR también requiere la activación de la GTPasa Rac1. Este proceso es estimulado por la unión de la α BTX al AChR a través de la activación de Src (202). Al igual que cuando los niveles celulares de Col son normales, la sobreexpresión de una mutante negativa de Rac1, disminuye significativamente el número de células que internalizan el AChR (Figura 19). Estos resultados evidencian que Rac1 no sólo actúa como moduladora del citoesqueleto

de actina en la internalización del AChR. También ponen de manifiesto la importancia de la proteína Rac1 en la determinación de la estabilidad del AChR en la membrana, ya que su actividad es necesaria para la internalización del AChR ante diversos estímulos.

La inhibición de la actividad de Arf6 por la sobreexpresión de una mutante dominante negativa, también inhibe la internalización del AChR inducida por el tratamiento con M β CDx (Figura 16). Se observa una clara disminución en el número de células transfectadas que internalizan el AChR en presencia de M β CDx (Figura 16) y un enlentecimiento en la internalización del mismo (Figura 17). El hecho que no todas las células transfectadas muestren la inhibición de la internalización del AChR puede deberse a que no todas las células presentan el mismo grado de sobreexpresión de Arf6T27N. Debe haber un umbral de sobreexpresión para que se bloquee efectivamente la función de Arf6 y éste umbral dependerá de los niveles endógenos de dicha proteína.

En contraposición a los resultados obtenidos con la mutante dominante negativa, las células transfectadas con la mutante constitutivamente activa de Arf6, no presentaron cambios respecto a las células no transfectadas (Figura 16) al ensayarse la internalización del AChR en presencia de M β CDx. Se ha reportado que esta última mutante provoca el secuestro del PI(4,5)P₂ en un compartimento endosomal con la consecuente disminución en la membrana plasmática (Brown y col., 2001). Es decir, que la sobreexpresión de la mutante constitutivamente activa de Arf6, produce un fenotipo similar a la del PH-PLC δ -GFP. Consistente con esta observación son los resultados obtenidos (Figura 11, 12 y 16).

Existe evidencia creciente sobre la relación entre Arf6 y Rac1. La activación de Arf6 aumenta los niveles de Rac1-GTP (119), es necesaria para el movimiento de vesículas con Rac1 hacia la membrana plasmática (241) y recluta el GEF de Rac1 Kalirina a la membrana facilitando la activación de Rac1 (235). La asociación de Rac1 con la membrana es necesaria para acoplarse a sus efectores. También se ha observado que la depleción de Col activa la Rac1(236), mimetizando el efecto de la

pérdida de adhesión celular. Es interesante notar que la adhesión de células C2C12 a proteínas específicas de la matriz extracelular, promueve la formación de agregados de AChR complejos similares a los encontrados en UNM (242). La formación de agregados de AChR del orden de los micrómetros, está asociada a un aumento en la estabilidad del receptor y requiere Col (18,19,34). La disrupción de dominios lipídicos, ya sea por depleción de Col (18,19) o esfingolípidos (19,243) desestabiliza los agregados de AChR en células C2C12. El mecanismo operante no está claro pero la pérdida de asociación con rapsina y cambios en el estado de fosforilación del AChR fueron propuestos (19). Al respecto, nosotros hemos observado que la sobreexpresión de rapsina-GFP no resulta en la estabilización del AChR en condiciones de depleción de Col (Figura 13 y 14). Es decir que esta proteína no estaría involucrada en este proceso. Es destacable que aunque los nano-agregados de AChR presentes en las células CHO-K1/A5 (20) son mucho mas pequeños que los de las células C2C12, o los de la UNM, responden en forma similar a la depleción de Col, sugiriendo un mecanismo conservado en la estabilidad del AChR a través de la interacción del receptor con el Col.

La endocitosis del AChR es insensible a la actividad de Arf6 en células con niveles normales de Col (Capítulo I, Figura 18), mientras que es un requisito para la internalización en células depletadas de Col. Es decir que ante la depleción de Col la internalización del AChR se vuelve sensible a la actividad de Arf6. Como se explicara en el párrafo anterior, Arf6 es capaz de activar a Rac1. Es posible entonces que la activación de Arf6 estimule a Rac1 y esto inicie la internalización del AChR. La activación de Rac1 parece ser entonces el evento clave en la internalización del AChR y esta puede lograrse por mecanismos totalmente diferentes: la unión del antagonista competitivo α BTX (202), o la depleción de Col a través del tratamiento con M β CDx. Esta vía de señalización Arf6-Rac1 no estaría activa en el contexto de la internalización del AChR, cuando los niveles de Col son normales, pero se estimularía cuando ante la falta de Col.

Otra molécula efectora activada por Arf6, es la enzima fosfolipasa D (PLD)(244), la cual hidroliza la fosfatidilcolina generando ácido fosfatídico (PA). Debido a la geometría de este lípido, se lo ha involucrado en la formación de curvatura negativa en las membranas celulares (237,238). Esta curvatura facilitaría el proceso de formación y fisión de vesículas. Cuando inhibimos la formación de PA, observamos una reducción en la internalización del AChR inducida por M β CDx (Figura 20), lo cual indica que este proceso requiere PA. Se ha demostrado en otros sistemas celulares que el tratamiento con M β CDx, estimula la actividad de la PLD (245), sin embargo este efecto se atribuyó a la asociación inhibitoria de la enzima con dominios ricos en Col (245) y no a una activación de Arf6. Es posible especular que en este sistema, la activación de la PLD, ya sea resultado directamente de la depleción de Col o indirectamente a través de la activación de Arf6, incremente los niveles de PA en los dominios en los que se encuentra el AChR. Este incremento generaría la curvatura necesaria en la membrana para la formación y fisión de vesículas. Este hecho sumado a las señales provenientes de la activación de Rac1 resultaría en la acelerada internalización del AChR.

En resumen, en este Capítulo demostramos que la depleción de Col acelera la internalización del AChR por un mecanismo independiente de dinamina, de clatrina y del citoesqueleto. Demostramos además que para que este hecho ocurra es necesaria la activación de Arf6 y de Rac1 y la generación de PA.

