



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTOR EN BIOQUÍMICA

Título: “Efecto de las variaciones en los niveles de lípidos sobre el tráfico y propiedades del Receptor de Acetilcolina Nicotínico en células CHO”

Cristina Eugenia Gallegos

Bahía Blanca

Argentina

2008

---

## **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 (UNS), y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título ni en esta ni en otra Universidad. La misma contiene los resultados originales obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 12 de Noviembre de 2002 y el 30 de Abril de 2008, bajo la dirección del Dr. Francisco José Barrantes, Investigador Superior de CONICET, y Profesor titular de la Cátedra de Química Biológica I de la Universidad Nacional del Sur, y la co-dirección de la Dra. María Filomena Pediconi, Investigadora Adjunta de CONICET y Profesora Adjunta de la Cátedra de Química Biológica I y de Farmacología I de la Universidad Nacional del Sur.

30 de Abril de 2008

Cristina Eugenia Gallegos

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

---

---

## Agradecimientos

- A mis directores de Tesis, el Dr. Francisco J. Barrantes y la Dra. María F. Pediconi, por haberme permitido desarrollar las tareas de investigación presentadas en esta Tesis Doctoral y por su ayuda y dirección.
- Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB).
- A la Universidad Nacional del Sur (UNS).
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- A Javier, por su paciencia, contención y consejos, que tanta falta me hicieron durante todo este tiempo.
- A mi familia, sobretodo a mis papás, Perla y Alberto.
- A los Amigos, por los buenos momentos vividos a lo largo de todos estos años, y... por las risas!

---

---

## Resumen

La superfamilia de canales iónicos activados por ligandos (en inglés *ligand gated ion channels*, LGIC) incluye al receptor de acetilcolina nicotínico (AChR, neuronal y muscular), los receptores del ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA<sub>A</sub>R), el receptor de glicina (GlyR) y el subtipo 3 de los receptores de serotonina (5-HTR<sub>3</sub>). Dentro de esta superfamilia, el AChR es uno de los receptores mejor caracterizados y constituye el prototipo de los LGIC. El AChR muscular es un oligómero heteropentamérico compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y tres subunidades adicionales  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , en una estequiometría  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  en el AChR muscular fetal, mientras que en el adulto la subunidad  $\gamma$  es reemplazada por la subunidad  $\epsilon$ . Este receptor se encuentra en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular. La unión de su agonista natural, la acetilcolina (ACh) causa la activación del AChR, provocando un cambio conformacional en la proteína, con rápida apertura del canal y la entrada de iones sodio al interior celular. Debido a que el AChR es una proteína integral de membrana plasmática, sus dominios hidrofóbicos transmembrana se hallan en contacto con los lípidos presentes en la bicapa. Estos lípidos interactúan con diversos dominios del receptor modulando su funcionalidad.

En esta Tesis estudiamos los efectos promovidos por alteraciones en los niveles de lípidos celulares tales como el colesterol, la esfingomielina o ceramidas, sobre la síntesis y el tráfico del AChR, así como también sobre su afinidad por ligandos y estabilidad en la membrana plasmática. Todos estos parámetros fueron evaluados utilizando como modelo experimental a las células CHO-K1/A5, una línea celular desarrollada en nuestro laboratorio que expresa en forma heteróloga estable el AChR de tipo muscular adulto ( $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ ).

En primer lugar, evaluamos los efectos de la depleción metabólica crónica del colesterol por la droga Mevinolina, potente inhibidor de la enzima microsomal 3-

hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, enzima limitante en la biosíntesis de colesterol. Se logró determinar que cuando los niveles de colesterol celular son disminuidos por acción de esta droga, el número de AChRs presentes en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 sufre una drástica disminución (46%), con un aumento concomitante en el número de receptores intracelulares. Dichas variaciones se produjeron por inhibición del tráfico exocítico de la proteína con la consecuente retención del AChR a nivel del TGN. De igual modo, observamos que en condiciones controles el AChR se localiza parcialmente en membranas resistentes a detergentes (DRMs o balsas lipídicas) de retículo endoplasmático y Golgi, y que la depleción del colesterol afecta esta distribución, disminuyendo la proporción de AChRs presentes en dichos dominios de membrana. En conjunto, estos resultados nos permitieron concluir que el colesterol modula el transporte de nuevos AChRs hacia la superficie celular, a través de la asociación de dichos receptores con plataformas lipídicas enriquecidas en colesterol.

En segundo lugar, estudiamos los efectos ejercidos por las ceramidas, precursoras en la síntesis de esfingolípidos, sobre diferentes propiedades del AChR. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de ceramidas de corta o larga cadena, o bien se expusieron a la incubación con esfingomielinasa para evaluar los efectos promovidos por la generación de ceramidas endógenas. Se logró demostrar la efectividad de las ceramidas en modular no sólo el tráfico del AChR sino también su afinidad por ligandos. En cuanto al tráfico del receptor, se demostró que las ceramidas ejercen una modulación dual de este proceso, aumentando o disminuyendo el número de AChRs en la superficie celular, dependiendo de la concentración de lípido utilizada. Con respecto a la afinidad del AChR por el ligando  $\alpha$ BTX, se observó un aumento de la misma cuando las células son incubadas a altas concentraciones (25 ó 37.5  $\mu$ M) de ceramidas, mientras que a bajas concentraciones del lípido (5  $\mu$ M) no se produjeron tales cambios. Finalmente, se determinó que la generación de ceramidas endógenas

por tratamiento con esfingomielinasa también fue efectiva en promover la disminución de los niveles de AChR en la membrana celular, a través del aumento en la tasa de endocitosis del receptor.

---

---

## Abstract

The ligand-gated ion channel superfamily (LGIC) comprises the nicotinic acetylcholine receptor (AChR, neuronal and muscle-types), the  $\gamma$ -amino butyric acid receptor (GABA<sub>A</sub>R), the glycine receptor (GlyR) and the serotonin receptor subtype 3 (5-HTR<sub>3</sub>). Within this superfamily, the AChR is the best characterized and is considered as the prototype LGIC. The muscle AChR is a heteropentamer composed of two  $\alpha$  subunits and three additional subunits ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) in the stoichiometry  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  (in the foetal AChR) whereas in the adult receptor form the  $\gamma$  subunit is replaced with the  $\epsilon$ . This receptor is present at the postsynaptic membrane of the neuromuscular junction. The binding of its natural agonist, acetylcholine (ACh), leads to the activation of the AChR, causing a conformational change in the protein, with the rapid aperture of the channel and the entry of sodium ions inside the cell. On account of the fact that the AChR is an integral membrane protein, its hydrophobic transmembrane domains are in close contact with the bilayer lipids. These lipids interact with various domains of the receptor, thereby modulating its functionality.

In the present Thesis we study the effects exerted either by alterations of cellular lipids such as cholesterol, sphingomyelin, or ceramides, on the synthesis and trafficking of the AChR, as well as on its affinity for ligands and stability in the plasma membrane. All these parameters were evaluated using, as experimental model, CHO-K1/A5 cells, a cell line developed in our laboratory that heterologously express the adult form of the AChR ( $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ ).

Firstly, we evaluated the effects of chronic metabolic cholesterol depletion elicited by the drug Mevinolin, a potent inhibitor of the microsomal enzyme, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, the limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. We determined that when cellular cholesterol levels decrease, the number of AChRs present at the plasma membrane of CHO-K1/A5 cells undergo a

drastic diminution (46%), with the concomitant increase in the number of intracellular receptors. These variations are due to an inhibition of the exocytic traffic of the protein with the consequent retention of the AChR at the level of the TGN. In addition, we observed that under control conditions the AChR is partially localized in detergent-resistant membranes (DRMs) obtained from the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and that cholesterol depletion affects such distribution, decreasing the proportion of AChRs present in those membrane domains. Altogether, these results lead us to conclude that cholesterol modulates the transport of newly synthesized AChRs to the cell surface by association of these receptors with lipid platforms enriched in cholesterol.

Secondly, we studied the effects exerted by ceramides, precursors in the synthesis of sphingolipids, on different properties of the AChR. To this end, the cells were either incubated with different concentrations of short-chain or long-chain ceramides or exposed to incubation with sphingomyelinase in order to evaluate the effects exerted by the generation of endogenous ceramides. We demonstrate the effectiveness of ceramide treatment in modulating not only AChR trafficking but also receptor affinity for ligands. With respect to receptor trafficking, we demonstrate that ceramides modulate this process in a dual manner, either augmenting or decreasing the number of AChRs present at the cell surface depending on the lipid concentration. In addition, we observed that the affinity of the AChR for the ligand  $\alpha$ BTX increased when cells were incubated with high ceramide concentrations (25 or 37.5  $\mu$ M). In contrast, low ceramide concentrations (5  $\mu$ M) exerted no such changes. Finally, we determined that the generation of endogenous ceramides by treatment of cells with sphingomyelinase also effectively decreased AChR levels at the cell membrane by enhancing receptor endocytosis.

---

---

# ***Índice***

---

---

---

---

**Índice de Capítulos**

<b>Capítulo 1 - Introducción General</b> .....	2
Clasificación de los AChRs.....	4
Patologías asociadas al AChR.....	9
El AChR y su entorno lipídico.....	11
Influencia de los lípidos sobre el AChR en sistemas celulares.....	14
Objetivo de la Tesis Doctoral.....	16
<b>Capítulo 2 - Efecto de la depleción metabólica crónica del colesterol sobre el tráfico del AChR en células CHO-K1/A5</b> .....	17
Introducción.....	17
Materiales y métodos.....	24
Materiales.....	24
Cultivo celular.....	25
Análisis Lipídico.....	26
a) Extracción de lípidos.....	26
b) Determinación del contenido lipídico de las muestras.....	26
Ensayos de unión de [ <sup>125</sup> I] αBTX.....	27
Curvas de desplazamiento de [ <sup>125</sup> I] αBTX.....	28
Análisis de los datos farmacológicos.....	28
Determinación de proteínas.....	28
Microscopía de Fluorescencia.....	29
a) Obtención de imágenes.....	29
b) Marcación del AChR de superficie.....	29
c) Marcación del AChR intracelular.....	29

d) Análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía de fluorescencia.....	30
e) Procesamiento de las imágenes.....	30
Transfección transiente.....	31
Retención del AChR en el aparato de Golgi inducida por temperatura.....	31
Tratamiento con Brefeldina A.....	31
Fraccionamiento subcelular.....	32
Ensayo de fraccionamiento A.....	32
Ensayo de fraccionamiento B.....	33
Geles de poliacrilamida.....	36
Transferencia a membranas de Inmobilon.....	36
Tinción con Rojo Ponceau.....	36
Marcaje con anticuerpos y Western Blot.....	37
Ensayos de solubilización del AChR en Tritón X-100 en frío.....	37
Resultados.....	39
1. Evaluación del contenido de colesterol y fosfolípidos luego del tratamiento con Mev.....	39
2. Ensayos de unión de [ <sup>125</sup> I] αBTX.....	40
2.1. Evaluación del número de AChRs de superficie y de su afinidad por el ligando específico αBTX.....	40
2.2. Estudios de la distribución del AChR.....	42
3. Evaluación de la distribución del AChR por microscopía de fluorescencia.....	43
3.1. Distribución del AChR de superficie.....	43
3.2. Determinación del AChR intracelular.....	45
3.2.1. Marcado del AChR con Alexa <sup>594</sup> αBTX.....	45
3.2.2. Arresto del AChR en el aparato de Golgi.....	45

---

---

3.2.3. Colocalización del AChR con el marcador de <i>trans</i> -Golgi/TGN, pEYFP-GalT.....	46
3.2.4. Incubación con BFA.....	47
3.2.5. Colocalización del AChR con el marcador de TGN, syntaxina 6.....	49
4. Expresión en superficie de la proteína VSVG-GFP.....	50
5. Reversibilidad del efecto de Mev.....	51
6. Estudios de la solubilidad en Tritón X-100 del AChR presente en membranas enriquecidas en Golgi y RE.....	53
Discusión.....	57

### **Capítulo 3 - Efecto de ceramidas de corta (C<sub>6</sub>-ceramidas) y larga (ceramidas cerebrales) cadena sobre el tráfico y propiedades del AChR en células CHO-K1/A5.....**

Introducción.....	65
Materiales y métodos.....	73
Materiales.....	73
Cultivo celular.....	73
Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.....	74
Cromatografía en capa fina utilizando lípidos fluorescentes.....	75
Transfección transiente.....	75
Microscopía de fluorescencia.....	76
a) Obtención de imágenes.....	76
b) Marcación del AChR de superficie e intracelular.....	76
c) Marcado de la SM de la membrana plasmática con lisenina.....	76
d) Generación de C <sub>5</sub> -BODIPY-Cer a partir de C <sub>5</sub> -BODIPY-SM.....	76
Obtención de láminas de membrana plasmática y tratamiento con SMasa.....	77
Estudios de internalización del AChR.....	77

---

Evaluación del número de AChR desensamblados.....	78
Resultados.....	79
1. Incubación de células CHO-K1/A5 con bajas concentraciones de Cer.....	79
1.1. Distribución del AChR evaluada por microscopía de fluorescencia.....	79
1.2. Evaluación de la afinidad del AChR por $\alpha$ BTX.....	82
1.3. Expresión en superficie de la proteína VSVG-GFP.....	82
1.4. Esfingolípidos generados por incubación con bajas concentraciones de Cer.....	83
1.5. Incubación con SM exógena.....	85
1.6. Estudio del número de receptores desensamblados.....	85
2. Incubación de células CHO-K1/A5 con altas concentraciones de Cer.....	86
2.1. Incubación con Cer de corta cadena.....	86
2.1.1. Distribución del AChR determinado por ensayos de unión con [ <sup>125</sup> I] $\alpha$ BTX.....	86
2.1.2. Actividad de la enzima LDH en el medio de cultivo.....	87
2.1.3. Detección del AChR de membrana plasmática por microscopía de fluorescencia.....	88
2.1.4. Expresión en superficie de la proteína VSVG-GFP.....	89
2.1.5. Estudios de la afinidad del AChR por el ligando $\alpha$ BTX.....	90
2.1.6. Localización del AChR intracelular evaluado por microscopía de fluorescencia.....	92
2.2. Incubación con Cer de larga cadena.....	94
2.2.1. Distribución del AChR evaluado por ensayos de unión de [ <sup>125</sup> I] $\alpha$ BTX.....	94
2.2.2. Distribución del AChR evaluado por microscopía de fluorescencia.....	95
2.3. Efecto de la incubación con esfingosina.....	96

3. Generación de Cer endógenas por tratamiento con SMasa.....	97
3.1. Distribución del AChR evaluado por unión de ligando radioactivo y por microscopía de fluorescencia.....	97
3.2. Evaluación de la participación de PP2A en la disminución del AChR de superficie por tratamiento con SMasa.....	98
3.3. Evaluación de la acción de la enzima SMasa.....	99
3.3.1. Medición de la SM de membrana.....	99
3.3.2. Generación de C <sub>5</sub> -BODIPY-Cer a partir de C <sub>5</sub> -BODIPY-SM por tratamiento de las células con SMasa.....	100
3.4. Acción de SMasa sobre láminas de membrana plasmática aislada.....	101
3.5. Estudios de internalización del AChR.....	103
3.5.1. Evaluación de la distribución del AChR por microscopía de fluorescencia.....	103
3.5.2. Determinación de la cinética de internalización del AChR.....	104
3.6. Incubación con nistatina.....	105
Discusión.....	107
<b>Conclusiones.....</b>	<b>116</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>118</b>

### **Índice de Figuras**

Figura 1. Mecanismo de activación de los LGIC.....	3
Figura 2. Estructura de la UNM.....	6
Figura 3. El AChR nicotínico muscular.....	7
Figura 4. Representación de cintas del AChR.....	8
Figura 5. Representación esquemática de la activación del AChR en la UNM.....	9
Figura 6. El AChR en la membrana postsináptica.....	12

---

Figura 7. Transporte vesicular y no vesicular de colesterol.....	20
Figura 8.....	22
Figura 9.....	24
Figura 10. Ensayos de unión de [ <sup>125</sup> I] αBTX.....	41
Figura 11. Curvas de desplazamiento de [ <sup>125</sup> I] αBTX.....	42
Figura 12. Distribución del AChR en las células CHO-K1/A5.....	42
Figura 13. Distribución del AChR de superficie marcado con Alexa <sup>488</sup> αBTX.....	44
Figura 14. Distribución del AChR intracelular marcado con Alexa <sup>594</sup> αBTX.....	45
Figura 15. Acumulación artificial del AChR intracelular en el aparato de Golgi.....	46
Figura 16. Ensayo de colocalización del AChR con pEYFP-GalT.....	47
Figura 17. Marcaje del aparato de Golgi con C <sub>5</sub> -BODIPY-Cer y tratamiento con BFA.....	48
Figura 18. Tratamiento con BFA de las células depletadas de colesterol por Mev.....	49
Figura 19. Ensayo de colocalización del AChR con el marcador de TGN sintaxina 6.....	50
Figura 20. Transfección transiente con la proteína de fusión VSVG-GFP.....	51
Figura 21. Ensayos de recuperación.....	52
Figura 22. Ensayo de fraccionamiento subcelular A.....	54
Figura 23. Ensayo de solubilidad en Tritón-X100 a 4°C del AChR proveniente de fracciones enriquecidas en RE y Golgi, obtenidas mediante el ensayo de fraccionamiento A.....	54
Figura 24. Ensayo de fraccionamiento subcelular B.....	55
Figura 25. Ensayo de solubilidad en Tritón-X100 a 4°C del AChR presente en membranas enriquecidas en RE y Golgi, obtenidas por el ensayo de fraccionamiento B.....	56

---

Figura 26. Modelos propuestos para el direccionamiento de lípidos y proteínas en el aparato de Golgi.....	63
Figura 27. Estructuras químicas correspondientes a esfingosina, ceramida y esfingomielina.....	66
Figura 28. Vía no vesicular de tráfico de Cer desde el RE al Golgi.....	67
Figura 29.....	70
Figura 30. Microscopía de fluorescencia del AChR de superficie en células CHO-K1/A5 tratadas con bajas concentraciones de Cer.....	80
Figura 31. Distribución del AChR intracelular en células tratadas con 5 $\mu$ M C <sub>6</sub> -Cer.....	81
Figura 32. Determinación de la afinidad del AChR por $\alpha$ BTX en células controles y tratadas con bajas concentraciones de C <sub>6</sub> -Cer.....	82
Figura 33. Incubación de células CHO-K1/A5 transfectadas con la proteína VSVG-GFP con 5 $\mu$ M C <sub>6</sub> -Cer.....	83
Figura 34. Generación de SLs complejos a partir de C <sub>6</sub> -NBD-Cer.....	84
Figura 35. Incubación con SM exógena.....	85
Figura 36. Evaluación del número de receptores desensamblados.....	86
Figura 37. Distribución del AChR en células CHO-K1/A5 tratadas con altas concentraciones de Cer.....	87
Figura 38. Medición de los niveles de la enzima LDH en el medio de cultivo.....	88
Figura 39. Microscopía de fluorescencia del AChR de superficie en células CHO-K1/A5 tratadas con altas concentraciones de Cer.....	89
Figura 40. Tratamiento con 37.5 $\mu$ M C <sub>6</sub> -Cer de células CHO-K1/A5 transfectadas en forma transiente con la proteína VSVG-GFP.....	90
Figura 41. Caracterización farmacológica del AChR presente en células CHO-K1/A5 controles y tratadas con altas concentraciones de C <sub>6</sub> -Cer.....	91

---

Figura 42. Distribución del AChR intracelular en las células tratadas con 37.5 $\mu$ M C <sub>6</sub> -Cer.....	93
Figura 43. Distribución del AChR en células CHO-K1/A5 tratadas con Cer-cereb.....	95
Figura 44. Evaluación de los AChRs de superficie luego del tratamiento con SMasa.....	97
Figura 45. Incubación con ácido okadaico.....	98
Figura 46. Marcado de la SM de la membrana celular con la sonda lisenina.....	99
Figura 47. Generación de C5-BODIPY-Cer a partir de C5-BODIPY-SM por acción de SMasa.....	100
Figura 48. Tratamiento con SMasa de láminas de membrana plasmática.....	102
Figura 49. Ensayos de internalización del AChR en células tratadas con SMasa.....	104
Figura 50. Cinética de internalización del AChR en células tratadas con SMasa.....	105
Figura 51. Tratamiento con el antibiótico nistatina.....	106
Figura 52. Formación de dominios de Cer e invaginación en la membrana inducida por la acción hidrolítica de SMasa sobre un liposoma de PC/SM.....	112

### **Índice de Esquemas**

Esquema 1. Biosíntesis del colesterol.....	18
Esquema 2. Ensayo de fraccionamiento A .....	34
Esquema 3. Ensayo de fraccionamiento B.....	35
Esquema 4. Solubilización del AChR con 1% de Tritón X-100 a 4°C.....	38
Esquema 5. Síntesis de Esfingolípidos.....	68

**Índice de Tablas**

Tabla 1. Contenido de colesterol y ésteres de colesterol en células CHO-K1/A5  
crecidas bajo diferentes condiciones experimentales.....39

Tabla 2. Contenido de fosfolípidos en células CHO-K1/A5 crecidas bajo diferentes  
condiciones experimentales.....40

Tabla 3. Unión de [<sup>125</sup>I] αBTX en células CHO-K1/A5 crecidas bajo diferentes  
condiciones de cultivo.....43

Tabla 4. Efectos de la incubación con 37.5 μM de Cer-cereb sobre el AChR de  
superficie, intracelular y total detectado en células CHO-K1/A5.....94

Tabla 5. Efectos del tratamiento con 37.5 μM de Sph durante 5 h sobre la cantidad de  
AChR de superficie e intracelular expresado en células CHO-K1/A5.....96

---

---

# ***Capítulo 1***

## ***Introducción General***

---

---

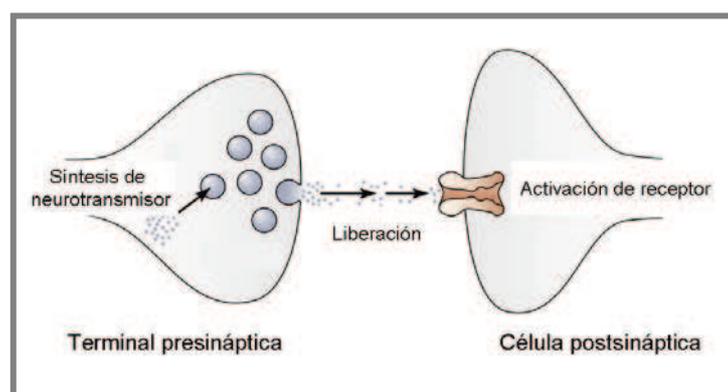
## Introducción general

El sistema nervioso tiene tres funciones básicas: sensitiva, integradora y motora. La integración de la información sensitiva, la generación de pensamientos y emociones, y la formación y almacenamiento de la memoria tienen lugar en el sistema nervioso central (SNC). Allí se originan además la mayoría de los impulsos nerviosos que estimulan la contracción muscular y las secreciones glandulares. El SNC está compuesto por el encéfalo y la médula espinal. La otra división anatómica del sistema nervioso es el sistema nervioso periférico (SNP), formado por nervios y neuronas que residen o se extienden fuera del SNC hacia los miembros y órganos.

Tanto en el SNC como en el SNP, la comunicación entre las células excitables (neuronas y fibras musculares) se lleva a cabo en regiones especializadas denominadas sinapsis, y es mediada por la liberación de sustancias químicas llamadas neurotransmisores. Los receptores de neurotransmisores constituyen un componente fundamental de la sinapsis, actuando como transductores de la señal química. La superfamilia de canales iónicos activados por ligandos (en inglés *ligand gated ion channels*, LGIC) comprende varias familias de receptores de neurotransmisores, relacionados evolutiva y estructuralmente (Numa, 1989; Cockcroft y col., 1992; Ortells y Lunt, 1995; ver revisión en Popot y Changeux, 1984). Dentro de ella, el receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) es uno de los que ha sido mejor caracterizado, y constituye el prototipo de LGIC (Unwin, 1993). Además del AChR, esta superfamilia está compuesta por los receptores del ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R) (Stephenson, 1995), el receptor de glicina (GlyR) (Betz, 1990), el subtipo 3 de los receptores de serotonina (5-HTR<sub>3</sub>) (Peters y col., 1992) y los receptores de histidina y glutamato de invertebrados. En cuanto a su selectividad iónica, el AChR y el 5-HTR<sub>3</sub> son canales selectivos para cationes, mientras que el receptor de GABA y el GlyR son selectivos para aniones.

Los miembros de esta familia tienen un alto grado de homología en su secuencia aminoacídica (ver revisiones en Barrantes, 1998; Corringier y col., 2000) y se los conoce también como receptores de lazo de cistina (“*cys-loop*” en inglés), debido a que en el dominio N-terminal de cada subunidad contienen un par de cisteínas unidas por puente disulfuro, separadas por 13 aminoácidos (Cockcroft y col., 1990; ver revisión Karlin, 2002). Todos ellos constituyen proteínas oligoméricas con subunidades homólogas situadas en la membrana plasmática. Estas subunidades poseen un gran dominio N-terminal extracelular, cuatro segmentos transmembrana, y un corto segmento C-terminal, también extracelular (ver revisión Barrantes, 1998; Galzi y Changeux, 1995).

El mecanismo básico de transducción de señales es común a todos los miembros de la familia de LGIC, y consiste en la unión del neurotransmisor seguido de cambios conformacionales en la proteína receptora llevando a la apertura transiente del canal iónico con los consecuentes cambios en la permeabilidad a cationes de la membrana post-sináptica (Barrantes, 2004).



**Figura 1.** Mecanismo de activación de los LGIC. Diagrama obtenido del libro “From Neuron to Brain”, Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG y Fuchs PA. *Sinauer Associates, Inc. Publishers* (2001) Cuarta Edición.

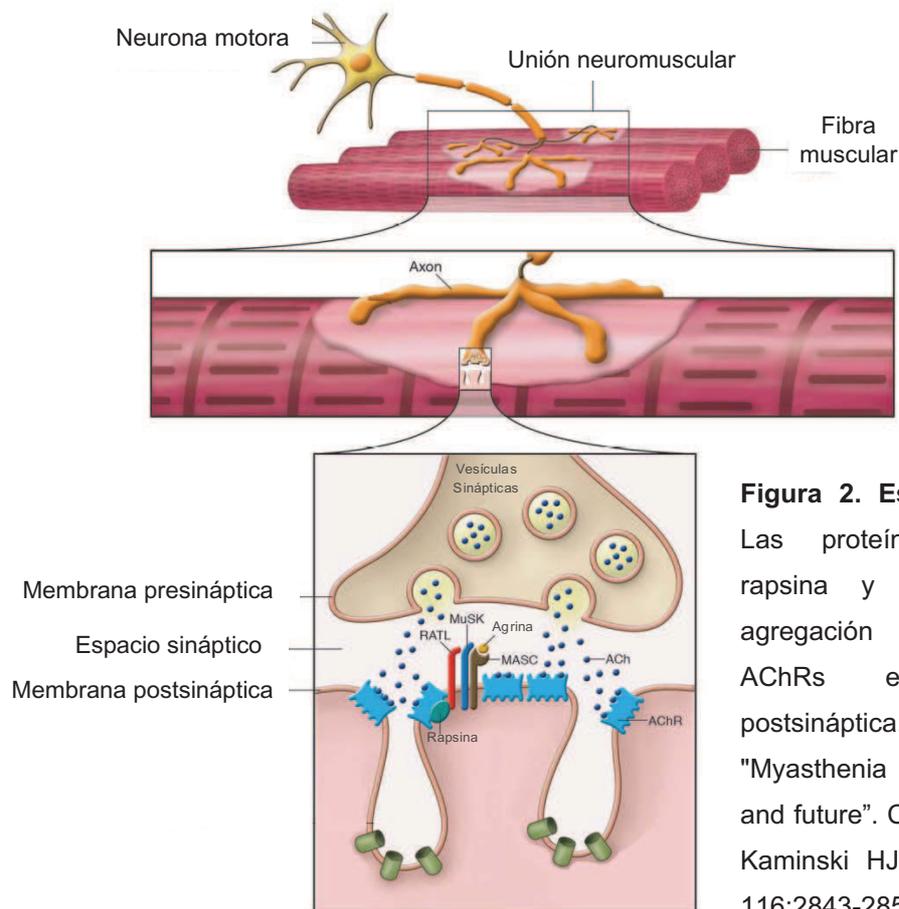
## Clasificación de los AChRs

Se puede subdividir a los AChR en dos grandes grupos: los AChR neuronales y los AChR musculares. Los AChR neuronales se encuentran en el SNC y ganglios periféricos, más precisamente en las membranas pre- y post-sinápticas de las células nerviosas. Estos receptores forman estructuras oligoméricas (Anand y col., 1991; Cooper y col., 1991; Rangwala y col., 1997) y son altamente permeables a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Desde el punto de vista funcional existen diferentes tipos de AChR neuronales, los que se generan por combinación de distintos productos génicos. Su gran diversidad estructural sugiere su participación en una gran variedad de funciones neuronales, lo cual se verifica experimentalmente (ver revisión en Barrantes y col., 2000c; Whiting y col., 1991). A su vez, se puede subdividir a los AChRs neurales en dos subgrupos: el primero incluye a los AChR compuestos por subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  en combinación con una o más de las subunidades estructurales  $\beta 2$  y  $\beta 4$ ; este tipo de receptores es insensible al antagonista competitivo  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ BTX). El segundo subgrupo está integrado por los AChR compuestos por subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  o  $\alpha 9$ , los cuales pueden ensamblarse formando pentámeros homoméricos sensibles a  $\alpha$ BTX. De ellos, los AChR de tipo  $\alpha 7$  son la forma predominante en mamíferos (ver revisión Lindstrom, 2003). Aunque algunos subtipos de AChR neuronales, como los receptores  $\alpha 3\beta 4$  de los ganglios autónomos, tienen un papel post-sináptico en la neurotransmisión (Xu y col., 1999), se cree que la mayoría de los AChRs cerebrales actúan pre-sinápticamente, modulando la liberación de diferentes neurotransmisores (Jones y col., 2001). En este sentido, tanto el receptor  $\alpha 4\beta 2$  como el  $\alpha 3\beta 2$  actuarían modulando la liberación de ácido  $\gamma$  amino butírico del hipocampo (Alkondon y col., 1999), mientras que el AChR  $\alpha 4\beta 2$ , como así también el  $\alpha 6\beta 2\beta 3$ , modularían la liberación de dopamina en el corpus striatum y sustancia nigra (Kulak y col., 2002).

En cambio, el AChR de tipo muscular se encuentra en la membrana post-sináptica de la unión neuromuscular (UNM) formando grandes agrupamientos con elevada densidad de receptores (Sanes y Lichtman, 1999). La diferenciación de la UNM es un proceso secuencial que requiere de la interacción coordinada entre las terminales nerviosas y la fibra muscular (Sanes y Lichtman, 2001).

En las miofibrillas en desarrollo, los AChRs se agrupan en las regiones centrales de la fibra muscular, y este “pre-patrón” es utilizado como guía por las neuronas motoras para la formación de los contactos sinápticos. La liberación de ACh por la terminal nerviosa motora causa la producción de potenciales post-sinápticos por los AChRs lo que regularía la localización y estabilización de los receptores en estos sitios de contacto nervio-músculo (ver revisión en Witzemann, 2006). La ACh causa también la dispersión de los AChRs no sinápticos (Chen y col., 2007; ver revisiones en Madhavan y Peng, 2005 y Witzemann, 2006). La agrupación de AChRs es estimulada además por una glicoproteína extracelular denominada agrina (McMahan, 1990), la cual es liberada por el nervio al espacio sináptico. El músculo también expresa agrina, pero la isoforma neural es 1000 veces más potente que la isoforma muscular en inducir los agregados de AChR (Gesemann y col., 1995). La actividad de agrina en la agrupación de AChRs está mediada por el receptor de tirosina quinasa específico de músculo (MuSK) (Glass y col., 1996) y por rapsina, una proteína citoplasmática periférica de membrana de 43 kDa que se encuentra en íntima asociación con el AChR (Bloch y Froehner, 1987; Gautam y col., 1995) y favorece el anclaje del receptor con el citoesqueleto (Maimone y Merlie, 1993). Una vez activado, MuSK desencadena la activación de una serie de moléculas efectoras que reorganizan el citoesqueleto de actina (ver revisión en Strohlic y col., 2005). La interacción de los AChRs con el citoesqueleto de actina favorece la agregación y restringe la difusión de los receptores en la membrana (Hoch y col., 1994; Dai y col., 2000). Sin embargo, otros mecanismos podrían también llevar a la agregación de AChRs en la UNM, como por ejemplo su

asociación con dominios lipídicos específicos (Zhu y col., 2006; Stetzkowski-Marden y col., 2006)

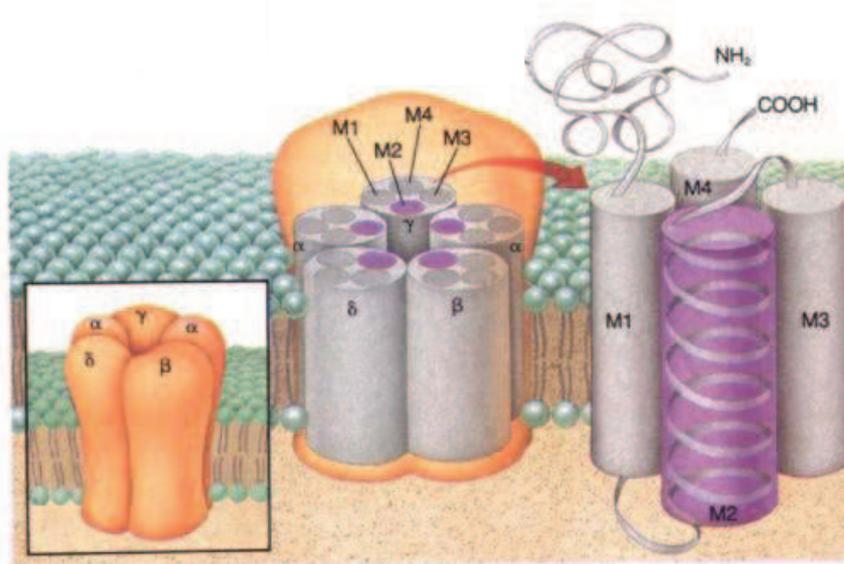


**Figura 2. Estructura de la UNM.**

Las proteínas agrina (neural), rapsina y MuSK favorecen la agregación y estabilización de AChRs en la membrana postsináptica. Diagrama obtenido de "Myasthenia gravis: past, present, and future". Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. *J Clin Invest* (2006) 116:2843-2854.

El AChR muscular es una glicoproteína de 290 kDa (ver revisión en Unwin, 2005) compuesta por cinco subunidades: dos subunidades  $\alpha$  y tres subunidades adicionales ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma/\epsilon$ ), con una estequiometría  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  en el AChR muscular fetal, y  $\alpha_2\beta\epsilon\delta$  en el AChR de tipo muscular adulto (Conti-Tronconi y Raftery, 1982; Gotti y col., 1982; Barrantes, 1983; Galzi y Changeux, 1995; Hucho y col., 1996). Dichas subunidades atraviesan la bicapa lipídica delimitando un poro central, el canal iónico. El AChR tiene un largo aproximado de 160 Å y puede dividirse en tres dominios principales: un gran

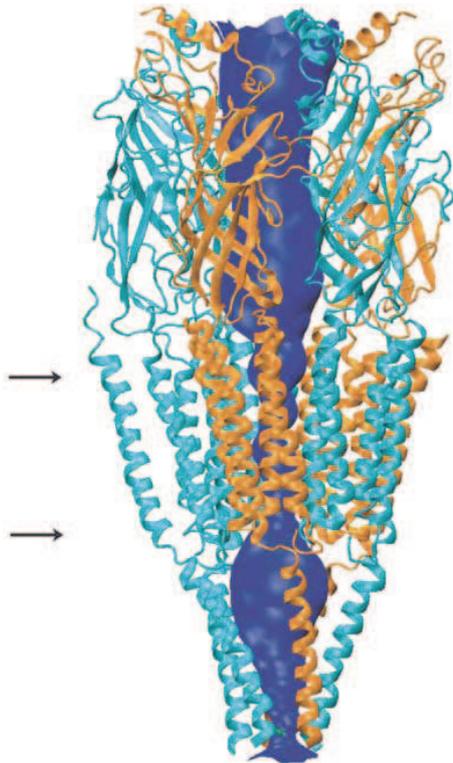
dominio extracelular donde se encuentra el sitio de unión de ligandos, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular más pequeño (ver revisión en Unwin, 2005).



**Figura 3. El AChR nicotínico muscular.** Se muestra la disposición de las cinco subunidades que lo conforman y la ubicación de los cuatro segmentos transmembrana correspondientes a cada subunidad. Obtenido de "Chemical signaling in the brain". Changeux JP. *Sci Am* (1993) 269:58-62.

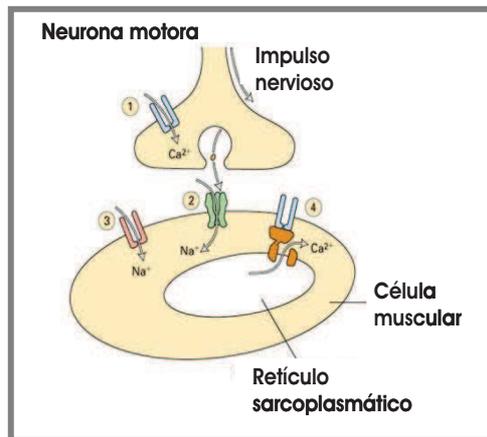
El segmento extracelular de cada subunidad está constituido a su vez, por un arreglo de diez hojas  $\beta$  plegadas y una  $\alpha$ -hélice. Esta porción contiene además la región "cys-loop" (característica de la familia de los LGIC) y otras varias regiones de tipo "lazo", críticas para la funcionalidad del receptor. La porción transmembrana está compuesta por cuatro segmentos  $\alpha$ -hélice hidrofóbicos ( $M1, M2, M3$  y  $M4$ ), de unos 20-30 aminoácidos de largo cada uno. Los segmentos  $M2$  contribuyen a la formación del canal iónico, mientras que el segmento  $M4$  es el segmento en mayor contacto con los lípidos de la bicapa (ver revisión en Barrantes, 2004). Finalmente, la porción intracelular está compuesta por una secuencia de unos 150-280 aminoácidos, ubicada entre los segmentos  $M3$  y  $M4$  (Karlin, 2002; Lindstrom, 2000a), e incluye una  $\alpha$ -hélice precediendo al segmento  $M4$  (Finer-Moore y Stroud, 1984). A través de este dominio

el AChR muscular se une a rapsina (Miyazawa y col., 1999). Las  $\alpha$ -hélices citosólicas de cada subunidad contribuyen a la formación de las paredes del vestíbulo intracelular del AChR (Miyazawa y col., 1999).



**Figura 4. Representación de cintas del AChR.** Se muestran las subunidades  $\alpha$  en color naranja, y las subunidades no- $\alpha$  en celeste. En azul se indica la superficie correspondiente al poro del canal en sus porciones extracelular, transmembrana e intracelular. Las flechas señalan la ubicación de la membrana plasmática. Obtenido de “Recent advances in Cys-loop receptor structure and function”. Sine SM y Engel AG. *Nature* (2006) 440:448-455.

Por aposición de los dominios extracelulares amino-terminales de la subunidad  $\alpha$  con las subunidades vecinas no- $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , se forman los dos sitios para unión de agonistas (Karlin, 2002; ver revisión Barrantes, 1998). La activación por su ligando específico, la acetilcolina (ACh), produce la apertura transiente del canal, con flujo de iones  $\text{Na}^+$  hacia el interior celular, lo cual provoca a su vez un cambio en el potencial de membrana de la célula postsináptica. En este proceso, la señal química de la ACh es traducida a una señal eléctrica, obteniéndose como resultado final la contracción de la fibra muscular esquelética.



**Figura 5.** Representación esquemática de la activación del AChR en la UNM.

El AChR de mamífero es altamente homólogo con el receptor presente en el órgano eléctrico de las rayas del género *Torpedo*. Debido a que este último puede ser obtenido fácilmente y en grandes cantidades, ha constituido una importante fuente de AChR (Gu y Hall, 1988) y por este motivo el AChR de *Torpedo* fue el primer miembro de la familia en ser purificado, caracterizado, y clonado. Mucho de lo que se asume acerca de la estructura de los otros miembros de la familia LGIC se ha basado en los datos estructurales del AChR obtenido a partir de esta fuente.

### Patologías asociadas al AChR

Tanto el AChR muscular como los AChRs neuronales pueden estar involucrados en patologías de etiología diversa. Dentro de ellas, una enfermedad que ha sido foco de numerosos estudios es la *miastenia gravis* (MG). La MG es la enfermedad somática adquirida más común que involucra al AChR (ver revisión Barrantes, 1998). Está causada por auto-anticuerpos dirigidos contra el AChR muscular (Lindstrom, 2000b) y aún se desconoce qué es lo que desencadena esta respuesta autoinmune. Como consecuencia de la reacción autoinmune, el número de AChRs sufre una marcada disminución, causando dificultades en la transmisión neuromuscular; esto se traduce en las conocidas manifestaciones clínicas de la enfermedad, con fatiga y debilidad muscular severa (ver revisión Barrantes, 1998;

Lindstrom, 2000b). Cuando los anticuerpos se unen al AChR se desencadena una lisis mediada por el sistema del complemento, con la consecuente disminución en el número de AChRs en la UNM. La unión de los anticuerpos a los AChRs provoca además la agrupación de los receptores, lo que aumenta su internalización y conduce también a la reducción en el número de receptores. En cuanto a respuestas autoinmunes contra AChRs neuronales, se han identificado auto-anticuerpos contra la subunidad  $\alpha 3$  en pacientes con disautonomía (Vernino y col., 2000) y contra el receptor  $\alpha 9$  de queratinocitos en la enfermedad dermatológica Pemphigus vulgaris (Nguyen y col., 2000).

Los llamados *síndromes miasténicos congénitos* (SMC) presentan los síntomas clínicos típicos de la MG, pero a diferencia de esta última, no hay respuesta autoinmune involucrada. Los SMC son causados por mutaciones en subunidades del AChR muscular. Se conocen más de 60 mutaciones diferentes causales de SMC (Engel y col., 2002). Las enfermedades resultantes de mutaciones en los AChRs neuronales son más difíciles de identificar debido a que se desconoce mucho acerca de su papel funcional normal. Sin embargo algunas patologías han podido ser identificadas. Entre ellas podemos citar la epilepsia nocturna del lóbulo frontal autosómica dominante, la cual se asocia con mutaciones del AChR tanto en la subunidad  $\alpha 4$  (Steinlein, 2000) como en la  $\beta 2$  (De Fusco y col., 2000; Phillips y col., 2001).