Referencias

1. **Karlin, A.** 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat.Rev.Neurosci.* **3**:102–114.
2. **Unwin, N.** 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J.Mol.Biol.* **346**:967–989.
3. **Gotti, C., M. Zoli, and F. Clementi.** 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol.Sci.* **27**:482–491.
4. **Jones, I. W., J. P. Bolam, and S. Wonnacott.** 2001. Presynaptic localisation of the nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit immunoreactivity in rat nigrostriatal dopaminergic neurones. *J.Comp Neurol.* **439**:235–247.
5. **Barrantes, F. J.** 2003. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* **6**:620–632.
6. **Barrantes, F. J.** 2004. Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **47**:71–95.
7. **Jones, O. T. and M. G. McNamee.** 1988. Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **27**:2364–2374.
8. **Criado, M., H. Eibl, and F. J. Barrantes.** 1982. Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. *Biochemistry* **21**:3622–3629.
9. **Barrantes, F. J.** 1983. Recent developments in the structure and function of the acetylcholine receptor. *Int.Rev.Neurobiol.* **24**:259–341.
10. **Barrantes, F. J.** 1989. The lipid environment of the nicotinic acetylcholine receptor in native and reconstituted membranes. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* **24**:437–478.
11. **Barrantes, F. J.** 2007. Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *J.Neurochem.* **103 Suppl 1**:72–80.
12. **Hamouda, A. K., M. Sanghvi, D. Sauls, T. K. Machu, and M. P. Blanton.** 2006. Assessing the lipid requirements of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **45**:4327–4337.
13. **Sunshine, C. and M. G. McNamee.** 1994. Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity. *Biochim.Biophys.Acta* **1191**:59–64.

14. **Brannigan, G., J. Henin, R. Law, R. Eckenhoff, and M. L. Klein.** 2008. Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**:14418–14423.
15. **Bruses, J. L., N. Chauvet, and U. Rutishauser.** 2001. Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J.Neurosci.* **21**:504–512.
16. **Pato, C., F. Stetzkowski–Marden, K. Gaus, M. Recouvreur, A. Cartaud, and J. Cartaud.** 2008. Role of lipid rafts in agrin–elicited acetylcholine receptor clustering. *Chem.Biol.Interact.* **175**:64–67.
17. **Campagna, J. A. and J. Fallon.** 2006. Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment–induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* **138**:123–132.
18. **Stetzkowski–Marden, F., K. Gaus, M. Recouvreur, A. Cartaud, and J. Cartaud.** 2006. Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J.Lipid Res.* **47**:2121–2133.
19. **Zhu, D., W. C. Xiong, and L. Mei.** 2006. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J.Neurosci.* **26**:4841–4851.
20. **Kellner, R. R., C. J. Baier, K. I. Willig, S. W. Hell, and F. J. Barrantes.** 2007. Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy. *Neuroscience* **144**:135–143.
21. **Pediconi, M. F., C. E. Gallegos, E. B. Los Santos, and F. J. Barrantes.** 2004. Metabolic cholesterol depletion hinders cell–surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience* **128**:239–249.
22. **Sanes, J. R. and J. W. Lichtman.** 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu.Rev.Neurosci.* **22**:389–442.
23. **Sanes, J. R. and J. W. Lichtman.** 2001. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat.Rev.Neurosci.* **2**:791–805.
24. **Lin, W., R. W. Burgess, B. Dominguez, S. L. Pfaff, J. R. Sanes, and K. F. Lee.** 2001. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* **410**:1057–1064.
25. **Lin, W., B. Dominguez, J. Yang, P. Aryal, E. P. Brandon, F. H. Gage, and K. F. Lee.** 2005. Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5–dependent mechanism. *Neuron* **46**:569–579.
26. **Misgeld, T., R. W. Burgess, R. M. Lewis, J. M. Cunningham, J. W. Lichtman, and J. R. Sanes.** 2002. Roles of neurotransmitter in synapse formation: development

- of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* **36**:635–648.
27. **Misgeld, T., T. T. Kummer, J. W. Lichtman, and J. R. Sanes.** 2005. Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**:11088–11093.
 28. **Chen, F., L. Qian, Z. H. Yang, Y. Huang, S. T. Ngo, N. J. Ruan, J. Wang, C. Schneider, P. G. Noakes, Y. Q. Ding, L. Mei, and Z. G. Luo.** 2007. Rapsyn interaction with calpain stabilizes AChR clusters at the neuromuscular junction. *Neuron* **55**:247–260.
 29. **Madhavan, R. and H. B. Peng.** 2005. Molecular regulation of postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *IUBMB.Life* **57**:719–730.
 30. **Witzemann, V.** 2006. Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res.* **326**:263–271.
 31. **Strochlic, L., A. Cartaud, and J. Cartaud.** 2005. The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: new partners, new functions. *Bioessays* **27**:1129–1135.
 32. **Hoch, W., J. T. Campanelli, and R. H. Scheller.** 1994. Agrin-induced clustering of acetylcholine receptors: a cytoskeletal link. *J.Cell Biol.* **126**:1–4.
 33. **Dai, Z., X. Luo, H. Xie, and H. B. Peng.** 2000. The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters. *J.Cell Biol.* **150**:1321–1334.
 34. **Willmann, R., S. Pun, L. Stallmach, G. Sadasivam, A. F. Santos, P. Caroni, and C. Fuhrer.** 2006. Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *EMBO J.* **25**:4050–4060.
 35. **Conti-Fine, B. M., M. Milani, and H. J. Kaminski.** 2006. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J.Clin.Invest* **116**:2843–2854.
 36. **Gu, Y. and Z. W. Hall.** 1988. Immunological evidence for a change in subunits of the acetylcholine receptor in developing and denervated rat muscle. *Neuron* **1**:117–125.
 37. **Shyng, S. L. and M. M. Salpeter.** 1990. Effect of reinnervation on the degradation rate of junctional acetylcholine receptors synthesized in denervated skeletal muscles. *J.Neurosci.* **10**:3905–3915.
 38. **Shyng, S. L. and M. M. Salpeter.** 1989. Degradation rate of acetylcholine receptors inserted into denervated vertebrate neuromuscular junctions. *J.Cell Biol.* **108**:647–651.

39. **Rotzler, S., H. Schramek, and H. R. Brenner.** 1991. Metabolic stabilization of endplate acetylcholine receptors regulated by Ca²⁺ influx associated with muscle activity. *Nature* **349**:337–339.
40. **Rotzler, S. and H. R. Brenner.** 1990. Metabolic stabilization of acetylcholine receptors in vertebrate neuromuscular junction by muscle activity. *J.Cell Biol.* **111**:655–661.
41. **Akaaboune, M., S. M. Culican, S. G. Turney, and J. W. Lichtman.** 1999. Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *Science* **286**:503–507.
42. **Andreose, J. S., R. Xu, T. Lomo, M. M. Salpeter, and G. Fumagalli.** 1993. Degradation of two AChR populations at rat neuromuscular junctions: regulation in vivo by electrical stimulation. *J.Neurosci.* **13**:3433–3438.
43. **Bruneau, E., D. Sutter, R. I. Hume, and M. Akaaboune.** 2005. Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *J.Neurosci.* **25**:9949–9959.
44. **Bruneau, E. G. and M. Akaaboune.** 2006. The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. *Development* **133**:4485–4493.
45. **St John, P. A. and H. Gordon.** 2001. Agonists cause endocytosis of nicotinic acetylcholine receptors on cultured myotubes. *J.Neurobiol.* **49**:212–223.
46. **Aderem, A. and D. M. Underhill.** 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* **17**:593–623.
47. **Simpson, F., N. K. Hussain, B. Qualmann, R. B. Kelly, B. K. Kay, P. S. McPherson, and S. L. Schmid.** 1999. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat.Cell Biol.* **1**:119–124.
48. **Owen, D. J. and J. P. Luzio.** 2000. Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Curr.Opin.Cell Biol.* **12**:467–474.
49. **Mousavi, S. A., L. Malerod, T. Berg, and R. Kjekshus.** 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem.J.* **377**:1–16.
50. **Brodsky, F. M., C. Y. Chen, C. Knuehl, M. C. Towler, and D. E. Wakeham.** 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **17**:517–568.
51. **Kirchhausen, T.** 2000. Clathrin. *Annu.Rev.Biochem.* **69**:699–727.
52. **Di Fiore, P. P. and P. De Camilli.** 2001. Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* **106**:1–4.

53. **Beattie, E. C., C. L. Howe, A. Wilde, F. M. Brodsky, and W. C. Mobley.** 2000. NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J.Neurosci.* **20**:7325–7333.
54. **De Camilli, P. and K. Takei.** 1996. Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron* **16**:481–486.
55. **Robinson, M. S. and J. S. Bonifacino.** 2001. Adaptor-related proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**:444–453.
56. **Tebar, F., S. K. Bohlander, and A. Sorkin.** 1999. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol.Biol.Cell* **10**:2687–2702.
57. **McMahon, H. T.** 1999. Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages. *Curr.Biol.* **9**:R332–R335.
58. **Morris, S. A., S. Schroder, U. Plessmann, K. Weber, and E. Ungewickell.** 1993. Clathrin assembly protein AP180: primary structure, domain organization and identification of a clathrin binding site. *EMBO J.* **12**:667–675.
59. **Danino, D., K. H. Moon, and J. E. Hinshaw.** 2004. Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *J.Struct.Biol.* **147**:259–267.
60. **Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid.** 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**:190–192.
61. **Marks, B., M. H. Stowell, Y. Vallis, I. G. Mills, A. Gibson, C. R. Hopkins, and H. T. McMahon.** 2001. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**:231–235.
62. **Damke, H., T. Baba, D. E. Warnock, and S. L. Schmid.** 1994. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J.Cell Biol.* **127**:915–934.
63. **Marks, B., M. H. Stowell, Y. Vallis, I. G. Mills, A. Gibson, C. R. Hopkins, and H. T. McMahon.** 2001. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**:231–235.
64. **Smirnova, E., D. L. Shurland, E. D. Newman-Smith, B. Pishvae, and A. M. van der Bliek.** 1999. A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J.Biol.Chem.* **274**:14942–14947.
65. **Kozlov, M. M.** 1999. Dynamin: possible mechanism of "Pinchase" action. *Biophys.J.* **77**:604–616.

66. **Stowell, M. H., B. Marks, P. Wigge, and H. T. McMahon.** 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat.Cell Biol.* **1**:27–32.
67. **Sever, S., H. Damke, and S. L. Schmid.** 2000. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic.* **1**:385–392.
68. **Sever, S.** 2002. Dynamin and endocytosis. *Curr.Opin.Cell Biol.* **14**:463–467.
69. **Conner, S. D. and S. L. Schmid.** 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**:37–44.
70. **Benmerah, A., M. Bayrou, N. Cerf-Bensussan, and A. Dautry-Varsat.** 1999. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J.Cell Sci.* **112** (Pt 9):1303–1311.
71. **Benmerah, A., C. Lamaze, B. Begue, S. L. Schmid, A. Dautry-Varsat, and N. Cerf-Bensussan.** 1998. AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J.Cell Biol.* **140**:1055–1062.
72. **Tebar, F., T. Sorkina, A. Sorkin, M. Ericsson, and T. Kirchhausen.** 1996. Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J.Biol.Chem.* **271**:28727–28730.
73. **Cupers, P., A. P. Jadhav, and T. Kirchhausen.** 1998. Assembly of clathrin coats disrupts the association between Eps15 and AP-2 adaptors. *J.Biol.Chem.* **273**:1847–1850.
74. **Kalthoff, C., J. Alves, C. Urbanke, R. Knorr, and E. J. Ungewickell.** 2002. Unusual structural organization of the endocytic proteins AP180 and epsin 1. *J.Biol.Chem.* **277**:8209–8216.
75. **Itoh, T., S. Koshiba, T. Kigawa, A. Kikuchi, S. Yokoyama, and T. Takenawa.** 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* **291**:1047–1051.
76. **Ford, M. G., I. G. Mills, B. J. Peter, Y. Vallis, G. J. Praefcke, P. R. Evans, and H. T. McMahon.** 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**:361–366.
77. **Owen, D. J.** 2004. Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem.Soc.Trans.* **32**:1–14.
78. **Honing, S., D. Ricotta, M. Krauss, K. Spate, B. Spolaore, A. Motley, M. Robinson, C. Robinson, V. Haucke, and D. J. Owen.** 2005. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol.Cell* **18**:519–531.