Los AChR neuronales han sido también implicados en muchas otras enfermedades (Lloyd y Williams, 2000; ver revisión Barrantes, 1998). Entre ellas podemos citar el tabaquismo (Lindstrom, 2000a; Dani y col., 2001); enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Liu y col., 2001; Nagele y col., 2002) y la enfermedad de Parkinson (ver revisión en Lindstrom, 1997; Tumkosit y col., 2006); la esquizofrenia (Goff y col., 1992; Freedman y col., 2000) y trastornos

bipolares, ligados genéticamente al receptor de tipo  $\alpha 7$  (Leonard y col., 2001); entre otras.

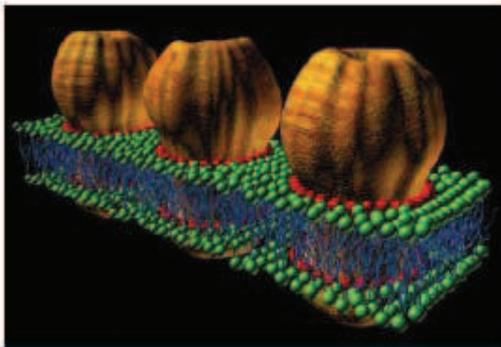
### **El AChR y su entorno lipídico**

El AChR es una proteína integral de membrana plasmática, y sus dominios hidrofóbicos transmembrana (TM) se hallan en íntimo contacto con los lípidos presentes en la bicapa. Esta interacción lípido-proteica acompaña al AChR desde procesos tan tempranos como su biosíntesis en el retículo endoplásmico (RE), así como también durante su tránsito a través de las cisternas del aparato de Golgi, hasta su destino final en la membrana postsináptica. Dado el estrecho contacto entre los lípidos de la membrana y el AChR, las propiedades fisicoquímicas de los lípidos que la constituyen influyen las propiedades estructurales y funcionales del receptor (Barrantes, 2004).

Los segmentos TM del AChR se disponen formando 3 anillos concéntricos (Barrantes, 2003). EL anillo interno, está constituido por los segmentos M2, los cuales contribuyen a la formación del canal iónico propiamente dicho; el anillo medio está formado por los segmentos M1 y M3; y el anillo externo, está conformado por los segmentos M4 de cada subunidad, los más hidrofóbicos y más expuestos a los lípidos de la membrana. Los segmentos M1 y M3 también son capaces de incorporar sondas hidrofóbicas fotoactivables, y están por tanto expuestos, al menos parcialmente, a los lípidos de la bicapa. En este sentido, Hamouda y col. (2006a) identificaron aquellos dominios del AChR de *Torpedo californica* que interactúan con el colesterol utilizando la sonda fotoactivable [ $^3\text{H}$ ] azicolesterol. Demostraron así que el colesterol interactúa con los segmentos M4, M3 y M1 de cada subunidad, teniendo la mayor interacción con el segmento M4.

Aquellos lípidos que se ubican en el perímetro inmediato del AChR y que rodean a la proteína a modo de “cinturón” o de “anillo” constituyen los denominados

lípidos vecinales o anillo lipídico del AChR (Marsh y Barrantes, 1978; Ellena y col., 1983; Dreger y col., 1997; Arias y col., 1990). Los lípidos de esta región constituyen una sub-población más rígida y ordenada que el resto de la membrana que lo rodea desde el punto de vista fisicoquímico, y exhiben un menor grado de penetración de moléculas de agua, lo que también la hace menos polar (Antollini y col., 1996; Antollini y Barrantes, 2002).



**Figura 6. El AChR en la membrana postsináptica.**

En este diagrama se observa al AChR rodeado por el cinturón de lípidos anulares (representado por las esferas rojas) y por el resto de los lípidos de la bicapa (esferas verdes). Obtenido de "Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function". Barrantes FJ. *Brain Res Brain Res Rev* (2004) 47:71-95.

Los lípidos anulares del AChR pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo a su grado de especificidad respecto de la proteína: (a) un grupo altamente específico, constituido por ácidos grasos como el esteárico, la cardiolipina y fosfatidilinositoles (Barrantes y col., 2000a; Mantipragada y col., 2003); androstanol (Barrantes y col., 2000a; Marsh y col., 1981) y ácido fosfatídico (PA) (Ellena y col., 1983); (b) un grupo intermedio, constituido por la esfingomielina (SM) (Bonini y col., 2002), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilglicerol (PG) (Mantipragada y col., 2003) y (c) un grupo de especificidad moderada a baja, donde se encuentran la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y los gangliósidos GD1b, GM1, GM2 y GM3 (Mantipragada y col., 2003).

Diversos estudios demostraron que los lípidos anulares son relativamente inmóviles respecto del resto de los lípidos, resaltando la existencia de una

heterogeneidad de fase lateral en los lípidos de la membrana (Marsh y Barrantes, 1978; Marsh y col., 1981; Rousselet y col., 1979; Marsh y Watts, 1982; Ellena y col., 1983). En este sentido se demostró la inducción de la proteína en restringir la movilidad de ácidos grasos y androstanol spin-marcados (Marsh y Barrantes, 1978) y de fosfolípidos spin-marcados (Marsh y col., 1981; Bienvenue y col., 1977) en membranas ricas en AChR de *Torpedo marmorata*. Más recientemente Wenz y Barrantes (2005) demostraron que en sistemas modelo el AChR era capaz de organizar su microentorno en forma de microdominios con elevada densidad de empaquetamiento y rigidez.

La inmovilidad de los lípidos vecinales puede explicarse de la siguiente manera: los lípidos de la región anular sufren un rápido intercambio con el resto de los lípidos de la membrana, del orden de  $5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  (ver revisión Barrantes 1993). Aquellas especies lipídicas que presentan mayor selectividad por el AChR permanecen en promedio un período mayor de tiempo en la vecindad inmediata de la proteína que aquellos lípidos que exhiben poca o ninguna selectividad (ver revisión en Barrantes, 2004).

Los lípidos son esenciales para preservar la actividad de canal iónico del AChR y la unión de ligandos (Barrantes, 1989; Criado y col., 1984). Los componentes lipídicos mayoritarios de las membranas biológicas en general son los fosfoglicéridos, el colesterol y los esfingolípidos (SLs). Los efectos de la composición de fosfoglicéridos en la función del AChR ha sido foco de numerosos estudios (Criado y col., 1982; 1984; Ochoa y col., 1983). El colesterol es un componente abundante de la membrana postsináptica (Barrantes, 1989). Se ha demostrado que el colesterol y los esteroides tienen un papel preponderante en la regulación de la funcionalidad del AChR (Barrantes, 1983; 1993; Barrantes y col., 2000b).

Numerosos estudios destacan la importancia del colesterol y fosfolípidos acídicos para preservar la funcionalidad del AChR en sistemas reconstituidos. Cuando

los AChRs son reconstituidos en vesículas lipídicas solo de PC, no son funcionales (Criado y col., 1982; 1984; Dalziel y col., 1980; Ochoa y col., 1983; da Costa y col., 2002). La presencia de colesterol y lípidos aniónicos como PA o PS restablecen la funcionalidad del AChR (Poveda y col., 2002; Fernandez-Carvajal y col., 2006; Morales y col., 2006; Baenziger y col., 2000; da Costa y col., 2002). Las membranas nativas de *Torpedo*, contienen aproximadamente 35 mol% de colesterol pero menos de 1 mol% de PA, sugiriendo que otros lípidos aniónicos deben actuar sustituyéndolo. De hecho, PS y PI, lípidos aniónicos abundantes en estas membranas, también estabilizan el estado de reposo del AChR, aunque con menor eficacia en comparación con el PA (Hamouda y col., 2006b).

Los ácidos grasos libres, en cambio, actúan como inhibidores no competitivos del AChR (Andreasen y McNamee, 1980; Villar y col., 1988). Estos ácidos grasos tienen una gran afinidad por la interfase lípido-AChR (Marsh y Barrantes, 1978; Ellena y col., 1983; Dreger y col., 1997; Mantipragada y col., 2003) y su localización en el dominio transmembrana del AChR ha podido ser confirmada mediante ensayos de proteólisis controlada con proteinasa K o el uso de fosfolipasa A2 (Fernández Nievas y col., 2007).

### **Influencia de los lípidos sobre el AChR en sistemas celulares**

Además de los efectos ejercidos sobre la funcionalidad del canal iónico enumerados anteriormente, los lípidos cumplen un importante papel regulando otros aspectos del AChR, tales como su síntesis, ensamblado, tráfico, inserción y estabilidad a nivel de la membrana plasmática. En lo que refiere al colesterol, se sabe que el mismo es necesario para el mantenimiento de la estabilidad del AChR neuronal de tipo  $\alpha 7$  en espinas somáticas de neuronas ciliares (Brusés y col., 2001). En células musculares C2C12, se pudo demostrar la importancia del colesterol en la generación de acúmulos ("*clusters*" en inglés) de AChR en la superficie celular, así como para la estabilidad de

estos agregados. La depleción de colesterol por metil- $\beta$ -ciclodextrina (CDx) inhibió la formación de los “clusters” o provocó la dispersión de las agrupaciones ya establecidas (Campagna y Fallon, 2006; Stetzkowski-Marden y col., 2006; Zhu y col., 2006). Utilizando células CHO-K1/A5, una línea celular que expresa el AChR de tipo muscular adulto, Borroni y col. (2007) demostraron que la exposición aguda a CDx, provoca una reducción de ~50% en el número de AChRs de superficie celular a través de la aceleración de la endocitosis del receptor. Estos resultados refuerzan la importancia de mantener niveles adecuados de colesterol celular para la modulación de la organización y estabilidad del AChR en la membrana plasmática. Además, Borroni y col. (2007) observaron una ganancia en la funcionalidad de canal iónico de los receptores remanentes en la superficie celular luego de la depleción del colesterol, mientras que el enriquecimiento en colesterol tuvo el efecto opuesto. Kellner y col. (2007) evaluaron la participación del colesterol en la organización del AChR en la membrana plasmática. Mediante microscopía de fluorescencia de depleción de emisión estimulada (“STED” en inglés), la cual provee una resolución superior al límite de difracción de los microscopios clásicos de epifluorescencia o confocal, observaron cambios en la distribución de las partículas de AChR luego del tratamiento con CDx, tanto en células CHO-K1/A5 enteras como en preparaciones de membranas plasmáticas, y la agregación de acúmulos de receptor inducida por anticuerpos en estructuras de mayor tamaño, tal como se observó en AChR solubilizado de *Torpedo* mediante microscopía electrónica (Barrantes, 1982).

En lo que respecta a los SLs, estudios realizados en células CHO-SPB1/SPH, una línea celular deficiente en SLs que expresa el AChR, demostraron que existe una relación directa entre los niveles de SLs y el tráfico exocítico del AChR (Roccamo y col., 1999). Cuando estas mutantes termosensibles son incubadas a temperaturas semipermissivas (37°C) el contenido de SM disminuye a un 50% de la línea parental CHO-K1 (Hanada y col., 1990), con disminución concomitante en los niveles de AChR presente en la superficie celular (Roccamo y col., 1999). Más recientemente, estudios

realizados por Baier y Barrantes (2007) reforzaron la importancia de mantener un nivel adecuado de SLs para el correcto tráfico del AChR hacia la superficie celular, y sugirieron la participación de los SLs como “chaperonas lipídicas” afectando la eficiencia del proceso de ensamblado del AChR, e influyendo por lo tanto sobre el tráfico de receptores recientemente sintetizados a la membrana plasmática.

### **Objetivo de la Tesis Doctoral**

El objetivo central de esta Tesis Doctoral fue evaluar si las alteraciones provocadas en los niveles de lípidos celulares tales como el colesterol, la SM o las ceramidas, precursoras en la biosíntesis de SLs, afectan los procesos de síntesis y tráfico del AChR, así como también su afinidad por ligandos y estabilidad en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5. Esta línea celular fue desarrollada en nuestro laboratorio y expresa en forma heteróloga estable el AChR de tipo muscular adulto ( $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ ) (Roccamo y col., 1999). Para alcanzar este objetivo central se desarrollaron dos líneas experimentales en paralelo: una de ellas, dedicada al estudio de los efectos de la depleción metabólica crónica del colesterol por la droga Mevinolina, inhibidora de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa); y otra línea experimental en la que se evaluaron los efectos promovidos por las ceramidas, ya sea agregadas en forma exógena, o bien generadas endogenamente por incubación con esfingomielinasa (SMasa) de *Bacillus cereus*.

Para explorar los efectos de las variaciones en estos lípidos celulares sobre el AChR recurrimos al empleo de metodologías bioquímicas, de biología celular y molecular, y microscopía óptica de epifluorescencia y confocal.

---

---

## ***Capítulo 2***

***Efecto de la depleción metabólica  
crónica del colesterol sobre el tráfico  
del AChR en células CHO-K1/A5***

---

---

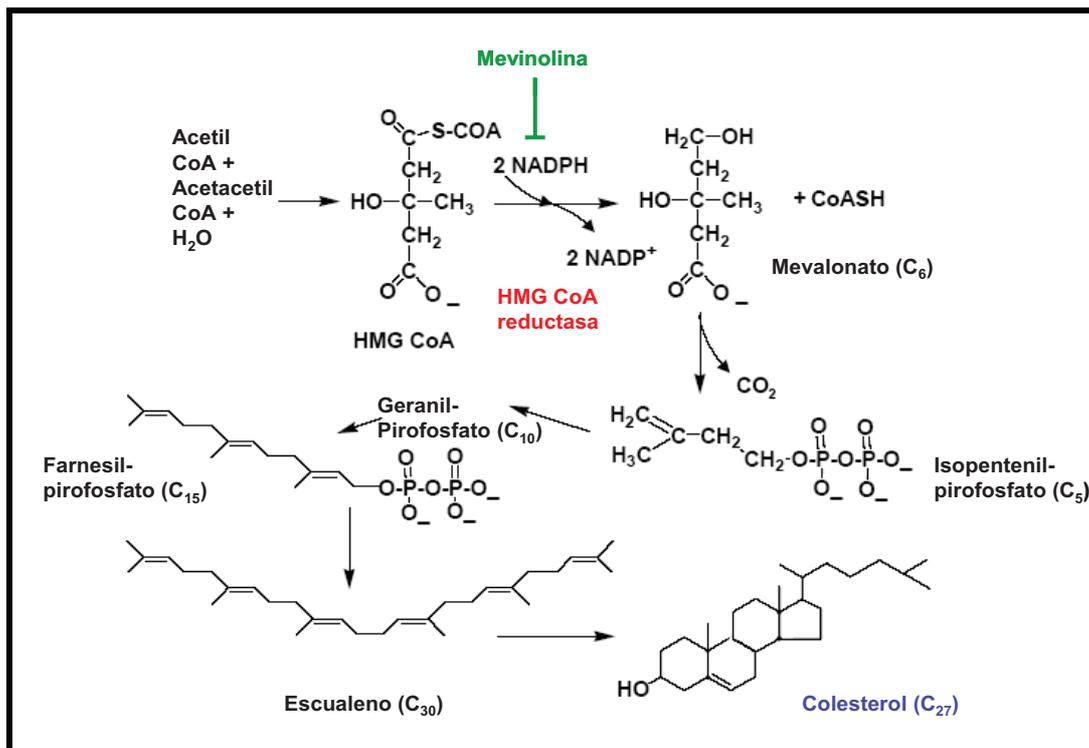
## **Efecto de la depleción metabólica crónica del colesterol sobre el tráfico del AChR en células CHO-K1/A5**

### **Introducción**

A pesar de la “mala fama” que ha ganado el colesterol por su participación en el desarrollo de enfermedades vasculares, este lípido es un componente esencial de las membranas de las células eucariotas, donde cumple numerosas e importantes funciones (Cress y Gerner, 1980; Brasaemle y Attie, 1990; Hao y col., 2002). Su contenido y metabolismo es estrictamente regulado, y las células en división retienen todas las enzimas necesarias para la colesterogénesis. Además, el colesterol es el mayor constituyente de las vainas de mielina en el sistema nervioso central y periférico, y se ha demostrado que la biosíntesis del colesterol tiene lugar localmente en el cerebro (Jurevics y Morell, 1995). La producción de colesterol por los oligodendrocitos es necesaria para que estas células de la neuroglía lleven a cabo el proceso de mielinización (Saher y col., 2005). Otra importante función que cumple el colesterol tiene que ver con su papel como precursor en la biosíntesis de las hormonas esteroideas y de los ácidos biliares. Estos últimos, a su vez, son necesarios para una absorción eficiente de los lípidos de la dieta, incluyendo al propio colesterol y vitaminas liposolubles.

La biosíntesis de colesterol comienza con la formación de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) a partir de acetil-CoA y acetacetil-CoA. Luego, a partir de HMG-CoA se sintetiza mevalonato, siendo este paso la etapa limitante en la formación de colesterol. La enzima que cataliza esta reacción, la HMG-CoA reductasa, es un importante punto de control en la biosíntesis de colesterol. El mevalonato es posteriormente convertido en isopentenilpirofosfato (C<sub>5</sub>), que condensa con su isómero, dimetilalilpirofosfato (C<sub>5</sub>) formando el geranilpirofosfato (C<sub>10</sub>). Por adición de una segunda molécula de isopentenilpirofosfato se libera farnesilpirofosfato (C<sub>15</sub>), que

se une con otra molécula igual para formar escualeno (C<sub>30</sub>). Este intermediario se cicla para dar posteriormente lanosterol (C<sub>30</sub>), el cual a su vez sufre una serie de modificaciones hasta convertirse finalmente en colesterol (C<sub>27</sub>) (Esquema 1).

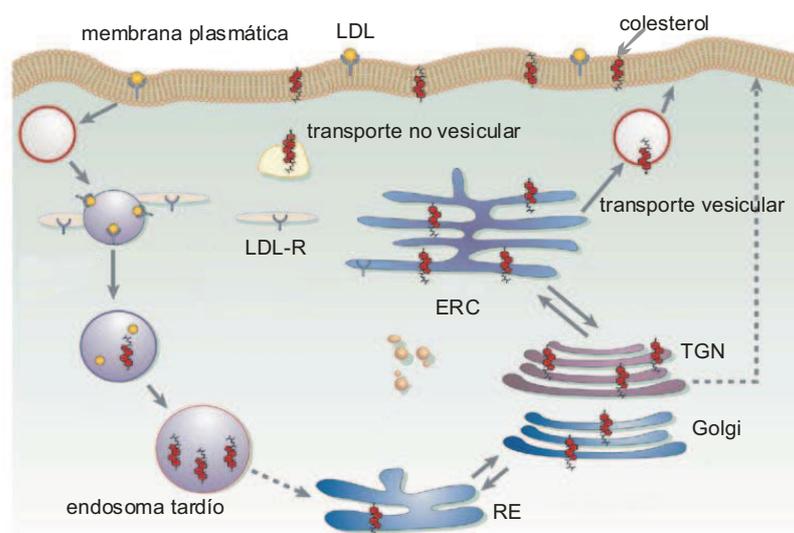


**Esquema 1. Biosíntesis del colesterol.** El colesterol se forma a partir de acetil-CoA. La síntesis de mevalonato a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) es la etapa limitante en su biosíntesis y la enzima que cataliza dicha reacción, la HMG-CoA reductasa, es inhibida competitivamente por la Mevinolina (ver más adelante).

A lo largo del camino exocítico, los niveles de colesterol siguen un gradiente de concentración creciente (Orci y col., 1981; Coxey y col., 1993), siendo en la membrana plasmática donde se localiza la mayor parte (80-95%) del contenido de colesterol celular total (Lange y Ramos, 1983; Lange 1991; Liscum y Underwood, 1995; Hao y col., 2002; ver revisión en Holthuis y Levine 2005). Allí, los esteroides restringen la flexibilidad de las cadenas acílicas de los fosfolípidos con reducción en la fluidez de la membrana, aumentan el grosor de la membrana (Schneiter y col., 1999; Sprong y col.,

2001; ver revisión en Holthuis y Levine 2005) y disminuyen la permeabilidad de pequeñas moléculas (Sprong y col., 2001; Yeagle, 1993). En el retículo endoplásmico (RE), la concentración de colesterol es baja (Lange, 1991), consistente con la necesidad de este compartimiento celular de poseer una membrana más fluida, para facilitar procesos tales como la translocación proteica (Nilsson y col., 2001). En el aparato de Golgi, en cambio, el contenido de colesterol juega un papel crucial en la regulación del transporte proteico, y sus niveles deben ser finamente regulados para mantener una adecuada organización estructural y funcional de esta organela y permitir un correcto transporte intracelular (Stüven y col., 2003). Varios trabajos científicos han determinado que la depleción de colesterol afecta específicamente el transporte de vesículas y causa la acumulación de proteínas en la región perinuclear (Keller y Simons, 1998; Hansen y col., 2000; Dhanvantari y Loh, 2000; Wang y col., 2000; Stüven y col., 2003). Niveles elevados de colesterol también afectan negativamente el transporte exocítico de proteínas, con bloqueo del tráfico a nivel de la red *trans*-Golgi (TGN) (Ying y col., 2003).

Debido a que el colesterol es un lípido altamente hidrofóbico, requiere de mecanismos especializados para su tráfico intracelular que incluyen vías vesiculares y no-vesiculares de transporte (ver revisiones en Soccio y Breslow, 2004; Prinz, 2007). El tráfico vesicular ocurre a través de su incorporación en vesículas secretorias o endocíticas, sin embargo cada vez son más numerosas las evidencias que destacan la importancia de las vías no-vesiculares. Este transporte no-vesicular del colesterol estaría mediado por ciertas proteínas, algunas de las cuales son proteínas transportadoras solubles, y otras son proteínas integrales de membrana. Entre ellas podemos citar a la proteína StAR y otros miembros de la familia START, la NPC2, la ORP (oxysterol binding protein-related protein o proteína relacionada a OSBP) y la SCP-2 (ver revisiones en Soccio y Breslow, 2004; Prinz, 2007; Schulz y Prinz, 2007).

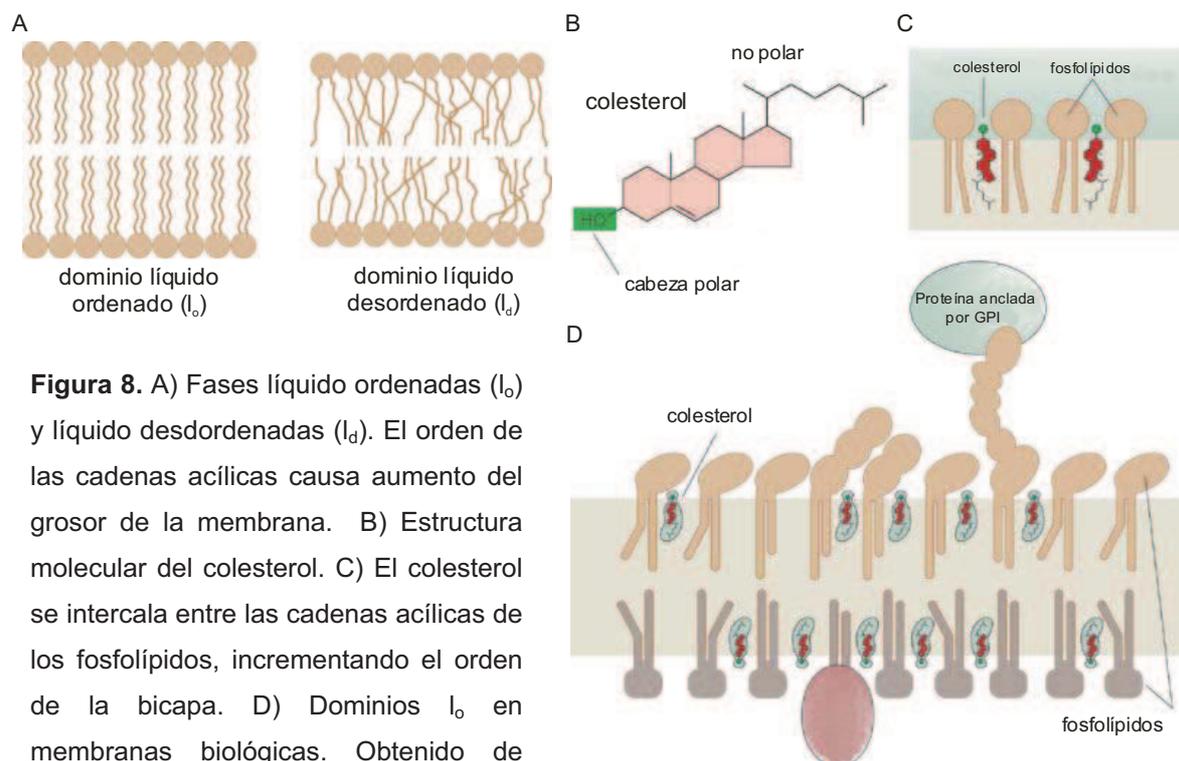


**Figura 7. Transporte vesicular y no vesicular de colesterol.**

Obtenido de "Role of cholesterol and lipid organization in disease". Maxfield FR y Tabas I. *Nature* (2005) 438:612-621.

En las membranas celulares el colesterol se encuentra formando complejos con SLs y otros fosfolípidos de cadenas saturadas, constituyendo las denominadas "balsas" ("rafts") lipídicas (Simons e Ikonen, 2000; Brown y London, 1998; McConnell y Vrljic, 2003; Edidin, 2003; Mukherjee y Maxfield, 2004). Estos dominios constituyen fases líquido-ordenadas ( $l_o$ ) donde las cadenas acílicas están empaquetadas en forma compacta por efecto del colesterol, rodeadas por un "mar" de lípidos líquido-desordenados ( $l_d$ ) (Brown y London, 1998; McConnell y Vrljic, 2003; Edidin, 2003; Mukherjee y Maxfield, 2004) (Fig. 8). Un aspecto central de la hipótesis que postula la existencia de "balsas" lipídicas es el concepto que fragmentos de membrana correspondientes a los estados o fases  $l_o$  y  $l_d$  pueden ser bioquímicamente separados por extracción de las mismas en detergentes no iónicos en frío. La resistencia de los dominios  $l_o$  a la solubilización con detergentes se debe al alto grado de empaquetamiento de los lípidos, lo que previene la incorporación del detergente en la bicapa (Xu y col., 2001). Luego de este tratamiento, se obtienen por un lado

membranas resistentes a detergentes (*"detergent resistant membranes"* o *"DRMs"* en inglés), en las cuales los lípidos se encuentran en la fase  $l_o$  y sus proteínas asociadas, y por otro el material soluble en detergente correspondiente a los lípidos  $l_d$  y proteínas asociadas (Brown y London, 1998; McConnell y Vrljic, 2003; Edidin, 2003; Mukherjee y Maxfield, 2004). Estudios en membranas modelo claramente demuestran la agrupación de los SLs, el colesterol, y ciertos tipos de glicerofosfolípidos (Dietrich y col., 2001; Veatch y Keller, 2005; Heberle y col., 2005) y también existe evidencia, de la presencia de estos microdominios en células vivas (Friedrichson y Kurzchalia, 1998; Varma y Mayor, 1998; Pralle y col., 2000). La habilidad de las "balsas" lipídicas para secuestrar proteínas específicas y excluir otras, las convierte en estructuras ideales para la organización espacial de diversas vías celulares. Han sido implicadas en la regulación de vías de señalización celular y traducción de señales, donde la asociación a microdominios de membrana de los componentes de una cascada de señalización facilita la interacción proteína-proteína y la amplificación de la señal (Simons y Toomre, 2000). También han sido implicadas en el tráfico exo- y endocítico (Simons y Toomre, 2000; Tooze, 2001; ver revisión en Brown, 2006). El concepto actual es que en las células en reposo estos dominios o "balsas" serían extremadamente pequeños (en la escala de los nm) comprendiendo unas pocas moléculas de proteínas y lípidos. Además serían estructuras muy inestables, con vidas medias muy cortas (en el orden de los  $\mu$ s a ms) y sus componentes estarían en equilibrio dinámico con componentes de los dominios "no-balsa" (ver revisiones en Brown, 2006 y Mishra y Joshi, 2007). Bajo determinadas circunstancias (como por ejemplo la unión de un ligando a un receptor) estos pequeños dominios podrían unirse para formar macro-dominios más estables, a través de interacciones lípido-proteína o proteína-proteína (ver revisiones en Brown, 2006 y Mishra y Joshi, 2007).



**Figura 8.** A) Fases líquido ordenadas ( $l_o$ ) y líquido desordenadas ( $l_d$ ). El orden de las cadenas acílicas causa aumento del grosor de la membrana. B) Estructura molecular del colesterol. C) El colesterol se intercala entre las cadenas acílicas de los fosfolípidos, incrementando el orden de la bicapa. D) Dominios  $l_o$  en membranas biológicas. Obtenido de "Role of cholesterol and lipid organization in disease". Maxfield FR y Tabas I. *Nature* (2005) 438:612-621.

El colesterol ejerce una modulación de la funcionalidad de las proteínas, ya sea por la promoción de cambios en la fluidez de las membranas, así como también por un efecto adicional directo sobre las propiedades de las proteínas insertas en la membrana. Como ejemplos podemos citar estudios realizados sobre la adenilato ciclasa (Whetton y col., 1983), el transportador de GABA (North y Fleischer, 1983) y el AChR de *Torpedo* (Fong y McNamee, 1986). En este sentido, y como ya fue comentado en el Capítulo I, numerosos trabajos destacan la importancia del colesterol en el correcto funcionamiento del AChR (Dalziel y col., 1980; Criado y col., 1982; McNamee y col., 1982; Jones y McNamee, 1988; ver revisión en Barrantes, 2004; 2007).

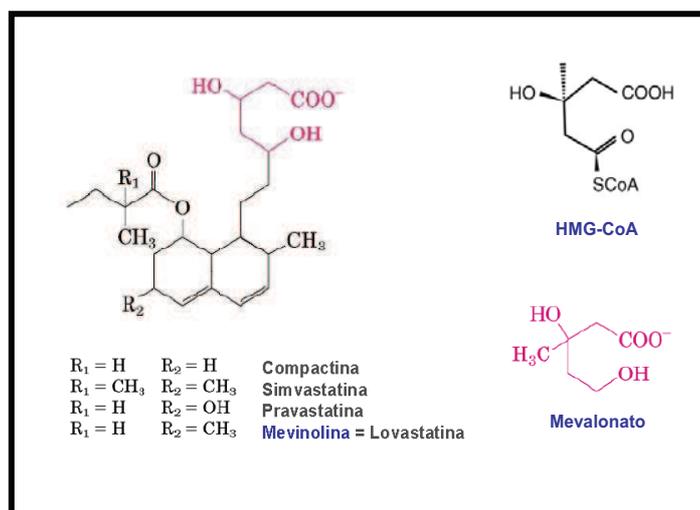
Además de estas interacciones a nivel molecular, numerosos trabajos han dedicado atención a las interacciones del AChR con el colesterol a nivel celular. En

neuronas ciliares el receptor nicotínico neuronal  $\alpha 7$  se agrega formando grandes agrupamientos que colocalizan con microdominios de membrana (Brusés y col., 2001). La desestabilización de estos microdominios por tratamiento con metil- $\beta$ -ciclodextrina (CDx) la cual remueve el colesterol de la membrana, provoca la redistribución del receptor en agrupaciones más pequeñas, indicando la importancia del colesterol en la organización del AChR en la superficie celular (Brusés y col., 2001). En forma similar, en la línea celular muscular C2C12, tanto los acúmulos del AChR como la estabilidad de estas agrupaciones de receptores resultaron ser dependientes del colesterol, ya que la depleción de colesterol por CDx inhibió la formación de dichos acúmulos o dispersó las agrupaciones ya existentes (Campagna y Fallon, 2006; Stetzkowski-Marden y col., 2006; Zhu y col., 2006). Incluso, además del AChR, otros receptores del sistema nervioso central se encuentran asociados a membranas resistentes a Tritón X-100. Tal es el caso del receptor GABA<sub>B</sub> (Becher y col., 2001) y de los receptores de glutamato AMPA (Hering y col., 2003) y NMDA (Besshoh y col., 2007), lo que indicaría que estos dominios de membrana o “balsas” lipídicas serían importantes para la localización específica de receptores en el sitio de sinapsis (Stetzkowski-Marden y col., 2006).

En el presente capítulo evaluamos de qué forma los niveles celulares de colesterol influyen el tráfico del AChR hacia la membrana plasmática.

Como modelo experimental utilizamos las células CHO-K1/A5, una línea celular desarrollada en nuestro laboratorio que expresa en forma heteróloga estable el AChR murino de tipo muscular adulto ( $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ ) (Roccamo y col., 1999). Empleamos esta línea celular para probar los efectos de la depleción metabólica crónica del colesterol inducida por la droga Mevinolina (Mev) sobre la distribución y expresión del AChR a nivel de la membrana plasmática. La Mev es un metabolito fúngico aislado y purificado a partir del hongo *Aspergillus terreus* que actúa como un potente inhibidor competitivo de la enzima microsomal 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA

reductasa) (Alberts y col., 1980). Esta enzima es la enzima limitante en la biosíntesis de colesterol, haciéndola un blanco de elección en la regulación farmacológica del contenido de este esterol.



**Figura 9.** Estructura química del HMG-CoA, del mevalonato y de diversos inhibidores metabólicos de la enzima HMG-CoA reductasa, incluyendo a la Mevinolina.

## Materiales y métodos

### Materiales

La [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ bungarotoxina ([<sup>125</sup>I]  $\alpha$ BTX, 120  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol) se obtuvo en New England Nuclear (Boston, MA, EEUU). La  $\alpha$ BTX nativa, *d*-tubocurarina (*d*-TC), carbamilcolina, Brefeldina A y Mevinolina (Mev) se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EEUU). El medio Nutridoma-BO con contenido de lípidos controlado se adquirió en Boehringer, Ingelheim (Alemania). El vector pEYFP-GalT (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, EEUU) fue un obsequio de la Dra. Jennifer Lippincott-Schwartz y el Dr. George Patterson (NICHD, Bethesda, MD, EEUU). El vector VSVG-GFP fue cedido por el Dr. Alfonso Gonzalez, de la Pontificia Universidad Católica de Chile. El reactivo de transfección Polifect transfection reagent se obtuvo de Quiagen

(Qiagen Inc., EEUU). La  $\alpha$ BTX conjugada con Alexa<sup>488</sup> (Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX) y Alexa<sup>594</sup> (Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX), y el fragmento IgG Alexa<sup>488</sup> F(ab')<sub>2</sub> anti-ratón de cabra fueron adquiridos en Molecular Probes (Invitrogen Corp., CA, EEUU). El anticuerpo monoclonal anti-sintaxina 6 y el anticuerpo policlonal anti-calnexina fueron de Stressgen Biotechnologies Corporation (Victoria, BC, Canadá). Los anticuerpos primarios anti-AChR H-101 y mAb 210 se obtuvieron en Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, EEUU) y Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EEUU) respectivamente. Se utilizaron también anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-ratón y anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EEUU)

### **Cultivo celular**

Como sistema modelo utilizamos la línea celular CHO-K1/A5, generada en nuestro laboratorio por transfección estable de la línea CHO-K1 con las cuatro subunidades del AChR de ratón de tipo muscular adulto ( $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ ) (Roccamo y col., 1999). Las células se cultivaron en medio Ham's F-12 suplementado con glutamina, 40  $\mu$ g/ml de sulfato de Gentamicina y 10% de suero fetal bovino, en un incubador Napco modelo 6100 mantenido a 37°C, con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub>/ 95% aire durante los 2-3 días previos a los experimentos. Posteriormente las células se incubaron por 48 h bajo 5 condiciones experimentales diferentes: a) medio completo Ham's F-12, b) medio completo Ham's F-12 + 0.5  $\mu$ M Mev, c) medio delipidado Nutridoma-BO, d) medio delipidado Nutridoma-BO + 0.5  $\mu$ M Mev y e) medio delipidado Nutridoma-BO + 5.0  $\mu$ M Mev.

## **Análisis Lipídico**

### **a) Extracción de lípidos**

Para la extracción de los lípidos del cultivo celular se utilizó el método de Folch y col. (1957). Las células CHO-K1/A5 fueron cultivadas en cápsulas de 10 cm de diámetro en medio completo por 2-3 días. Posteriormente se incubaron las células bajo las distintas condiciones experimentales. Las células se lavaron dos veces con buffer PBS, pH 7,4, y se rasparon de las cápsulas con ayuda de una espátula. La suspensión celular se colectó y transfirió a un tubo de vidrio. Se disrumpieron las células mediante dos ciclos de 5 segundos en un sonicador Branson y los lípidos se extrajeron con 20 volúmenes de cloroformo:metanol (C:M; 2:1, v/v) a temperatura ambiente por 3 h. Los extractos crudos se centrifugaron a 2000 rpm; se particionaron con 0.2 volúmenes de agua destilada y se centrifugaron nuevamente a igual velocidad. La fase lipídica orgánica se secó bajo nitrógeno.

### **b) Determinación del contenido lipídico de las muestras**

Las muestras se resuspendieron en isopropanol para la determinación del contenido de colesterol o bien en C:M (2:1) para la separación de los glicerofosfolípidos por cromatografía en capa fina (CCF). El contenido de fósforo de fosfolípidos se determinó para cada mancha mediante el método de Rouser y col. (1970), luego del tratamiento de las muestras con ácido perclórico a 180°C. El contenido de colesterol total se determinó a partir de una alícuota del extracto lipídico total usando un método enzimático colorimétrico de laboratorios Wiener (Rosario, Argentina). Este método se basa en la acción de una colesterol hidrolasa, una colesterol oxidasa y una peroxidasa, acoplada a un ensayo colorimétrico. El contenido de colesterol libre fue determinado por el mismo método colorimétrico pero en ausencia de la enzima colesterol hidrolasa. Los ésteres de colesterol se calcularon por diferencia entre el contenido de colesterol total y el contenido de colesterol libre.

---

**Ensayos de unión de [<sup>125</sup>I] αBTX**

Se determinó la expresión del AChR de superficie por incubación de las células (70-80% de confluencia) con concentraciones crecientes (1-60 nM) de [<sup>125</sup>I] αBTX en el medio de cultivo por 1 h a 25°C. Al final del período de incubación las células se lavaron dos veces con buffer PBS y se levantaron con NaOH 0.1 N. Se midió la radioactividad de las muestras en un contador de centelleo gama con una eficiencia del 80%. La unión inespecífica se determinó como el remanente luego de la preincubación de las células con 10 μM de αBTX o carbamilcolina 2 mM previo a la adición de [<sup>125</sup>I] αBTX.

La cantidad de AChRs totales se determinó mediante lisis de las células con buffer fosfato 10 mM, pH 7,4, conteniendo 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.02 % NaN<sub>3</sub>, 10 μg/ml seroalbúmina bovina, 2 mM PMSF, y 10 μg/ml de quimostatina, leupeptina, pepstatina, tosil-lisina clorometil-cetona y tosil fenilalanina clorometil cetona, agregados al buffer en el momento de usar. Las células se lisaron toda la noche a 4°C (Green y Claudio, 1993) y el ensayo de unión de [<sup>125</sup>I] αBTX se realizó según Schmidt y Raftery (1973). Alícuotas de 20-40 μl del lisado celular se incubaron con buffer fosfato 10 mM conteniendo 100 mM NaCl, 1% Triton X-100 y [<sup>125</sup>I] αBTX (60 nM) en un volumen final de 125 μl. La unión inespecífica se determinó en muestras tratadas por 1 h con 2 mM de carbamilcolina, o hervidas por 5 min antes del ensayo de unión con toxina radiactiva. La unión inespecífica obtenida por cualquiera de los dos procedimientos alcanzó ~20-30 % de la unión total. La reacción de unión se detuvo por siembra de 100 μl de la reacción de incubación en papeles de DE-81 (Whatman, 2x2 cm). Los papeles de DE-81 se lavaron luego con buffer fosfato 10 mM conteniendo 0.1 % Triton X-100 por tres intervalos de 10 minutos cada uno. Los papeles secos se contaron en un contador de centelleo gamma con un 80 % de

eficiencia. Se calculó el número de AChRs intracelulares por diferencia entre el número de receptores totales y el número de receptores de la superficie celular.

### **Curvas de desplazamiento de [<sup>125</sup>I] αBTX**

Con el fin de determinar IC<sub>50</sub> del AChR para *d*-TC evaluamos la unión de [<sup>125</sup>I] αBTX luego de la incubación de las células CHO-K1/A5 con este antagonista. Para ello, las células se incubaron en un volumen de reacción de 800 μl de medio de cultivo conteniendo la concentración deseada de *d*-TC por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregó la [<sup>125</sup>I] αBTX en una concentración final de 10 nM, incubándose las células durante 20 min adicionales. Luego se removió el medio y se lavaron las células con buffer Dulbecco's. Las células se solubilizaron por adición de 2 ml de NaOH 0.1N y los extractos se usaron para el contaje de radioactividad.

### **Análisis de los datos farmacológicos**

Los datos obtenidos a partir de las curvas de saturación, así como las transformadas de Scatchard correspondientes, las cinéticas de asociación y vida media del AChR y los experimentos de desplazamiento de ligandos se analizaron con el programa Origin 5.0. La significatividad estadística de los datos se determinó mediante el test de Student.

### **Determinación de proteínas**

El contenido proteico total se determinó por el método de Lowry y col. (1951) usando una alícuota de los extractos celulares hechos con NaOH 0,1 N luego de la medición de radioactividad. Se utilizó seroalbúmina bovina como estándar.

## **Microscopía de Fluorescencia**

### **a) Obtención de imágenes**

Para la obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia, las células CHO-K1/A5 se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en medio Ham's F-12 por 2-3 días a 37°C previo a los experimentos de citoquímica. Las imágenes se obtuvieron utilizando microscopios de fluorescencia de campo ancho (Nikon Eclipse E-600 y Nikon TE-300) y se capturaron mediante el empleo de las cámaras digitales SBIG modelo ST-7 y Hamamatsu Orca, para cada microscopio respectivamente. La cámara ST-7 fue manejada con el programa CCDOPS (SBIG Astronomical Instruments, versión 5.02, Santa Barbara, CA, USA) y la cámara Hamamatsu Orca, con el programa MetaMorph 5.0 (Universal Imaging Corp. Downingtown, PA, EEUU). Ambas cámaras fueron termostáticamente enfriadas a –10°C. Se utilizaron objetivos de inmersión en aceite de 40x (1.0 A.N.), 60x (1.4 A.N.) ó 100x (1.4 A.N.) y los correspondientes filtros dicróicos y de emisión de acuerdo a las longitudes de onda utilizadas.

### **b) Marcación del AChR de superficie**

Los AChRs de la superficie celular se marcaron mediante incubación de las células CHO-K1/A5 con  $\alpha$ BTX conjugada con el fluoróforo Alexa<sup>488</sup> (Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX) en una concentración final de 1  $\mu$ g/ml en PBS, por 1 h, sobre hielo. El exceso de marca se removió por lavados con PBS frío antes de realizar la microscopía.

### **c) Marcación del AChR intracelular**

Para marcar los AChRs intracelulares se saturaron en primer lugar los receptores de superficie por incubación de las células con 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ BTX en PBS por 1 h, en hielo. Luego, se procedió a la fijación de las células con 4% paraformaldehído

por 40 min y se las permeabilizó con 0.1% Triton X-100 por 20 min. Finalmente las células se incubaron con Alexa<sup>594</sup>  $\alpha$ BTX en una concentración final de 1  $\mu$ g/ml PBS por 1 h, a temperatura ambiente.

#### **d) Análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía de fluorescencia**

Las imágenes de fluorescencia se analizaron mediante el programa Scion Image versión 4.0.2 (Scion Corp., Frederick, MD, USA). Las intensidades de fluorescencia fueron medidas a partir de las imágenes de 16-bits seleccionando pequeñas áreas de membrana, para la cuantificación de los receptores de superficie o seleccionando la totalidad de la célula ó grupo celular para la cuantificación de los AChR intracelulares. Calculamos así la intensidad de fluorescencia promedio en varias áreas para cada foto en particular, obteniendo luego un valor promediado de intensidades de fluorescencia para cada condición experimental. Los valores de intensidad de fluorescencia en cada caso se corrigieron por diferencia con el correspondiente valor de intensidad de fluorescencia de un área libre de células (fluorescencia basal de fondo). Finalmente calculamos la intensidad de fluorescencia promedio para cada condición experimental. En cada caso, las células se seleccionaron al azar a partir de las imágenes de contraste de fase.

#### **e) Procesamiento de las imágenes**

Con fines ilustrativos las imágenes se procesaron y fueron pseudocoloreadas con el programa Adobe Photoshop 7.0. Para los estudios de colocación del AChR con otras proteínas fluorescentes se pseudocolorearon las imágenes de acuerdo a la correspondiente longitud de onda de emisión de la  $\alpha$ BTX conjugada con fluoróforo y del marcador específico respectivamente y se procedió a la superposición de las imágenes. Obtuvimos así una nueva imagen en la que pudimos observar en forma cualitativa el grado de superposición de ambas señales fluorescentes. La

deconvolución de las imágenes se realizó con el programa Deconv Wizard. Para la diagramación y presentación final de las figuras se recurrió al empleo del programa Corel Draw 11.

### **Transfección transiente**

Las células CHO-K1/A5 se transfectaron en forma transiente con los ADNc que codifican para las proteínas de fusión fluorescentes, proteína fluorescente amarilla/ $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa (pEYFP-GalT) o para la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSVG) acoplado a proteína fluorescente verde (VSVG-GFP). La transfección se realizó 1-2 días posteriores al sembrado de las células. Se usaron reactivos de transfección comerciales (Polifect transfection reagent-Quigen) siguiendo el protocolo correspondiente.

### **Retención del AChR en el aparato de Golgi inducida por temperatura**

Con el propósito de definir la localización intracelular precisa del AChR acumulado en las células depletadas de colesterol, se bloqueó artificialmente el transporte proteico por incubación de las células CHO-K1/A5 a 20°C durante 2,5 h. Este procedimiento provoca el bloqueo del tráfico proteico en células CHO-K1, principalmente a nivel del TGN (Xia y col., 1997). Luego de este procedimiento se marcó el AChR intracelular como ya fue descrito anteriormente.

### **Tratamiento con Brefeldina A**

La Brefeldina A (BFA) es un metabolito fúngico que causa la redistribución de constituyentes de membrana del *cis*-, *medial*- y *trans*-Golgi hacia el RE pero no del TGN (Lippincott-Schwartz y col., 1991; Rosa y col., 1992; Banting y Ponnambalam, 1997; Chardin y McCormick, 1999; Watson y Pessin, 2000). Por esto último, una proteína que se está acumulando a nivel del TGN, no debería ver afectada su distribución luego

del tratamiento de las células con BFA. Aprovechamos esta propiedad de la BFA para comprobar la localización intracelular del AChR en las células tratadas con Mev.

En primer lugar, probamos la eficiencia de BFA en provocar la desorganización del aparato de Golgi, utilizando la sonda C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer como marcador de dicha organela (Pagano y col., 1991). Una vez realizada esta prueba, las células CHO-K1/A5 depletadas de colesterol se trataron con 2.5 µg/ml de BFA por 30 min a 37°C en presencia de Mev. El AChR intracelular se marcó como se describió anteriormente y se analizó su distribución antes y después del tratamiento con BFA.

### **Fraccionamiento subcelular**

Para la obtención de fracciones enriquecidas en RE y Golgi, realizamos dos tipos de ensayos de fraccionamiento subcelular a los que llamamos ensayos de fraccionamiento A y B siguiendo los protocolos propuestos por Zhang y col. (1998) y Sarnataro y col (2004) para el caso del ensayo de fraccionamiento A, y Vidugiriene y col. (1999) para el fraccionamiento B, con algunas modificaciones.

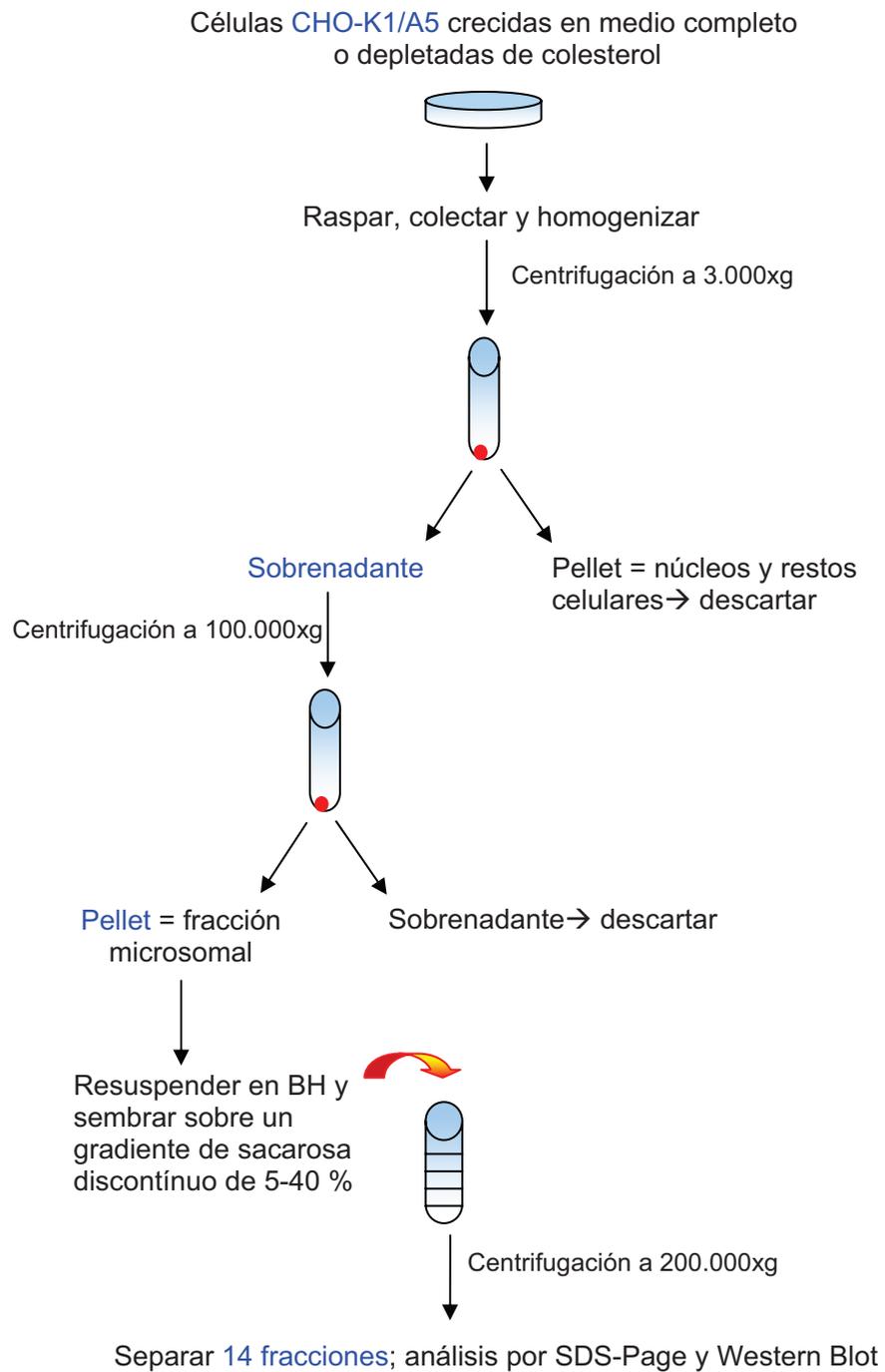
#### *Ensayo de fraccionamiento A:*

Las células CHO-K1/A5 crecidas en cápsulas de 10 cm de diámetro en un 80-90% de confluencia, se lavaron una vez con Buffer de homogenización (BH; 10 mM HEPES, pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,25 M sacarosa) y se rasparon con espátula. Colectamos la suspensión celular en homogenizador Potter-Elvehjem (tipo Thomas) y agregamos una mezcla de inhibidores de proteasas (leupeptina, TPCK, TLCK, aprotinina, pepstatina, inhibidor de proteasas activadas por Ca<sup>2+</sup>). Se disrumpieron las células mediante quince golpes de homogenizador y posterior pasaje por aguja 21G. El homogenado celular se centrifugó a 3.000xg 10 min obteniéndose un pellet (núcleos y células enteras) y un sobrenadante postnuclear (SPN). Descartamos el sedimento, y centrifugamos el SPN a 100.000xg durante 1 hora a 4°C. Obtuvimos así un segundo sedimento (fracción microsomal) y descartamos el sobrenadante. La fracción

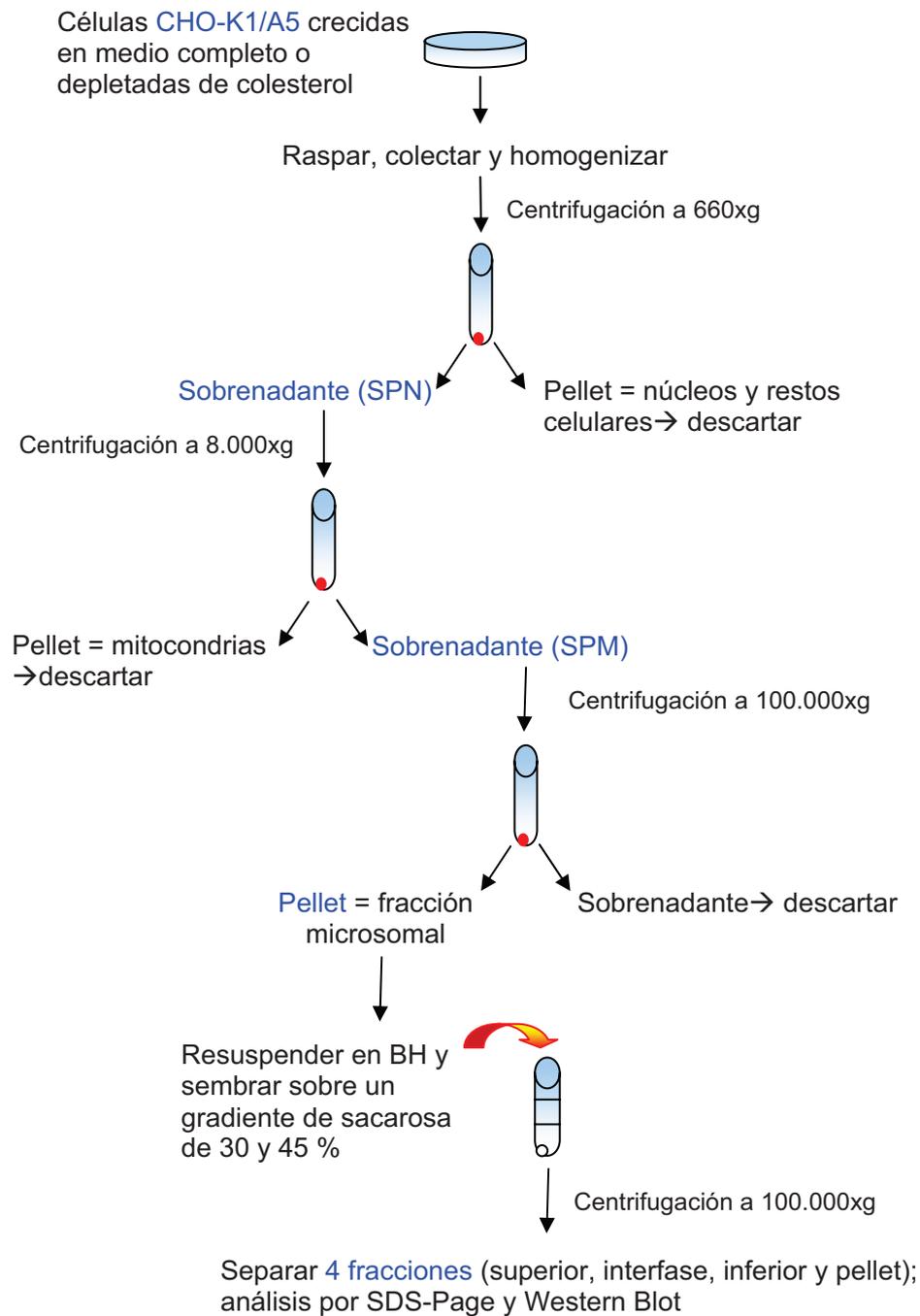
microsomal se resuspendió en BH conteniendo 5% de sacarosa y se sembró sobre un gradiente discontinuo de sacarosa de 5-40% en BH. Se centrifugaron los gradientes a 200.000xg en rotor SW 50.1, durante 3 h, a 4°C. Colectamos 14 fracciones desde la parte superior hasta la parte inferior del gradiente (Esquema 2). La pureza de las fracciones se determinó mediante SDS-PAGE y Western Blot.

### *Ensayo de fraccionamiento B:*

A diferencia del protocolo de fraccionamiento A, en este fraccionamiento el homogenado celular fue centrifugado a 660xg durante 10 min a 4°C. El pellet así obtenido (núcleos y células enteras) se descartó, y el SPN se centrifugó a 8.000xg por 10 min a 4°C. Descartamos nuevamente el pellet (mitocondrias) y el sobrenadante post mitocondrial (SPMIT) fue centrifugado a 100.000xg durante 1 hora a 4°C. Conservamos este último pellet (fracción microsomal) y descartamos el sobrenadante. La fracción microsomal fue resuspendida en buffer de homogenado (BH) y sembrada sobre un gradiente de sacarosa constituido por dos capas (30 y 45% en BH). Se centrifugaron los gradientes a 100.000xg durante 2 h, a 4°C. Luego de la centrifugación pudimos distinguir 3 fases (fase superior, interfase y fase inferior) y un pellet (Esquema 3). Colectamos cada fase por separado. El pellet se resuspendió en BH conteniendo 45% de sacarosa. Se determinó la pureza de las fracciones mediante SDS-PAGE y Western Blot.



**Esquema 2. Ensayo de fraccionamiento A.** Metodología seguida para el aislamiento de fracciones enriquecidas en RE y Golgi.



**Esquema 3. Ensayo de fraccionamiento B.** Metodología seguida para el aislamiento de fracciones enriquecidas en RE y Golgi.

Las proteínas de cada fracción (para ambos protocolos de fraccionamiento) se precipitaron mediante el agregado de ácido tricloroacético (TCA) al 5% en volumen final. Se dejaron precipitando toda la noche a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 min, descartando el sobrenadante (TCA); los restos de TCA se eliminaron mediante lavados con acetona. Finalmente las muestras se disolvieron con buffer de Laemmli 2X (100 mM Tris pH 6,8, 200 mM ditiotretitol, 4% SDS, 0.2% azul de bromofenol y 20% glicerol). En paralelo se procesaron las alícuotas para la determinación de proteínas de cada fracción, con la diferencia de que estas muestras fueron disueltas en NaOH 0,1N en lugar de buffer de Laemmli.

### **Geles de poliacrilamida**

Las muestras se analizaron por SDS-Page, corriéndose en geles de poliacrilamida al 12.5%. Una vez listos los geles, se arma la cuba de electroforesis y se cargan con buffer de corrida Tris-glicina en ambas cámaras. Las muestras y el estándar de peso molecular (Kaleidoscope Precision Plus Protein prestained standard, Bio-Rad Labs) fueron corridas en geles durante 1 ½ h a 40 V constantes, y luego a 15 mA constantes en un instrumento Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System.

### **Transferencia a membranas de Immobilon**

Finalizado el tiempo de corrida se realizó la transferencia de las muestras desde el gel a membranas de Immobilon (Millipore Corp., EEUU). Utilizamos para ello el kit accesorio “Mini Trans-Blot Module” también de Bio-Rad Labs. Se transfirieron las muestras durante 1 h a 350 mA.

### **Tinción con Rojo Ponceau**

Para evaluar la carga proteica de cada calle luego de realizada la transferencia, las membranas se tiñeron con solución de Rojo Ponceau (rojo Ponceau 500 mg; ácido

acético glacial 1 ml; completar a 100 ml con agua destilada) y se escanearon. Posteriormente se cuantificó el contenido de proteínas de las calles sembradas mediante el programa de análisis de imágenes Image J.

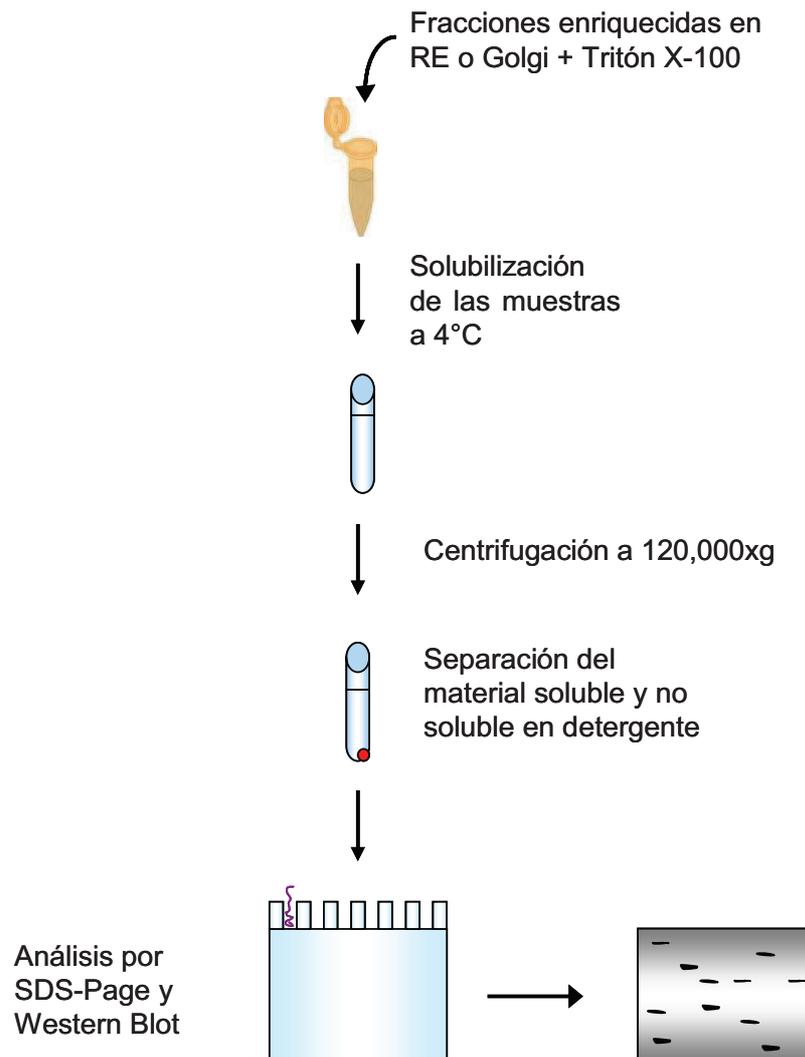
### **Marcación con anticuerpos y Western Blot**

Para evidenciar las bandas se realizó la incubación de las membranas con anticuerpos primarios dirigidos contra la proteína de interés. Para Golgi utilizamos el anticuerpo primario anti-Syntaxina 6, para RE el anticuerpo anti-Calnexina y para marcar AChR utilizamos los anticuerpos H-101, y mAb210. Primeramente se bloquearon los sitios inespecíficos incubando las membranas con 5% de leche descremada en buffer TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) durante 2 h, a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego se hicieron 4 lavados de 5 min c/u con buffer TTBS. Se agregó la solución de anticuerpo primario en el título correspondiente en TTBS + 0.5% albúmina y se dejó incubando toda la noche a 4°C con agitación. Se hicieron 5 lavados de 5 min con TTBS y se agregó el anticuerpo secundario correspondiente (acoplado a la enzima peroxidasa) según la especie del anticuerpo primario. La dilución del anticuerpo secundario se hizo también en TTBS-0.5% albúmina. Se dejaron incubando las membranas durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Se realizaron luego 4 lavados de 5 min con TTBS y un último lavado de 5 min con TBS (buffer TTBS sin Tween 20). Se revelaron las bandas con reactivo de quimioluminiscencia utilizando placas Kodak BioMax XAR Film.

### **Ensayos de solubilización del AChR en Tritón X-100 en frío**

Las fracciones enriquecidas en Golgi y RE se sometieron a solubilización con 1% de Tritón X-100 a 4°C, durante 30 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 120.000xg durante 1 h a 4°C, obteniéndose así un sobrenadante

(material soluble en detergente) y un pellet (material insoluble en detergente). Se analizó la presencia del AChR en dichas fracciones por SDS-Page y Western blot, revelando con el anticuerpo H-101 o mAb210 según el caso (Esquema 4).



**Esquema 4. Solubilización del AChR con 1% de Tritón X-100 a 4°C.**

Diagrama de la obtención de “DRMs” de las fracciones enriquecidas en RE y Golgi y su posterior análisis por SDS-Page y Western Blot utilizando anticuerpos contra el AChR.

## Resultados

### 1. Evaluación del contenido de colesterol y fosfolípidos luego del tratamiento con Mev

Las Tablas 1 y 2 muestran el contenido de colesterol y fosfolípidos respectivamente de células CHO-K1/A5 controles crecidas en medio completo Ham's F-12 y aquellas tratadas con Mev. En las células tratadas con Mev (Nutridoma-BO + Mev 0.5  $\mu$ M) los niveles de colesterol libre disminuyeron un 40% respecto de los controles. Los ésteres de colesterol (minoritarios) mostraron una tendencia a disminuir luego del tratamiento con Mev, pero las diferencias respecto de los controles no fueron significativas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Contenido de colesterol y ésteres de colesterol en células CHO-K1/A5 crecidas bajo diferentes condiciones experimentales.

Lípido	Medio completo Ham's F-12 (5)	Medio completo+ Mev (6)	Nutridoma (7)	Nutridoma + Mev (7)
<b>Colesterol</b>	45 $\pm$ 9.5	37 $\pm$ 5.3	31 $\pm$ 7.0*	27 $\pm$ 5.4**
<b>Ésteres de colesterol</b>	22 $\pm$ 5.3	13 $\pm$ 3.8*	17 $\pm$ 3.5	13 $\pm$ 5.5*
<b>Ésteres de colesterol/ colesterol</b>	0.48	0.36	0.54	0.49

Los datos están expresados como nmol de lípido/mg de proteína y son el promedio  $\pm$  D.E. del número de muestras indicado entre paréntesis. \*p<0.025; \*\*p<0.005 con respecto al valor control, medio completo.

En cuanto al contenido de glicerofosfolípidos, las células tratadas con Mev no mostraron diferencias significativas respecto a los valores hallados para las células controles (Tabla 2). Por lo tanto, el tratamiento con Mev fue efectivo para lograr la

disminución del contenido de colesterol celular sin afectar los niveles de otros lípidos celulares.

**Tabla 2.** Contenido de fosfolípidos en células CHO-K1/A5 crecidas bajo diferentes condiciones experimentales.

Fosfolípido	Medio completo Ham's F-12	Medio completo + Mev	Nutridoma	Nutridoma + Mev
PS	8.7 ± 1.7	7.4 ± 1.6	8.9 ± 1.4	11.6 ± 2.8
PI	7.2 ± 0.6	8.4 ± 0.3	9.0 ± 2.7	8.4 ± 0.6
SM	8.3 ± 2.0	11.0 ± 1.3	11.1 ± 1.5	10.1 ± 0.6
PC	49.8 ± 3.3	46.4 ± 1.4	43.8 ± 2.0	43.5 ± 3.3
PE	26.0 ± 0.1	27.0 ± 1.9	27.2 ± 1.1	26.3 ± 3.5

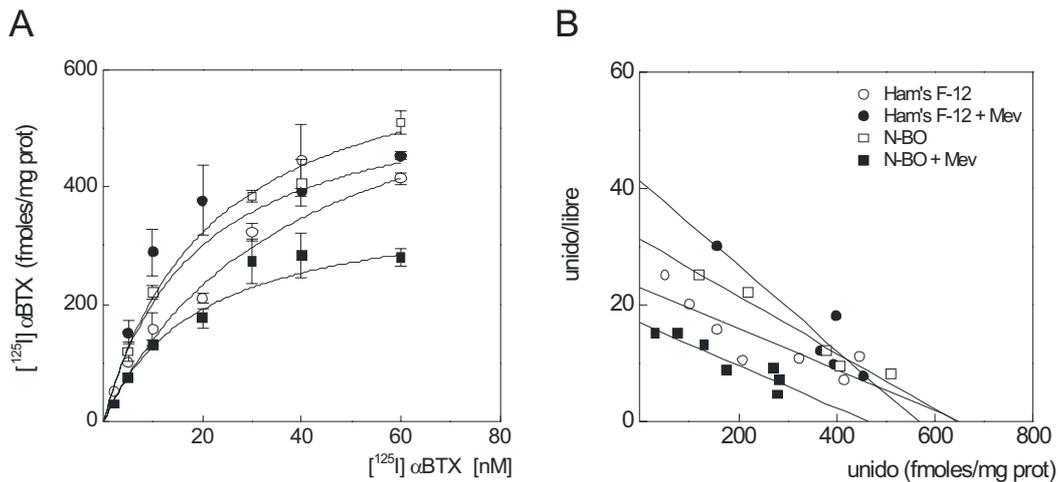
Los datos están expresados como porcentaje y son promedio ± D.E. (PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina.

## 2. Ensayos de unión de [<sup>125</sup>I] αBTX

### 2.1. Evaluación del número de AChRs de superficie y de su afinidad por el ligando específico αBTX.

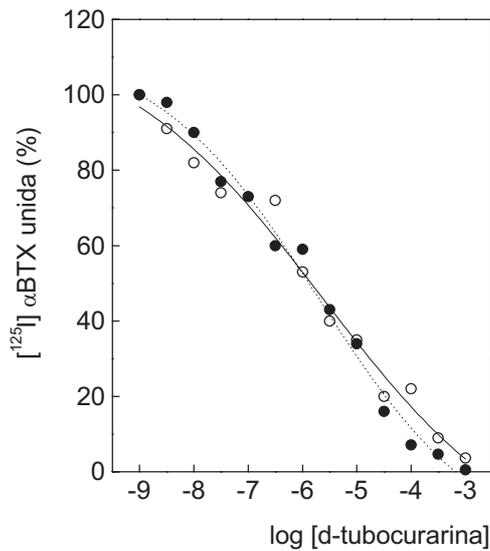
Para evaluar si el tratamiento con Mev y consecuente cambio en los niveles de colesterol afectaban la expresión del AChR en superficie, se efectuaron experimentos de unión con el antagonista competitivo [<sup>125</sup>I] αBTX. Para ello realizamos curvas de saturación incubando las células con concentraciones crecientes (1-60 nM) de [<sup>125</sup>I] α BTX en el medio de cultivo (Fig. 10A). El nivel de saturación se halló a una concentración de ligando entre 40-60 nM. A partir de las curvas de saturación realizamos las correspondientes transformadas de Scatchard (Fig. 10B), y determinamos el  $B_{máx}$  y la  $Kd_{ap}$  para las distintas condiciones experimentales. El

tratamiento con 0.5  $\mu\text{M}$  de Mev durante 48 h en medio Nutridoma-BO produjo una disminución significativa (46%) en el número de AChRs de superficie respecto de los valores obtenidos para las células controles crecidas en medio completo (Figs. 10A y B, y Tabla 3). Sin embargo la afinidad del AChR por [ $^{125}\text{I}$ ]  $\alpha\text{BTX}$  no sufrió cambios (Fig. 10B y Tabla 3).



**Figura 10. Ensayos de unión de [ $^{125}\text{I}$ ]  $\alpha\text{BTX}$ .** Curvas de saturación de [ $^{125}\text{I}$ ]  $\alpha\text{BTX}$  (A) y las respectivas transformadas de Scatchard (B) correspondientes a AChRs presentes en la superficie de células CHO-K1/A5 crecidas bajo las diferentes condiciones experimentales.

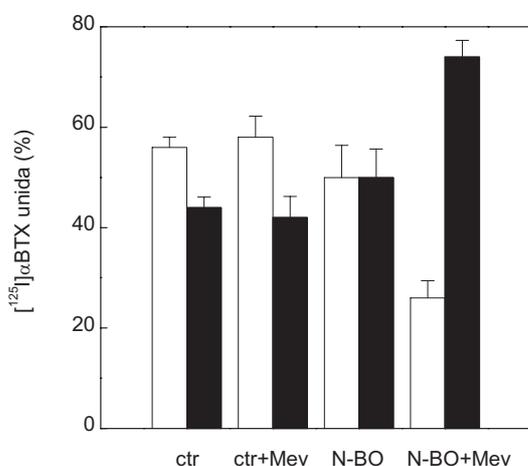
Para corroborar que el tratamiento con Mev no provocaba cambios en la afinidad del AChR por  $\alpha\text{BTX}$ , se realizaron ensayos de desplazamiento de [ $^{125}\text{I}$ ]  $\alpha\text{BTX}$  por el antagonista competitivo *d*-TC. El resultado obtenido para células CHO-K1/A5 crecidas en medio Nutridoma-BO en la presencia de Mev fue similar al hallado en células cultivadas en medio completo Ham's F-12. Se obtuvieron valores de  $\text{IC}_{50}$  de 5.6-5.7  $\mu\text{M}$  para ambas condiciones experimentales (Fig. 11). Por lo tanto, ya sea a partir de las transformadas de Scatchard como de los ensayos de desplazamiento, podemos concluir que la afinidad para el antagonista colinérgico no se modifica luego de la depleción de colesterol mediada por Mev.



**Figura 11. Curvas de desplazamiento de  $[^{125}\text{I}] \alpha\text{BTX}$ .** Curvas de desplazamiento de  $[^{125}\text{I}] \alpha\text{BTX}$  por las concentraciones indicadas del antagonista *d*-TC en células CHO-K1/A5 controles crecidas en medio completo Ham's F-12 (○) o en la presencia de 0.5  $\mu\text{M}$  Mev en medio Nutridoma-BO por 48 h (●).

## 2.2. Estudios de la distribución del AChR

La disminución del AChR de superficie inducida por Mev no fue acompañada por cambios en el número de receptores totales (Tabla 3). La relación AChR intracelular/superficie fue afectada significativamente en las células depletadas de colesterol:  $74 \pm 3.3\%$  del AChR permaneció en compartimientos intracelulares en las células tratadas con Mev, en comparación con el  $44 \pm 2.1\%$  de AChR hallado a nivel intracelular en las células CHO-K1/A5 controles (Fig. 12).



**Figura 12. Distribución del AChR en las células CHO-K1/A5.** Porcentaje de AChR de superficie (barras blancas) e intracelular (barras negras) detectado mediante ensayos de unión de  $[^{125}\text{I}] \alpha\text{BTX}$  en células CHO-K1/A5 crecidas bajo las diferentes condiciones experimentales. El número de receptores intracelulares fue calculado como la diferencia entre el número de receptores totales y el número de receptores de superficie.

**Tabla 3.** Unión de [<sup>125</sup>I] αBTX en células CHO-K1/A5 crecidas bajo diferentes condiciones de cultivo.

	Medio Completo	Medio completo + Mev	Nutridoma	Nutridoma + Mev
[ <sup>125</sup> I] αBTX de superficie	647±30	595±25	575±40 *	352±34 *** (**)
Kd <sub>ap</sub> de [ <sup>125</sup> I] αBTX de superficie	26±2.1	15±2.8	19±0.7	23±5.4
[ <sup>125</sup> I] αBTX total	1155±150	1021±176	1171±138	1348±270

Los valores de AChR de superficie y total están expresados como fmoles de [<sup>125</sup>I] αBTX específicamente unida/mg proteína. Los valores de B<sub>máx</sub> y Kd<sub>app</sub> fueron obtenidos de las correspondientes transformadas de Scatchard de las curvas de saturación con [<sup>125</sup>I] αBTX en el rango 5-60 nM. Los resultados son promedio ± D.E. de tres experimentos individuales. \*p<0.05; \*\*\*p<0.001 con respecto al valor control, medio completo. (\*\*p<0.005 con respecto a medio Nutridoma BO).

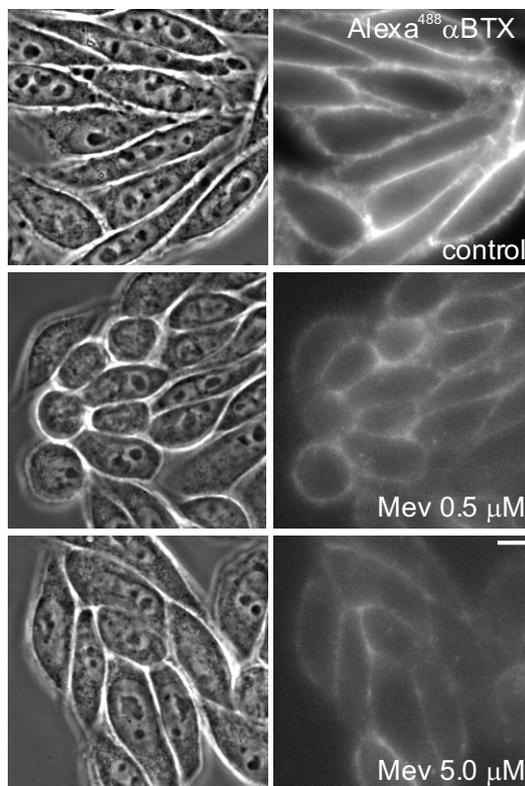
### 3. Evaluación de la distribución del AChR por microscopía de fluorescencia

#### 3.1. Distribución del AChR de superficie

Recurrimos al empleo de la microscopía de fluorescencia como herramienta para evaluar la distribución del AChR en las células depletadas de colesterol. Para ello se marcó el AChR de superficie con αBTX derivatizada con el fluoróforo Alexa<sup>488</sup> (Alexa<sup>488</sup>αBTX). El patrón de fluorescencia de superficie observado en las células CHO-K1/A5 tratadas con Mev no difirió del observado en las células controles (Fig. 13A), siguiendo en ambos casos una distribución uniforme a lo largo del perímetro celular. Sin embargo, sí pudimos observar cambios en la intensidad de la señal fluorescente, con disminución de la señal correspondiente a receptores marcados con

Alexa<sup>488</sup>αBTX en las células tratadas con Mev, y en concordancia con los resultados obtenidos de ensayos con toxina radioactiva. Este efecto fue ya aparente a la concentración 0.5 μM de Mev (Fig. 13A y B), con una reducción de la intensidad de fluorescencia a menos del 50% respecto de la hallada en células controles. Concentraciones de Mev mayores (5 μM) produjeron esencialmente el mismo porcentaje de reducción en los niveles de fluorescencia de superficie (Fig. 13A y B).

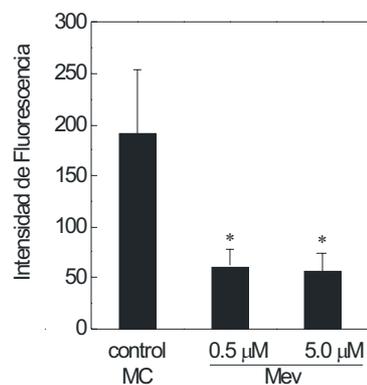
A



**Figura 13. Distribución del AChR de superficie marcado con Alexa<sup>488</sup>αBTX.**

A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de AChRs de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup>αBTX en células CHO-K1/A5 controles crecidas en medio completo y en células incubadas con 0.5 y 5 μM Mev en medio Nutridoma-BO por 48 h. En los paneles de la izquierda se observan las correspondientes imágenes de contraste de fase en cada condición. Escala: 10 μm. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa de Alexa<sup>488</sup>αBTX en la superficie de células CHO-K1/A5 crecidas bajo las condiciones experimentales indicadas en (A). \*p< 0.0001.

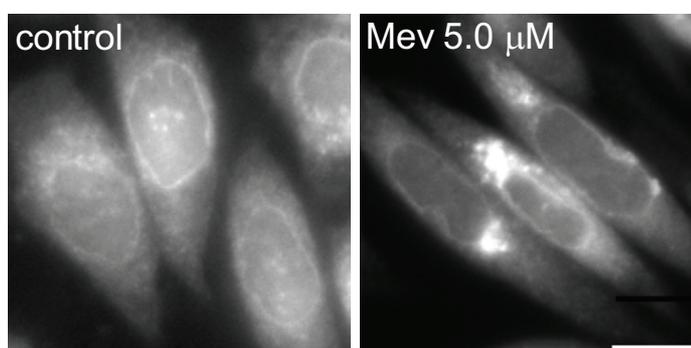
B



### 3.2. Determinación del AChR intracelular

#### 3.2.1. Marcado del AChR con Alexa<sup>594</sup>αBTX

En células CHO-K1/A5 controles los AChR intracelulares marcados con Alexa<sup>594</sup>αBTX mostraron una distribución de la marca fluorescente mayormente uniforme (Fig. 14, panel de la izquierda). El tratamiento con Mev cambió este patrón de fluorescencia: la marca fluorescente adquirió una distribución más compartimentalizada y perinuclear (Fig. 14, panel de la derecha), compatible con la acumulación del AChR en el aparato de Golgi.

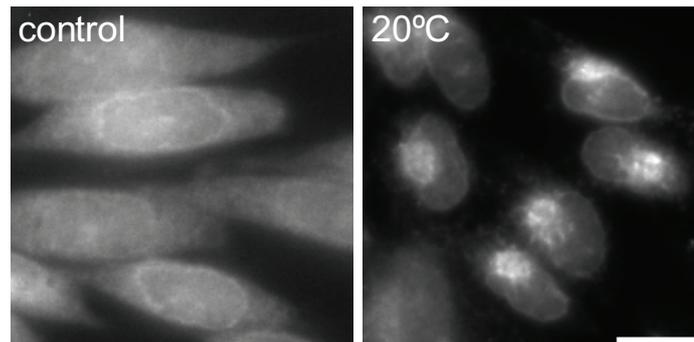


**Figura 14. Distribución del AChR intracelular marcado con Alexa<sup>594</sup>αBTX.** Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando la distribución de los AChRs intracelulares marcados con Alexa<sup>594</sup>αBTX en células CHO-K1/A5 controles crecidas en medio completo (panel de la izquierda) y en células tratadas con 5 μM Mev en medio Nutridoma-BO por 48 h (panel de la derecha). Escala: 10 μm.

#### 3.2.2. Arresto del AChR en el aparato de Golgi

Con el propósito de definir la precisa localización intracelular del AChR acumulado en las células depletadas de colesterol, se recurrió en primer lugar a la acumulación artificial del AChR inducida por incubación de las células CHO-K1/A5 a 20°C. Este procedimiento provoca el bloqueo del tráfico proteico en células CHO-K1, principalmente a nivel del TGN (Xia y col., 1997). El patrón de fluorescencia

correspondiente al AChR marcado con Alexa<sup>594</sup>αBTX en las células incubadas a 20°C fue muy similar al observado en las células tratadas con Mev (Fig. 15, panel de la derecha); en ambos casos la fluorescencia se distribuyó mayoritariamente en la región perinuclear, en un compartimiento de tipo Golgiano.

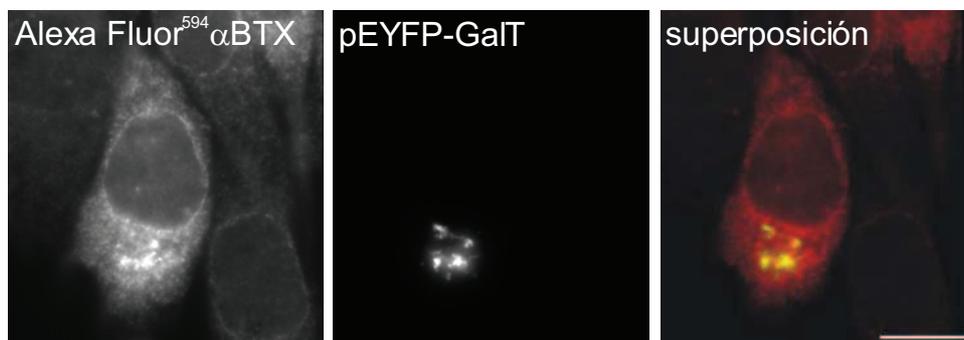


**Figura 15. Acumulación artificial del AChR intracelular en el aparato de Golgi.** Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando la distribución de los AChRs intracelulares marcados con Alexa<sup>594</sup>αBTX en células CHO-K1/A5 controles crecidas en medio completo (panel de la izquierda) y en células incubadas a 20°C durante 2,5 h para favorecer el arresto del tráfico proteico en el TGN (panel de la derecha). Escala: 10 μm.