79. **Doray, B., I. Lee, J. Knisely, G. Bu, and S. Kornfeld.** 2007. The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol.Biol.Cell* **18**:1887–1896.
80. **Mukherjee, S., R. N. Ghosh, and F. R. Maxfield.** 1997. Endocytosis. *Physiol Rev.* **77**:759–803.
81. **Kowanetz, K., I. Szymkiewicz, K. Haglund, M. Kowanetz, K. Husnjak, J. D. Taylor, P. Soubeyran, U. Engstrom, J. E. Ladbury, and I. Dikic.** 2003. Identification of a novel proline–arginine motif involved in CIN85–dependent clustering of Cbl and down–regulation of epidermal growth factor receptors. *J.Biol.Chem.* **278**:39735–39746.
82. **Marsh, M. and H. T. McMahon.** 1999. The structural era of endocytosis. *Science* **285**:215–220.
83. **D'Hondt, K., A. Heese–Peck, and H. Riezman.** 2000. Protein and lipid requirements for endocytosis. *Annu.Rev.Genet.* **34**:255–295.
84. **Parton, R. G., B. Joggerst, and K. Simons.** 1994. Regulated internalization of caveolae. *J.Cell Biol.* **127**:1199–1215.
85. **Anderson, R. G.** 1998. The caveolae membrane system. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:199–225.
86. **Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller, and T. V. Kurzchalia.** 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin–1 gene–disrupted mice. *Science* **293**:2449–2452.
87. **Razani, B., X. B. Wang, J. A. Engelman, M. Battista, G. Lagaud, X. L. Zhang, B. Kneitz, H. Hou, Jr., G. J. Christ, W. Edelmann, and M. P. Lisanti.** 2002. Caveolin–2–deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol.Cell Biol.* **22**:2329–2344.
88. **Razani, B., T. P. Combs, X. B. Wang, P. G. Frank, D. S. Park, R. G. Russell, M. Li, B. Tang, L. A. Jelicks, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti.** 2002. Caveolin–1–deficient mice are lean, resistant to diet–induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J.Biol.Chem.* **277**:8635–8647.
89. **Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial, and A. Helenius.** 2004. Caveolin–stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* **118**:767–780.
90. **Thomsen, P., K. Roepstorff, M. Stahlhut, and B. van Deurs.** 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol.Biol.Cell* **13**:238–250.

91. **Tagawa, A., A. Mezzacasa, A. Hayer, A. Longatti, L. Pelkmans, and A. Helenius.** 2005. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J.Cell Biol.* **170**:769–779.
92. **Sharma, D. K., J. C. Brown, A. Choudhury, T. E. Peterson, E. Holicky, D. L. Marks, R. Simari, R. G. Parton, and R. E. Pagano.** 2004. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol.Biol.Cell* **15**:3114–3122.
93. **Minshall, R. D., C. Tirupathi, S. M. Vogel, W. D. Niles, A. Gilchrist, H. E. Hamm, and A. B. Malik.** 2000. Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J.Cell Biol.* **150**:1057–1070.
94. **Pelkmans, L. and A. Helenius.** 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* **3**:311–320.
95. **Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius.** 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat.Cell Biol.* **3**:473–483.
96. **Oh, P., D. P. McIntosh, and J. E. Schnitzer.** 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J.Cell Biol.* **141**:101–114.
97. **Yao, Q., J. Chen, H. Cao, J. D. Orth, J. M. McCaffery, R. V. Stan, and M. A. McNiven.** 2005. Caveolin-1 interacts directly with dynamin-2. *J.Mol.Biol.* **348**:491–501.
98. **Sharma, D. K., J. C. Brown, A. Choudhury, T. E. Peterson, E. Holicky, D. L. Marks, R. Simari, R. G. Parton, and R. E. Pagano.** 2004. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol.Biol.Cell* **15**:3114–3122.
99. **Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial, and A. Helenius.** 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* **118**:767–780.
100. **Pelkmans, L. and M. Zerial.** 2005. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* **436**:128–133.
101. **Grassart, A., A. Dujeancourt, P. B. Lazarow, A. Dautry-Varsat, and N. Sauvonnnet.** 2008. Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO Rep.* **9**:356–362.
102. **Ridley, A. J.** 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**:522–529.
103. **Vidal, C., B. Geny, J. Melle, M. Jandrot-Perrus, and M. Fontenay-Roupie.** 2002. Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates

- human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood* **100**:4462–4469.
104. **Hofmann, C., M. Shepelev, and J. Chernoff.** 2004. The genetics of Pak. *J.Cell Sci.* **117**:4343–4354.
105. **Sabharanjak, S., P. Sharma, R. G. Parton, and S. Mayor.** 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev.Cell* **2**:411–423.
106. **Guha, A., V. Sriram, K. S. Krishnan, and S. Mayor.** 2003. Shibire mutations reveal distinct dynamin-independent and -dependent endocytic pathways in primary cultures of *Drosophila* hemocytes. *J.Cell Sci.* **116**:3373–3386.
107. **Sharma, P., R. Varma, R. C. Sarasij, Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, and S. Mayor.** 2004. Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* **116**:577–589.
108. **Chadda, R., M. T. Howes, S. J. Plowman, J. F. Hancock, R. G. Parton, and S. Mayor.** 2007. Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic.* **8**:702–717.
109. **Llorente, A., A. Rapak, S. L. Schmid, B. van Deurs, and K. Sandvig.** 1998. Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. *J.Cell Biol.* **140**:553–563.
110. **Simpson, J. C., D. C. Smith, L. M. Roberts, and J. M. Lord.** 1998. Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp.Cell Res.* **239**:293–300.
111. **Gauthier, N. C., P. Monzo, V. Kaddai, A. Doye, V. Ricci, and P. Boquet.** 2005. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. *Mol.Biol.Cell* **16**:4852–4866.
112. **Shyng, S. L., J. E. Heuser, and D. A. Harris.** 1994. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J.Cell Biol.* **125**:1239–1250.
113. **Sunyach, C., A. Jen, J. Deng, K. T. Fitzgerald, Y. Frobert, J. Grassi, M. W. McCaffrey, and R. Morris.** 2003. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* **22**:3591–3601.
114. **Peters, P. J., A. Mironov, Jr., D. Peretz, E. van Donselaar, E. Leclerc, S. Erpel, S. J. DeArmond, D. R. Burton, R. A. Williamson, M. Vey, and S. B. Prusiner.** 2003. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J.Cell Biol.* **162**:703–717.

115. **Sharma, P., S. Sabharanjak, and S. Mayor.** 2002. Endocytosis of lipid rafts: an identity crisis. *Semin.Cell Dev.Biol.* **13**:205–214.
116. **Arnautova, I., C. L. Jackson, O. S. Al Awar, J. G. Donaldson, and Y. P. Loh.** 2003. Recycling of Raft-associated prohormone sorting receptor carboxypeptidase E requires interaction with ARF6. *Mol.Biol.Cell* **14**:4448–4457.
117. **Dunphy, J. L., R. Moravec, K. Ly, T. K. Lasell, P. Melancon, and J. E. Casanova.** 2006. The Arf6 GEF GEP100/BRAG2 regulates cell adhesion by controlling endocytosis of beta1 integrins. *Curr.Biol.* **16**:315–320.
118. **Naslavsky, N., R. Weigert, and J. G. Donaldson.** 2003. Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol.Biol.Cell* **14**:417–431.
119. **Radhakrishna, H. and J. G. Donaldson.** 1997. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J.Cell Biol.* **139**:49–61.
120. **Naslavsky, N., R. Weigert, and J. G. Donaldson.** 2004. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol.Biol.Cell* **15**:3542–3552.
121. **Kalia, M., S. Kumari, R. Chadda, M. M. Hill, R. G. Parton, and S. Mayor.** 2006. Arf6-independent GPI-anchored protein-enriched early endosomal compartments fuse with sorting endosomes via a Rab5/phosphatidylinositol-3'-kinase-dependent machinery. *Mol.Biol.Cell* **17**:3689–3704.
122. **Sigismund, S., T. Woelk, C. Puri, E. Maspero, C. Tacchetti, P. Transidico, P. P. Di Fiore, and S. Polo.** 2005. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**:2760–2765.
123. **Birkle, S., G. Zeng, L. Gao, R. K. Yu, and J. Aubry.** 2003. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* **85**:455–463.
124. **Mayor, S., K. G. Rothberg, and F. R. Maxfield.** 1994. Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* **264**:1948–1951.
125. **Nichols, B. J.** 2002. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat.Cell Biol.* **4**:374–378.
126. **Glebov, O. O., N. A. Bright, and B. J. Nichols.** 2006. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat.Cell Biol.* **8**:46–54.
127. **Mayor, S. and M. Rao.** 2004. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.* **5**:231–240.

128. **Mayor, S. and R. E. Pagano.** 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**:603–612.
129. **Madore, N., K. L. Smith, C. H. Graham, A. Jen, K. Brady, S. Hall, and R. Morris.** 1999. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.* **18**:6917–6926.
130. **Maxfield, F. R. and T. E. McGraw.** 2004. Endocytic recycling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**:121–132.
131. **Luzio, J. P., B. A. Rous, N. A. Bright, P. R. Pryor, B. M. Mullock, and R. C. Piper.** 2000. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J.Cell Sci.* **113 (Pt 9)**:1515–1524.
132. **Di Paolo, G. and P. De Camilli.** 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**:651–657.
133. **Odorizzi, G., M. Babst, and S. D. Emr.** 1998. Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* **95**:847–858.
134. **Birkeland, H. C. and H. Stenmark.** 2004. Protein targeting to endosomes and phagosomes via FYVE and PX domains. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **282**:89–115.
135. **Simonsen, A., R. Lippe, S. Christoforidis, J. M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B. H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, and H. Stenmark.** 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**:494–498.
136. **Simonsen, A., A. E. Wurmser, S. D. Emr, and H. Stenmark.** 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**:485–492.
137. **De Matteis, M. A. and A. Godi.** 2004. PI-loting membrane traffic. *Nat.Cell Biol.* **6**:487–492.
138. **Burger, K. N., R. A. Demel, S. L. Schmid, and B. de Kruijff.** 2000. Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry* **39**:12485–12493.
139. **Zoncu, R., R. M. Perera, R. Sebastian, F. Nakatsu, H. Chen, T. Balla, G. Ayala, D. Toomre, and P. V. De Camilli.** 2007. Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**:3793–3798.
140. **Janmey, P. A., W. Xian, and L. A. Flanagan.** 1999. Controlling cytoskeleton structure by phosphoinositide-protein interactions: phosphoinositide binding protein domains and effects of lipid packing. *Chem.Phys.Lipids* **101**:93–107.