### 3.2.3. Colocalización del AChR con el marcador de *trans*-Golgi/TGN, pEYFP-GalT

Para confirmar la localización en Golgi de los AChRs intracelulares en las células depletadas de colesterol, las células CHO-K1/A5 tratadas con Mev fueron transfectadas en forma transiente con el vector que codifica para la proteína de fusión proteína fluorescente amarilla/β1,4-galactosiltransferasa humana (pEYFP-GalT). Se ha visto que la enzima GalT fusionada con la proteína fluorescente verde (GFP-GalT) colocaliza con la GalT endógena en células HeLa durante todos los estadios del ciclo celular (Zaal y col., 1999). Se sabe además que esta enzima se localiza a nivel de las cisternas del *trans*-Golgi (Roth y Berger, 1982) y del TGN (Lucocq y col., 1989; Nilsson y col., 1993), con lo cual puede ser utilizada como un marcador de dichos

compartimientos intracelulares. El AChR intracelular se marcó con Alexa<sup>594</sup>αBTX. En las células tratadas con Mev, las regiones de mayor intensidad de fluorescencia correspondiente a Alexa<sup>594</sup>αBTX (Fig. 16, panel de la izquierda) exhibieron un elevado grado de colocación con el marcador de *trans*-Golgi/TGN (Fig. 16, panel de la derecha, superposición).

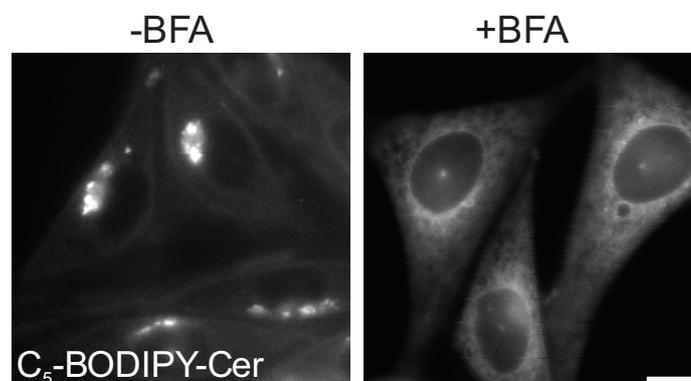


**Figura 16. Ensayo de colocación del AChR con pEYFP-GalT.** Colocalización del AChR intracelular marcado con Alexa<sup>594</sup>αBTX (panel de la izquierda) con el marcador de *trans*-Golgi/TGN, pEYFP-GalT (panel medio) en células CHO-K1/A5 tratadas con 5 μM Mev por 48 hs. En el panel de la derecha se muestra la superposición de ambas señales fluorescentes. Escala: 10 μm.

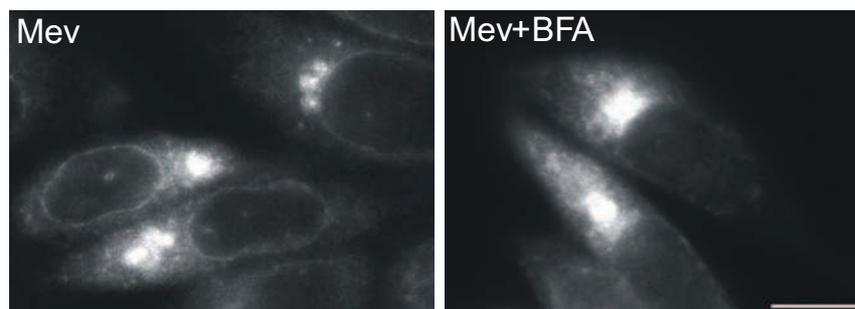
### 3.2.4. Incubación con BFA

Posteriormente recurrimos al uso de la droga BFA para comprobar si el sitio de acumulación intracelular del AChR era el TGN. La BFA es un metabolito fúngico que provoca el tráfico retrógrado de constituyentes de membrana del *cis*-, *medial*- y *trans*-Golgi pero no del TGN hacia el RE (Lippincott-Schwartz y col., 1991; Rosa y col., 1992; Banting y Ponnambalam, 1997; Chardin y McCormick, 1999; Watson y Pessin, 2000). Para evaluar la efectividad de la acción de la BFA en nuestro sistema, las células CHO-K1/A5 se incubaron con la sonda lipídica C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer, la cual es

ampliamente utilizada como marcador del aparato de Golgi (Pagano y col., 1991), dando una marca fluorescente claramente perinuclear (Fig. 17, panel de la izquierda). Luego del tratamiento BFA dicha marca se redistribuyó en la totalidad del citoplasma celular siguiendo el patrón de un fino reticulado (Fig. 17, panel de la derecha), indicando que la BFA era efectiva en promover la disrupción del aparato de Golgi. Una vez realizado este control, las células CHO-K1/A5 depletadas de colesterol se trataron con 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de BFA por 30 min a 37°C en presencia de Mev y se marcó el AChR intracelular con Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX. Luego de la incubación con BFA la distribución de fluorescencia correspondiente a receptor intracelular no sufrió cambios, permaneciendo en la región perinuclear, donde se encuentran usualmente el TGN y endosomas tardíos (Fig. 18, panel de la derecha). Esto fue un claro indicio de que la acumulación del AChR estaba ocurriendo a nivel del TGN.



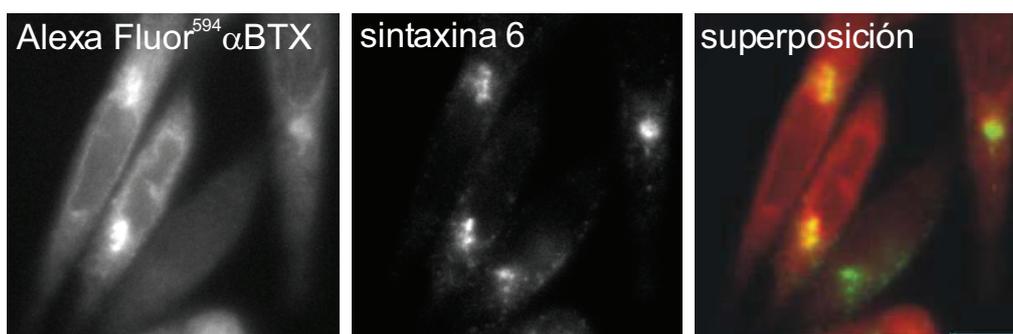
**Figura 17. Marcación del aparato de Golgi con C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer y tratamiento con BFA.** Distribución de la sonda lipídica C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer, utilizada como marcador del aparato de Golgi (Pagano y col., 1991), en células CHO-K1/A5 controles incubadas en ausencia (panel de la izquierda) o presencia de BFA (panel de la derecha). Escala: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18. Tratamiento con BFA de las células depletadas de colesterol por Mev.** Distribución de la fluorescencia correspondiente a AChRs intracelulares marcados con Alexa<sup>594</sup>  $\alpha$ BTX en células CHO-K1/A5 tratadas con 5  $\mu$ M Mev por 48 h (panel de la izquierda) y en aquellas tratadas con 5  $\mu$ M Mev por 48 h seguidas de incubación con 2,5  $\mu$ g/ml de BFA por 30 min a 37°C (panel de la derecha). Escala: 10  $\mu$ m.

### 3.2.5. Colocalización del AChR con el marcador de TGN, sintaxina 6

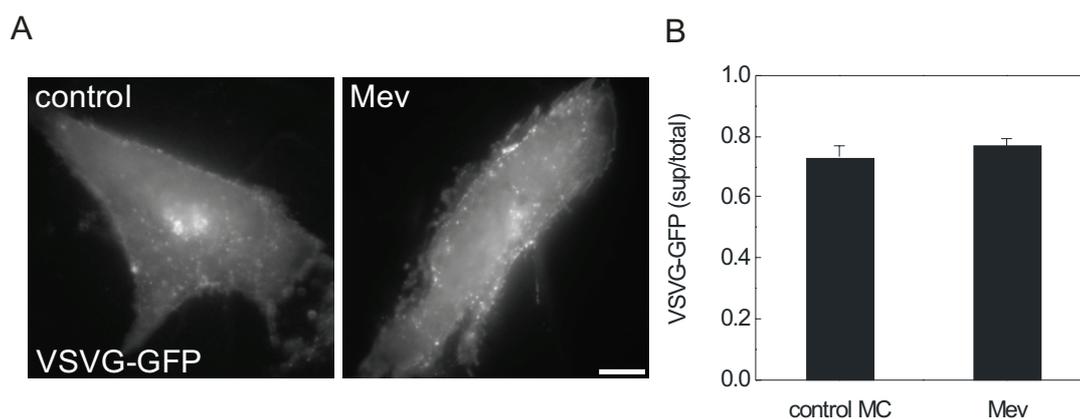
Finalmente confirmamos la localización del AChR acumulado intracelularmente por tratamiento con Mev, mediante experimentos de inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-sintaxina 6, un marcador específico del compartimiento TGN (Vandenbulcke y col., 2000). Sintaxina 6 es un miembro de la familia de las sintaxinas, cuyos constituyentes son requeridos para diversas vías de tráfico vesicular intracelular. Estudios de microscopía electrónica han permitido demostrar la localización de la sintaxina 6 primariamente en el TGN y pequeñas vesículas en la vecindad de estructuras de tipo endosoma (Bock y col., 1997). En células CHO-K1/A5 tratadas con 5.0  $\mu$ M de Mev, el AChR intracelular y sintaxina 6 mostraron una superposición parcial de las respectivas señales fluorescentes (Fig. 19, panel de la derecha), reforzando la idea de que en las células depletadas de colesterol por tratamiento con Mev, el AChR queda retenido a nivel del TGN, ocasionando la disminución de los receptores de superficie.



**Figura 19. Ensayo de colocalización del AChR con el marcador de TGN syntaxina 6.** Colocalización del AChR intracelular marcado con Alexa<sup>594</sup>αBTX (panel de la izquierda) con el marcador de TGN, syntaxina-6 (panel medio) en células CHO-K1/A5 tratadas con 5 μM Mev por 48 hs. En el panel de la derecha se muestra la superposición de ambas señales fluorescentes. Escala: 10 μm.

#### 4. Expresión en superficie de la proteína VSVG-GFP

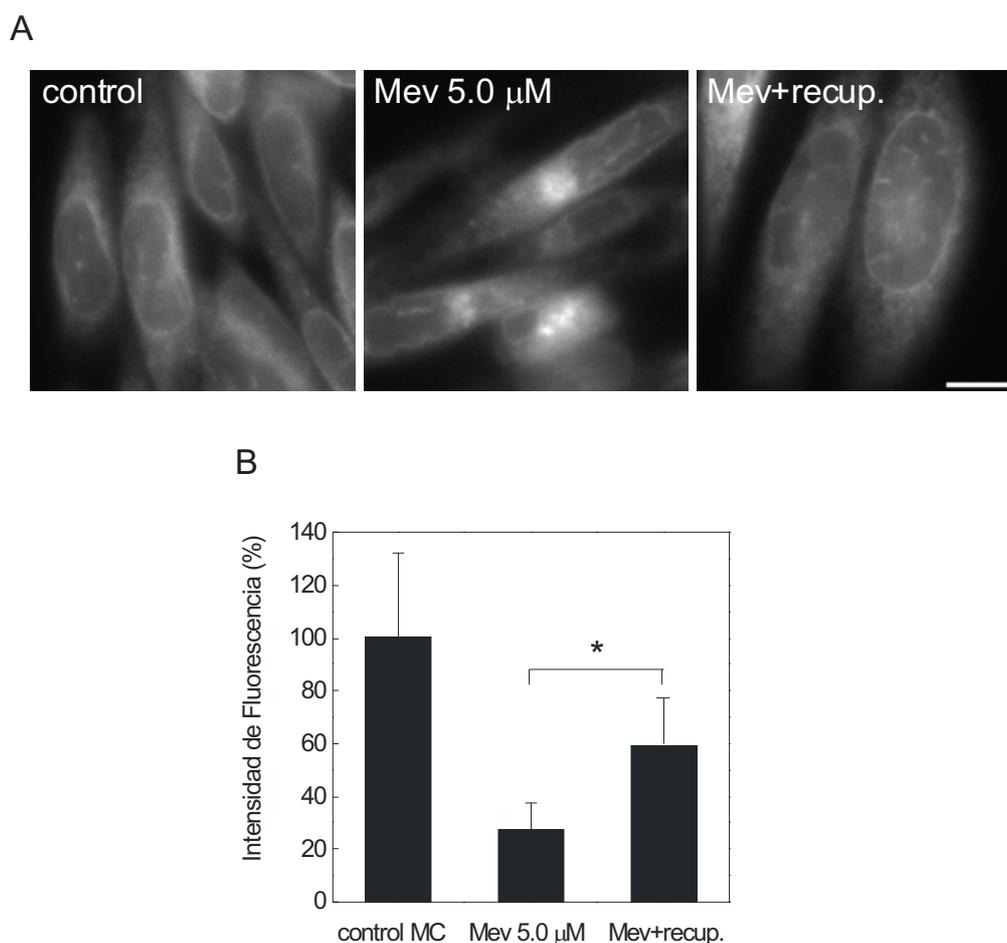
Para determinar si el tratamiento con Mev afectaba el tráfico de otras proteínas además del AChR, las células CHO-K1/A5 se transfectaron en forma transiente con el ADNc codificando para la proteína fluorescente de fusión VSVG-GFP y se incubaron posteriormente con Mev. La VSVG-GFP es una sonda eficiente para evaluar el comportamiento de proteínas integrales de membrana a lo largo del camino exocítico (Kuhle y col., 2006). Dado que una proteína transfectada en forma transiente puede tener variaciones en los niveles de expresión de una célula a otra, se midió la intensidad de fluorescencia de VSVG-GFP en superficie y se normalizó dicho valor dividiendo por la intensidad de fluorescencia total para cada célula en particular. No se observaron diferencias significativas en la relación intensidad de VSVG-GFP en superficie/intensidad total entre células CHO-K1/A5 controles y tratadas con Mev (Fig. 20) indicando que la alteración del tráfico del AChR por depleción metabólica del colesterol no fue mediada por un mecanismo generalizado.



**Figura 20. Transfección transiente con la proteína de fusión VSVG-GFP.** A) Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondiente a la proteína VSVG-GFP expresada en células CHO-K1/A5 controles (panel de la izquierda) y tratadas con 5  $\mu$ M Mev (panel de la derecha). B) Las barras representan la relación entre la señal de fluorescencia de VSVG-GFP en la superficie y la señal de fluorescencia total para cada condición experimental. Escala: 10  $\mu$ m.

## 5. Reversibilidad del efecto de Mev

Quisimos indagar si el efecto provocado por la droga Mev sobre el tráfico del AChR hacia la membrana plasmática constituía un proceso reversible. Para ello, las células CHO-K1/A5 se trataron con 5  $\mu$ M de Mev por 48 h en medio delipidado Nutridoma-BO, seguidas de incubación por 24 horas adicionales en medio completo Ham's F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Luego de este tratamiento, se logró reestablecer el patrón de fluorescencia intracelular correspondiente a receptores marcados con Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX, siendo este semejante al observado en las células controles (Fig. 21A). Además pudimos observar una recuperación parcial en la intensidad de la señal fluorescente de los AChRs de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX (Fig. 21B). Ambos resultados nos permitieron determinar que la inhibición del tráfico del AChR por tratamiento con Mev se trataba de un mecanismo reversible.

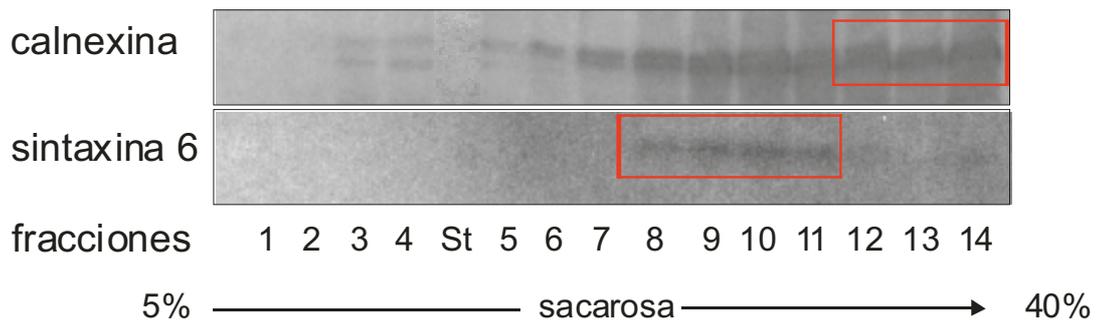


**Figura 21. Ensayos de recuperación.** A) Distribución de la fluorescencia correspondiente a AChRs intracelulares marcados con Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX en células CHO-K1/A5 controles crecidas en medio completo Ham's F-12 conteniendo 10% de suero fetal bovino (panel de la izquierda), en células tratadas con 5  $\mu$ M Mev en medio Nutridoma-BO por 48 h (panel medio) y en aquellas tratadas con 5  $\mu$ M Mev por 48 h seguidas de 24 h de incubación en medio completo (panel de la derecha). Escala: 10  $\mu$ m. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de receptores marcados con Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX presentes en la superficie de células CHO-K1/A5 crecidas bajo las condiciones experimentales descritas en (A). \*  $p < 0.01$ .

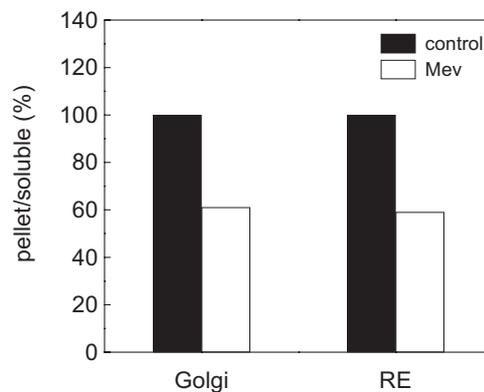
---

## 6. Estudios de la solubilidad en Tritón X-100 del AChR presente en membranas enriquecidas en Golgi y RE

Se sabe que los dominios enriquecidos en colesterol y SLs, denominados balsas lipídicas, existen no sólo a nivel de la membrana plasmática sino también en membranas de RE y aparato de Golgi. Estas balsas actúan en el TGN como plataformas para el direccionamiento de proteínas (Simons y van Meer, 1988; Simons e Ikonen, 1997). Se ha reportado además que en células COS-7 el tráfico del AChR junto con la proteína rapsina, es mediado por asociación con microdominios enriquecidos en colesterol y SLs (Marchand y col. 2002). La técnica más ampliamente utilizada para aislar dichos dominios es mediante su extracción con detergentes. A bajas temperaturas, los mismos son resistentes a detergentes no iónicos como el Tritón X-100, y flotan en las capas más livianas de un gradiente de densidad (Brown y London, 2000), describiéndose los usualmente como membranas resistentes a detergentes o “DRMs” (Brown y London, 1998; 2000; Skwarek, 2004). Quisimos determinar en nuestro modelo experimental la posible asociación del AChR con DRMs a lo largo del camino exocítico, y ver si esta asociación se modificaba luego del tratamiento con Mev. Para ello realizamos en primer lugar ensayos de fraccionamiento subcelular (ensayos de fraccionamiento A y B, detallados en los esquemas 2 y 3) con el objeto de obtener fracciones enriquecidas en membranas de RE y Golgi. La efectividad de ambos ensayos para lograr la separación de las fracciones se evaluó midiendo el enriquecimiento en los marcadores específicos para RE y Golgi, calnexina y syntaxina-6 respectivamente. Para el caso del ensayo de fraccionamiento A, las fracciones 8-11 correspondieron a las fracciones enriquecidas en el marcador de Golgi, y las fracciones 12-14 a las enriquecidas en el marcador de RE (Fig. 22). Para el ensayo de fraccionamiento B, las fracciones enriquecidas en el marcador de Golgi correspondieron a las fracciones superior e interfase, mientras que las enriquecidas en el marcador de RE correspondieron a las fracciones inferior y sedimento (Fig. 24).

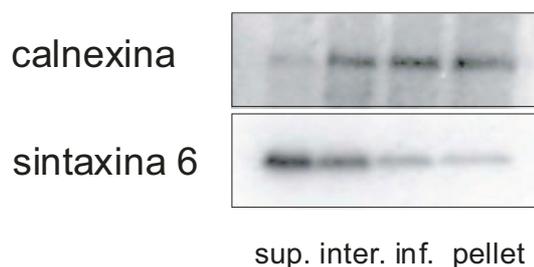


**Figura 22. Ensayo de fraccionamiento subcelular A.** Inmunoblots mostrando las fracciones enriquecidas en los marcadores de RE (calnexina; fracciones 12-14) y aparato de Golgi (syntaxina-6; fracciones 8-11) separadas según el protocolo de fraccionamiento A.

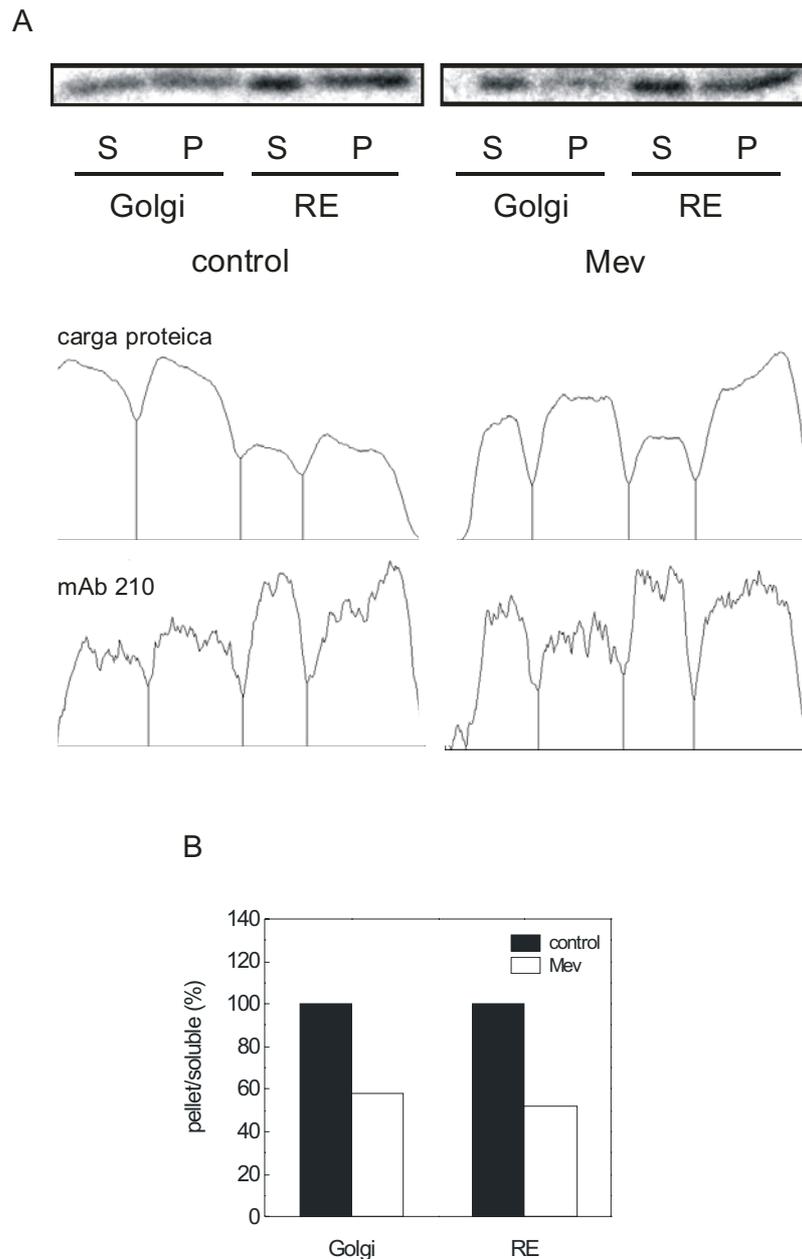


**Figura 23. Ensayo de solubilidad en Tritón-X100 a 4°C del AChR proveniente de fracciones enriquecidas en RE y Golgi, obtenidas mediante el ensayo de fraccionamiento A.** Proporción del AChR presente en pellet/soluble en las fracciones enriquecidas en RE o Golgi provenientes de células CHO-K1/A5 controles (barras negras) o tratadas con 5  $\mu$ M Mev (barras blancas), luego de la solubilización con 1% de Tritón X-100 y la posterior centrifugación a 120.000xg. El AChR fue marcado con el anticuerpo H-101.

Se colectaron y juntaron las fracciones correspondientes a RE y Golgi en cada caso y se solubilizaron luego con Tritón X 1%-100 a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 120.000xg obteniéndose así un sobrenadante (material soluble en detergente) y un sedimento (material insoluble en detergente, o “DRM”). Se analizó la presencia del AChR en dichas fracciones por SDS-Page y Western blot, revelando con anticuerpos anti-AChR. Con ambos ensayos de fraccionamiento obtuvimos el mismo resultado: en las células tratadas con Mev disminuyó la relación  $[AChR \text{ en "DRM"} / AChR \text{ en soluble}]$  respecto de los valores controles, tanto en las fracciones de RE como en las de Golgi (Figs. 23 y 25). Esto se traduce como un aumento del AChR presente en fracciones “no DRM” en las membranas enriquecidas en RE y Golgi y estaría indicando que en las células controles el AChR particiona (al menos en parte) en dominios tipo “balsa” presentes en las membranas del RE y Golgi. La disrupción de estos dominios por depleción metabólica del colesterol causa una redistribución del AChR de los dominios “balsa” (sedimento, “DRM”) a los dominios “no DRM” (soluble), lo que podría explicar la alteración en el tráfico exocítico del AChR hacia la membrana plasmática en las células tratadas con Mev.



**Figura 24. Ensayo de fraccionamiento subcelular B.** Inmunoblots mostrando las fracciones enriquecidas en los marcadores de RE (calnexina; fracciones inferior y pellet) y aparato de Golgi (syntaxina-6; fracciones superior e interfase) separadas según el protocolo de fraccionamiento B.



**Figura 25. Ensayo de solubilidad en Tritón-X100 a 4°C del AChR presente en membranas enriquecidas en RE y Golgi, obtenidas por el ensayo de fraccionamiento B.** A) Inmunoblots de AChR (marcado con el anticuerpo mAb210) proveniente de fracciones enriquecidas en RE o Golgi de células CHO-K1/A5, controles o tratadas con 5  $\mu$ M Mev, luego de la solubilización con Tritón X-1001% a 4°C por 30 min. y posterior centrifugación a 120.000xg (panel superior). Se muestra además el análisis densitométrico para cada fracción, correspondiendo el panel medio a la carga proteica (medida por tinción de la membrana de Immobilon con rojo Ponceau) y el panel inferior a las bandas del AChR marcado con el anticuerpo mAb210. B) Porcentaje del AChR presente en pellet/soluble en las fracciones descritas en (A). Las barras negras corresponden a las células CHO-K1/A5 controles y las barras blancas a las células tratadas con 5  $\mu$ M Mev.

---

## Discusión

La disminución de los niveles de colesterol celular en células CHO-K1/A5 inducida por la droga Mevinolina, inhibidora de la enzima limitante en la biosíntesis del colesterol HMG-CoA reductasa, provocó la disminución del número de AChRs presentes en la membrana plasmática con el concomitante aumento en el nivel de receptores intracelulares (Figs. 10, 12 y 13). Dado que en los ensayos de unión de [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ BTX no se observaron diferencias en los valores de AChR total entre células controles y tratadas con Mev (Tabla 3), podemos afirmar que la disminución del AChR de superficie por depleción metabólica crónica del colesterol por Mev no se debió a alteraciones en la síntesis de nuevos receptores.

Como se indicó anteriormente, en las células tratadas con Mev además de detectar una disminución en el número de receptores de superficie, observamos el aumento del número de receptores retenidos en el interior celular. Un mecanismo posible para la retención del AChR podría involucrar una deficiencia en el ensamblado del mismo. Cuando la subunidad  $\alpha$  no se ensambla con el resto de las subunidades, no se transporta a la membrana plasmática, quedando retenida en el interior celular (Blount y Merlie, 1988; Wang y col., 2002), aunque tiene la capacidad de ligar  $\alpha$ BTX (Smith y col., 1987). Las subunidades del AChR abandonan el RE solo como pentámeros totalmente ensamblados (Smith y col., 1987; Gu y col., 1989; Ross y col., 1991; Gelman y col., 1995). Esto se debe a la presencia de chaperonas en el RE y señales específicas en las subunidades del AChR que actúan como parte de la maquinaria de control de calidad regulando el tráfico proteico desde el RE al Golgi, manteniendo a las proteínas inmaduras en el RE (Wang y col., 2002; ver revisión en Wanamaker y col., 2003). Sin embargo, si este hubiera sido el caso para las células tratadas con Mev, el AChR intracelular marcado con Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX debería haberse distribuido en todo el citoplasma de la célula, siguiendo el patrón de los marcadores de

---

RE, tal como lo reportaron Baier y Barrantes (2007) y Roccamo y Barrantes (2007). En las células tratadas con Mev pudimos efectivamente comprobar la retención del receptor en un compartimiento intracelular, pero las características de la marca fluorescente correspondiente a AChR fue la que típicamente aparece cuando una proteína queda retenida en el aparato de Golgi, indicando que el receptor completamente ensamblado abandonó exitosamente el RE, alcanzando el aparato de Golgi, pero quedando retenido en este último compartimiento. En este sentido, la acumulación perinuclear del AChR luego del tratamiento con Mev (Fig. 14), el mantenimiento de esta distribución intracelular luego del tratamiento con BFA (Fig. 18), la semejanza de la misma con el patrón del AChR observado en las células incubadas a 20°C (Fig. 15) y la colocalización del AChR con los marcadores de *trans*-Golgi/TGN y TGN, pEYFP-GalT y sintaxina-6 respectivamente (Figs. 16 y 19), son todos indicativos de que la depleción de colesterol inducida por Mev resulta en la acumulación del receptor en el *trans*-Golgi/TGN, y sugieren la participación del colesterol en el tráfico exocítico del AChR desde esta organela hasta la membrana plasmática. En coincidencia con nuestros resultados, Wang y col. (2000) observaron que la depleción de colesterol con la droga Lovastatina (análoga de Mev) causa el bloqueo del tráfico exocítico de la proteína de secreción POMC y su acumulación en el TGN. Estos autores demostraron además la reversibilidad del efecto de Lovastatina, lo que también se asemeja a nuestros resultados, ya que la incubación de las células CHO-K1/A5 previamente tratadas con Mev en medio Ham's F12 completo reestableció parcialmente los niveles de AChR en la superficie celular así como también el patrón de fluorescencia intracelular (Fig. 21).

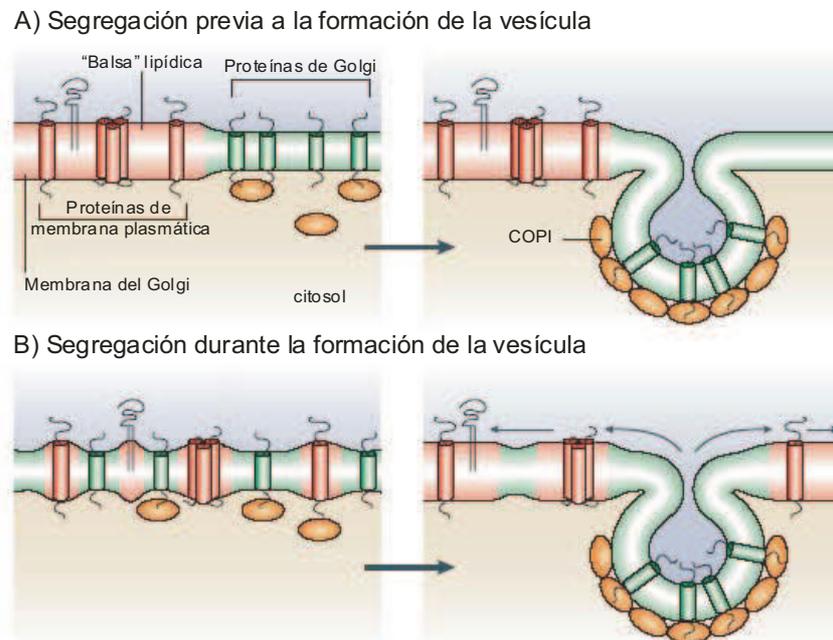
Numerosos estudios indican la presencia de dominios enriquecidos en colesterol y SLs en el aparato de Golgi (Hansen y col., 2000; Gkantiragas y col., 2001; Helms y Zurzolo, 2004) e incluso también se demostró su existencia en las membranas del RE (Bagnat y Simons 2002; Helms y Zurzolo 2004; Browman y col.,

2006). En el TGN estos dominios actúan como plataformas para el direccionamiento de proteínas tanto en células polarizadas como en las no polarizadas (Simons y van Meer, 1988; van Meer y Simons, 1988; ver revisión en Brestcher y Munro, 1993; Simons e Ikonen, 1997; Simons y Toomre 2000; Helms y Zurzolo 2004) y su desestabilización por depleción del colesterol afecta el tráfico de proteínas asociadas a estos microdominios (Burgos y col., 2004; Helms y Zurzolo 2004). Tal es el caso de la proteína carboxipeptidasa E, la cual se asocia con dominios ricos en colesterol y glicoesfingolípidos en el TGN y permanece asociada con esos dominios en los gránulos secretorios derivados del TGN (Dhanvantari y Loh, 2000; Zhang y col., 2003). El tratamiento de las células AtT-20 con Lovastatina causa la pérdida de almacenamiento de carboxipeptidasa E en los gránulos secretorios, con acumulación de la proteína en la región perinuclear (Dhanvantari y Loh, 2000). En forma similar, el tratamiento de monocitos con la droga Sinvastatina (otra estatina análoga de Mev) disminuye la expresión en superficie de moléculas MHC-II. Este efecto se debe a la inhibición del tráfico hacia la membrana plasmática por desestabilización de los dominios enriquecidos en colesterol con los que estas moléculas se asocian (Kuipers y col., 2005). Considerando que el colesterol es un componente importante de las membranas de las células eucariotas (Cress y Gerner, 1980; Brasaemle y Attie, 1990; Hao y col., 2002), su depleción podría afectar el tráfico proteico en general. Sin embargo varios trabajos reportan cierta selectividad en la inhibición del tráfico de proteínas luego de la depleción del colesterol. Esto se comprobó en células BHK, en las cuales la depleción de colesterol por tratamiento con Lovastatina + CDx afectó el transporte desde el TGN a la membrana plasmática de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza (HA) sin afectar el transporte exocítico de la proteína VSVG (Keller y Simons, 1998). En forma similar, Martín-Belmonte y col., (2000) observaron que en células FRT tanto la asociación con DRMs como el transporte a la membrana apical de la proteína HA es dependiente de colesterol. El tratamiento de estas células

con Compactina + CDx disminuyó su insolubilidad en Tritón X-100 así como también la llegada de esta proteína a la membrana apical. Sin embargo el transporte de la proteína E-Caderina (soluble en Tritón X-100) a la membrana basolateral no sufrió alteraciones. Otro ejemplo que podemos citar es el de la proteína priónica PrP. Esta proteína se asocia a balsas lipídicas en el RE, siendo esta asociación dependiente de colesterol (Sarnataro y col., 2002). Sin embargo, cuando las células son depletadas de colesterol, el transporte de PrP a la membrana plasmática no se afecta (Sarnataro y col., 2002) aunque si se observan defectos en su maduración y ensamblado (Sarnataro y col., 2004). Para determinar si en nuestro sistema experimental la inhibición en el tráfico exocítico del AChR por depleción crónica del colesterol respondía a un mecanismo generalizado, transfectamos células CHO-K1/A5 con la proteína fluorescente VSVG-GFP y medimos su expresión en superficie luego de la incubación con Mev. Tal como esperábamos, la depleción crónica del colesterol no alteró los niveles en superficie de una proteína no residente en dominios lipídicos tipo “balsa” como la VSVG (Dukhovny y col., 2006) (Fig. 20) indicando cierta especificidad en la inhibición del tráfico del AChR mediada por Mev, además de sugerir la asociación del receptor con dominios enriquecidos en colesterol a lo largo del camino exocítico. En este sentido, se sabe que el AChR es co-transportado hacia la membrana postsináptica junto con la proteína miristoilada rapsina (Marchand y col., 2000), y en células COS-7 el tráfico de ambas proteínas es mediado por asociación con microdominios enriquecidos en colesterol y SLs (Marchand y col., 2002). Esta asociación del AChR es independiente de rapsina, ya que el receptor se mantuvo en dichos dominios aún en ausencia de expresión de dicha proteína (Marchand y col., 2002). Además, numerosos trabajos destacan la interacción del AChR con dominios enriquecidos en colesterol también a nivel de la membrana plasmática: el receptor nicotínico neuronal  $\alpha 7$  en la superficie de neuronas ciliares colocaliza con microdominios de membrana formando grandes agrupamientos (Brusés y col., 2001).

El tratamiento con CDx provoca la redistribución del receptor en agrupaciones más pequeñas, destacando la importancia del colesterol en la organización del AChR en la superficie celular (Brusés y col., 2001). Más recientemente se pudo demostrar que en la línea celular muscular C2C12, el AChR también se encuentra agrupado en la membrana plasmática y la estabilidad de estas agrupaciones de receptores resultaron ser dependientes del colesterol, ya que la depleción de colesterol por CDx inhibió la formación de dichos acúmulos o dispersó las agrupaciones ya existentes (Campagna y Fallon, 2006; Stetzkowski-Marden y col., 2006; Zhu y col., 2006). Para corroborar la hipótesis de que en células CHO-K1/A5 el transporte de nuevos AChRs hacia la superficie celular está mediado por la asociación del receptor con plataformas lipídicas enriquecidas en colesterol, realizamos experimentos de extracción con Tritón X-100 bajas temperaturas (Brown y London, 2000) en membranas de RE y Golgi obtenidas por fraccionamiento subcelular de células CHO-K1/A5 controles y tratadas con Mev. La presencia del AChR en fracciones livianas de gradientes de sacarosa (las correspondientes a “balsas” lipídicas) luego de la extracción con Tritón X-100 en frío (Brown y London, 2000) fue reportada previamente por Marchand y col. (2002) en células COS-7 y más recientemente por Stetzkowski-Marden y col. (2006) y Zhu y col. (2006) en células C2C12. Aunque existen ciertas controversias entre los resultados de estos dos últimos autores (Stetzkowski-Marden sostiene que la asociación del AChR con DRMs es independiente de agrina, mientras que Zhu afirma que la previa incubación de los miotubos con agrina es necesaria para su localización en dichos dominios) ambos coinciden en el hecho que el AChR es capaz de asociarse con “balsas” lipídicas. Coincidentemente con los resultados expuestos en estos trabajos, pudimos observar una disminución del AChR presente en DRMs de fracciones enriquecidas en RE y Golgi luego del tratamiento con Mev (Figs. 23 y 25), indicando que en células CHO-K1/A5 controles una cierta población de AChRs se encontraría asociada a “balsas” lipídicas presentes en las membranas de RE y Golgi.

Considerando el modelo propuesto por Bretscher y Munro (1993) para el direccionamiento de proteínas en el aparato de Golgi, podríamos plantear un posible mecanismo por el cual el AChR quedaría retenido en el aparato de Golgi luego de la depleción del colesterol por Mev. Según este modelo, las enzimas del Golgi tienen dominios TM generalmente más cortos que las proteínas de membrana plasmática. Esta característica impediría la inclusión de las proteínas de Golgi en los dominios enriquecidos en colesterol y SLs (de mayor grosor) y por el contrario favorecería la inclusión en estos dominios de las proteínas de membrana plasmática. A su vez, la SM y el colesterol son excluidos de las vesículas recubiertas por COPI (Brügger y col., 2000), encargadas del tráfico retrógrado de vesículas entre el RE y el Golgi (ver revisiones en Barlowe, 2000; Mancias y Goldberg, 2005). Esto favorecería la retención de las proteínas de Golgi en dicha organela, mientras que las proteínas de membrana plasmática serían direccionadas a la superficie celular a través de su asociación con “balsas” lipídicas. La desestabilización de los dominios por depleción de colesterol conduciría a la acumulación de las proteínas de superficie en el aparato de Golgi. Sin embargo este modelo no siempre se aplica y la asociación de proteínas con balsas lipídicas no siempre se correlaciona con el ancho de su segmento transmembrana (ver revisión en Brown, 2006). Las proteínas que se incorporan específicamente a dominios de membrana suelen tener modificaciones lipídicas como anclaje por GPI, palmitoilación o miristoilación (Simons e Ikonen, 1997), mientras que las señales que regulan la asociación de proteínas transmembrana a “balsas” lipídicas incluirían palmitoilación, así como también determinadas secuencias de aminoácidos en los segmentos transmembrana o bien en los segmentos citoplasmáticos o extracelulares (ver revisión en Brown, 2006). En el caso del AChR los dominios transmembrana se hallan en íntimo contacto con los lípidos presentes en la bicapa, siendo los segmentos M4 de cada subunidad los más expuestos a los lípidos de la membrana (ver revisión en Barrantes, 2004). Se sabe además que el colesterol es un componente abundante



**Figura 26. Modelos propuestos para el direccionamiento de lípidos y proteínas en el aparato de Golgi.** Las regiones de la membrana ricas en colesterol y SLs (“balsas” lipídicas) tienen mayor grosor que el resto de la membrana. Esto provocaría que las proteínas de Golgi (que poseen segmentos TM cortos) queden excluidas de estos dominios, a diferencia de las proteínas de membrana plasmática (segmentos TM más largos). Las vesículas recubiertas por COPI contienen bajo contenido de colesterol y SLs. Esta segregación de lípidos podría ocurrir previamente (A) o durante (B) la formación de la vesícula. Obtenido de “Lipid traffic: floppy drives and a superhighway”. Holthuis JC y Levine TP. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2005) 6:209-220.

de la membrana postsináptica (Barrantes, 1989) y se ha demostrado su interacción con los segmentos M4, M3 y M1 de cada subunidad, teniendo la mayor interacción con el segmento M4 (Hamouda y col., 2006a). Estas propiedades podrían favorecer la asociación del AChR con dominios enriquecidos en colesterol y SLs. La disrupción de estos dominios por depleción metabólica crónica del colesterol podría alterar las interacciones lípido-proteicas, afectando la inserción del AChR en vesículas de

transporte exocítico, e impidiendo de este modo un correcto tráfico del receptor hacia la membrana plasmática con la acumulación concomitante del AChR a nivel del trans-Golgi/TGN y disminución del número de receptores en la superficie celular.

---

---

## **Capítulo 3**

***Efecto de ceramidas de corta  
(C<sub>6</sub>-ceramidas) y larga (ceramidas  
cerebrales) cadena sobre el tráfico y  
propiedades del AChR en células  
CHO-K1/A5***

---

---

---

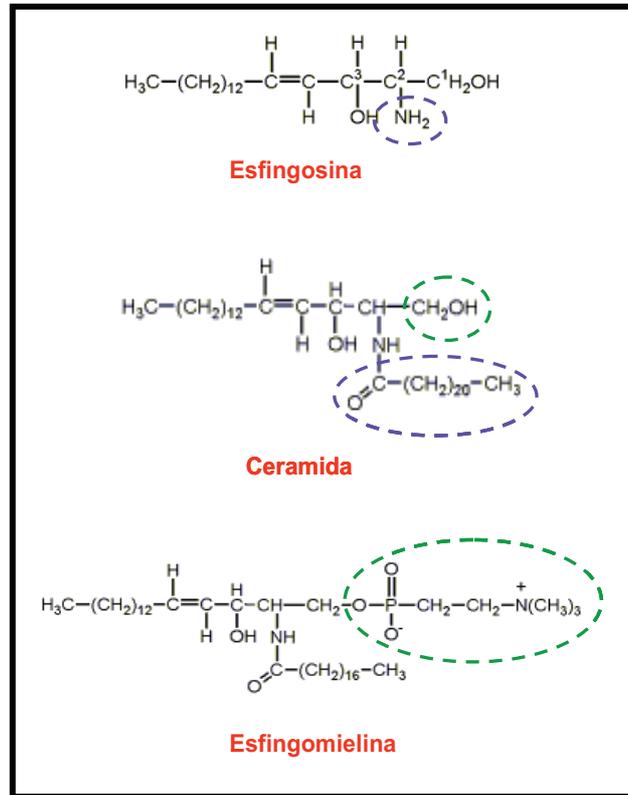
---

## **Efecto de ceramidas de corta (C<sub>6</sub>-ceramidas) y larga (ceramidas cerebrales) cadena sobre el tráfico y propiedades del AChR en células CHO-K1/A5**

### **Introducción**

Hasta fines de la década del 70 la esfingomielina (SM) fue considerada como un lípido meramente estructural, mayormente concentrado en la hemicapa externa de la membrana plasmática. Sin embargo, en las últimas décadas numerosos hallazgos han permitido resaltar el importante papel que cumplen los esfingolípidos (SLs) como moléculas bioactivas, actuando como segundos mensajeros y controlando diversos procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación, crecimiento, senescencia, migración y apoptosis (Spiegel y col., 1996; ver revisiones en Futerman y Hannun, 2004; Posse de Chaves, 2006). Las membranas biológicas de las células eucariotas contienen grandes cantidades de SLs y colesterol, además de glicerofosfolípidos. Los dos primeros lípidos se localizan principalmente en la hemicapa externa de la membrana plasmática (ver revisión en Bollinger y col., 2005). La SM es el SL mayoritario de la membrana celular y está compuesta por una porción hidrofóbica de ceramida (Cer) y una porción hidrofílica, la cual está constituida por la cabeza polar de fosfocolina (Fig. 27). La biosíntesis de SM ocurre en el aparato de Golgi (Jeckel y col., 1990; Futerman y col., 1990). La enzima SM sintetasa transfiere un grupo fosfocolina de la fosfatidilcolina (PC) a la Cer, liberándose como co-producto de esta reacción diacilglicerol (DAG) (Esquema 5), el cual posee a su vez funciones biológicas muy importantes (Wang y Kazanietz, 2006; Carrasco y Merida, 2007). Además de ser el precursor metabólico de la SM, la Cer forma el esqueleto de otros SLs complejos tales como los cerebrósidos y gangliósidos (Esquema 5), cuya síntesis ocurre también a nivel del aparato de Golgi (van Meer y Holthuis, 2000; ver revisión en Maccioni 2007). La Cer a su vez está compuesta por D-eritro-esfingosina y un ácido graso que contiene de 2 a 28 átomos de carbono (ver revisión en Bollinger y col.,

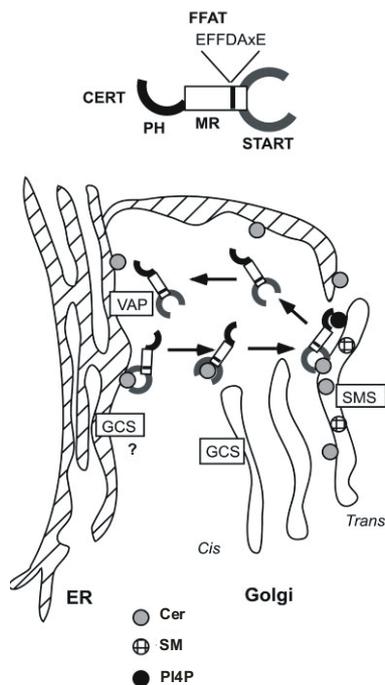
2005) (Fig. 27). La mayoría de las Cer celulares poseen largos de cadena de entre 16 y 24 átomos de carbono aunque las Cer de cadena corta (de 2 a 6 átomos de carbono) también existen en la naturaleza (Sot y col., 2005; Goñi y col., 2005).



**Figura 27.** Estructuras químicas correspondientes a esfingosina, ceramida y esfingomiolina.

Con excepción de la epidermis, donde las Cer forman una barrera protectora para evitar la pérdida de agua (Wertz y Downing, 1983), la mayoría de las células contienen niveles muy bajos de Cer en condiciones basales. Las Cer pueden generarse en diversas localizaciones subcelulares (Huwiler y col., 2000; van Meer y Holthuis, 2000). La síntesis de Cer se produce principalmente en el RE (síntesis de novo) (Funakoshi y col., 2000; Kawano y col., 2006) y de allí la Cer es transportada al aparato de Golgi donde es utilizada para la síntesis de SLs complejos. La vía mayoritaria de transporte de Cer desde el RE al Golgi es una vía no vesicular

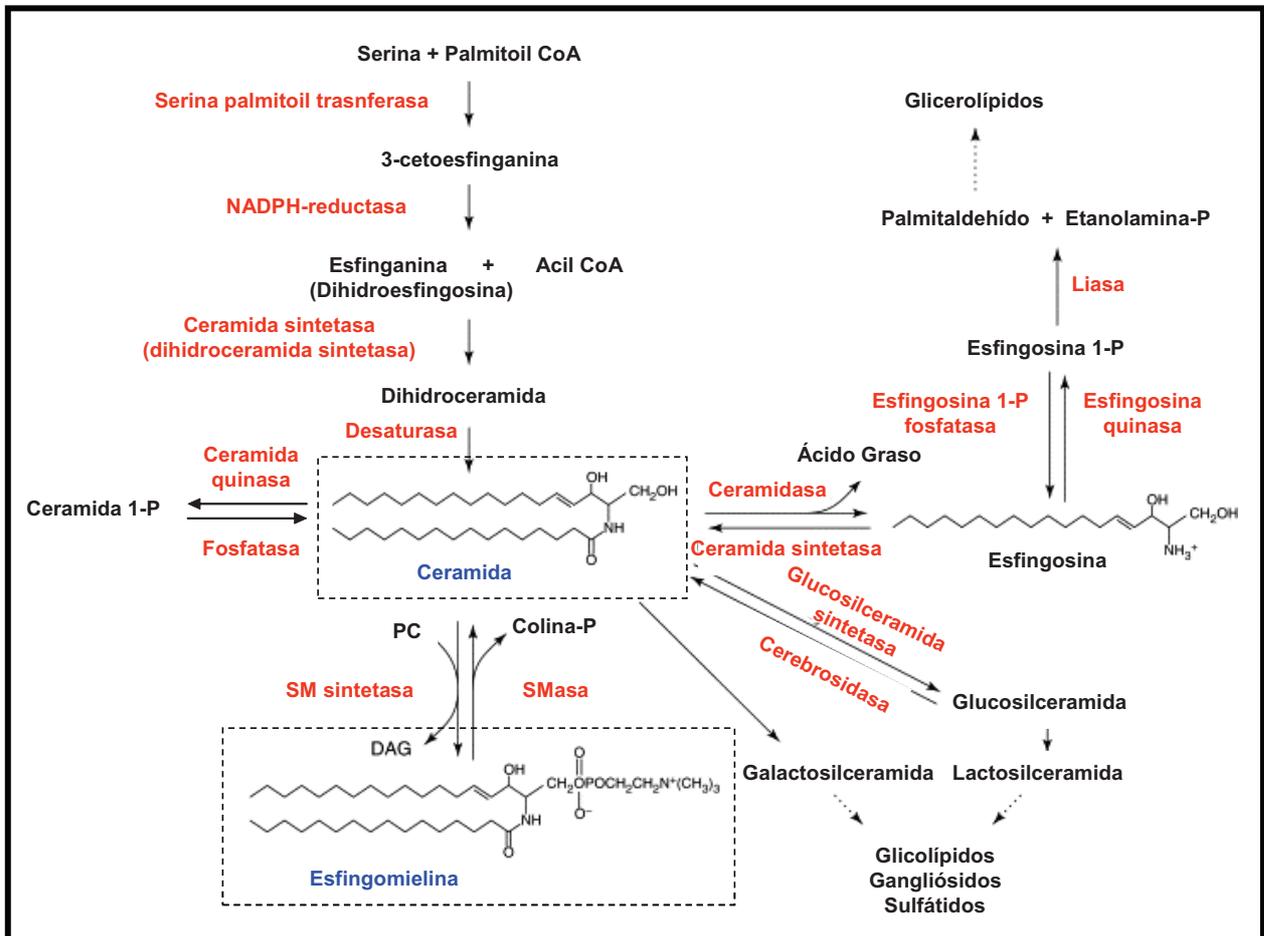
dependiente de ATP y citosol (Funakoshi y col., 2000) y está mediada por la proteína transportadora de ceramida (en inglés *ceramide transfer protein*, CERT; Hanada y col., 2003). Esta proteína posee un dominio "START" capaz de extraer Cer específicamente de la membrana, un dominio "PH" (*pleckstrin homology*) que la dirige al aparato de Golgi mediante el reconocimiento de fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI4P), y una secuencia de unos pocos aminoácidos denominada "FFAT", que interactúa con la proteína residente en RE, VAPA (Kawano y col., 2006; Saito y col., 2007) (Fig. 28).



**Figura 28. Vía no vesicular de tráfico de Cer desde el RE al Golgi.** Se muestra además una representación esquemática de la proteína CERT con sus dominios START, PH y el motivo FFAT. Obtenido de "Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT". Kawano M, Kumagai K, Nishijima M y Hanada K. *J Biol Chem* (2006) 281:30279-30288.

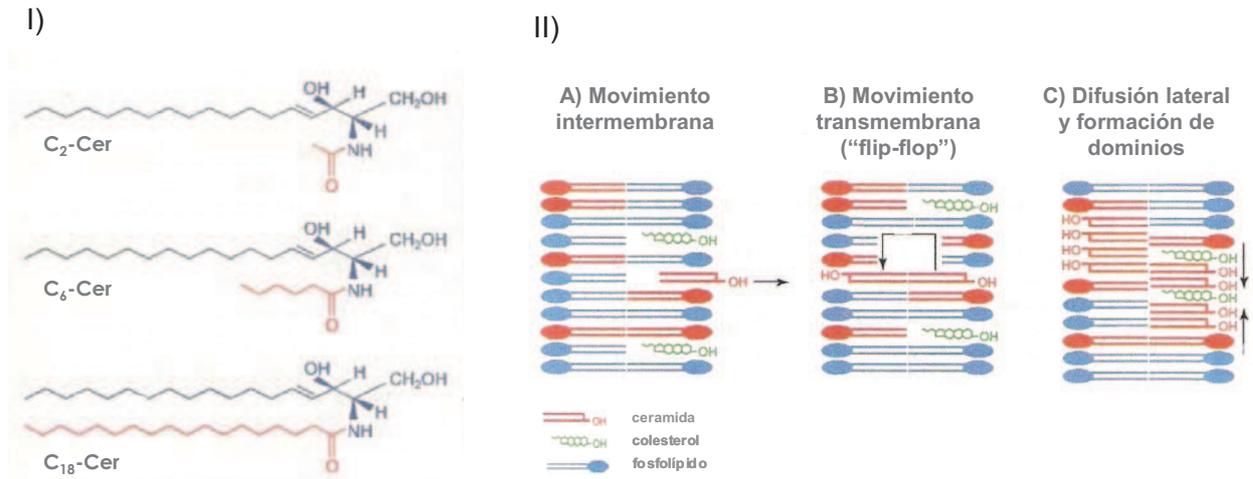
Otra vía de generación de Cer es por acción de esfingomielinasas (SMasas) (ver revisión en Sawai y Hannun, 1999; Contreras y col., 2003; Coll y col., 2007), enzimas que hidrolizan la SM de la membrana. Las Cer producidas por la activación de SMasas han sido involucradas en diversas funciones de señalización (ver revisión en Clarke y Hannun, 2006). Esta vía provee un rápido incremento de los niveles celulares de Cer en respuesta a estímulos diversos. Por otro lado, las Cer generadas

por la vía de síntesis de novo han sido reconocidas también, aunque mucho más tarde, como segundos mensajeros (Bose y col., 1995; Perry, 2000; Dbaibo y col., 2001; Senchenkov y col., 2001). Entre los posibles blancos de acción de Cer están las proteínas fosfatasas activadas por Cer (PF2A; Dobrowsky y col., 1993), una proteína quinasa activada por Cer (Liu y col., 1994), el factor intercambiador de nucleótidos de guanina, Vav (Gulbins y col., 1994), y la proteína quinasa zeta (PKC $\zeta$ ) (Lozano y col., 1994; Muller y col., 1995; Ruvolo, 2003).



**Esquema 5. Síntesis de Esfingolípidos.** Rutas biosintéticas de las diferentes clases de esfingolípidos. Obtenido de "Ceramide in the eukaryotic stress response". Hannun YA y Luberto C. *Trends in Cell Biol* (2000) 10:73-79.

La utilización de Cer exógenas constituye una importante herramienta para el estudio del tráfico intracelular y el metabolismo de estos lípidos, así como también para evaluar los efectos que ejercen las Cer sobre diversos aspectos de la biología celular. Las Cer de corta cadena son rápidamente incorporadas por las células y se acumulan en el aparato de Golgi (Lipsky y Pagano, 1983; Pagano y col., 1991). Incluso los análogos fluorescentes de Cer, como C<sub>6</sub>-NBD-Cer y C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer son ampliamente utilizados como sondas específicas de esta organela (Lipsky y Pagano, 1983; Pagano y col., 1991). Las Cer de cadena corta tienen la capacidad de experimentar movimientos rápidos y espontáneos entre diferentes membranas (movimientos intermembrana), así como también de una a otra hemicapa dentro de la misma membrana (movimientos transmembrana o “flip-flop”) (Koval y Pagano, 1990; Venkataraman y Futerman, 2000). La internalización de SLs en células de mamífero fue también estudiada por Zegers y col. (1997) utilizando los análogos fotoactivables <sup>125</sup>I-N<sub>3</sub>-Cer y <sup>125</sup>I-N<sub>3</sub>-glucocilceramida (<sup>125</sup>I-N<sub>3</sub>-GlcCer). Estos autores observaron que la Cer fotoactivable era capaz de internalizarse eficientemente tanto a 37°C como a 4°C, indicativo de una transferencia por difusión monomérica, a diferencia del análogo de GlcCer, el cual solo se internalizó a 37°C, reflejando un mecanismo endocítico de internalización. Por su carácter altamente hidrofóbico, durante mucho tiempo se dudó de la capacidad de las Cer de larga cadena de realizar movimientos transmembrana (“flip-flop”) (Venkataraman y Futerman, 2000; van Blitterswijk y col., 2003). Sin embargo, recientemente se pudo comprobar la rápida translocación de estas especies lipídicas tanto en vesículas gigantes (Lopez-Montero y col., 2005) como en la membrana plasmática de células en cultivo (Mitsutake y Igarashi, 2007).



**Figura 29.** I) Estructuras químicas correspondientes a Cer de corta y larga cadena. La base esfingoide se muestra en azul y el ácido graso en rojo. II) Propiedades biofísicas de las Cer. Obtenido de "Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems". Venkataraman K y Futerman AH *Trends Cell Biol* (2000) 10:408-412.

Las Cer pueden ser hidrolizadas por acción de enzimas denominadas ceramidasa (Birbes y col., 2002; el Bawab y col., 2002) dando como producto esfingosina (Sph). La Sph a su vez puede convertirse en esfingosina 1-fosfato (Sph-1-P) (Tani y col., 2005) (Esquema 5). Al igual que las Cer, sus metabolitos, Sph y Sph-1-P constituyen también lípidos bioactivos muy importantes, los cuales están implicados en una gran variedad de procesos biológicos (ver revisiones en Posse de Chaves, 2006; Hla, 2003; Cuvillier, 2002). Dado que la Cer puede ser rápidamente convertida en Sph y Sph-1-P (Taha y col., 2006), es importante diferenciar si es específicamente la Cer o sus metabolitos los que inducen efectos celulares. En muchos casos las respuestas celulares a Cer y sus metabolitos son diferentes e incluso opuestos, siendo Cer la que usualmente inhibe la proliferación y promueve la apoptosis, y la Sph-1-P quien estimula el crecimiento y suprime la apoptosis (ver revisiones en Maceyka y col., 2002; Posse de Chaves, 2006). Sin embargo, en bajas concentraciones, las Cer pueden tener efectos beneficiosos sobre las células. Así por ejemplo, la Cer y no la Sph o Sph-1-P, protege a las motoneuronas de la apoptosis (Irie y Hirabayashi, 1999).

En neuronas de hipocampo son las Cer exógenas y no la Sph o Sph-1-P las que promueven la supervivencia, aunque los tres lípidos pueden desencadenar la muerte celular a concentraciones superiores a 5  $\mu$ M (Mitoma y col., 1998).

Además de sus efectos como segundos mensajeros, las Cer promueven cambios en las propiedades biofísicas de las membranas. Como ya se dijo en los capítulos anteriores, los SLs y el colesterol coexisten en microdominios de membrana denominadas balsas lipídicas (Simons e Ikonen, 1997). La generación de Cer dentro de dichas balsas por hidrólisis de la SM cambia dramáticamente las propiedades biofísicas de los mismos ya que las moléculas de Cer espontáneamente se asocian unas con otras y tienen tendencia a formar pequeños microdominios de membrana enriquecidos en Cer (Holopainen y col., 1998; Kolesnick y col., 2000). Estos microdominios, a su vez, son capaces de fusionarse en grandes macrodominios o plataformas (Nurminen y col., 2002; Holopainen y col., 1998; Kolesnick y col., 2000). Las Cer estabilizan las balsas lipídicas (Xu y col., 2001) ya que permiten un alto grado de empaquetamiento de los lípidos (Kolesnick y col., 2000). Además, la Cer puede alterar la composición de estos microdominios mediante competencia y exclusión del colesterol de los dominios ordenados en las bicapas lipídicas (Bjorkqvist y col., 2005; London y London, 2004; Ali y col., 2006). La función de estas plataformas enriquecidas en Cer es, en general, concentrar y reorganizar receptores y moléculas señalizadoras en regiones particulares de la membrana plasmática (Simons y Toomre, 2000; Edidin, 2003), facilitando y amplificando el proceso de señalización celular. La transformación de pequeñas balsas (“inactivas”) en grandes plataformas de señalización (“activas”) por generación de Cer explica la función de este lípido en los procesos de activación celular mediados por receptores, estímulos de estrés, etc. (ver revisión en Bollinger y col., 2005).

En el Capítulo 2 se discutió la importancia del colesterol en la regulación de los niveles de AChR en la superficie de células CHO-K1/A5. Con respecto a los SLs,

Roccamo y col. (1999) demostraron que en células CHO-SPB1/SPH (una línea celular deficiente en SLs que expresa el AChR), la biosíntesis reducida de estos lípidos provoca la disminución de los niveles de receptores en la superficie celular. En este sentido, Baier y Barrantes (2007) remarcaron la relación existente entre los niveles de SLs y el tráfico exocítico del AChR, y propusieron la participación de estos lípidos en el proceso de ensamblado del receptor. La importancia de los SLs en la regulación del tráfico proteico está bien documentada. Las proteínas recientemente sintetizadas cuyo destino final es la superficie celular, deben viajar a través de compartimentos conteniendo cuali- y cuantitativamente diferentes SLs, y las alteraciones en los niveles de SLs pueden influir sobre el transporte proteico (Rosenwald y col., 1992). En levaduras, la síntesis alterada de SLs causa defectos en el tráfico de la proteína residente en microdominios de membrana, Fus-Mid-GFP desde el TGN a la membrana plasmática (Proszinski y col., 2005). La inhibición de la síntesis de GlcCer por tratamiento con la droga PDMP (inhibidor de la enzima GlcCer sintasa) resulta en la disminución de la llegada a superficie de la proteína MDR1 en hepatocitos, demostrando la importancia de este SL para el correcto tráfico de esta proteína desde el Golgi a la superficie apical (Wojtal y col., 2006). Más recientemente Lucic y col. (2007) observaron que la inhibición de la síntesis de SM reduce la secreción de la proteína apoE por macrófagos y aumenta la retención intracelular de esta proteína.

En este capítulo estudiamos los efectos ejercidos por las Cer, precursoras en la síntesis de SLs, sobre el tráfico y diferentes propiedades del AChR. El modelo experimental elegido consistió en utilizar la línea celular CHO-K1/A5, que expresa al AChR de tipo muscular adulto. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de Cer de cadena corta ( $C_6$ -Cer), de cadena larga (Cer provenientes de cerebro bovino), o bien se expusieron a la incubación con SMasa en el medio de cultivo para evaluar los efectos resultantes de la generación de Cer endógenas.

---

## Materiales y métodos

### Materiales

Las C<sub>6</sub>-ceramidas (C<sub>6</sub>-Cer) se obtuvieron en Matreya (Pleasant Gap, Pennsylvania, EEUU). Las ceramidas cerebrales (Cer-cereb) de cerebro bovino, la esfingosina (Sph), esfingomielinasa (SMasa) de *Bacillus cereus*, el ácido okadaico (Ác. Ok), el pseudosustrato de la proteína kinasa C  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) y la albúmina bovina (fracción V, para cultivo celular), se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EEUU). Alexa<sup>647</sup> $\alpha$ BTX, NBD-C<sub>6</sub>-Cer y BODIPY-C<sub>5</sub>-SM fueron obtenidos de Molecular Probes (Invitrogen Corp., CA, EEUU). La mutante no tóxica de la lisenina conjugada con la proteína fluorescente roja (nt-lysenin-RFP) fue cedida por el Dr. Toshihide Kobayashi, RIKEN (Institute of Physical and Chemical Research), en Japón. El resto de los reactivos empleados en el presente capítulo ya fue descrito en la sección: "Materiales y Métodos" correspondiente al capítulo 2.

### Cultivo celular

Las células CHO-K1/A5 crecieron en medio Ham's F-12 suplementado con glutamina, 40  $\mu$ g/ml de sulfato de gentamicina y 10% de suero fetal bovino, en un incubador Napco mantenido a 37°C, con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub>/ 95% aire. Luego de 2-3 días de crecimiento bajo estas condiciones, las células se lavaron e incubaron en medio Ham's F-12 sin suero conteniendo albúmina (probada para cultivo celular, Sigma, MO, EEUU) (control) o C<sub>6</sub>-Cer, Cer-cereb o Sph, por un período adicional de 1, 3 ó 5 hs. Las células se incubaron a diferentes concentraciones del lípido (12.5, 25 ó 37.5  $\mu$ M). Tanto las C<sub>6</sub>-Cer como las Cer-cereb se agregaron al medio de cultivo en forma de complejos con albúmina, según lo descrito por Rosenwald y Pagano (1993), mientras que la Sph se solubilizó en metanol (concentración final del solvente en el medio de cultivo: 0.2%).

Los tratamientos por períodos más prolongados se realizaron incubando las células con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{C}_6\text{-Cer}$  o  $\text{Cer-cereb}$  por 24 h en medio Nutridoma-BO sin suero.

Por otra parte, se realizaron otros experimentos en los cuales las células fueron incubadas en medio sin suero en ausencia (control) o presencia de 100 mU/ml de SMasa, durante 1h, a 37°C. En algunos casos también se realizó la preincubación de las células con 0.1  $\mu\text{M}$  de ácido okadaico (solución madre, 10  $\mu\text{M}$  en agua) previo al tratamiento con SMasa.

Para el tratamiento con el antibiótico nistatina, la droga (50  $\mu\text{g/ml}$ ) se agregó en medio Ham's F12 sin suero, y las células se incubaron a 37°C por 30 min, seguidos de 1 h de incubación adicional con SMasa, en presencia de nistatina.

Las incubaciones con SM exógena se realizaron a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , como lo describieron Baier y Barrantes (2007). En este caso se utilizó etanol:decano (98:2) como vehículo, el cual se mantuvo por debajo del 0.16% en el medio de cultivo.

### **Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa**

Se determinó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Yildiz y col., 1998; Fujii y col., 1998) en el medio de cultivo de células CHO-K1/A5 controles y tratadas con  $\text{C}_6\text{-Cer}$  como índice de daño celular. Como control positivo, se evaluó la actividad de la enzima en muestras sometidas a disrupción en un sonicador durante 5 seg. La actividad de LDH se monitoreó en las distintas condiciones por medio de un ensayo cinético de detección al UV (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina) en el cual se mide la disminución de la absorbancia correspondiente a la transformación de NADH en NAD. La lectura se efectuó en un espectrofotómetro a 340 nm. Los datos de absorbancia obtenidos a diferentes intervalos de tiempo son proporcionales a la cantidad de NADH convertido en  $\text{NAD}^+$  a medida que la reacción se va produciendo.

---

### **Cromatografía en capa fina utilizando lípidos fluorescentes**

En algunos experimentos las C<sub>6</sub>-Cer se agregaron al medio de cultivo como precursor de la síntesis de SLs complejos. Con este fin, las células CHO-K1/A5 crecieron en cápsulas de 10 cm en medio completo Ham's F-12 durante 24 hs. Las células se lavaron posteriormente con PBS estéril y el medio completo se reemplazó por medio de Nutridoma-BO sin suero. Una mezcla de C<sub>6</sub>-Cer (concentración final 5 μM) y de NBD-C<sub>6</sub>-Cer (trazas; concentración final 25 nM) se agregó al medio de cultivo y se incubaron las células a 37°C por 30 min (T<sub>0.5</sub>) o 24 h adicionales (T<sub>24</sub>). Las células se lavaron con PBS y se utilizaron para la extracción lipídica como fue descrito anteriormente. Los distintos esfingolípidos se separaron por cromatografía en capa fina (CCF) usando placas de sílica gel G y CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (65:25:4) (vol/vol) como fase móvil (Lipsky y Pagano, 1983; Loidl y col., 2002). En la cromatografía se usaron estándares fluorescentes de NBD-C<sub>6</sub>-Cer y BODIPY-C<sub>5</sub>-SM. Las manchas correspondientes a los lípidos covalentemente derivatizados con fluoróforos se detectaron mediante iluminación con luz UV.

### **Transfección transiente**

Las células CHO-K1/A5 se transfectaron en forma transiente con los ADNc que codifican para las proteínas de fusión fluorescentes pEYFP-GalT o la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSVG) acoplado a proteína fluorescente verde (GFP), utilizando el reactivo de transfección *Polifect transfection reagent* (Quiagen) siguiendo el protocolo correspondiente. La transfección se realizó 24 h antes del tratamiento con Cer.

## **Microscopía de fluorescencia**

### **a) Obtención de imágenes**

Las imágenes de microscopía de epifluorescencia se obtuvieron con un microscopio Nikon Eclipse E-600 acoplado a una cámara CCD, SBIG modelo ST-7. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas con un microscopio Leica TCS SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH).

### **b) Marcación del AChR de superficie e intracelular**

El AChR de superficie se marcó con Alexa<sup>488</sup>αBTX, mientras que para el marcado del receptor intracelular se utilizó Alexa<sup>594</sup>αBTX, tal como se explicara en el capítulo anterior.

### **c) Marcado de la SM de la membrana plasmática con lisenina**

Se utilizó la sonda lisenina, la cual detecta y se une específicamente a la SM (Nakai y col, 2000) como herramienta para evaluar la acción de la enzima SMasa sobre la SM de la superficie celular. Utilizamos una mutante no tóxica de la lisenina, conjugada con la proteína fluorescente roja (nt-lisenina-RFP; Kiyokawa y col., 2005). Luego de 1 h de incubación en presencia o ausencia de SMasa, las células se lavaron e incubaron con lisenina (1/50 en PBS) durante 1 h en hielo, y se cuantificó la intensidad de fluorescencia correspondiente a lisenina por microscopía de fluorescencia, tanto en células controles como en las tratadas con SMasa.

### **d) Generación de C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer a partir de C<sub>5</sub>-BODIPY-SM**

La generación endógena de Cer por acción de la SMasa agregada al medio de cultivo, se observó mediante microscopía de fluorescencia. Primero, las células se incubaron con 15 nM C<sub>5</sub>-BODIPY-SM en medio Ham's F-12 sin suero durante 30 min a 4°C para marcar la membrana plasmática de las células CHO-K1/A5. Luego de lavarlas

con PBS para remover la C<sub>5</sub>-BODIPY-SM no unida, las células se incubaron durante 5 min a 37°C en ausencia o presencia de SMasa (Zha y col., 1998).

### **Obtención de láminas de membrana plasmática y tratamiento con SMasa**

Para la preparación de las láminas de membrana plasmática, las células CHO-K1/A5 se crecieron en cubreobjetos recubiertos con polilisina y se disrumpieron como lo describen Borroni y col. (2007) y Kellner y col. (2007). Para ello se utilizó un pulso de ultrasonido de 300 ms en buffer KGlu (20 mM Hepes, pH 7.2, conteniendo 120 mM de glutamato de potasio, y 20 mM de acetato de potasio) frío. Para promover la hidrólisis de la SM, las láminas de membrana celular se incubaron por 30 min a 37°C en buffer KGlu conteniendo 100 mU/ml SMasa, y posteriormente se lavaron con buffer KGlu frío. Las láminas de membrana controles se incubaron solamente con buffer KGlu. Se realizó la doble marcación de las láminas con Alexa<sup>488</sup>αBTX y nt-lisenina-RFP durante 60 min a 4°C en buffer KGlu, y se lavaron 2-3 veces con buffer KGlu. Luego se fijaron con 4% PFA en PBS durante 30 min, y se lavaron con PBS. Finalmente, la láminas de membrana se marcaron con 25 μl/ml de una solución saturada de TMA-DPH en PBS, para poder identificar las láminas de membrana por microscopía de fluorescencia, pero evitando la selección preferencial de aquellas que presentaran mayor intensidad en los canales correspondientes a Alexa<sup>488</sup>αBTX o nt-lisenina-RFP.

### **Estudios de internalización del AChR**

Los AChR de superficie se marcaron con Alexa<sup>488</sup>αBTX a 4°C como se describió anteriormente, seguido de la incubación a 37°C por períodos crecientes de tiempo (de 0 a 4 h) en ausencia (control) o presencia de SMasa. La intensidad de fluorescencia en la superficie celular y la relación [AChR de superficie/AChR total] se calculó para cada tiempo de incubación. En otro caso se recurrió al empleo de un

protocolo de marcado doble como lo describen Borroni y col. (2007): las células se marcaron en primer lugar con Alexa<sup>647</sup>αBTX (infrarrojo) a 4°C y luego se incubaron a 37°C por 0 y 1 h, respectivamente para favorecer la endocitosis del AChR. Los AChRs remanentes en la superficie celular se marcaron posteriormente con el anticuerpo mAb 210 (el cual reconoce un epítopo extracelular de la subunidad α del AChR) a 4°C, y se marcaron subsecuentemente con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa<sup>488</sup> (verde).

### **Evaluación del número de AChR desensamblados**

La determinación de los AChR desensamblados se realizó según Baier y col. (2006). El fundamento del método radica en lo siguiente la αBTX se une tanto a receptores ensamblados como a las subunidades α desensambladas; la carbamilcolina, en cambio, se une sólo a las subunidades α ensambladas. Por lo tanto, en presencia de carbamilcolina, la αBTX fluorescente sólo podrá unirse a las subunidades α no ensambladas constituyendo el valor de intensidad de fluorescencia de Alexa<sup>594</sup>αBTX un índice del número de receptores desensamblados. Las células se sometieron al protocolo habitual de marcación del AChR intracelular (ya descrito) con la diferencia que, con anterioridad a la adición de Alexa<sup>594</sup>αBTX, éstas se incubaron con 10 mM de carbamilcolina en PBS durante 1 h, a temperatura ambiente. La incubación con la αBTX fluorescente se realizó en presencia de carbamilcolina. Se midió la intensidad de fluorescencia y se calculó el porcentaje de AChRs desensamblados por comparación con la señal fluorescente en ausencia de carbamilcolina (receptores intracelulares totales = AChR ensamblado + AChR desensamblado).

---

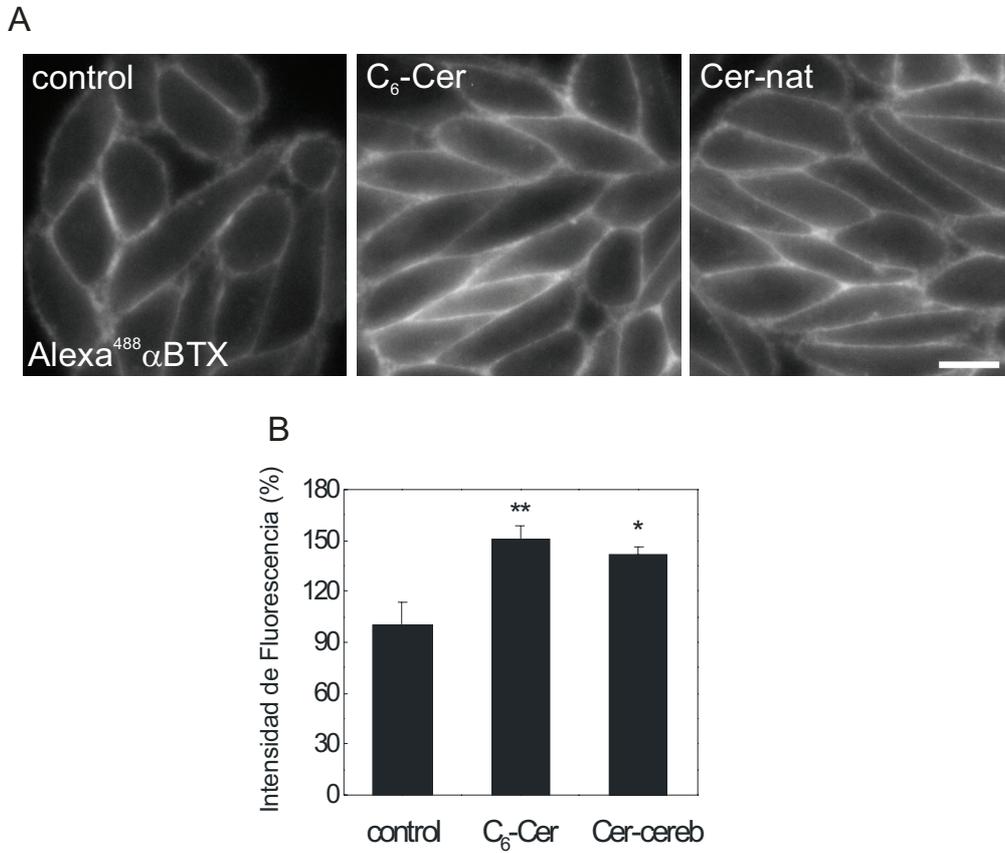
## Resultados

### 1. Incubación de células CHO-K1/A5 con bajas concentraciones de Cer

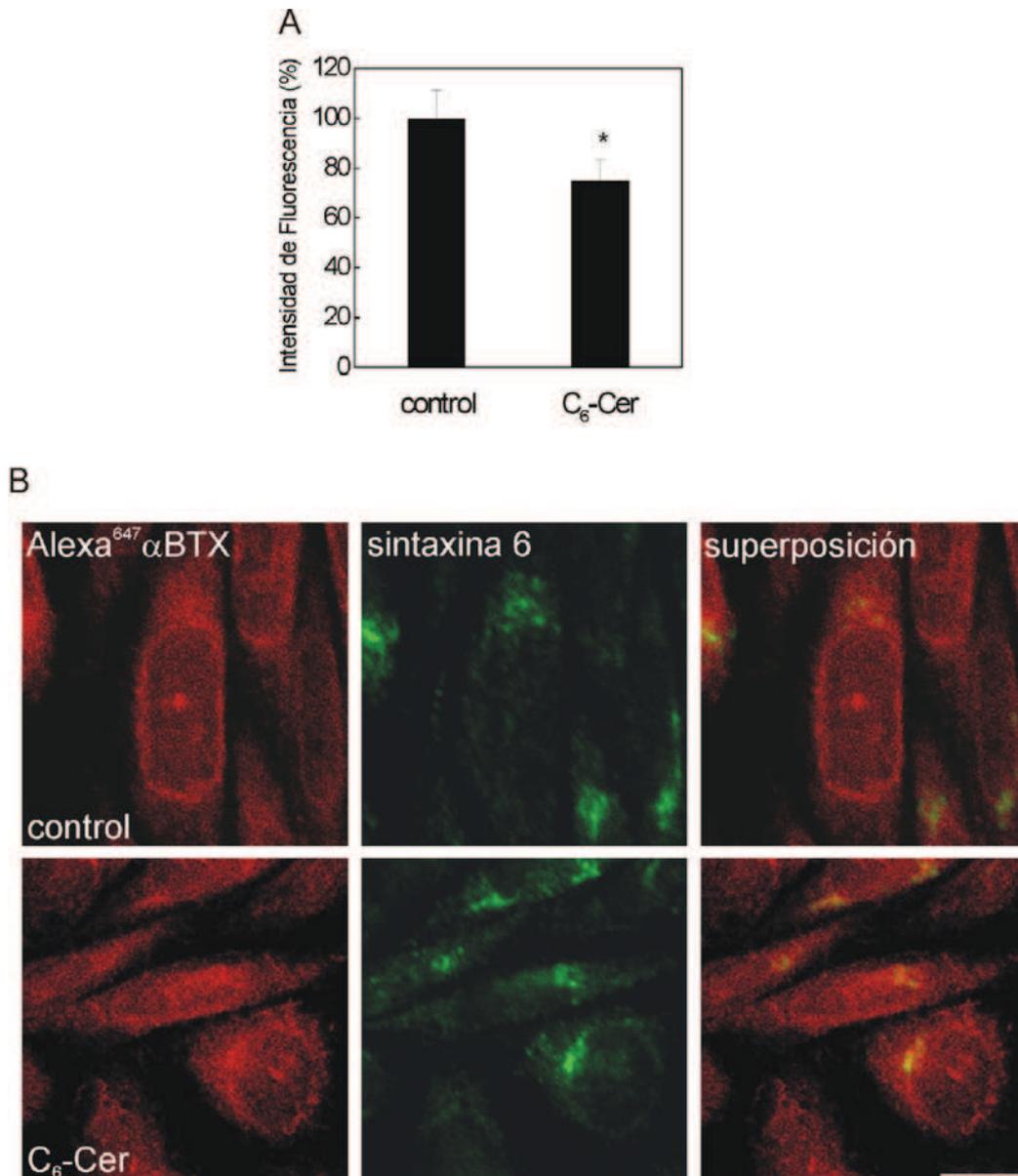
#### 1.1. Distribución del AChR evaluada por microscopía de fluorescencia

Con el fin de evaluar si las Cer agregadas en forma exógena afectan la distribución del AChR, las células CHO-K1/A5 fueron incubadas durante 24 h en medio Nutridoma-BO sin suero en presencia de 5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer. Se marcó el AChR de superficie con Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX y el receptor intracelular con Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX. Luego del tratamiento con C<sub>6</sub>-Cer pudimos observar que la señal de superficie correspondiente a AChRs marcados con Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX aumentó en un 50% (Fig. 30A y B), mientras que la fluorescencia intracelular disminuyó aproximadamente un 30% (Fig. 31A). El patrón de fluorescencia correspondiente a AChR intracelular no evidenció cambios luego del tratamiento con Cer (Fig. 31B), así como tampoco se vio afectada la morfología del TGN, evaluada por marcación con el anticuerpo marcador específico de dicha organela, anti-sintaxina 6 (Fig. 31B).

Aunque las Cer de cadena corta (C<sub>2</sub>-Cer) existen en la naturaleza (Sot y col., 2005), en algunos casos los efectos ejercidos por éstas pueden diferir de aquéllos inducidos por las especies de cadena larga (ver revisión en van Blitterswijk, 2003). Por este motivo, decidimos comparar los resultados obtenidos con las C<sub>6</sub>-Cer con los efectos producidos por las Cer de larga cadena, a las que llamamos Cer cerebrales (Cer-cereb). Para ello, utilizamos una mezcla compleja de Cer de larga cadena, de cerebro bovino, incubándose las células bajo las mismas condiciones que las utilizadas con las Cer de corta cadena. De igual modo, se marcó el AChR de superficie con Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX y se las observó mediante microscopía de epifluorescencia. Como se puede observar en la Fig. 30A y B, las Cer-cereb fueron también capaces de incrementar (42% de aumento) el AChR de superficie.



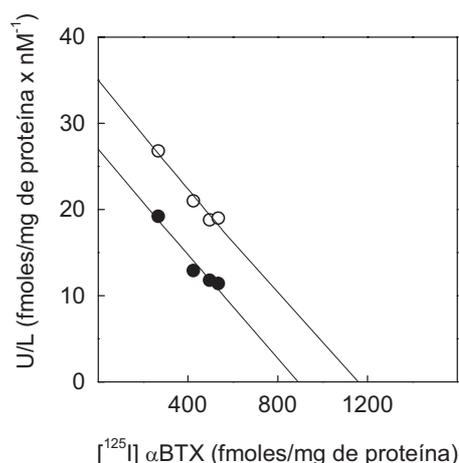
**Figura 30. Microscopía de fluorescencia del AChR de superficie en células CHO-K1/A5 tratadas con bajas concentraciones de Cer.** A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de AChRs de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup>αBTX en células CHO-K1/A5 crecidas durante 24 h bajo condiciones controles (panel de la izquierda), o incubadas con 5 μM C<sub>6</sub>-Cer (panel medio) o 5 μM Cer-cereb (panel de la derecha) en medio Nutridoma-BO. B) Porcentaje de intensidad de fluorescencia correspondiente a receptores de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup>αBTX en células CHO-K1/A5 incubadas bajo las condiciones experimentales descritas en (A). \*\* p< 0.01 y \* p< 0.05. Escala: 10 μm.