141. **Nakagawa, H., H. Miki, M. Ito, K. Ohashi, T. Takenawa, and S. Miyamoto.** 2001. N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J.Cell Sci.* **114**:1555–1565.
142. **Hancock, J. F.** 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **7**:456–462.
143. **Lagerholm, B. C., G. E. Weinreb, K. Jacobson, and N. L. Thompson.** 2005. Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu.Rev.Phys.Chem.* **56**:309–336.
144. **Pike, L. J.** 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J.Lipid Res.* **44**:655–667.
145. **Rajendran, L. and K. Simons.** 2005. Lipid rafts and membrane dynamics. *J.Cell Sci.* **118**:1099–1102.
146. **Mayor, S., S. Sabharanjak, and F. R. Maxfield.** 1998. Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *EMBO J.* **17**:4626–4638.
147. **Pichler, H. and H. Riezman.** 2004. Where sterols are required for endocytosis. *Biochim.Biophys.Acta* **1666**:51–61.
148. **Ayscough, K. R.** 2000. Endocytosis and the development of cell polarity in yeast require a dynamic F-actin cytoskeleton. *Curr.Biol.* **10**:1587–1590.
149. **Fujimoto, L. M., R. Roth, J. E. Heuser, and S. L. Schmid.** 2000. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic.* **1**:161–171.
150. **Engqvist-Goldstein, A. E. and D. G. Drubin.** 2003. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **19**:287–332.
151. **Qualmann, B., M. M. Kessels, and R. B. Kelly.** 2000. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J.Cell Biol.* **150**:F111–F116.
152. **Merrifield, C. J., M. E. Feldman, L. Wan, and W. Almers.** 2002. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat.Cell Biol.* **4**:691–698.
153. **Pelkmans, L., D. Puntener, and A. Helenius.** 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**:535–539.
154. **Chadda, R., M. T. Howes, S. J. Plowman, J. F. Hancock, R. G. Parton, and S. Mayor.** 2007. Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic.* **8**:702–717.

155. **May, R. C. and L. M. Machesky.** 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J.Cell Sci.* **114**:1061–1077.
156. **Badizadegan, K., H. E. Wheeler, Y. Fujinaga, and W. I. Lencer.** 2004. Trafficking of cholera toxin–ganglioside GM1 complex into Golgi and induction of toxicity depend on actin cytoskeleton. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **287**:C1453–C1462.
157. **Bennett, E. M., C. Y. Chen, A. E. Engqvist–Goldstein, D. G. Drubin, and F. M. Brodsky.** 2001. Clathrin hub expression dissociates the actin–binding protein Hip1R from coated pits and disrupts their alignment with the actin cytoskeleton. *Traffic.* **2**:851–858.
158. **Dunaevsky, A. and E. A. Connor.** 2000. F–actin is concentrated in nonrelease domains at frog neuromuscular junctions. *J.Neurosci.* **20**:6007–6012.
159. **Shupliakov, O., O. Bloom, J. S. Gustafsson, O. Kjaerulff, P. Low, N. Tomilin, V. A. Pieribone, P. Greengard, and L. Brodin.** 2002. Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:14476–14481.
160. **Gaidarov, I., F. Santini, R. A. Warren, and J. H. Keen.** 1999. Spatial control of coated–pit dynamics in living cells. *Nat.Cell Biol.* **1**:1–7.
161. **Trifaro, J. M. and M. L. Vitale.** 1993. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* **16**:466–472.
162. **Gottlieb, T. A., I. E. Ivanov, M. Adesnik, and D. D. Sabatini.** 1993. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J.Cell Biol.* **120**:695–710.
163. **Shurety, W., N. L. Stewart, and J. L. Stow.** 1998. Fluid–phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly–promoting drug Jasplakinolide. *Mol.Biol.Cell* **9**:957–975.
164. **Lamaze, C., L. M. Fujimoto, H. L. Yin, and S. L. Schmid.** 1997. The actin cytoskeleton is required for receptor–mediated endocytosis in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **272**:20332–20335.
165. **Apodaca, G.** 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic.* **2**:149–159.
166. **Merrifield, C. J., S. E. Moss, C. Ballestrem, B. A. Imhof, G. Giese, I. Wunderlich, and W. Almers.** 1999. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat.Cell Biol.* **1**:72–74.
167. **Frischknecht, F., V. Moreau, S. Rottger, S. Gonfloni, I. Reckmann, G. Superti–Furga, and M. Way.** 1999. Actin–based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* **401**:926–929.

168. **Rozelle, A. L., L. M. Machesky, M. Yamamoto, M. H. Driessens, R. H. Insall, M. G. Roth, K. Luby-Phelps, G. Marriott, A. Hall, and H. L. Yin.** 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr.Biol.* **10**:311–320.
169. **Cossart, P.** 2000. Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell Microbiol.* **2**:195–205.
170. **Bourne, H. R.** 1995. GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **349**:283–289.
171. **Nobes, C. D. and A. Hall.** 1995. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem.Soc.Trans.* **23**:456–459.
172. **Kozma, R., S. Ahmed, A. Best, and L. Lim.** 1995. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol.Cell Biol.* **15**:1942–1952.
173. **Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey.** 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**:2295–2322.
174. **Bar-Sagi, D. and A. Hall.** 2000. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**:227–238.
175. **Martinez, O. and B. Goud.** 1998. Rab proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1404**:101–112.
176. **Novick, P. and M. Zerial.** 1997. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**:496–504.
177. **Schimmoller, F., I. Simon, and S. R. Pfeffer.** 1998. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J.Biol.Chem.* **273**:22161–22164.
178. **Bucci, C., R. G. Parton, I. H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack, and M. Zerial.** 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**:715–728.
179. **Gorvel, J. P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg.** 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**:915–925.
180. **van der, S. P., M. Hull, P. Webster, P. Male, B. Goud, and I. Mellman.** 1992. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**:729–740.
181. **Ren, M., G. Xu, J. Zeng, C. Lemos-Chiarandini, M. Adesnik, and D. D. Sabatini.** 1998. Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:6187–6192.