**Figura 31. Distribución del AChR intracelular en células tratadas con 5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer.** A) Cuantificación de la señal de fluorescencia correspondiente a AChRs intracelulares marcados con Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX en células CHO-K1/A5 tratadas con 5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer durante 24 h en medio Nutridoma-BO. \* $p < 0.05$ . B) Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal mostrando la colocalización de los receptores intracelulares marcados con Alexa<sup>647</sup> $\alpha$ BTX (panel de la izquierda) con el marcador de TGN sintaxina 6 (panel medio) en células controles y en las tratadas con 5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer. En el panel de la derecha se observa la superposición de ambas marcas fluorescentes. Escala: 10  $\mu$ m.

## 1.2. Evaluación de la afinidad del AChR por $\alpha$ BTX

Posteriormente se realizaron experimentos con [ $^{125}$ I]  $\alpha$ BTX para determinar si el tratamiento con bajas concentraciones de Cer afectaban la afinidad del AChR por este antagonista competitivo. El  $B_{m\acute{a}x}$  correspondiente a receptores de superficie obtenido a partir de las transformadas de Scatchard fue un 40% superior en las células tratadas con  $C_6$ -Cer (Fig. 32) en coincidencia con los resultados obtenidos en los experimentos de microscopía de fluorescencia (Fig. 30A y B). El aumento en el número de AChRs de superficie inducido por  $C_6$ -Cer no estuvo acompañado por cambios en la  $Kd_{ap}$  por [ $^{125}$ I]  $\alpha$ BTX, indicando que el tratamiento con bajas concentraciones de Cer durante 24 h afecta el número de receptores de la superficie celular sin provocar cambios en la afinidad del AChR por el ligando [ $^{125}$ I]  $\alpha$ BTX (Fig. 32).

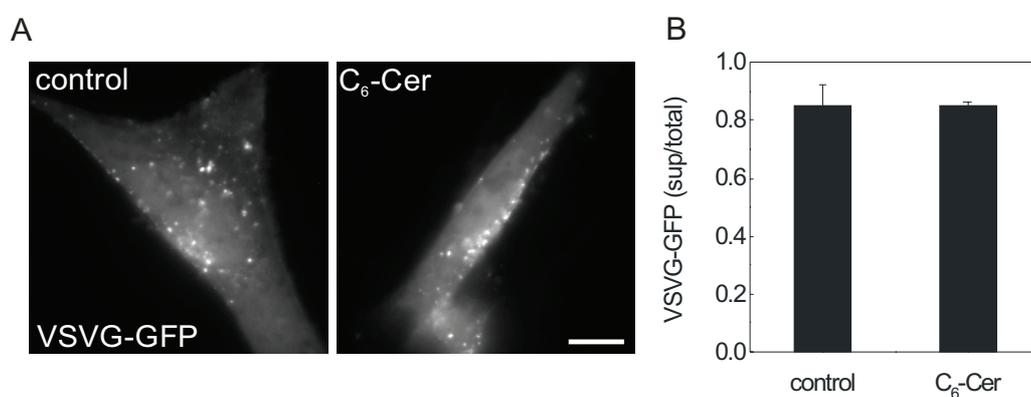


**Figura 32. Determinación de la afinidad del AChR por  $\alpha$ BTX en células controles y tratadas con bajas concentraciones de  $C_6$ -Cer.** Transformadas de Scatchard obtenidas mediante la unión específica de [ $^{125}$ I]  $\alpha$ BTX en células CHO-K1/A5 controles (●) y en las incubadas con 5  $\mu$ M  $C_6$ -Cer (○).

## 1.3. Expresión en superficie de la proteína VSVG-GFP

Posteriormente recurrimos a la transfección transiente de las células CHO-K1/A5 con la proteína de fusión VSVG-GFP para evaluar si el tratamiento con Cer afectaba el tráfico de otras proteínas además del AChR. Tal como se indicó en el capítulo 2, la VSVG-GFP es comúnmente utilizada para estudiar el comportamiento de proteínas integrales de membrana a lo largo del camino exocítico (Kuhle y col., 2006).

Las células CHO-K1/A5 transfectadas con el ADNc que codifica para dicha proteína fueron incubadas *a posteriori* con 5  $\mu\text{M}$  de C<sub>6</sub>-cer por 24 h y se cuantificó la expresión en superficie correspondiente a VSVG-GFP. No se observaron diferencias significativas en la señal fluorescente de superficie de VSVG-GFP entre las células controles y las tratadas con Cer, descartando de esta manera que la alteración en el tráfico del AChR por incubación con bajas concentraciones de Cer fuera mediada por un mecanismo generalizado (Fig. 33).

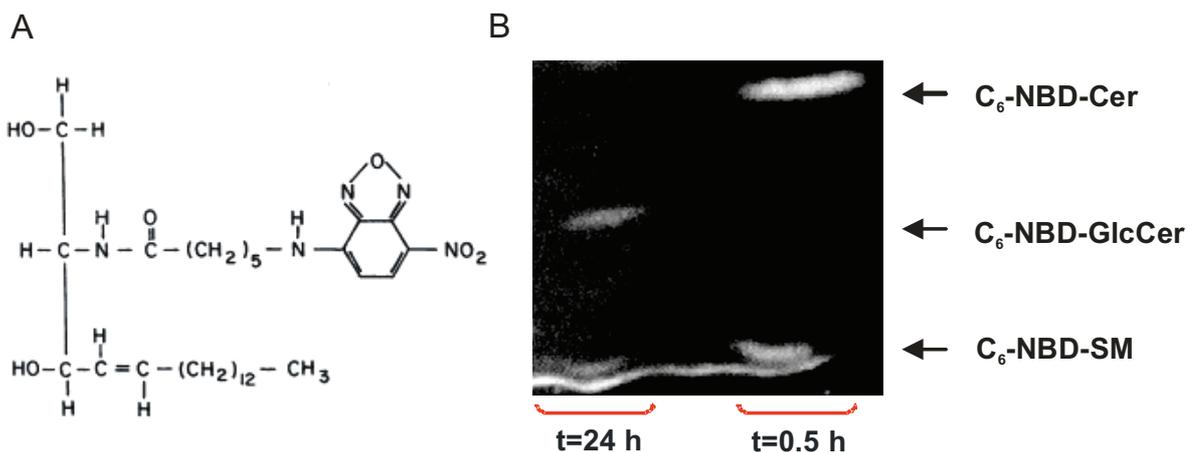


**Figura 33. Incubación de células CHO-K1/A5 transfectadas con la proteína VSVG-GFP con 5  $\mu\text{M}$  C<sub>6</sub>-Cer.** A) Imágenes de fluorescencia correspondientes a VSVG-GFP expresada en forma transiente en células CHO-K1/A5 crecidas bajo condiciones controles (panel de la izquierda) o en presencia de 5  $\mu\text{M}$  C<sub>6</sub>-Cer durante 24 h (panel de la derecha). B) Las barras representan la cuantificación de la señal fluorescente de VSVG-GFP en la superficie celular. \* $p < 0.01$ . Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

#### 1.4. Esfingolípidos generados por incubación con bajas concentraciones de Cer

Nos propusimos también indagar si las C<sub>6</sub>-Cer agregadas en forma exógena en bajas concentraciones durante 24 h son capaces de actuar como precursoras para la síntesis de SLs complejos. Para ello, las células se incubaron con 5  $\mu\text{M}$  C<sub>6</sub>-Cer en presencia de concentraciones trazas (25 nM) de C<sub>6</sub>-Cer fluorescente (C<sub>6</sub>-NBD-Cer). Se

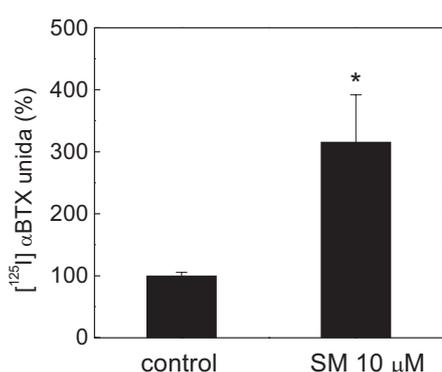
realizó la extracción de lípidos por el método de Folch y la separación de las clases lipídicas mediante CCF con el sistema de solventes descrito por Lipsky y Pagano (1983). La producción de C<sub>6</sub>-NBD-SM se hizo evidente a los 30 min de incubación. Sin embargo, la mancha fluorescente correspondiente a C<sub>6</sub>-NBD-Cer aún se detectaba claramente a ese tiempo. Luego de 24 h de incubación, las bandas fluorescentes correspondientes C<sub>6</sub>-NBD-SM y C<sub>6</sub>-NBD-GlcCer se visualizaban con claridad mientras que la mancha correspondiente a C<sub>6</sub>-NBD-Cer ya no estaba presente, indicando que el precursor había sido completamente metabolizado a lípidos más complejos (Fig. 34).



**Figura 34. Generación de SLs complejos a partir de C<sub>6</sub>-NBD-Cer.** A) Estructura de la C<sub>6</sub>-NBD-Cer. Obtenido de "Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: Microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue". Lipsky NG y Pagano RE. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1983) 80:2608-2612. B) Las células CHO-K1/A5 se incubaron con 5 μM C<sub>6</sub>-Cer + C<sub>6</sub>-NBD-Cer durante 0.5 ó 24 h. Se extrajeron los lípidos por el método de Folch y se separaron por CCF como se describió en materiales y métodos. Como estándares se utilizaron los lípidos fluorescentes C<sub>5</sub>-BODIPY-SM y C<sub>6</sub>-NBD-Cer. El cromatograma se fotografió bajo luz UV.

### 1.5. Incubación con SM exógena

En otra serie de experimentos, las células se incubaron con 10  $\mu\text{M}$  de SM exógena en medio Nutridoma-BO por 24 h. Como vehículo para la SM utilizamos una mezcla de EtOH:decano (98:2 v/v). Se evaluó la expresión en superficie del AChR mediante marcado radioactivo con [ $^{125}\text{I}$ ]  $\alpha\text{BTX}$ . En forma similar a lo reportado por Baier y Barrantes (2007), la adición de SM exógena al medio de cultivo de células CHO-K1/A5 causó un aumento de 3 veces en el número de AChRs presentes en la membrana celular (Fig. 35). Este hallazgo reforzó la importancia de los SLs para el correcto tráfico del AChR a la membrana celular.

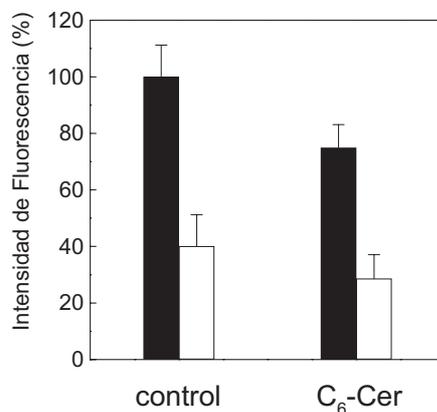


**Figura 35. Incubación con SM exógena.** Porcentaje de unión de [ $^{125}\text{I}$ ]  $\alpha\text{BTX}$  a AChRs de superficie en células CHO-K1/A5 controles y tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de SM exógena durante 24 h en medio Nutridoma-BO. \* $p < 0.005$ .

### 1.6. Estudio del número de receptores desensamblados

Con el fin de determinar si los niveles aumentados de AChR en la superficie celular luego de la incubación con 5  $\mu\text{M}$  de Cer se debían a un aumento en el ensamblado del receptor, se determinó el número de receptores desensamblados utilizando un ensayo de microscopía de fluorescencia reportado recientemente por Baier y Barrantes (2007). En las células controles el porcentaje de subunidades  $\alpha$  desensambladas fue de ~40%, disminuyendo a ~30% en las células tratadas con Cer (Fig. 36). Esta tendencia a la disminución en el porcentaje de AChRs desensamblados, junto con el descenso en el número de receptores intracelulares

totales (AChRs ensamblados + desensamblados) (Fig. 31A) indicaría un posible aumento en la eficiencia del proceso de ensamblado del AChR luego de la incubación de las células con 5  $\mu$ M de C<sub>6</sub>-Cer.



**Figura 36. Evaluación del número de receptores desensamblados.** El número de subunidades  $\alpha$  desensambladas se determinó mediante la preincubación de las células con 10 mM de carbamilcolina y marcado con Alexa<sup>594</sup>  $\alpha$ BTX como fue descrito en materiales y métodos. Las barras negras representan los AChRs intracelulares totales (ensamblados+desensamblados) y las blancas a las subunidades  $\alpha$  desensambladas, en células CHO-K1/A5 controles y tratadas con 5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer durante 24 h. Los valores se expresan como porcentaje del AChR control total.

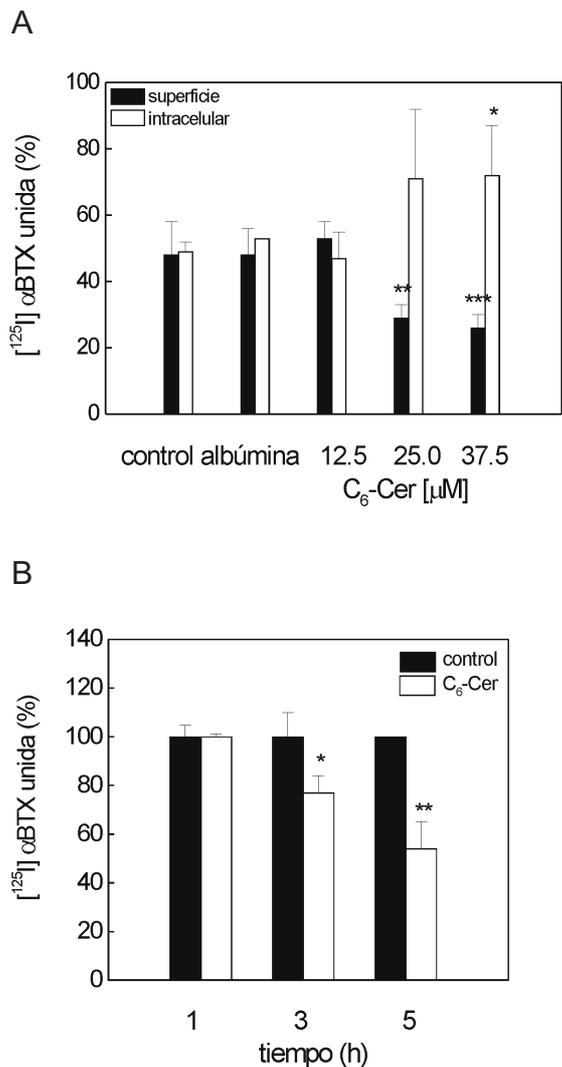
## 2. Incubación de células CHO-K1/A5 con altas concentraciones de Cer

### 2.1. Incubación con Cer de corta cadena

#### 2.1.1. Distribución del AChR determinado por ensayos de unión con [<sup>125</sup>I] $\alpha$ BTX

Posteriormente evaluamos los efectos producidos por concentraciones crecientes de Cer sobre la distribución del AChR. La incubación de células CHO-K1/A5 con 12.5  $\mu$ M de C<sub>6</sub>-Cer durante 5 h no modificó la unión de [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ BTX (Fig. 37A). Sin embargo, el tratamiento con 25 y 37.5  $\mu$ M de C<sub>6</sub>-Cer disminuyó los AChRs de superficie con el aumento concomitante en el número de receptores intracelulares (Fig. 37A). Bajo esas condiciones experimentales, no se detectaron cambios significativos

en el número total de AChRs. Este efecto fue dependiente del tiempo de incubación (Fig. 37B); el AChR de superficie disminuyó a un  $77 \pm 7$  y  $54 \pm 11$  % de los valores controles a las 3 y 5 h de incubación con  $37.5 \mu\text{M}$  de  $\text{C}_6\text{-Cer}$ , respectivamente.



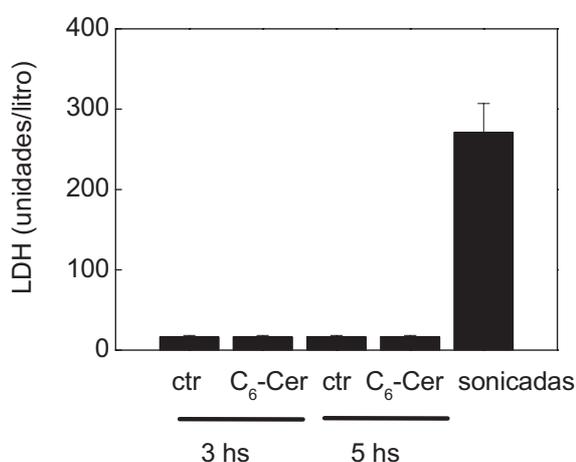
**Figura 37. Distribución del AChR en células CHO-K1/A5 tratadas con altas concentraciones de Cer.**

A) Porcentaje de unión de  $[^{125}\text{I}] \alpha\text{BTX}$  a receptores de superficie (barras negras) e intracelulares (barras blancas) en células CHO-K1/A5 incubadas durante 5 h bajo condiciones controles, o en presencia de 12.5, 25 ó  $37.5 \mu\text{M}$  de  $\text{C}_6\text{-Cer}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ . B) Unión de  $[^{125}\text{I}] \alpha\text{BTX}$  a AChRs de superficie en función del tiempo de incubación en células incubadas con  $37.5 \mu\text{M}$  de  $\text{C}_6\text{-Cer}$ . Las barras representan el porcentaje obtenido luego del tratamiento con Cer (barras blancas) respecto del hallado en células controles (barras negras). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ .

### 2.1.2. Actividad de la enzima LDH en el medio de cultivo

Dado que se ha postulado que las Cer de cadena corta pueden inducir daño celular (Hu y col., 2005), evaluamos la posibilidad de que esto estuviera ocurriendo en nuestras condiciones experimentales. Para ello utilizamos una prueba ampliamente

conocida, que se basa en la determinación de los niveles de la enzima citosólica LDH en el medio de cultivo (Yildiz y col., 1998; Fujii y col., 1998). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de LDH entre las células controles y las tratadas con 37.5  $\mu$ M de C<sub>6</sub>-Cer por 5 h a 37°C (Fig. 38), indicando que las Cer a esa concentración y a ese tiempo de incubación no producen daño celular.

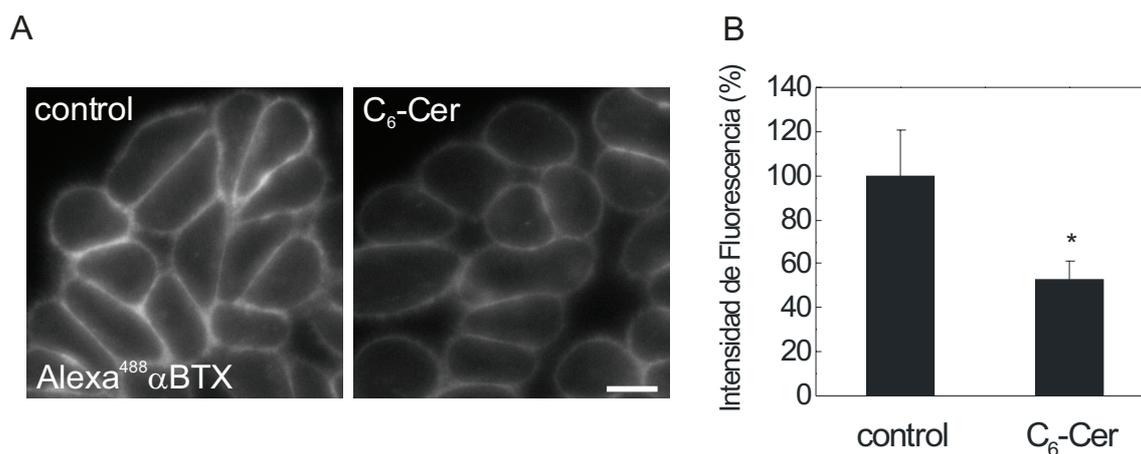


**Figura 38. Medición de los niveles de la enzima LDH en el medio de cultivo.** Las células CHO-K1/A5 se incubaron durante 3 ó 5 h a 37°C en condiciones controles ó en presencia de 37.5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer y se midió el contenido de LDH en el medio de cultivo mediante un método UV comercial. Se dan indican además los valores de LDH en células sometidas a disrupción por sonicación como control de daño celular (más detalles en materiales y métodos).

### 2.1.3. Detección del AChR de membrana plasmática por microscopía de fluorescencia

Además de los ensayos de unión con ligando radioactivo, desarrollamos en paralelo experimentos de microscopía de fluorescencia para estudiar la distribución del AChR en las células tratadas con Cer. Los resultados de microscopía corroboraron

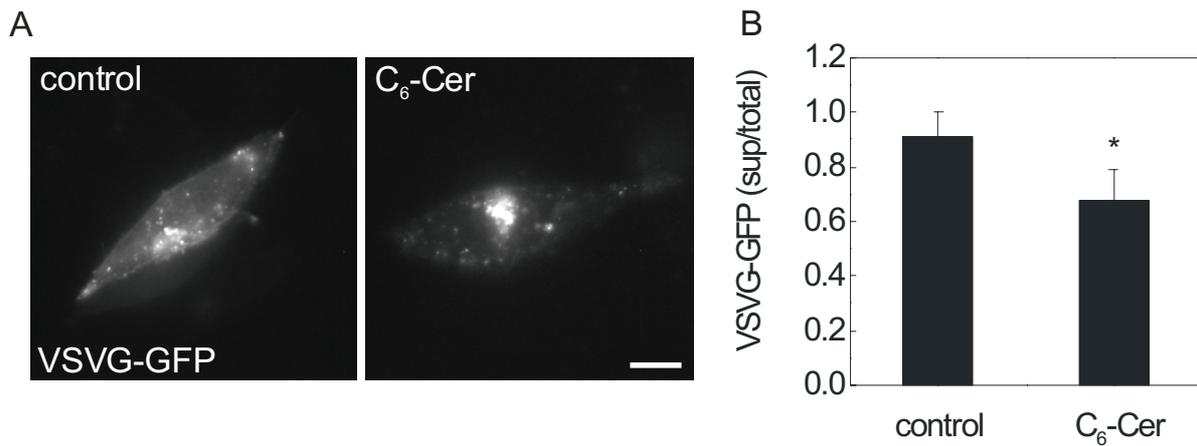
aquéllos obtenidos mediante unión de [<sup>125</sup>I] αBTX, con una disminución de la señal de fluorescencia correspondiente a Alexa<sup>488</sup>αBTX de superficie del 46% en las células tratadas con 37.5 μM C<sub>6</sub>-Cer durante 5 h (Fig. 39).



**Figura 39. Microscopía de fluorescencia del AChR de superficie en células CHO-K1/A5 tratadas con altas concentraciones de Cer.** A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de AChRs de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup>αBTX en células CHO-K1/A5 controles (panel de la izquierda), o incubadas con 37.5 μM C<sub>6</sub>-Cer durante 5 h (panel de la derecha). B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia correspondiente a receptores de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup>αBTX en células CHO-K1/A5 incubadas bajo las condiciones experimentales descritas en (A). \*p<0.0001. Escala: 10 μm.

#### 2.1.4. Expresión en superficie de la proteína VSVG-GFP

La expresión en superficie de la proteína de fusión VSVG-GFP se estudió en las mismas condiciones indicadas en el inciso anterior, determinándose una reducción significativa de la señal fluorescente del 25% en las células tratadas con Cer respecto de las controles, lo que indica que el tratamiento con altas concentraciones de Cer afecta el tráfico de otras proteínas además del AChR (Fig. 40).

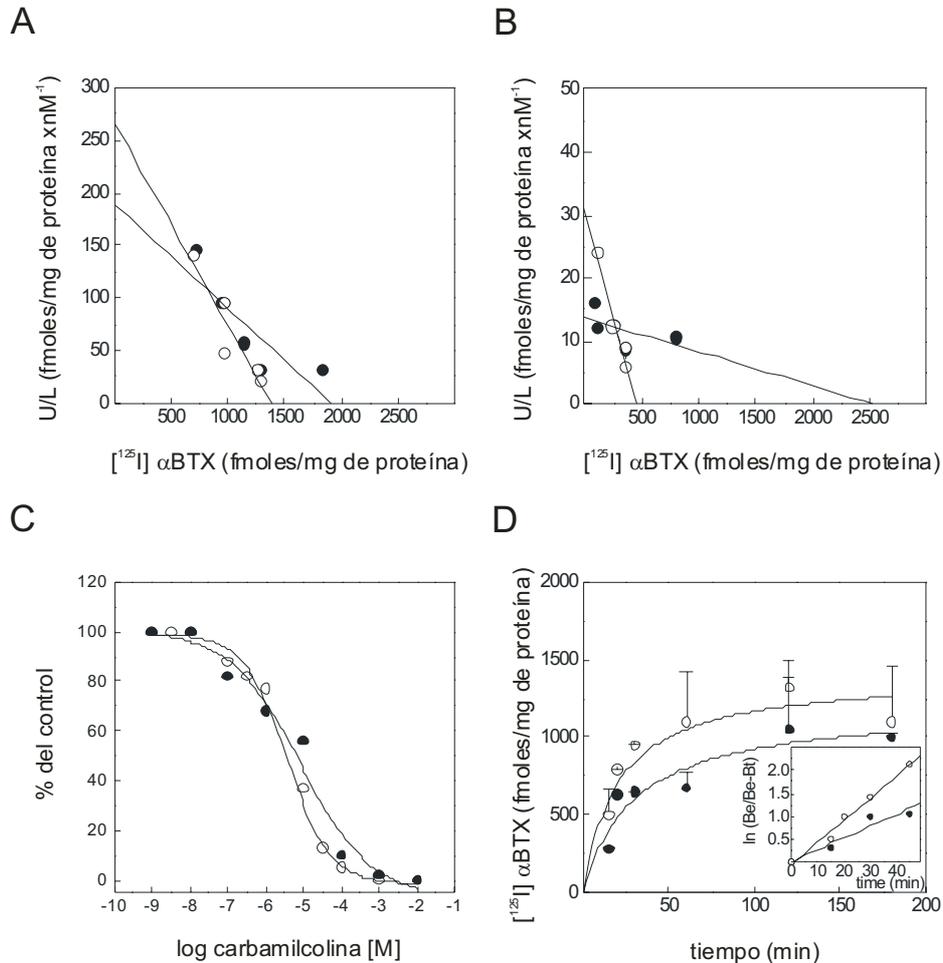


**Figura 40. Tratamiento con 37.5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer de células CHO-K1/A5 transfectadas en forma transiente con la proteína VSVG-GFP.** A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de la proteína VSVG-GFP expresada en células controles (panel de la izquierda) y tratadas con 37.5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer (panel de la derecha). B) Cuantificación de la señal de fluorescencia de VSVG-GFP en la superficie celular. Escala: 10  $\mu$ m.

### 2.1.5. Estudios de la afinidad del AChR por el ligando $\alpha$ BTX

Se determinó además si el tratamiento con altas concentraciones de Cer afectan la afinidad del AChR por el ligando  $\alpha$ BTX. Las C<sub>6</sub>-Cer en concentraciones que disminuyen la expresión del receptor en superficie produjeron un aumento en la afinidad por [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ BTX (Fig. 41A-B). La constante de disociación aparente correspondiente a los AChRs remanentes en la superficie celular luego del tratamiento con Cer disminuyó en aproximadamente un 50% y 60% en las células tratadas con 25 y 37.5  $\mu$ M de C<sub>6</sub>-Cer, respectivamente. La mayor afinidad del AChR luego del tratamiento con Cer fue también evidente en los ensayos de desplazamiento con el agonista carbamilcolina (Fig. 41C). La velocidad de asociación entre la toxina y el AChR también aumentó luego del tratamiento con Cer (Fig. 41D). Todos estos resultados nos permitieron asegurar que la disminución en los niveles de AChR de la superficie celular por incubación con Cer no resultan de una disminución de la afinidad

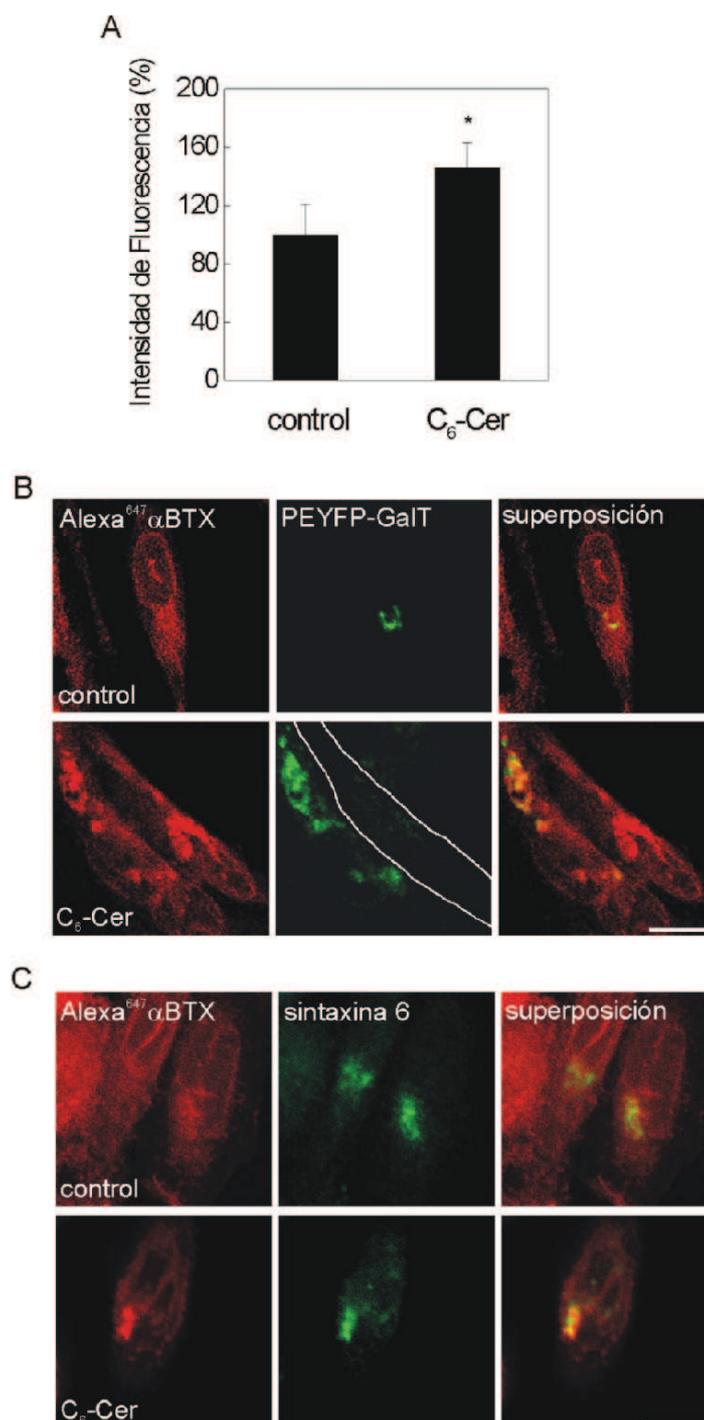
por el antagonista competitivo  $\alpha$ BTX, y que por el contrario, el tratamiento con altas concentraciones de Cer provoca el aumento de la afinidad del receptor por dicho ligando.



**Figura 41. Caracterización farmacológica del AChR presente en células CHO-K1/A5 controles y tratadas con altas concentraciones de C<sub>6</sub>-Cer.** A-B) Transformadas de Scatchard obtenidas mediante la unión específica de [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ BTX en células controles (●) y en las incubadas con 25  $\mu$ M ó 37.5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer (○) en (A) y (B) respectivamente. C) Curvas de desplazamiento de la unión de [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ BTX promovida por la presencia de las concentraciones indicadas de carbamilcolina para células controles o tratadas con 37.5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer. D) Cinéticas de asociación de [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ BTX al AChR para las condiciones descritas en (C). Detalle: linealización de las curvas de asociación descritas en (D).

### 2.1.6. Localización del AChR intracelular evaluado por microscopía de fluorescencia

El tratamiento con 37.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{C}_6\text{-Cer}$  durante 5 h produjo un aumento del 50% aproximadamente en la señal de fluorescencia de AChRs intracelulares marcados con Alexa<sup>594</sup> $\alpha\text{BTX}$  (Fig. 42A). El patrón de fluorescencia intracelular también sufrió cambios por el tratamiento con el lípido: mientras que en las células controles el AChR se distribuye en forma mayormente uniforme, pudimos observar que en las células tratadas con  $\text{C}_6\text{-Cer}$  la señal fluorescente se concentraba de manera no homogénea en la región perinuclear (Fig. 42B). Debido a que este patrón de fluorescencia es muy similar al TGN, identificado en el capítulo anterior como el compartimiento subcelular donde el AChR es retenido luego de la depleción crónica del colesterol (Pediconi y col., 2004), las células se transfectaron con el vector que codifica para la proteína de fusión pEYFP-GalT. Elegimos esta enzima dado que la GalT es un buen marcador del TGN (Mackenzie y col., 1999; Schaub y col., 2006). Pasadas 24 h de la transfección, las células se incubaron con 37.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{C}_6\text{-Cer}$  durante 5 hs, y los AChRs intracelulares se marcaron con Alexa<sup>647</sup> $\alpha\text{BTX}$ . Las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal revelaron un importante grado de colocalización de las señales fluorescentes correspondientes a receptores intracelulares marcados y el marcador de TGN (Fig. 42B). También se realizaron experimentos de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-syntaxina 6 como marcador específico del TGN (Vandenbulcke y col., 2000), obteniéndose una colocalización similar (Fig. 42C). Por lo tanto, el tratamiento con altas concentraciones de  $\text{C}_6\text{-Cer}$  produciría el bloqueo del tráfico del AChR a la membrana plasmática dando como resultado la acumulación del AChR a nivel del TGN.



**Figura 42. Distribución del AChR intracelular en las células tratadas con 37.5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer.** A) Porcentaje de AChRs intracelulares marcados con Alexa<sup>647</sup> $\alpha$ BTX en células CHO-K1/A5 controles o incubadas en presencia de 37.5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer durante 5h. \* $p < 0.001$ . B y C) Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal mostrando la colocalización de los receptores intracelulares marcados con Alexa<sup>647</sup> $\alpha$ BTX (paneles de la izquierda) con los marcadores de trans-Golgi/TGN pEYFP-GalT y syntaxina 6 respectivamente (paneles medios) en células controles y tratadas con 37.5  $\mu$ M C<sub>6</sub>-Cer durante 5h. Las correspondientes imágenes de superposición se observan en los paneles de la derecha. Escala: 10  $\mu$ m.

## 2.2. Incubación con Cer de larga cadena

### 2.2.1. Distribución del AChR evaluado por ensayos de unión de [<sup>125</sup>I] αBTX

Se realizaron experimentos de unión con [<sup>125</sup>I] αBTX empleando células CHO-K1/A5 para evaluar los efectos de las Cer de larga cadena (Cer-cereb) sobre la distribución del AChR. Luego de 3 y 5 h de tratamiento pudimos observar que las Cer-cereb (37.5 μM) también fueron efectivas en la reducción de los AChR de superficie, provocando también el aumento de los receptores intracelulares (Tabla 4).

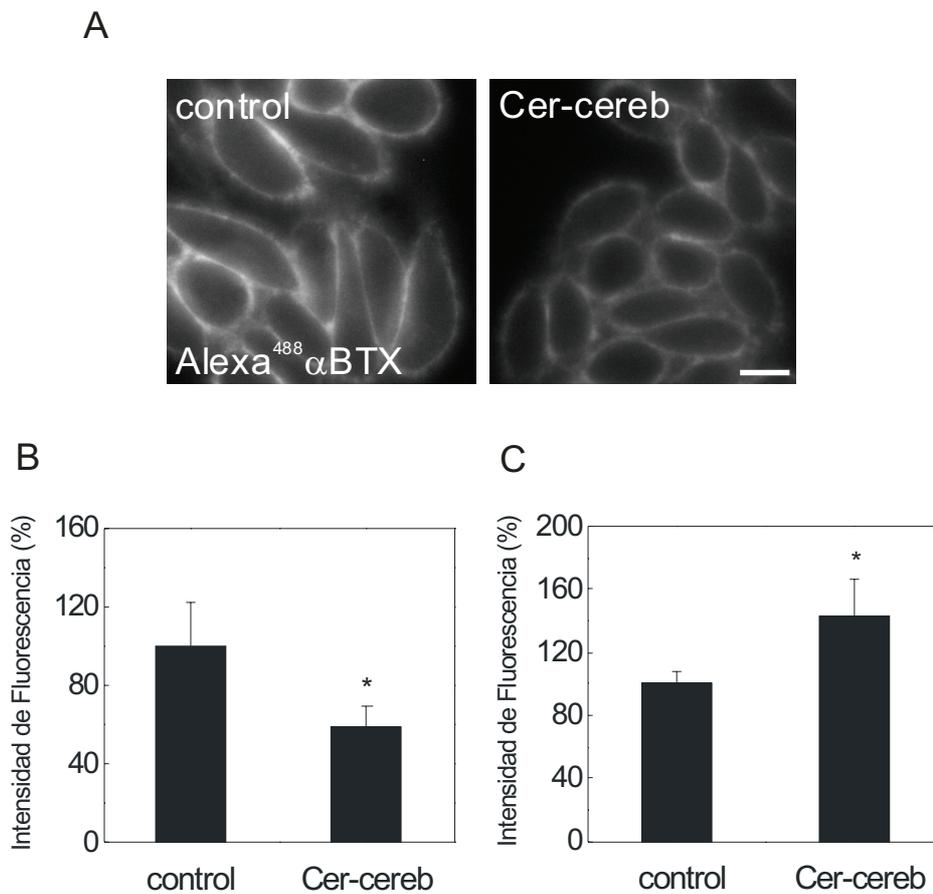
**Tabla 4.** Efectos de la incubación con 37.5 μM de Cer-cereb sobre el AChR de superficie, intracelular y total detectado en células CHO-K1/A5.

Condición	Superficie	Intracelular	Total
Control (6)	527 ± 27	571 ± 140	1098 ± 285
Albúmina 3 h (5)	524 ± 4	579 ± 104	1103 ± 199
Cer-cereb 3 h (5)	369 ± 45 **	629 ± 159	998 ± 252
Albúmina 5 h (7)	532 ± 80	577 ± 115	1109 ± 167
Cer-cereb 5 h (7)	285 ± 106 **	462 ± 95	747 ± 154 *

Los resultados son valores promedio ± D.E. expresado como fmoles de [<sup>125</sup>I] αBTX específicamente unida/mg de proteína. Los números entre paréntesis indican el número de muestras individuales analizadas. \* p < 0.025; \*\* p < 0.001.

### 2.2.2. Distribución del AChR evaluado por microscopía de fluorescencia

El tratamiento de las células CHO-K1/A5 con 37.5  $\mu$ M de Cer-cereb provocó una disminución del AChR de superficie (~40%), determinada mediante experimentos de microscopía de fluorescencia con Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX (Figs. 43A y B), con el concomitante aumento de la fluorescencia intracelular correspondiente a receptores marcados con Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX (Fig. 43C). Estos datos concuerdan con los obtenidos en los ensayos de unión de ligando radioactivo (Tabla 4).



**Figura 43. Distribución del AChR en células CHO-K1/A5 tratadas con Cer-cereb.**

A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de receptores de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX en células controles (panel de la izquierda) o tratadas con 37.5  $\mu$ M de Cer-cereb durante 5 h (panel de la derecha). B) Cuantificación de la señal de fluorescencia de Alexa<sup>488</sup> $\alpha$ BTX en la superficie de células crecidas bajo las condiciones descritas en (A). C) Cuantificación de los receptores intracelulares marcados con Alexa<sup>594</sup> $\alpha$ BTX. \* $p < 0.001$  y \* $p < 0.0001$  en (B) y (C) respectivamente. Escala: 10  $\mu$ m.

### 2.3. Efecto de la incubación con esfingosina

Debido a que por acción de una ceramidasa las Cer pueden ser convertidas rápidamente a Sph (Taha y col, 2006), fue necesario determinar si son las Cer y no su metabolito las que inducen cambios sobre la distribución del AChR. Por este motivo, evaluamos si la Sph es también capaz de producir cambios análogos a los detectados con Cer. Luego de incubar las células con 37.5  $\mu$ M de Sph durante 5 h no se observaron cambios en el número de AChRs de superficie ni en los niveles de receptor intracelular (Tabla 5), indicando que los cambios en la distribución del receptor son ejercidos específicamente por las Cer.

**Tabla 5.** Efectos del tratamiento con 37.5  $\mu$ M de Sph durante 5 h sobre la cantidad de AChR de superficie e intracelular expresado en células CHO-K1/A5.

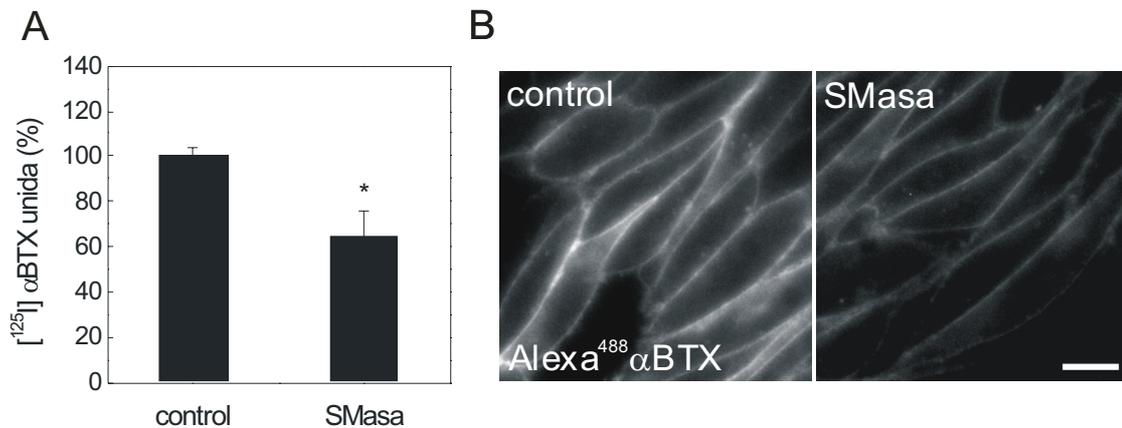
Condición	Superficie	Intracelular	Total
<b>Control (6)</b>	527 $\pm$ 27	571 $\pm$ 140	1208 $\pm$ 121
<b>MeOH 5 h (13)</b>	550 $\pm$ 33	549 $\pm$ 11	1099 $\pm$ 22
<b>Esfingosina 5 h (12)</b>	511 $\pm$ 66	619 $\pm$ 92	1130 $\pm$ 170

Los resultados son valores promedio  $\pm$  D.E. expresado como fmoles de [ $^{125}$ I]  $\alpha$ BTX específicamente unida/mg de proteína.

### 3. Generación de Cer endógenas por tratamiento con SMasa

#### 3.1. Distribución del AChR evaluado por unión de ligando radioactivo y por microscopía de fluorescencia

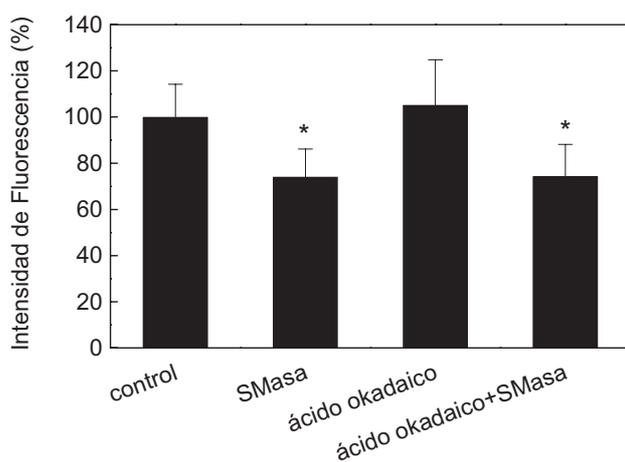
Con el propósito de indagar si las Cer endógenas promueven cambios sobre el número de AChR de superficie en forma similar a las Cer agregadas exógenamente, las células CHO-K1/A5 se incubaron con 100 mU/ml de esfingomielinasa de *Bacillus cereus* (SMasa) por 1 h a 37°C. Los experimentos de unión con [<sup>125</sup>I] αBTX evidenciaron una disminución del AChR de superficie de aproximadamente 35% en las células tratadas con SMasa respecto de las células controles (Fig. 44A). Resultados similares se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia, utilizando Alexa<sup>488</sup> αBTX (Fig. 44B).



**Figura 44. Evaluación de los AChRs de superficie luego del tratamiento con SMasa.** A) Porcentaje de [<sup>125</sup>I] αBTX unida a receptores de superficie en células CHO-K1/A5 controles ó incubadas con 100 mU/ml de SMasa durante 1 h a 37°C. \*p<0.005. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia de AChRs de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup> αBTX en células controles (panel de la izquierda) o tratadas con SMasa (panel de la derecha). Escala: 10 μm.

### 3.2. Evaluación de la participación de PP2A en la disminución del AChR de superficie por tratamiento con SMasa

Dado que las Cer están involucradas en la activación de la proteína fosfatasa PP2A (Dobrowsky y col., 1993; Hannun, 1996), y teniendo en cuenta que tanto el ensamblado de las subunidades del AChR, como su inserción y estabilidad en la membrana plasmática son afectados por el estado de fosforilación del receptor (Ross y col., 1987; Sadasivam y col., 2005; Bruneau y Akaaboune, 2006; Lanuza y col., 2006) decidimos estudiar si el mecanismo de retención intracelular del AChR mediado por Cer involucra la activación de PP2A. Para esto, realizamos experimentos en presencia de ácido okadaico, un conocido inhibidor de la PP2A activada por Cer (Haystead y col., 1989). La pre-incubación de las células con 0.1  $\mu$ M de ácido okadaico no pudo revertir la disminución de la señal de fluorescencia de AChR de superficie producida por tratamiento con SMasa (Fig. 45), descartando de este modo la participación de la PP2A en dicho proceso.

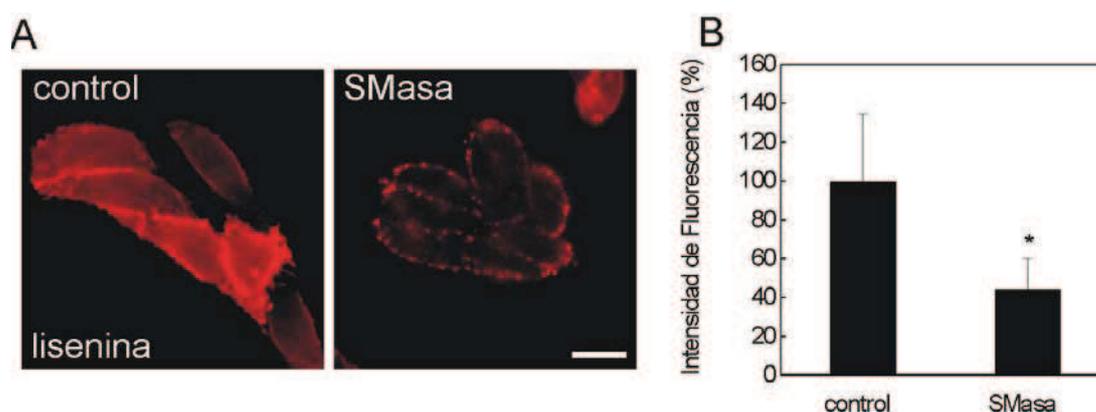


**Figura 45. Incubación con ácido okadaico.** Porcentaje de receptores de superficie marcados con Alexa<sup>488</sup>αBTX en células CHO-K1/A5 incubadas bajo diferentes condiciones experimentales. \*p<0.001.

### 3.3. Evaluación de la acción de la enzima SMasa

#### 3.3.1. Medición de la SM de membrana

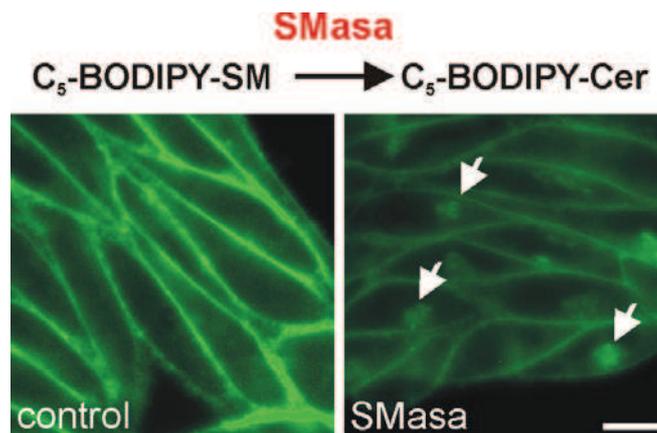
Para comprobar la efectividad de la acción de la SMasa sobre la SM de membrana plasmática utilizamos la sonda fluorescente nt-lisenina-RFP. La lisenina es una toxina proveniente del erizo de mar que reconoce específicamente los dominios de membrana enriquecidos en SM e induce la lisis celular mediante la formación de poros (Yamaji-Hasegawa y col., 2003). La unión específica de la lisenina a la SM la convierte en una herramienta adecuada para examinar la distribución de dicho lípido en las membranas celulares (Nakai y col., 2000). La lisenina que utilizamos fue una mutante no tóxica, acoplada a proteína fluorescente roja, recientemente desarrollada por Kiyokawa y colaboradores (2005). Luego de la incubación con SMasa la marca de lisenina se observó en la superficie celular como una fluorescencia discreta y puntiforme. Además, la señal fluorescente correspondiente a lisenina sufrió una reducción del 55% en las células tratadas respecto de las controles (Fig. 46).



**Figura 46. Marcado de la SM de la membrana celular con la sonda lisenina.** A) Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando la marca de nt-lisenina-RFP en la superficie de células CHO-K1/A5 controles (panel de la izquierda) o tratadas con SMasa (panel de la derecha). B) Cuantificación de la señal fluorescente correspondiente a SM marcada con nt-lisenina-RFP en células incubadas bajo las condiciones descritas en (A). \* $p < 0.0001$ . Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

**3.3.2. Generación de C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer a partir de C<sub>5</sub>-BODIPY-SM por tratamiento de las células con SMasa**

Otra forma de evaluar la acción de la SMasa fue mediante la visualización de la generación de Cer endógenas. Para ello, las células CHO-K1/A5 se marcaron con un análogo fluorescente de la SM, C<sub>5</sub>-BODIPY-SM, y se trataron con SMasa en forma semejante a lo reportado por Zha y col. (1998). Luego de la incubación con SMasa durante 5 min a 37°C pudo observarse la generación de C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer el cual se traslocó rápidamente a la región del aparato de Golgi, (Fig. 47, flechas) en concordancia con lo reportado por Pagano y col. (1991).

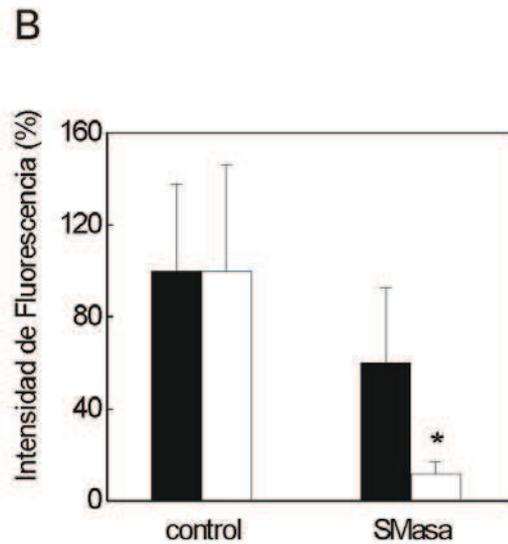
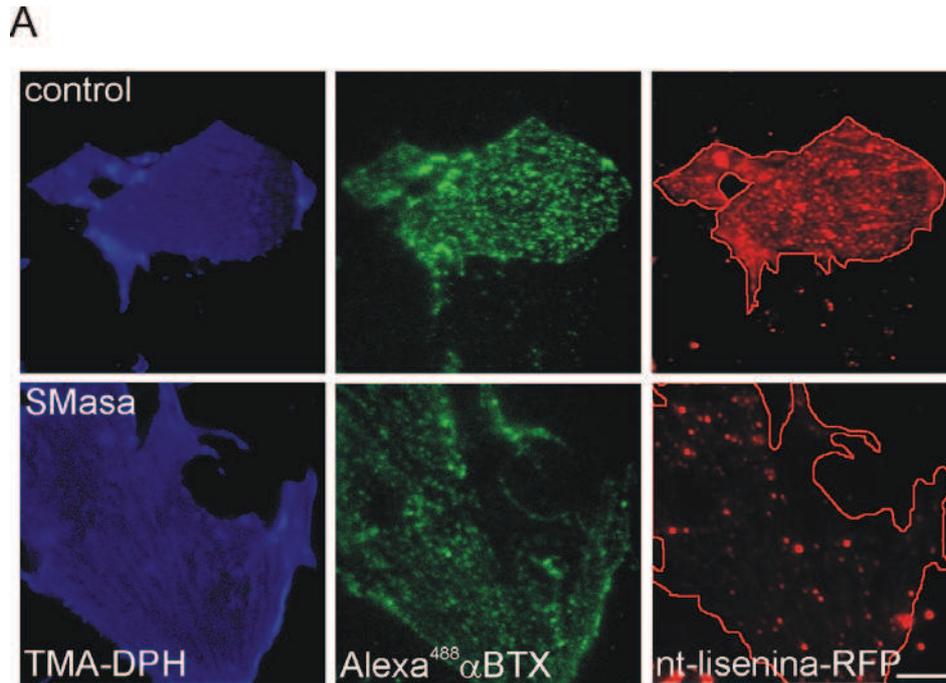


**Figura 47. Generación de C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer a partir de C<sub>5</sub>-BODIPY-SM por acción de SMasa.** En el panel de la izquierda se muestra al lípido fluorescente C<sub>5</sub>-BODIPY-SM en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5 controles. Luego de la incubación con 100 mU/ml de SMasa el lípido es hidrolizado a C<sub>5</sub>-BODIPY-Cer el cual se localiza en el aparato de Golgi (panel de la derecha; flechas). En ambas condiciones las células fueron incubadas durante 5 min a 37°C. Escala: 10 μm.

---

### 3.4. Acción de SMasa sobre láminas de membrana plasmática aislada

Para determinar si la disminución en el AChR de superficie mediada por tratamiento con SMasa resultaba de las variaciones en los niveles de SM en la membrana, realizamos otra serie de experimentos con SMasa sobre láminas de membrana plasmática aisladas de células CHO-K1/A5 mediante ultrasonido, como fue recientemente descrito por Borroni y col. (2007) y Kellner y col. (2006). Luego de este procedimiento las células quedan “destechadas”, es decir, solamente con la membrana que se encuentra adherida al vidrio, eliminando el citosol, organelas, y la integridad metabólica de la célula. Luego de la incubación de las láminas de membrana plasmática con SMasa durante 30 min a 37°C en *buffer* KGlu, los especímenes fueron doblemente marcados con Alexa<sup>488</sup>αBTX y con nt-lisenina-RFP. No se observaron diferencias significativas en la señal de fluorescencia proveniente de los AChRs marcados con Alexa<sup>488</sup>αBTX. Sin embargo, la señal fluorescente de lisenina sufrió una drástica disminución (~90%) (Fig. 48). Este resultado nos estaría indicando que para que la SMasa sea efectiva en provocar la disminución del AChR de superficie, sería imprescindible que se conserve la integridad celular.



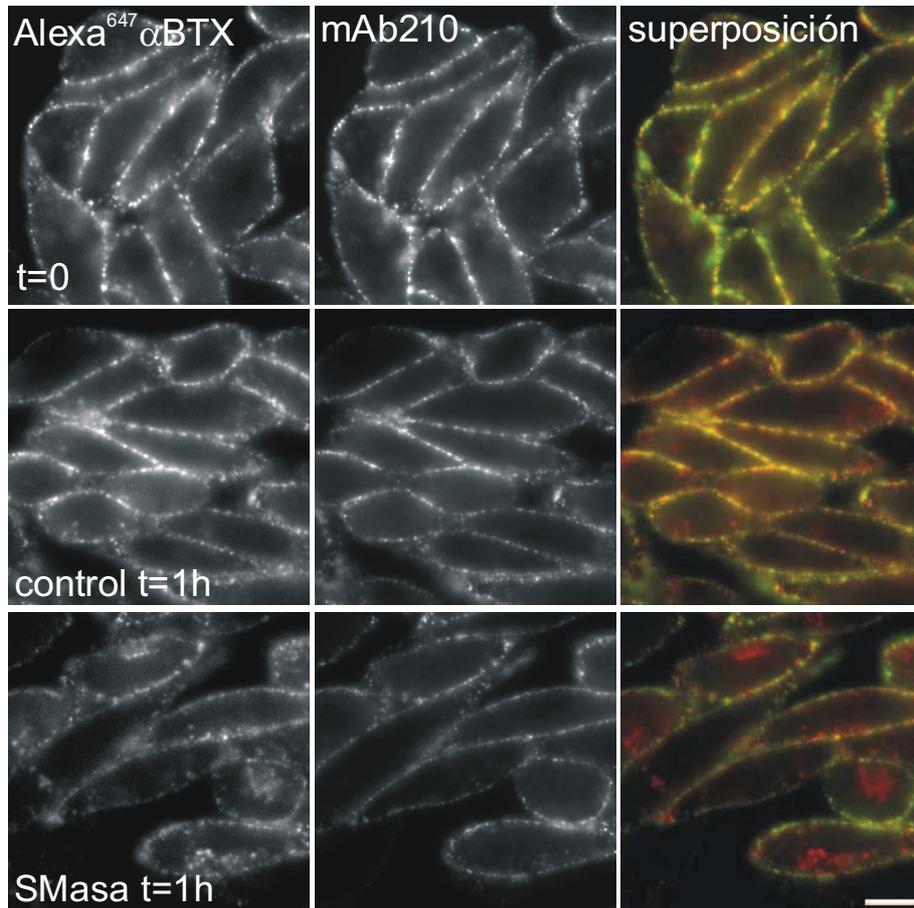
**Figura 48. Tratamiento con SMasa de láminas de membrana plasmática.** A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de láminas de membrana plasmática aisladas de células CHO-K1/A5, e incubadas en ausencia (control) o presencia de SMasa. Las membranas se marcaron luego con el lípido fluorescente TMA-DPH (panel de la izquierda), con Alexa<sup>488</sup>αBTX (panel medio) y con nt-lisena-RFP (panel de la derecha). Escala: 5 μm. El perímetro de las membranas está marcado en los paneles de nt-lisena-RFP para facilitar la visualización. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia correspondiente a Alexa<sup>488</sup>αBTX (barras negras) y nt-lisena-RFP (barras blancas) en laminas de membrana plasmática controles o tratadas con SMasa. \* p<0.001.

### 3.5. Estudios de internalización del AChR

#### 3.5.1. Evaluación de la distribución del AChR por microscopía de fluorescencia

El colesterol y la SM se encuentran en íntima asociación en las biomembranas formando microdominios o balsas lipídicas (Simons e Ikonen, 1997; Brown y London, 1998). La depleción del colesterol por CDx causa la rápida internalización del AChR en células CHO-K1/A5 (Borroni y col., 2007). Nosotros hipotetizamos que la disminución en los niveles de AChR de superficie luego de la depleción de SM por SMasa podría operar a través de un mecanismo similar. Para probar esta hipótesis medimos la tasa de internalización del AChR luego del tratamiento con SMasa, utilizando el protocolo de marcado doble descrito por Borroni y col. (2007) de acuerdo con el cual las células se marcaron en primer lugar con Alexa<sup>647</sup>αBTX a 4°C y posteriormente se incubaron a 37°C por 0 y 1 h, respectivamente. Los AChRs remanentes en la superficie celular a estos dos tiempos se marcaron luego con el anticuerpo mAb 210 (el cual reconoce un epítipo extracelular de la subunidad α del AChR) a 4°C, seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa<sup>488</sup>. En las células controles, luego de 1 h de incubación a 37°C, la señal fluorescente correspondiente al AChR se observó casi exclusivamente en la superficie celular. La comparación de la distribución de las señales fluorescentes de AChR marcado con Alexa<sup>647</sup>αBTX y de aquellos marcados con a mAb 210, tanto a t = 0 como a t = 1h, reveló un alto grado de superposición, indicando que la mayor parte de los AChRs permanecieron en la superficie celular luego de 1 h de incubación a 37°C (Fig. 49), pudiendo observarse sólo unas pocas vesículas de endocitosis en el interior celular. Por el contrario, en las células tratadas con SMasa, la fluorescencia de Alexa<sup>647</sup>αBTX se acumuló en abundantes vesículas endocíticas, en paralelo con la disminución del solapamiento de las señales fluorescentes correspondientes a receptores “viejos” y “nuevos” en la membrana plasmática (Fig. 49). Por lo tanto, el tratamiento con SMasa provocaría una

disminución del número de AChR de la superficie celular a través de un aumento en su internalización.

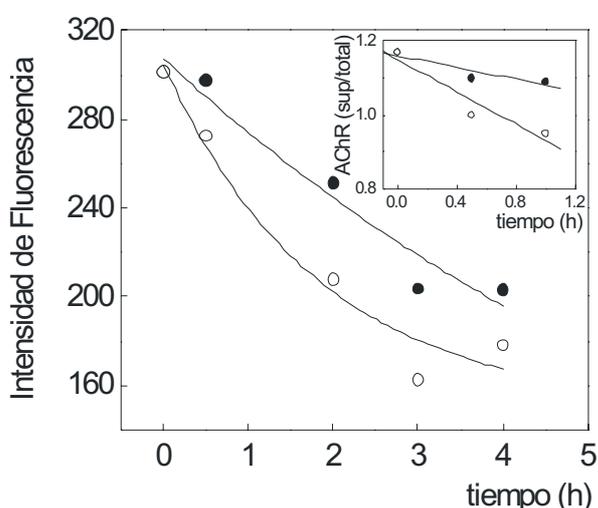


**Figura 49. Ensayos de internalización del AChR en células tratadas con SMasa.** Imágenes de microscopía de fluorescencia siguiendo la internalización del AChR de membrana plasmática marcado con Alexa<sup>647</sup> αBTX en células controles y tratadas con SMasa en los tiempos indicados. Escala: 10 μm.

### 3.5.2. Determinación de la cinética de internalización del AChR

Con el fin de determinar la cinética de este proceso, los AChRs de superficie se marcaron con Alexa<sup>488</sup> αBTX a 4°C, seguidos de incubación con SMasa a 37°C por

períodos de tiempo crecientes (de 0 a 4 h). La intensidad de fluorescencia en la superficie celular se midió para cada tiempo y se calculó la relación AChR de superficie/AChR total. El  $t_{1/2}$  disminuyó de 1.7 h en las células controles a 1.0 h en las tratadas con SMasa (Fig. 50), indicando que la depleción de la SM de membrana plasmática por acción de la enzima SMasa aceleró la cinética de internalización del AChR, semejante a lo observado en células CHO-K1/A5 luego de la depleción de colesterol por tratamiento con CDx (Borroni y col., 2007).

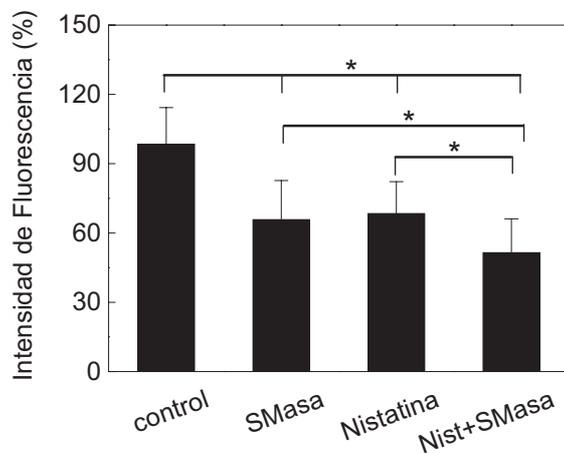


**Figura 50. Cinética de internalización del AChR en células tratadas con SMasa.** Las curvas muestran la disminución en la fluorescencia de superficie de receptores marcados con Alexa<sup>488</sup>  $\alpha$ BTX en función del tiempo, para células CHO-K1/A5 controles (●) y tratadas con SMasa (○). Detalle: cinéticas de internalización del AChR en las mismas condiciones experimentales.

### 3.6. Incubación con nistatina

Además de causar la hidrólisis de la SM, varios trabajos reportan que el tratamiento con SMasa produce una rápida internalización del colesterol de la membrana plasmática (Slotte y Bierman, 1988; Ridgway, 2000; London y London, 2004). Por este motivo decidimos evaluar la posibilidad de que la disminución de los AChRs de la superficie celular resulte de la internalización del colesterol además de la depleción de SM por tratamiento con SMasa. Para ello, incubamos las células con el antibiótico nistatina, el cual interactúa y secuestra específicamente el colesterol de la membrana plasmática, reteniéndolo a ese nivel (Tewary y col., 2006). Si bien en las

células tratadas con nistatina los niveles de AChR de superficie disminuyeron en un 30%, el tratamiento combinado con ambas drogas (nistatina + SMasa) promovió una disminución mayor de la proteína a nivel de la membrana celular, la cual fue del 50% respecto del valor control (Fig. 51), sugiriendo que la SMasa es efectiva en disminuir los AChRs de membrana plasmática, aun cuando el colesterol no es internalizado.



**Figura 51. Tratamiento con el antibiótico nistatina.** Porcentaje de intensidad de fluorescencia de Alexa<sup>488</sup>αBTX en la superficie de células CHO-K1/A5 incubadas en las diferentes condiciones experimentales indicadas en la figura. \*p<0.01.

---

## Discusión

En el presente capítulo, examinamos los efectos ejercidos por las Cer de corta y larga cadena sobre diferentes propiedades del AChR, así como también sobre su tráfico hacia la membrana plasmática en células CHO-K1/A5, las cuales expresan en forma heteróloga estable el AChR de tipo muscular adulto. Encontramos que la incubación con C<sub>6</sub>-Cer exógenas en concentraciones bajas (5 μM) durante 24 h provocaron el aumento del número de AChR presentes en la superficie celular (Fig. 30A y B) a la vez que disminuyeron los niveles de receptor intracelular (Fig. 31A) sin que se produzcan cambios en la afinidad del receptor por αBTX (Fig. 32). El tratamiento con 5 μM de Cer-cereb produjo cambios similares en los niveles de AChR de superficie e intracelular (Fig. 30A y B).

Además del papel de las Cer como segundos mensajeros, estos lípidos son importantes moléculas intermediarias en el metabolismo de los SLs (Hannun, 1994; Hannun y Obeid, 2002; van Blitterswijk y col., 2003; Futerman y Hannun, 2004). Numerosos trabajos demuestran que las Cer exógenas pueden actuar como precursores de SLs complejos. Así por ejemplo, la incubación de células HL-60 con [<sup>14</sup>C] C<sub>16</sub>-Cer, condujo a la formación de SM conteniendo Cer marcada, además de a una pequeña proporción de glicolípidos neutros y gangliósidos (Ardail y col., 2002). En forma similar, utilizando también Cer radiactivamente marcada, Ridgway y col. (1995) y Furuya y col. (1998) observaron la conversión de este lípido en SM y GlcCer en células CHO y en neuronas de cerebelo respectivamente. Además, Chigorno y col. (2005) demostraron que SLs celulares pueden ser sintetizados principalmente mediante el reciclado de las bases esfingoides obtenidas de la vía de degradación. En nuestro sistema experimental (células CHO-K1/A5) pudimos observar que a los 30 min de incubación con 5 μM de C<sub>6</sub>-Cer en presencia de concentraciones trazas de C<sub>6</sub>-NBD-Cer, la producción de C<sub>6</sub>-NBD-SM era notoria (Fig. 34). Luego de 24 h de

---

incubación, además de la banda fluorescente de C<sub>6</sub>-NBD-SM, pudimos observar una nueva banda correspondiente a C<sub>6</sub>-NBD-GlcCer, con la desaparición concomitante de la banda de C<sub>6</sub>-NBD-Cer, indicando que la Cer fluorescente había sido completamente convertida a SLs complejos. Venkataraman y Futerman, (2001) demostraron que las Cer de corta y de larga cadena poseen un comportamiento semejante en la ruta biosintética de los SLs. Por este motivo pensamos que resultados similares a los que obtuvimos con C<sub>6</sub>-Cer podrían obtenerse con Cer de larga cadena. Como corroboración de este planteo está el hecho de que los efectos producidos sobre el tráfico del AChR por las C<sub>6</sub>-Cer pudieron ser reproducidos por las Cer-cereb. Por otra parte, pudimos determinar que el tratamiento de las células CHO-K1/A5 con 10 μM de SM exógena produjo el aumento de los niveles de AChR en la superficie celular (Fig. 35). En conjunto, estos resultados nos indicarían que el tratamiento con bajas concentraciones de Cer aumentaría el número de AChR presentes en la membrana plasmática mediante el aumento de la síntesis de SLs. Trabajos de nuestro laboratorio destacan la importancia de los SLs para un correcto ensamblado de las subunidades del AChR en el RE (Baier y Barrantes, 2007) y para el tráfico del receptor a la membrana plasmática (Roccamo y col., 1999; Baier y Barrantes, 2007). En este sentido, nosotros observamos que la incubación con 5 μM de C<sub>6</sub>-Cer produjo una disminución en el porcentaje de subunidades α desensambladas que pasó de ~40% en las células controles a ~30% en las células tratadas con Cer (Fig. 36). Por otra parte, cuando se sintetiza SM a partir de Cer, se libera DAG como co-producto de la reacción, el cual cumple un papel crucial en el transporte proteico desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática (Litvak y col., 2005). La consecuente generación de DAG por el agregado de Cer exógenas en nuestro sistema experimental podría también contribuir al aumento del tráfico del AChR a la superficie celular.

La alteración en la distribución del AChR por tratamiento con 5 μM de Cer no responde a un mecanismo generalizado dado que la expresión en superficie de la

---

proteína VSVG-GFP no se vio afectada por incubación con esa concentración de C<sub>6</sub>-Cer (Fig. 33). Además, el hecho de que la incubación con Cer aumenta en este caso el AChR en la superficie celular sin producir cambios en los niveles de VSVG-GFP, una proteína que principalmente no particiona en balsas lipídicas (Harder y col., 1998; Dukhovny y col., 2006), no sólo pone de manifiesto una vez más, la importancia de los SLs para el correcto tráfico exocítico del AChR (Roccamo y col., 1999; Baier y Barrantes, 2007) sino que sugiere la asociación del AChR con dominios lipídicos a lo largo del camino de exocitosis, como se describe en el Capítulo 2 de esta Tesis.

Posteriormente evaluamos los efectos generados por incubación con concentraciones mayores de Cer (25 y 37.5 µM). Este rango de concentración es el que normalmente se utiliza para estudiar los efectos de las Cer sobre el tráfico proteico (Rosenwald y Pagano, 1993; Luan y Griffiths, 2006). A estas concentraciones, las Cer disminuyeron marcadamente el AChR de la membrana plasmática (Figs. 37, 39, 41A y 41B), con el aumento concomitante de los niveles de receptor intracelular (Fig. 37A y 42A). En forma similar, Rosenwald y Pagano (1993) determinaron que la incubación de células CHO-K1 (línea celular progenitora de la usada por nosotros, CHO-K1/A5) con 25 µM de C<sub>6</sub>-Cer provoca la inhibición del tráfico exocítico de la proteína VSVG a través del *medial*- y *trans*-Golgi y su consecuente transporte a la superficie celular. Más recientemente, Luan y Griffiths (2006) demostraron que las Cer de corta cadena bloquean el transporte del receptor CD36 a la membrana plasmática de monocitos y macrófagos. Además, las C<sub>6</sub>-Cer causan disrupción del aparato de Golgi, seguido de inhibición de la reorganización de los citoesqueletos de F-actina y microtúbulos, y cambios drásticos en la morfología celular, lo que también llevaría a la inhibición del tráfico proteico (Hu y col. 2005). En forma análoga, las Cer en altas concentraciones podrían reducir el número de AChRs de la superficie celular mediante el bloqueo del tráfico exocítico del receptor, como lo sugieren los cambios en su distribución intracelular y su acumulación en la región perinuclear (Fig. 42B). Más específicamente,

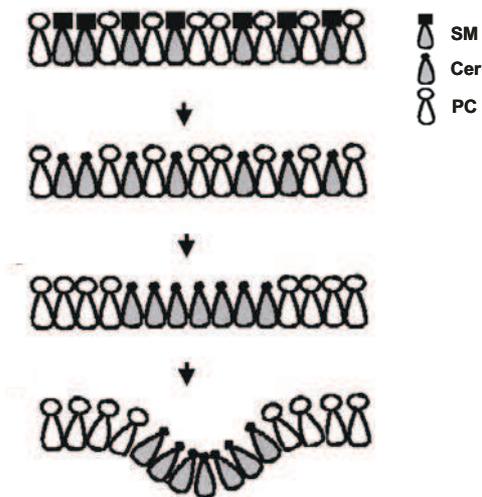
---

podimos observar la colocalización del AChR intracelular marcado con Alexa<sup>647</sup> $\alpha$ BTX con marcadores del *trans*-Golgi/TGN, como la pEYFP-Gal-T y la syntaxina 6 (Schaub y col., 2006, Vandenbulcke y col., 2000) en grandes cuerpos vesiculares generados por el tratamiento con Cer (Fig. 42B), reminiscentes de los cuerpos multivesiculares que Rosenwald y Pagano (1993) caracterizaron por microscopía electrónica. Es posible entonces que el bloqueo del tráfico del AChR por Cer exógenas en altas concentraciones pudiera afectar el tráfico de otras proteínas además del AChR a través de un mecanismo más generalizado. Corroboramos esta posibilidad transfectando las células CHO-K1/A5 con la proteína fluorescente VSVG-GFP. Observamos una disminución significativa (~25%) en la fluorescencia de GFP en la membrana plasmática luego del tratamiento con 37.5  $\mu$ M de C<sub>6</sub>-Cer (Fig. 40), indicando que un bloqueo del tráfico más general opera cuando se incuban las células con altas concentraciones de Cer. El mecanismo por el cual las Cer ejercen esta inhibición en el tráfico exocítico de proteínas podría responder a múltiples causas como lo propusieron Rosenwald y Pagano (1993) y Fukunaga y col. (2000). Dado que las Cer actúan como segundos mensajeros (Senchenkov y col., 2001) produciendo la activación de fosfatasa y quinasas (Dobrowsky y col., 1993; Liu y col., 1994; Ruvolo, 2003), una posibilidad sería que las Cer indujeran cambios en el estado de fosforilación de proteínas reguladoras del tráfico proteico. Un posible blanco podría ser por ejemplo la Rab 8, una proteína pequeña unidora de GTP, que participa en el tráfico vesicular desde el TGN a la membrana plasmática (Ren y col., 1996; Sato y col., 2007). Uno y col. (2007) observaron la fosforilación de la Rab8 del insecto *Bombyx mori* (BRab8) por PKC tanto *in vitro* como *in vivo*. Además cuando esta proteína es co-transfectada en células 293T se asocia con la proteína quinasa Rab8ip, sugiriendo una modulación de la secreción por la quinasa (Ren y col., 1996). En plaquetas, la Rab 8 es fosforilada luego de la activación por trombina, potente inductor de secreción (Karniguan y col., 1993). En células CHO las C<sub>2</sub>-Cer disminuyen la unión de ARF-1

---

(ADP-ribosylation factor) y PKC- $\alpha$  a las membranas del Golgi, impidiendo de este modo la activación de la fosfolipasa D (PLD) (Abousalham y col., 2002). La PLD conduce a la formación de ácido fosfatídico (PA) importante para la generación de vesículas de transporte en las membranas del Golgi (Siddhanta y Shields, 1998; Siddhanta y col., 2000; Abousalham y col., 2002). En nuestro sistema experimental la inhibición por ácido okadaico de la PP2A (una proteína fosfatasa activada por Cer; Dobrowsky y col., 1993; Hannun, 1996) no pudo revertir la disminución de los AChRs de superficie inducida por la generación de Cer endógenas por tratamiento con SMasa (Fig. 45), descartando de este modo la participación de la PP2A en dicho proceso.

Dado que las Cer agregadas en forma exógena son rápidamente incorporadas por las células y se acumulan en el aparato de Golgi (Lipsky y Pagano, 1983; Pagano y col., 1991) otra posibilidad sería que las Cer afecten el tráfico proteico a través de la alteración de las propiedades biofísicas de las membranas de esta organela. En este sentido, las Cer de cadena larga y las de corta cadena difieren en su comportamiento. Las Cer de larga cadena incrementan el orden de los lípidos (Massey, 2001; Wang y Silvius, 2000), mientras que las Cer de corta cadena ( $C_2$ - y  $C_6$ -Cer) causan una disminución del orden lipídico (Gidwani y col., 2003; Chiantia y col., 2007). Además, las Cer de cadena larga poseen una geometría de tipo cónico por tener una cabeza polar pequeña. Por este motivo promueven curvaturas negativas en el lado de la membrana donde se generan o se agregan (Holopainen y col., 2000; Goñi y col., 2005; Sot y col., 2005) (Fig. 52). Las Cer de cadena corta en cambio, promueven curvaturas positivas en monocapas lipídicas (Goñi y col., 2005; Sot y col., 2005). De una u otra forma, la acumulación de Cer tanto de corta como de larga cadena en el aparato de Golgi, podría promover la desestabilización de sus membranas, llevando a la vesiculación y pérdida de funcionalidad de esta organela (Rosenwald y Pagano 1993; Fukunaga y col. 2000).



**Figura 52.** Formación de dominios de Cer e invaginación en la membrana inducida por la acción hidrolítica de SMasa sobre un liposoma de PC/SM. Por su pequeña cabeza polar, las Cer de cadena larga tienen una geometría cónica, por lo que promueven curvaturas negativas en el lado de la membrana donde se generan o se agregan. Obtenido de "Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes". Holopainen JM, Angelova MI y Kinnunen PK. *Biophys J* (2000) 78:830-838.

Además de la reducción en el número de AChRs de la membrana plasmática, la incubación con altas concentraciones de C<sub>6</sub>-Cer causó un aumento en la afinidad de los receptores remanentes en la superficie celular por su ligando  $\alpha$ BTX, como se evidencia en las transformadas de Scatchard, en las curvas de desplazamiento y en las de cinética de asociación (Fig. 41A-D). El aumento de la afinidad del AChR por el antagonista competitivo  $\alpha$ BTX luego del tratamiento con Cer podría resultar de cambios en las propiedades biofísicas de la membrana celular luego de la incubación con Cer. En este sentido, Heron y col. (1980) postularon que existe una relación directa entre la fluidez de las membranas y la afinidad del receptor de serotonina por su ligando específico. Ellos encontraron que el aumento de la fluidez de las membranas resultaba en una disminución de la K<sub>d</sub>, lo que se traduce en una mayor afinidad del receptor por su ligando. Resultados similares fueron reportados para el receptor de trombina (Tandon y col., 1983) y para el receptor de LDL (Kuo y col., 1990). Las Cer de larga cadena incrementan el orden de los lípidos en membranas modelo que contienen colesterol (Massey, 2001; Wang y Silvius, 2000). Además, se asocian con balsas lipídicas (Xu y col., 2001; Wang y Silvius, 2003) y estos

---

microdominios enriquecidos en Cer son capaces de fusionarse espontáneamente en grandes plataformas de membrana enriquecidas en Cer (Bock y col., 2003; Bollinger y col., 2005; Silva y col., 2006). Por el contrario, las Cer de corta cadena (C<sub>2</sub>- y C<sub>6</sub>-Cer) causan una disminución del orden lipídico (aumento de la fluidez) dependiente de la concentración (Gidwani y col., 2003) y alteran las propiedades físicas de los dominios l<sub>o</sub>, disminuyendo su estabilidad y viscosidad y perturbando el empaquetado de los lípidos (Chiantia y col., 2007). Esto sugeriría que las C<sub>6</sub>-Cer en altas concentraciones provocarían el aumento de la afinidad del AChR por  $\alpha$ BTX por aumento de la fluidez de la membrana.

Otra posibilidad por la cual las Cer podrían promover el aumento en la afinidad del AChR por  $\alpha$ BTX, sería por su interacción con dominios transmembrana del receptor. En efecto, mediante estudios de transferencia de energía de tipo Förster (FRET) realizados en nuestro laboratorio se pudo demostrar que en membranas de *Torpedo* ricas en AChR, marcadas con pireno-SM y tratadas con SMasa, las Cer generadas presentan mayor afinidad por el receptor que la SM parental (Bonini y col., 2002). Antollini y Barrantes (2002) observaron que diferentes AGL comparten un sitio común en la interfase lípido-proteica del AChR, y sugirieron que el efecto inhibitorio de estos ácidos grasos sobre la funcionalidad del AChR (Villar y col., 1988) se debe a que provocan el desplazamiento de lípidos esenciales de sus sitios en la interfase lípido-proteica. Además, la interacción de los AGL con estos sitios no anulares podrían inducir cambios conformacionales en el AChR (Fernandez Nievas y col., 2007). Las Cer podrían unirse a sitios análogos a los que ocupan los AGL en la interfase lípido-AChR (Bonini y col. 2002), y en forma semejante a los AGL podrían regular la unión a ligandos del AChR.

El tratamiento de células CHO-K1/A5 con SMasa, la cual hidroliza la SM de la membrana plasmática con generación de Cer endógenas, disminuyó también los niveles de AChR de la superficie celular (Fig. 44) y aceleró la endocitosis del receptor

(Figs. 49 y 50). Estos resultados se correlacionan con lo hallado en el caso del receptor CD36 de monocitos y macrófagos luego de la acción de SMasa (Luan y Griffiths, 2006). Además, el tratamiento con SMasa produjo en macrófagos y fibroblastos la formación de numerosas vesículas de internalización de la membrana plasmática (Zha y col., 1998). Holopainen y col. (2000) pudieron demostrar que la generación asimétrica de Cer en liposomas gigantes de PC/SM por acción de SMasa conduce a la formación de vesículas, que fueron de tipo endocítico cuando la enzima actuó sobre la monocapa externa del liposoma, o de tipo secretorio cuando la SMasa lo hizo sobre la hemicapa interna. Esto se debe a que por su geometría cónica, las Cer de larga cadena promueven curvaturas negativas en las membranas (Holopainen y col., 2000; Goñi y col., 2005; Sot y col., 2005).

La depleción aguda del colesterol de células CHO-K1/A5 por CDx acelera dramáticamente la endocitosis del AChR (Borroni y col., 2007). La cinética de internalización del AChR luego del tratamiento con SMasa fue muy similar a la resultante luego de la depleción de colesterol por CDx (Borroni y col., 2007), sugiriendo que en ambos casos dicha aceleración podría resultar de la disrupción de los dominios lipídicos de la membrana plasmática enriquecidos en colesterol y SM. Las Cer de cadena larga tienen la capacidad de desplazar específicamente a los esteroides de las balsas lipídicas (London y London, 2004; Ali y col., 2006) y requieren una cadena de al menos 8 unidades metileno para poder desplazar al colesterol de los dominios enriquecidos en SM (Nybond y col., 2005). Nuestra hipótesis es que la causa de la aceleración del tráfico endocítico del AChR por acción de SMasa está ligada a la generación de especies endógenas de Cer que desplazan al colesterol y/o a la SM de los dominios lipídicos en virtud de su mayor afinidad por el AChR (Bonini y col., 2002). Además, el colesterol de la superficie celular es rápidamente internalizado luego de la acción de SMasa (Slotte y Bierman, 1988; Ridgway, 2000; London y London, 2004). Para evaluar este fenómeno, se trataron las células con el antibiótico nistatina, el cual

se une específicamente al colesterol de la membrana y lo secuestra sin removerlo de la membrana celular (Tewary y col., 2006). La nistatina por sí sola disminuyó ~30% los niveles de AChR en superficie (Fig. 51). La preincubación con nistatina seguida de tratamiento con SMasa en presencia de nistatina mostró una mayor disminución (~50%) en los niveles de AChR de superficie (Fig. 51). En conjunto, esta serie de experimentos permite indicar que la SM está involucrada en la estabilidad de los AChRs de la membrana plasmática, papel importante que cumpliría junto con el colesterol (Kellner y col., 2007; Borroni y col., 2007).

En resumen, nuestros resultados nos permiten concluir que las Cer no solo modulan una propiedad intrínseca del AChR, como la unión de ligandos, sino que también son efectivas en la regulación del tráfico del receptor, aumentando o disminuyendo sus niveles en la superficie celular, dependiendo de la concentración del lípido disponible y a través de mecanismos diferentes.

---

---

## ***Conclusiones***

---

---

## Conclusiones

En base a los resultados presentados en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral determinamos que la depleción metabólica crónica del colesterol ejerce una modulación de la distribución del AChR en células CHO-K1/A5. Este efecto se logró mediante el empleo de la droga Mevinolina (Mev), inhibidor competitivo de la síntesis del colesterol.

Determinamos que la reducción de los niveles de colesterol provoca una disminución en el número de AChRs en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5, estableciendo que dicha variación se produce por inhibición del tráfico exocítico de la proteína con la consecuente retención del receptor en la porción más distal del aparato de Golgi, el TGN.