182. **Meresse, S., J. P. Gorvel, and P. Chavrier.** 1995. The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J.Cell Sci.* **108 (Pt 11)**:3349–3358.
183. **Donaldson, J. G. and A. Honda.** 2005. Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem.Soc.Trans.* **33**:639–642.
184. **Honda, A., M. Nogami, T. Yokozeki, M. Yamazaki, H. Nakamura, H. Watanabe, K. Kawamoto, K. Nakayama, A. J. Morris, M. A. Frohman, and Y. Kanaho.** 1999. Phosphatidylinositol 4–phosphate 5–kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**:521–532.
185. **Brown, F. D., A. L. Rozelle, H. L. Yin, T. Balla, and J. G. Donaldson.** 2001. Phosphatidylinositol 4,5–bisphosphate and Arf6–regulated membrane traffic. *J.Cell Biol.* **154**:1007–1017.
186. **Cockcroft, S., G. M. Thomas, A. Fensome, B. Geny, E. Cunningham, I. Gout, I. Hiles, N. F. Totty, O. Truong, and J. J. Hsuan.** 1994. Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* **263**:523–526.
187. **Santy, L. C. and J. E. Casanova.** 2002. GTPase signaling: bridging the GAP between ARF and Rho. *Curr.Biol.* **12**:R360–R362.
188. **Santy, L. C. and J. E. Casanova.** 2001. Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J.Cell Biol.* **154**:599–610.
189. **Peters, P. J., V. W. Hsu, C. E. Ooi, D. Finazzi, S. B. Teal, V. Oorschot, J. G. Donaldson, and R. D. Klausner.** 1995. Overexpression of wild–type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J.Cell Biol.* **128**:1003–1017.
190. **Roccamo, A. M., M. F. Pediconi, E. Aztiria, L. Zanello, A. Wolstenholme, and F. J. Barrantes.** 1999. Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Eur.J.Neurosci.* **11**:1615–1623.
191. **Sato, S. B., K. Ishii, A. Makino, K. Iwabuchi, A. Yamaji–Hasegawa, Y. Senoh, I. Nagaoka, H. Sakuraba, and T. Kobayashi.** 2004. Distribution and transport of cholesterol–rich membrane domains monitored by a membrane–impermeant fluorescent polyethylene glycol–derivatized cholesterol. *J.Biol.Chem.* **279**:23790–23796.
192. **Tzartos, S. J., D. Sophianos, K. Zimmerman, and A. Starzinski–Powitz.** 1986. Antigenic modulation of human myotube acetylcholine receptor by myasthenic sera. Serum titer determines receptor internalization rate. *J.Immunol.* **136**:3231–3238.

193. **Sabharanjak, S., P. Sharma, R. G. Parton, and S. Mayor.** 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Dev.Cell* **2**:411–423.
194. **Ehlers, M. D.** 2000. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**:511–525.
195. **Herring, D., R. Huang, M. Singh, L. C. Robinson, G. H. Dillon, and N. J. Leidenheimer.** 2003. Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor. *J.Biol.Chem.* **278**:24046–24052.
196. **Man, H. Y., W. Ju, G. Ahmadian, and Y. T. Wang.** 2000. Intracellular trafficking of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Mol.Life Sci.* **57**:1526–1534.
197. **Nong, Y., Y. Q. Huang, W. Ju, L. V. Kalia, G. Ahmadian, Y. T. Wang, and M. W. Salter.** 2003. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* **422**:302–307.
198. **Clementi, F. and E. Sher.** 1985. Antibody induced internalization of acetylcholine nicotinic receptor: kinetics, mechanism and selectivity. *Eur.J.Cell Biol.* **37**:220–228.
199. **Scott, D. B., I. Michailidis, Y. Mu, D. Logothetis, and M. D. Ehlers.** 2004. Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J.Neurosci.* **24**:7096–7109.
200. **Lin, J. W., W. Ju, K. Foster, S. H. Lee, G. Ahmadian, M. Wyszynski, Y. T. Wang, and M. Sheng.** 2000. Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat.Neurosci.* **3**:1282–1290.
201. **Drachman, D. B., C. W. Angus, R. N. Adams, J. D. Michelson, and G. J. Hoffman.** 1978. Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N.Engl.J.Med.* **298**:1116–1122.
202. **Kumari, S., V. Borroni, A. Chaudhry, B. Chanda, R. Massol, S. Mayor, and F. J. Barrantes.** 2008. Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. *J.Cell Biol.* **181**:1179–1193.
203. **Devreotes, P. N. and D. M. Fambrough.** 1976. Turnover of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **40**:237–251.
204. **Myers, J. N., I. Tabas, N. L. Jones, and F. R. Maxfield.** 1993. Beta-very low density lipoprotein is sequestered in surface-connected tubules in mouse peritoneal macrophages. *J.Cell Biol.* **123**:1389–1402.

205. **Zha, X., I. Tabas, P. L. Leopold, N. L. Jones, and F. R. Maxfield.** 1997. Evidence for prolonged cell–surface contact of acetyl–LDL before entry into macrophages. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **17**:1421–1431.
206. **Chaudhry, A., S. R. Das, A. Hussain, S. Mayor, A. George, V. Bal, S. Jameel, and S. Rath.** 2005. The Nef protein of HIV–1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J.Immunol.* **175**:4566–4574.
207. **Chaudhry, A., S. R. Das, S. Jameel, A. George, V. Bal, S. Mayor, and S. Rath.** 2007. A two–pronged mechanism for HIV–1 Nef–mediated endocytosis of immune costimulatory molecules CD80 and CD86. *Cell Host.Microbe* **1**:37–49.
208. **Trinidad, J. C. and J. B. Cohen.** 2004. Neuregulin inhibits acetylcholine receptor aggregation in myotubes. *J.Biol.Chem.* **279**:31622–31628.
209. **Borroni, V., C. J. Baier, T. Lang, I. Bonini, M. M. White, I. Garbus, and F. J. Barrantes.** 2007. Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron–sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane. *Mol.Membr.Biol.* **24**:1–15.
210. **Bogdanov, Y., G. Michels, C. Armstrong–Gold, P. G. Haydon, J. Lindstrom, M. Pangalos, and S. J. Moss.** 2006. Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *EMBO J.* **25**:4381–4389.
211. **Roche, K. W., S. Standley, J. McCallum, L. C. Dune, M. D. Ehlers, and R. J. Wenthold.** 2001. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat.Neurosci.* **4**:794–802.
212. **Pitha, J., T. Irie, P. B. Sklar, and J. S. Nye.** 1988. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* **43**:493–502.
213. **Davis, M. E. and M. E. Brewster.** 2004. Cyclodextrin–based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat.Rev.Drug Discov.* **3**:1023–1035.
214. **Uekama, K.** 2004. Design and evaluation of cyclodextrin–based drug formulation. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* **52**:900–915.
215. **Christian, A. E., M. P. Haynes, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat.** 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J.Lipid Res.* **38**:2264–2272.
216. **Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. A. Lampson, J. H. Keen, and T. E. McGraw.** 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin–coated pit budding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:6775–6780.
217. **Shvartsman, D. E., O. Gutman, A. Tietz, and Y. I. Henis.** 2006. Cyclodextrins but not compactin inhibit the lateral diffusion of membrane proteins independent of cholesterol. *Traffic.* **7**:917–926.

218. **de Kruijff, B. and R. A. Demel.** 1974. Polyene antibiotic–sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic–cholesterol complexes. *Biochim.Biophys.Acta* **339**:57–70.
219. **Kwik, J., S. Boyle, D. Fooksman, L. Margolis, M. P. Sheetz, and M. Edidin.** 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5–bisphosphate–dependent organization of cell actin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:13964–13969.
220. **Spector, I., N. R. Shochet, Y. Kashman, and A. Groweiss.** 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* **219**:493–495.
221. **Cooper, J. A.** 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J.Cell Biol.* **105**:1473–1478.
222. **Bubb, M. R., A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, K. L. Duncan, and E. D. Korn.** 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F–actin. *J.Biol.Chem.* **269**:14869–14871.
223. **Pike, L. J. and J. M. Miller.** 1998. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone–stimulated phosphatidylinositol turnover. *J.Biol.Chem.* **273**:22298–22304.
224. **Yamamoto, M., D. H. Hilgemann, S. Feng, H. Bito, H. Ishihara, Y. Shibasaki, and H. L. Yin.** 2001. Phosphatidylinositol 4,5–bisphosphate induces actin stress–fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *J.Cell Biol.* **152**:867–876.
225. **van Rheenen, J. and K. Jalink.** 2002. Agonist–induced PIP(2) hydrolysis inhibits cortical actin dynamics: regulation at a global but not at a micrometer scale. *Mol.Biol.Cell* **13**:3257–3267.
226. **Varnai, P. and T. Balla.** 2006. Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochim.Biophys.Acta* **1761**:957–967.
227. **Varnai, P. and T. Balla.** 2007. Visualization and manipulation of phosphoinositide dynamics in live cells using engineered protein domains. *Pflugers Arch.* **455**:69–82.
228. **Varnai, P. and T. Balla.** 2008. Live cell imaging of phosphoinositides with expressed inositide binding protein domains. *Methods* **46**:167–176.
229. **Porter, S. and S. C. Froehner.** 1985. Interaction of the 43K protein with components of Torpedo postsynaptic membranes. *Biochemistry* **24**:425–432.

230. **Banks, G. B., C. Fuhrer, M. E. Adams, and S. C. Froehner.** 2003. The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex. *J.Neurocytol.* **32**:709–726.
231. **Randazzo, P. A., Z. Nie, K. Miura, and V. W. Hsu.** 2000. Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci.STKE.* **2000**:RE1.
232. **D'Souza-Schorey, C., R. L. Boshans, M. McDonough, P. D. Stahl, and L. Van Aelst.** 1997. A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* **16**:5445–5454.
233. **Di Cesare, A., S. Paris, C. Albertinazzi, S. Dariozzi, J. Andersen, M. Mann, R. Longhi, and C. de, I.** 2000. p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat.Cell Biol.* **2**:521–530.
234. **Chen, C. Y., A. Y. Cheung, and H. M. Wu.** 2003. Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth. *Plant Cell* **15**:237–249.
235. **Koo, T. H., B. A. Eipper, and J. G. Donaldson.** 2007. Arf6 recruits the Rac GEF Kalirin to the plasma membrane facilitating Rac activation. *BMC.Cell Biol.* **8**:29.
236. **Grimmer, S., B. van Deurs, and K. Sandvig.** 2002. Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J.Cell Sci.* **115**:2953–2962.
237. **Siddhanta, A. and D. Shields.** 1998. Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J.Biol.Chem.* **273**:17995–17998.
238. **Huttner, W. B. and A. Schmidt.** 2000. Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission—insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr.Opin.Neurobiol.* **10**:543–551.
239. **Fong, T. M. and M. G. McNamee.** 1987. Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry* **26**:3871–3880.
240. **Zidovetzki, R. and I. Levitan.** 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim.Biophys.Acta* **1768**:1311–1324.
241. **Boshans, R. L., S. Szanto, L. Van Aelst, and C. D'Souza-Schorey.** 2000. ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol.Cell Biol.* **20**:3685–3694.

242. **Kummer, T. T., T. Misgeld, J. W. Lichtman, and J. R. Sanes.** 2004. Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus. *J.Cell Biol.* **164**:1077–1087.
243. **Baier, C. J. and F. J. Barrantes.** 2007. Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J.Neurochem.* **101**:1072–1084.
244. **Hiroyama, M. and J. H. Exton.** 2005. Localization and regulation of phospholipase D2 by ARF6. *J.Cell Biochem.* **95**:149–164.
245. **Diaz, O., S. Mebarek-Azzam, A. Benzaria, M. Dubois, M. Lagarde, G. Nemoz, and A. F. Prigent.** 2005. Disruption of lipid rafts stimulates phospholipase d activity in human lymphocytes: implication in the regulation of immune function. *J.Immunol.* **175**:8077–8086.