También observamos que en membranas de RE y Golgi, el AChR se localiza parcialmente en “balsas” lipídicas, y que la depleción del colesterol por tratamiento de las células con Mev afecta esta distribución, disminuyendo la proporción de AChRs presentes en dichos dominios de membrana.

Todos estos hallazgos nos permitieron determinar que el colesterol no sólo está involucrado en el mantenimiento de una correcta funcionalidad del AChR presente en la membrana plasmática, como se demostrara previamente (Barrantes, 1983; 1993; Barrantes y col., 2000b), sino que este lípido también modula el transporte de AChRs recientemente sintetizados hacia la superficie celular, a través de la asociación de dichos receptores con plataformas lipídicas enriquecidas en colesterol a lo largo del camino exocítico. La depleción del colesterol por la droga Mev provoca una inhibición del tráfico del AChR, retención del mismo a nivel intracelular y disminución significativa de los niveles de AChR en la superficie de la célula.

Los efectos ejercidos por las Cer sobre diferentes aspectos relacionados con la farmacología y el tráfico del AChR se presentan en el Capítulo 3. En lo que respecta a los estudios farmacológicos, demostramos que las Cer a altas concentraciones son

capaces de producir un aumento en la afinidad del AChR por su ligando específico  $\alpha$ -BTX, mientras que la incubación de las células CHO-K1/A5 con bajas concentraciones de Cer no afectan dicha propiedad del receptor. En cuanto al tráfico del AChR, demostramos que las Cer ejercen una modulación dual de este proceso que depende de la concentración de lípido utilizada. Cuando las células CHO-K1/A5 se incubaron con bajas concentraciones de Cer y por períodos de tiempo prolongados, se observó un aumento del número de AChRs de superficie, con disminución concomitante en la cantidad de receptores intracelulares. Este efecto podría estar mediado por el incremento en la síntesis de SLs a partir de las Cer agregadas en forma exógena, reforzando la importancia de estos lípidos para un correcto tráfico del AChR.

Por el contrario, la incubación con altas concentraciones de Cer produjo la disminución de los niveles de AChR en la membrana celular y aumento de los receptores intracelulares, los cuales colocalizaron con marcadores de *trans*-Golgi/TGN. Este resultado indica un bloqueo en el tráfico exocítico del AChR por Cer como consecuencia de efectos ejercidos sobre la organización y funcionalidad del aparato de Golgi.

Finalmente, el tratamiento de las células con SMasa, la cual hidroliza la SM de la membrana plasmática con generación de Cer endógenas, también fue efectivo en disminuir los niveles de AChR de superficie. Sin embargo, el mecanismo que mediaría este proceso no parece resultar del bloqueo del tráfico proteico sino del aumento en la tasa de endocitosis del AChR.

En base a estos resultados podemos concluir que las Cer ejercen efectos opuestos sobre el tráfico y propiedades del AChR dependiendo de la concentración y del origen del lípido.

---

---

## ***Referencias***

---

---

- Abousalham A, Hobman TC, Dewald J, Garbutt M y Brindley DN (2002) Cell-permeable ceramides preferentially inhibit coated vesicle formation and exocytosis in Chinese hamster ovary compared with Madin-Darby canine kidney cells by preventing the membrane association of ADP-ribosylation factor. *Biochem J* 361:653-661.
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Honberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3957-3961.
- Ali MR, Cheng KH y Huang J (2006) Ceramide drives cholesterol out of the ordered lipid bilayer phase into the crystal phase in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine/cholesterol/ceramide ternary mixtures. *Biochemistry* 45:12629-12638.
- Alkondon M, Pereira E, Eisenberg H y Albuquerque EX (1999) Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 19:2693-2705.
- Anand R, Conroy W, Schoepfer R, Whiting P y Lindstrom J (1991) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J Biol Chem* 266:11192-11198.
- Andreasen TJ y McNamee MG (1980) Inhibition of ion permeability control properties of acetylcholine receptor from *Torpedo californica* by long-chain fatty acids. *Biochemistry* 19:4719-4726.

- Antollini SS y Barrantes FJ (2002) Unique effects of different fatty acid species on the physical properties of the *torpedo* acetylcholine receptor membrane. *J Biol Chem* 277:1249-1254.
- Antollini SS, Soto MA, Bonini de Romanelli IC, Gutierrez-Merino C, Sotomayor P y Barrantes FJ (1996) Physical state of bulk and protein-associated lipid in nicotinic acetylcholine receptor-rich membrane studied by Laurdan generalized polarization and fluorescence energy transfer. *Biophys J* 70:1275-1284.
- Ardail D, Popa I, Bodennec J, Famy C, Louisot P y Portoukalian J (2002) Subcellular distribution and metabolic fate of exogenous ceramides taken up by HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1583:305-310.
- Arias HR, Sankaram MB, Marsh D y Barrantes FJ (1990) Effect of local anaesthetics on steroid–nicotinic acetylcholine receptor interactions in native membranes of *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochim Biophys Acta* 1027:287-294.
- Baenziger JE, Morris ML, Darsaut TE y Ryan SE (2000) Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 275:777-784.
- Bagnat M y Simons K (2002) Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14183-14188.
- Baier CJ y Barrantes FJ (2007) Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J Neurochem* 101:1072-1084.
- Banting G y Ponnambalam S (1997) TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology. *Biochim Biophys Acta* 1355:209-217.
- Barlowe C (2000) Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* 1:371-377.
- Barrantes FJ (1982) Oligomeric forms of the membrane-bound acetylcholine receptor disclosed upon extraction of the Mr 43,000 nonreceptor peptide. *J Cell Biol* 92:60-68.

- Barrantes FJ (1983) Recent developments in the structure and function of the acetylcholine receptor. *Int Rev Neurobiol* 24:259-341.
- Barrantes FJ (1989) The lipid environment of the nicotinic acetylcholine receptor in native and reconstituted membranes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 24:437-478.
- Barrantes FJ (1993) Structural–functional correlates of the nicotinic acetylcholine receptor and its lipid microenvironment. *FASEB J* 7:1460-1467.
- Barrantes FJ (1998) The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends. Springer Verlag/Heidelberg and Landes Publishing Co., Berlin/Georgetown, 1-226.
- Barrantes FJ (2003) Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6:620-632.
- Barrantes FJ (2004) Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res Rev* 47:71-95.
- Barrantes FJ (2007) Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurochem* 103:72-80.
- Barrantes FJ, Antollini SS, Blanton MP y Prieto M (2000a) Topography of nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *J Biol Chem* 275:37333-37339.
- Barrantes FJ, Antollini SS, Bouzat CB, Garbus I y Massol RH (2000b) Nongenomic effects of steroids on the nicotinic acetylcholine receptor. *Kidney Int.* 57:1382-1389.
- Barrantes FJ, Aztiria E, Rauschemberger MB y Vasconsuelo A (2000c) The neuronal nicotinic acetylcholine receptor in some hereditary epilepsies. *Neurochemical Res* 25:583-590.

- Becher A, White JH y McIlhinney RA (2001) The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J Neurochem* 79:787-795.
- Besshoh S, Chen S, Brown IR y Gurd JW (2007) Developmental changes in the association of NMDA receptors with lipid rafts. *J Neurosci Res* 85:1876-1883.
- Betz H (1990) Ligand-gated ion channels in the brain: The amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5:383-392.
- Bienvenue A, Rousselet A, Kato G y Devaux PF (1977) Fluidity of the lipids next to the acetylcholine receptor protein of torpedo membrane fragments. Use of amphiphilic reversible spin-labels. *Biochemistry* 16:841-848.
- Birbes H, Bawab SE, Obeid LM y Hannun YA (2002) Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Adv Enzyme Regul* 42:113-129.
- Bjorkqvist YJE, Nyholm TKM, Slotte JP y Ramsted B (2005) Domain formation and stability in complex lipid bilayers as reported by cholestatrienol. *Biophys J* 88:4054-4063.
- Bloch RJ y Froehner SC (1987) The relationship of the postsynaptic 43K protein to acetylcholine receptors in receptor clusters isolated from cultured rat myotubes. *J Cell Biol* 104:645-654.
- Blount P y Merlie JP (1988) Native folding of an acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit expressed in the absence of other receptor subunits. *J Biol Chem* 263:1072-1080.
- Bock J, Szabo I, Gamper N, Adams C y Gulbins E (2003) Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms, *Biochem. Biophys Res Commun* 305:890-897.
- Bock JB, Klumperman J, Davanger S y Scheller RH (1997) Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* 8:1261-1271.

- Bollinger CR, Teichgraber V y Gulbins E (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1746:284-294.
- Bonini IC, Antollini SS, Gutierrez-Merino C y Barrantes FJ (2002) Sphingomyelin composition and physical asymmetries in native acetylcholine receptor-rich membranes. *Eur Biophys J* 31:417-427.
- Borroni V, Baier CJ, Lang T, Bonini I, White MW, Garbus I y Barrantes FJ (2007) Cholesterol depletion activates rapid internalization of diffraction-limited acetylcholine receptor domains at the cell membrane. *Molec Membr Biol* 24:1-15.
- Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z y Kolesnick R (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* 82:405-414.
- Brasaemle DL y Attie AD (1990) Rapid intracellular transport of LDL-derived cholesterol to the plasma membrane in cultured fibroblasts. *J Lipid Res* 31:103-112.
- Bretscher MS y Munro S (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*. 261:1280-1281.
- Browman DT, Resek ME, Zajchowski LD y Robbins SM (2006) Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *J Cell Sci* 119:3149-3160.
- Brown DA (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* 21:430-439.
- Brown DA y London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:111-136.
- Brown DA y London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275:17221-17224.

- Brügger B, Sandhoff R, Wegehingel S, Gorgas K, Malsam J, Helms JB, Lehmann WD, Nickel W y Wieland FT (2000) Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *J Cell Biol* 151:507-518.
- Bruneau EG y Akaaboune M (2006) The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. *Development* 133:4485-4493.
- Brusés JL, Chauvet N y Rutishauser U (2001) Membrane lipid raft are necessary for the maintenance of the  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J Neurosci* 21:504-512.
- Burgos PV, Klattenhoff C, de la Fuente E, Rigotti A y González A (2004) Cholesterol depletion induces PKA-mediated basolateral-to-apical transcytosis of the scavenger receptor class B type I in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3845-3850.
- Campagna A y Fallon J (2006) Lipid rafts are involved in c95 (4,8) agrin Fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *J Neuroscience* 138:123-132.
- Carrasco S y Merida I (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci* 32:27-36.
- Changeux JP (1993) Chemical signaling in the brain. *Sci Am* 269:58-62.
- Chardin P y McCormick F (1999) Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 97:153-155.
- Chen F, Qian L, Yang ZH, Huang Y, Ngo ST, Ruan NJ, Wang J, Schneider C, Noakes PG, Ding YQ, Mei L y Luo ZG (2007) Rapsyn interaction with calpain stabilizes AChR clusters at the neuromuscular junction. *Neuron* 55:247-260.
- Chiantia S, Kahya N y Schwille P (2007) Raft domain reorganization driven by short- and long-chain ceramide: a combined AFM and FCS study. *Langmuir* 23:7659-7665.

- Chigorno V, Giannotta C, Ottico E, Sciannamblo M, Mikulak J, Prinetti A y Sonnino S (2005) Sphingolipid uptake by cultured cells: complex aggregates of cell sphingolipids with serum proteins and lipoproteins are rapidly catabolized. *J Biol Chem* 280:2668-2675.
- Clarke CJ y Hannun YA (2006) Neutral sphingomyelinases and nSMase2: bridging the gaps. *Biochim Biophys Acta* 1758:1893-1901.
- Cockcroft VB, Osguthorpe DJ, Barnard EA y Lunt GG (1990) Modeling of agonist binding to the ligand-gated ion channel superfamily of receptors. *Proteins* 8:386-397.
- Cockcroft VB, Osguthorpe DJ, Barnard EA, Friday AE y Lunt GG (1992) Ligand-gated ion channels: homology and diversity. *Molec Neurobiol* 4:129-169.
- Coll O, Morales A, Fernández-Checa JC y Garcia-Ruiz C (2007) Neutral sphingomyelinase-induced ceramide triggers germinal vesicle breakdown and oxidant-dependent apoptosis in *Xenopus laevis* oocytes. *J Lipid Res* 48:1924-1935.
- Conti-Fine BM, Milani M y Kaminski HJ (2006) Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 116:2843-2854.
- Conti-Tronconi BM y Raftery MA (1982) The nicotinic cholinergic receptor: correlation of molecular structure with functional properties. *Annu Rev Biochem* 51:491-530.
- Contreras FX, Villar AV, Alonso A, Kolesnick RN y Goñi FM (2003) Sphingomyelinase Activity Causes Transbilayer Lipid Translocation in Model and Cell Membranes. *J Biol Chem* 278:37169-37174.
- Cooper E, Couturier S y Ballivet M (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350:235-238
- Corringer PJ, Le Novère N y Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431-458.

- Coxey RA, Pentchev PG, Campbell G y Blanchette-Mackie EJ (1993) Differential accumulation of cholesterol in Golgi compartments of normal and Niemann-Pick type C fibroblasts incubated with LDL: a cytochemical freeze-fracture study. *J Lipid Res* 34:1165-1176.
- Cress AE y Gerner EW (1980) Cholesterol levels inversely reflect the thermal sensitivity of mammalian cells in culture. *Nature* 283:677-679.
- Criado M, Eibl H y Barrantes FJ (1982) Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. *Biochemistry* 21:3622-3629.
- Criado M, Eibl H y Barrantes FJ (1984) Functional properties of the acetylcholine receptor incorporated in model lipid membranes. Differential effects of chain length and head group of phospholipids on receptor affinity states and receptor-mediated ion translocation. *J Biol Chem* 259:9188-9198.
- Cuvillier O (2002) Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta* 1585:153-162.
- da Costa CJ, Ogrel AA, McCardy EA, Blanton MP y Baenziger JE (2002) Lipid-protein interactions at the nicotinic acetylcholine receptor. A functional coupling between nicotinic receptors and phosphatidic acid-containing lipid bilayers. *J Biol Chem* 277:201-208.
- Dai Z, Luo X, Xie H y Peng HB (2000) The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters. *J Cell Biol* 150:1321-1334.
- Dalziel AW, Rollins ES y McNamee MG (1980) The effect of cholesterol on agonist-induced flux reconstituted acetylcholine receptor vesicles. *FEBS Lett* 122:193-196.
- Dani J, Ji D y Zhou F-M (2001) Synaptic plasticity and nicotine addiction. *Neuron* 31:349-352.

- Dbaibo GS, El-Assaad W, Krikorian A, Liu B, Diab K, Idriss NZ, El-Sabban M, Driscoll TA, Perry DK y Hannun YA (2001) Ceramide generation by two distinct pathways in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *FEBS Lett* 503:7-12.
- De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A, Annesi G, Gambardella A, Quattrone A, Ballabio A, Wanke E y Casari G (2000) The nicotinic receptor  $\beta 2$  subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 26:275-276.
- Dhanvantari S y Loh YP (2000) Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting secretory pathway sorting receptor. *J Biol Chem* 275:29887-29893.
- Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K y Gratton E (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 80:1417-1428.
- Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC y Hannun YA (1993) Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 268:15523-15530.
- Dreger M, Krauss M, Herrmann A y Hucho F (1997) Interactions of the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane segments with the lipid bilayer in native receptor-rich membranes. *Biochemistry* 36:839-847.
- Dukhovny A, Goldstein ML y Hirschberg K (2006) The MAL proteolipid restricts detergent-mediated membrane pore expansion and percolation, *Mol Membr Biol* 23:245-257.
- Eddin M (2003) The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32:257-283.
- el Bawab S, Mao C, Obeid LM y Hannun YA (2002) Ceramidases in the regulation of ceramide levels and function. *Subcell Biochem* 36:187-205.
- Ellena JF, Blazing MA y McNamee MG (1983) Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor. *Biochemistry* 22:5523- 5535.

- Engel A, Ohno K y Sine S (2002) The spectrum of congenital myasthenic syndromes. *Mol Neurobiol* 26:347-367.
- Fernández Nievas GA, Barrantes FJ y Antollini SS (2007) Conformation-Sensitive Steroid and Fatty Acid Sites in the Transmembrane Domain of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biochemistry* 46:3503-3512.
- Fernandez-Carvajal AM, Encinar JA, Poveda JA, de Juan E, Martinez-Pinna J, Ivorra I, Ferragut JA, Morales A y Gonzalez-Ros JM (2006) Structural and functional changes induced in the nicotinic acetylcholine receptor by membrane phospholipids. *J Mol Neurosci* 30:121-124.
- Finer-Moore J y Stroud RM (1984) Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:155-159.
- Folch J, Lees M y Sloane-Stanley GM (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Fong TM y McNamee MG (1986) Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry* 25:830-40.
- Freedman R, Adams C, Leonard S (2000) The alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanatomy* 20:295-306.
- Friedrichson T y Kurzchalia TV (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 394:802-805.
- Fujii Y, Nomura T, Kanzawa H, Kameyama M, Yamanaka H, Akita M, Setsu K y Okamoto K (1998) Purification and characterization of enterotoxin produced by *Aeromonas sobria*. *Microbiol Immunol* 42:703-714.
- Fukunaga T, Nagahama M, Hatsuzawa K, Tani K, Yamamoto A y Tagaya M (2000) Implication of sphingolipid metabolism in the stability of the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 113:3299-3307.

- Funakoshi T, Yasuda S, Fukasawa M, Nishijima M y Hanada K (2000) Reconstitution of ATP- and cytosol-dependent transport of de novo synthesized ceramide to the site of sphingomyelin synthesis in semi-intact cells. *J Biol Chem* 275:29938-29945.
- Furuya S, Mitoma J, Makino A y Hirabayashi Y (1998) Ceramide and its interconvertible metabolite sphingosine function as indispensable lipid factors involved in survival and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J Neurochem* 71:366-377.
- Futerman AH y Hannun YA (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 5:777-782.
- Futerman AH, Stieger B, Hubbard AL y Pagano RE (1990) Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 265:8650-8657.
- Galzi JL y Changeux JP (1995) Neuronal nicotinic receptors: Molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 34:563-582.
- Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR y Merlie JP (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377:232-236.
- Gelman MS, Chang W, Thomas DY, Bergeron JJ y Prives JM (1995) Role of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin in subunit folding and assembly of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 270:15085-15092.
- Gesemann M, Denzer AJ y Ruegg MA (1995) Acetylcholine receptor aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J Cell Biol* 128:625-636.
- Gidwani A, Brown HA, Holowka D, Baird B (2003) Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by FcεRI. *J Cell Sci* 116:3177-3187.

- Gkantiragas I, Brügger B, Stüven E, Kaloyanova D, Li XY, Löhr K, Lottspeich F, Wieland FT y Helms JB (2001) Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol Biol Cell* 12:1819-1833.
- Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM y Yancopoulos GD (1996) Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85:513-523.
- Goff WR, Henderson DC y Amico E (1992) Cigarette smoking in schizophrenia: relationship to psychopathology and medication side effects. *Am J Psychiatry* 149:1189-1194.
- Goñi FM, Contreras FX, Montes LR, Sot J, Alonso A (2005) Biophysics (and sociology) of ceramides. *Biochem Soc Symp* 72:177-188.
- Gotti C, Conti-Tronconi BM y Raftery MA (1982) Mammalian muscle acetylcholine receptor purification and characterization. *Biochemistry* 21:3148-3154.
- Green WN y Claudio T (1993) Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. *Cell* 74:57-69.
- Gu Y y Hall ZW (1988) Characterization of acetylcholine receptor subunits in developing and in denervated mammalian muscle. *J Biol Chem* 263:12878-12885.
- Gu Y, Ralston E, Murphy-Erdosh C, Black Ra y Hall ZW (1989) Acetylcholine receptor in a C2 muscle cell variant is retained in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 109:729-738.
- Gulbins E, Coggeshall KM, Baier G, Telford D, Langlet C, Baier-Bitterlich G, Bonnefoy-Berard N, Burn P, Wittinghofer A y Altman A (1994) Direct stimulation of Vav-guanine nucleotide exchange activity for ras by phorbol esters and diglycerides. *Mol Cel Biol* 14:4749-4758.

- Hamouda AK, Chiara DC, Sauls D, Cohen JB y Blanton MP (2006a) Cholesterol Interacts with Transmembrane alpha-Helices M1, M3, and M4 of the *Torpedo* Nicotinic Acetylcholine Receptor: Photolabeling Studies Using [(3)H]Azicholesterol. *Biochemistry* 45:976-986.
- Hamouda AK, Sanghvi M, Sauls D, Machu TK y Blanton MP (2006b) Assessing the Lipid Requirements of the *Torpedo californica* Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biochemistry* 45:4327-4337.
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M y Nishijima M (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426:803-809.
- Hanada K, Nishijima M y Akamatsu Y (1990) A temperature-sensitive mammalian cell mutant with thermolabile serine palmitoyltransferase for the sphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem* 265:22137-22142.
- Hannan LA y Edidin M (1996) Traffic, polarity, and detergent solubility of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein after LDL-deprivation of MDCK cells. *J Cell Biol* 133:1265-1276.
- Hannun YA (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 269:3125-3128.
- Hannun YA (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274:1855-1859.
- Hannun YA y Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 10:73-80.
- Hannun YA y Obeid LM (2002) The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 277:25847-25850.
- Hansen GH, Niels-Christiansen L-L, Thorsen E, Immerdal L y Danielsen EM (2000) Cholesterol depletion of enterocytes: effect on the Golgi complex and apical membrane trafficking. *J Biol Chem* 275:5136-5142.

- Hao M, Lin SX, Karylowski OJ, Wüstner D, McGraw TE y Maxfield FR (2002) Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J Biol Chem* 277:609-617.
- Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141:929-942.
- Haystead TA, Sim ATR, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P y Hardie DG (1989) Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337:78-81.
- Heberle FA, Buboltz JT, Stringer D y Feigenson GW (2005) Fluorescence methods to detect phase boundaries in lipid bilayer mixtures. *Biochim Biophys Acta* 1746:186-192.
- Helms JB y Zurzolo C (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5:247-254.
- Hering H, Lin CC y Sheng M (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* 23:3262-3271.
- Heron DS, Shinitzkyt M, Hershkowitz M, Samuel D (1980) Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7463-7467.
- Hla T (2003) Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol Res* 47:401-407.
- Hoch W, Campanelli JT y Scheller RH (1994) Agrin induced clustering of acetylcholine receptors: a cytoskeletal link. *J Cell Biol* 126:1-4.
- Holopainen JM, Angelova MI y Kinnunen PK (2000) Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophys J* 78:830-838.

- Holopainen JM, Subramanian M y Kinnunen PK (1998) Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/ sphingomyelin membrane. *Biochemistry* 37:17562-17570.
- Holthuis JC y Levine TP (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:209-220.
- Hu W, Xu R, Zhang G, Jin J, Szulc ZM, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM y Mao C (2005) Golgi fragmentation is associated with ceramide-induced cellular effects. *Mol Biol Cell* 16:1555-1567.
- Hucho F, Tsetlin VI y Machold J (1996) The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 239:539-557.
- Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J y Sandhoff K (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signalling. *Biochim Biophys Acta* 1485:63-99.
- Irie F y Hirabayashi Y (1999) Ceramide prevents motoneuronal cell death through inhibition of oxidative signal. *Neurosci Res* 35:135-144.
- Jeckel D, Karrenbauer A, Birk R, Schmidt RR y Wieland F (1990) Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi. *FEBS Lett* 261:155-157.
- Jones OT y McNamee MG (1988) Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 27:2364-2374.
- Jones S, Bolan J y Wonnacott S (2001) Presynaptic localization of the nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$ 2 subunit immunoreactivity in the rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 439:235-247.
- Jurevics H y Morell P (1995) Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem* 64:895-901.
- Karlin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3:102-114.

- Karniguian A, Zahraoui A y Tavitian A (1993) Identification of small GTP-binding rab proteins in human platelets: thrombin-induced phosphorylation of rab3B, rab6, and rab8 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7647-7651.
- Kawano M, Kumagai K, Nishijima M y Hanada K (2006) Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem* 281:30279-30288.
- Keller P y Simons K (1998) Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 140:1357-1367.
- Kellner R, Baier CJ, Willig KI, Hell SW y Barrantes FJ (2007) Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by STED microscopy. *Neuroscience* 144:135-143.
- Kiyokawa E, Baba T, Otsuka N, Makino A, Ohno S y Kobayashi T (2005) Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains, *J Biol Chem* 280:24072-24084.
- Kolesnick RN, Goñi FM y Alonso A (2000) Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol* 184:285-300.
- Koval M y Pagano RE (1990) Sorting of an internalized plasma membrane lipid between recycling and degradative pathways in normal and Niemann-Pick, type A fibroblasts. *J Cell Biol* 111:429-442.
- Kuhle V, Abrahams GL y Hensel M (2006) Intracellular *Salmonella enterica* redirect exocytic transport processes in a *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent manner. *Traffic* 76:716-730.
- Kuipers HF, Biesta PJ, Groothuis TA, Neefjes JJ, Mommaas AM y van den Elsen PJ (2005) Statins Affect Cell-Surface Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules by Disrupting Cholesterol-Containing Microdomains. *Human Immunology* 66:653-665.

- Kulak J, McIntosh J, y Quick M (2002) Loss of nicotinic receptors in monkey stratum alter 1-methyl 1-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment is due to a decline in  $\alpha$  conotoxin M11 sites. *Mol Pharmacol* 61:230-238.
- Kuo P, Weinfeld M, Rudd MA, Amarante P y Loscalzo J (1990) Plasma membrane enrichment with cis-unsaturated fatty acids enhances LDL metabolism in U937 monocytes. *Arteriosclerosis* 10:111-118.
- Lange Y (1991) Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J Lipid Res* 32:329-339.
- Lange Y y Ramos BV (1983) Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell. *J Biol Chem* 258:15130-15134.
- Lanuza MA, Gizaw R, Vilorio A, Gonzalez CM, Besalduch N, Dunlap V, Tomas J y Nelson P (2006) Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor in myotube-cholinergic neuron cocultures. *J Neurosci Res* 83:1407-1414.
- Leonard S, Adler L, Benhammou K, Berger R, Breese CR, Drebing C, Gault J, Lee MJ, Logel J, Olincy A, Ross RG, Stevens K, Sullivan B, Vianzon R, Virnich DE, Waldo M, Walton K y Freedman R (2001) Smoking and mental illness. *Pharmacol Biochem Behav* 70:561-570.
- Lindstrom J (1997) Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol* 15:193-222.
- Lindstrom J (2000a) The structures of neuronal nicotinic receptors. *Handb Exp Pharmacol* 144:101-162.
- Lindstrom J (2000b) Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve* 23:453-477.
- Lindstrom J (2003) Nicotinic Acetylcholine receptors of muscle and nerves. *Ann N Y Acad Sci* 998:41-52.

- Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L y Klausner RD (1991) Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67:601–616.
- Lipsky NG y Pagano RE (1983) Sphingolipid metabolism in cultured fibroblast: Microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2608-2612.
- Liscum L y Underwood KW (1995) Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem* 270:15443-15446.
- Litvak V, Dahan N, Ramachandran S, Sabanay H y Lev S (2005) Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat Cell Biol* 7:225-234.
- Liu J, Mathias S, Yang Z y Kolesnick RN (1994) Renaturation and TNF $\alpha$  stimulation of a 97 kDa ceramide-activated protein phosphatase. *J Biol Chem* 269:3047-3052.
- Liu Q, Kawal H y Berg D (2001)  $\beta$  amyloid peptide blocks the response  $\alpha$ 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4734-4739.
- Lloyd K y Williams M (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. *J Pharmacol Exp Ther* 292:461-467.
- Loidl A, Claus R, Deigner HP y Hermetter A (2002) High-precision fluorescence assay for sphingomyelinase activity of isolated enzymes and cell lysates. *J Lipid Res* 43:815-823.
- London M y London E (2004) Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem* 279:9997-10004.

- López-Montero I, Rodríguez N, Cribier S, Pohl A, Vélez M y Devaux PF (2005) Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes. *J Biol Chem* 280:25811-25819.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ (1951) A protein determination by the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lozano J, Berra E, Municio MM, Díaz-Mecco MT, Domínguez I, Sanz L y Moscat J (1994) Protein kinase C isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* 269:19200-19202.
- Luan Y y Griffiths HR (2006) Ceramides reduce CD36 cell surface expression and oxidised LDL uptake by monocytes and macrophages. *Arch Biochem Biophys* 450:89-99.
- Lucic D, Huang ZH, Gu D, Subbaiah PV y Mazzone T (2007) Cellular sphingolipids regulate macrophage apolipoprotein E secretion. *Biochemistry* 46:11196-11204.
- Lucocq JM, Berger EG y Warren G (1989) Mitotic Golgi fragments in HeLa cells and their role in the reassembly pathway. *J Cell Biol* 109:463-474.
- Maccioni HJ (2007) Glycosylation of glycolipids in the Golgi complex. *J Neurochem* 103:81-90.
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S y Spiegel S (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:193-201.
- Mackenzie JM, Jones MK y Westaway EG (1999) Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J Virol* 73:9555-9567.
- Madhavan R y Peng HB (2005) Molecular regulation of postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *IUBMB Life* 57:719-730.
- Maimone M y Merlie J (1993) Interaction of the 43 kd postsynaptic protein with all subunits of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 11:53-66.
- Mancias JD y Goldberg J (2005) Exiting the endoplasmic reticulum. *Traffic* 6:278-285.

- Mantipragada SB, Horvath LI, Arias HR, Schwarzmann G, Sandhoff K, Barrantes FJ y Marsh D (2003) Lipid–protein interactions and effect of local anesthetics in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry* 42:9167-9175.
- Marchand S, Bignami F, Stetzkowski-Marden F y Cartaud J (2000) The myristoylated protein rapsyn is cotargeted with the nicotinic acetylcholine receptor to the postsynaptic membrane via the exocytic pathway. *J Neurosci* 20:521-528.
- Marchand S, Devillers-Thiéry A, Pons E, Changeux J-P y Cartaud J (2002) Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J Neurosci* 22:8891-8901.
- Marsh D y Barrantes FJ (1978) Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4329-4333.
- Marsh D y Watts (1982) Spin labeling and lipid–protein interactions in membranes In: P Jost and O Hayes, Editors, *Lipid–protein Interactions* vol. 2, John Wiley and Sons, 53-126.
- Marsh D, Watts A y Barrantes FJ (1981) Phospholipid chain immobilization and steroid rotational immobilization in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochim Biophys Acta* 645:97-101.
- Martín-Belmonte F, Puertollano R, Millán J y Alonso MA (2000) The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines. *Mol Biol Cell* 11:2033-2045.
- Massey JB (2001) Interaction of ceramides with phosphatidylcholine, sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1510:167-184.
- Maxfield FR y Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438:612-621.

- McConnell HM y Vrljic M (2003) Liquid-liquid immiscibility in membranes, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32:469-492.
- McMahan UJ (1990) The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:407-418.
- Mishra S y Joshi PG (2007) Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem* 103:135-142.
- Mitoma J, Ito M, Furuya S y Hirabayashi Y (1998) Bipotential roles of ceramide in the growth of hippocampal neurons: promotion of cell survival and dendritic outgrowth in dose- and developmental stage dependent manners. *J Neurosci Res* 51:712-722.
- Mitsutake S y Igarashi Y (2007) Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359:622-627.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowel M y Unwin N (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288:765-786.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M y Unwin N (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288:765-786.
- Morales A, de Juan E, Fernandez-Carvajal AM, Martinez-Pinna J, Poveda JA, Encinar JA, Ivorra I y Gonzalez-Ros JM (2006) Nicotinic acetylcholine receptor properties are modulated by surrounding lipids: an in vivo study. *J Mol Neurosci* 30:5-6.
- Mukherjee S y Maxfield FR (2004) Membrane domains, *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:839-866.
- Muller G, Ayoub M, Storz P, Rannecke J, Fabbro D y Pfizenmaier K (1995) PKC  $\xi$  is a molecular switch in signal transduction of TNF $\alpha$ , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 14:1961-1969.

- Nagele R, D'Andrea M, Anderson W y Wang HY (2002) Intracellular accumulation of  $\beta$ -amyloid1-42 in neurons is facilitated by the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110:199-211.
- Nakai Y, Sakurai Y, Yamaji A, Asou H, Umeda M, Uyemura K y Itoh K (2000) Lysenin-sphingomyelin binding at the surface of oligodendrocyte lineage cells increases during differentiation in vitro. *J Neurosci Res* 62:521-529.
- Nguyen VT, Ndoye A y Grando SA (2000) Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 157:1377-1391.
- Nicholls JG, Martin R y Wallace BG (2001) *From Neuron to Brain*. Sinauer Associates; 4<sup>th</sup> edition. ISBN: 0878934391.
- Nilsson I, Ohvo-Rekila H, Slotte JP, Johnson AE y von Heijne, G (2001) Inhibition of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane by sterols. *J Biol Chem* 276:41748-41754.
- Nilsson T, Pypaert M, Hoe MH, Slusarewicz P, Berger EG y Warren G (1993) Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells. *J Cell Biol* 120:5-13.
- North P y Fleischer S (1983) Alteration of synaptic membrane cholesterol/phospholipid ratio using a lipid transfer protein. Effect on gamma-aminobutyric acid uptake. *J Biol Chem* 258:1242-1253.
- Numa S (1989) A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. *Harvey Lecture Series* 83:121-165.
- Nurminen TA, Holopainen JM, Zhao H y Kinnunen PK (2002) Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J Am Chem Soc* 124:12129-12134.

- Nybond S, Bjorkqvist YJ, Ramstedt B y Slotte JP (2005) Acyl chain length affects ceramide action on sterol/sphingomyelin-rich domains. *Biochim Biophys Acta* 1718:61-66.
- Ochoa EL, Dalziel AW y McNamee MG (1983) Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochim Biophys Acta* 727:151-162.
- Orci L, Montesano R, Meda P, Mailaisse-Lagae F, Brown D, Perrelet A y Vassalli P (1981) Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:293-297.
- Ortells MO y Lunt GG (1995) Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18:121-127.
- Pagano RE, Martin OC, Kang HC y Haugland RP (1991) A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. *J Cell Biol* 113:1267-1279.
- Patrick J, McMillan J, Wolfson H y O'Brien JC (1977) Acetylcholine receptor metabolism in a nonfusing muscle cell line. *J Biol Chem* 252:143-153.
- Pediconi MF, Gallegos CE, De los Santos EB y Barrantes FJ (2004) Metabolic cholesterol depletion hinders cell-surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience* 128:239-249.
- Perry DK (2000) The role of *de novo* ceramide synthesis in chemotherapy-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 905:91-96.
- Peters J, Malone H y Lambert J (1992) Recent advances in the electrophysiological characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13:392-397.

- Phillips H, Favre I, Kirkpatrick M, Zuberi SM, Goudie D, Heron SE, Scheffer IE, Sutherland GR, Berkovic SF, Bertrand D y Mulley JC (2001) CHRNB2 is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am J Hum Genet* 68:225-231.
- Popot JL y Changeux JP (1984) Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein. *Physiol Rev* 64:1162-1239.
- Posse de Chaves EI (2006) Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Bioch Biophys Acta* 1758:1995-2015
- Poveda JA, Encinar JA, Fernandez AM, Mateo CR, Ferragut JA y Gonzalez-Ros JM (2002) Segregation of Phosphatidic Acid-Rich Domains in Reconstituted Acetylcholine Receptor Membranes. *Biochemistry* 41:12253-12262.
- Pralle A, Keller P, Florin E-L, Simons K y Horber JKH (2000) Sphingolipid cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148:997-1007.
- Prinz WA (2007) Non-vesicular sterol transport in cells. *Prog Lipid Res* 46:297-314.
- Proszinski TJ, Klemm RW , Gravert M, Hsu PP, Gloor Y, Wagner J, Kozak K, Grabner H, Walzer K, Bagnat M, Simons K y Walch-Solimena C (2005) A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *PNAS* 102:17981-17986.
- Rangwala F, Drisdell R, Rakhilin S, Ko E, Atluri P, Harkins A, Fox A, Salman S y Green WN (1997) Neuronal alpha-bungarotoxin receptors differ structurally from other nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 17:8201-8212.
- Ren M, Zeng J, De Lemos-Chiarandini C, Rosenfeld M, Adesnik M y Sabatini DD (1996) In its active form, the GTP-binding protein rab8 interacts with a stress-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5151-5155.
- Ridgway ND (2000) Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta* 1484:129-141.

- Ridgway ND y Merrian DL (1995) Metabolism of short chain ceramide and dihidroceramide analogues in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Biochim Biophys Acta* 1256:57-70.
- Roccamo AM, Barrantes FJ (2007) Charged amino acid motifs flanking each extreme of the alphaM4 transmembrane domain are involved in assembly and cell-surface targeting of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurosci Res* 85:285-293.
- Roccamo AM, Pediconi MF, Aztiria E, Zanello LP, Wolstenholme A y Barrantes FJ (1999) Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amount of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Neurosci* 11:1615-1623.
- Rosa P, Barr FA, Stinchcombe JC, Binacchi C y Huttner WB (1992) Brefeldin A inhibits the formation of constitutive secretory vesicles and immature secretory granules from the trans-Golgi network. *Eur J Cell Biol* 59:265-274.
- Rosenwald AG y Pagano RE (1993) Inhibition of glycoprotein traffic through the secretory pathway by ceramide. *J Biol Chem* 268:4577-4579.
- Rosenwald AG, Machamer CE y Pagano RE (1992) Effects of a sphingolipid synthesis inhibitor on membrane transport through the secretory pathway. *Biochemistry* 31:3581-3590.
- Ross AF, Green WN, Hartman DS y Claudio T (1991) Efficiency of acetylcholine receptor subunit assembly and its regulation by cAMP. *J Cell Biol* 113:623-636.
- Ross AF, Rapuano M, Schmidt JH y Prives JM (1987) Phosphorylation and assembly of nicotinic acetylcholine receptor subunits in cultured chick muscle cells. *J Biol Chem* 262:14640-14647.
- Roth J y Berger EG (1982) Immunocytochemical localisation of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae. *J Cell Biol* 93:223-229.

- Rouser G, Fleicher S y Yamamoto A (1970) Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids. *Lipids* 5:494-496.
- Rousselet A, Devaux PF y Wirtz KW (1979) Free fatty acids and esters can be immobilized by receptor rich membranes from *Torpedo marmorata* but not phospholipids acyl chains. *Biochem Biophys Res Commun* 90:871-877.
- Ruvolo PP (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological Res* 47:383-392.
- Sadasivam G, Willmann R, Lin S, Erb-Vogtli S, Kong XC, Ruegg MA y Fuhrer C (2005) Src-family kinases stabilize the neuromuscular synapse in vivo via protein interactions, phosphorylation, and cytoskeletal linkage of acetylcholine receptors. *J Neurosci* 25:10479-10493.
- Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S y Nave KA (2005) High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 8:468-475.
- Saito S, Matsui H, Kawano M, Kumagai K, Tomishige N, Hanada K, Echigo S, Tamura S y Kobayashi T (2008) Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *J Biol Chem* 283:6584-6593.
- Sanes JR y Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.
- Sanes JR y Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2:791-805.
- Sarnataro D, Campana V, Paladino S, Stornaiuolo M, Nitsch L y Zurzolo C (2004) PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol Biol Cell* 15:4031-4042.

- Sarnataro D, Paladino S, Campana V, Grassi J, Nitsch L y Zurzolo C (2002) PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* 3:810-821.
- Sato T, Mushiake S, Kato Y, Sato K, Sato M, Takeda N, Ozono K, Miki K, Kubo Y, Tsuji A, Harada R y Harada A (2007) The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* 448:366-369
- Sawai H y Hannun YA (1999) Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. *Chem Phys Lipids* 102:141-147.
- Schaub BE, Berger B, Berger EG y Rohrer J (2006) Transition of galactosyltransferase 1 from trans-Golgi cisterna to the trans-Golgi network is signal mediated. *Mol Biol Cell* 17:5153-5162.
- Schmidt J y Raftery MA (1973) A simple assay for the study of solubilized acetylcholine receptors. *Anal Biochem* 52:349-354.
- Schneider R, Brügger B, Sandhoff R, Zellnig G, Leber A, Lampl M, Athenstaedt K, Hrastnik C, Eder S, Daum G, Paltauf F, Wieland FT y Kohlwein SD (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol* 146:741-754.
- Schulz TA y Prinz WA (2007) Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family. *Biochim Biophys Acta* 1771:769-780.
- Senchenkov A, Litvak DA y Cabot MC (2001) Targeting Ceramide Metabolism: A Strategy for Overcoming Drug Resistance. *J Natl Cancer Inst* 93:347-357.
- Siddhanta A, Backer JM y Shields D (2000) Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *J Biol Chem* 275:12023-12031.

- Siddhanta A, Shields D (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem* 273:17995-17998.
- Silva L, de Almeida RF, Fedorov A, Matos AP y Prieto M (2006) Ceramide-platform formation and -induced biophysical changes in a fluid phospholipid membrane. *Mol Membr Biol* 23:137-148.
- Simons K e Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Simons K e Ikonen E (2000) How cells handle cholesterol. *Science* 290:1721-1726.
- Simons K y Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.
- Simons K y van Meer G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27:6197-6202.
- Sine SM y Engel AG (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440:448-455.
- Skwarek M (2004) Recent controversy surrounding lipid rafts. *Arch Immunol Ther Exp* 52:427-431.
- Slotte JP y Bierman EL (1988) Depletion of plasma membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblast. *Biochem J* 250:653-658.
- Smith MM, Lindstrom J y Merlie JP (1987) Formation of the alphabungarotoxin binding site and assembly of the nicotinic acetylcholine receptor subunits occur in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262:4367-4376.
- Soccio RE y Breslow JL (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1150-1160.
- Sot J, Goñi FM y Alonso A (2005) Molecular associations and surface-active properties of short- and long-N-acyl chain ceramides. *Biochim Biophys Acta* 1711:12-19.
- Spiegel S, Foster D y Kolesnick R (1996) Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* 8:159-167.

- Sprong H, van der Sluijs P y van Meer G (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:504-513.
- Steinlein O (2000) Neuronal nicotinic receptors in human epilepsy. *Eur J Pharmacol* 393:243-247.
- Stephenson F (1995) The GABA<sub>A</sub> receptors. *Biochem J* 310:1-9.
- Stetzkowski-Marden F, Gaus K, Recouvreur M, Cartaud A y Cartaud J (2006) Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J Lipid Res* 47:2121-2133.
- Strohlic L, Cartaud A y Cartaud J (2005) The synaptic musclespecific kinase (MuSK) complex: new partners new functions. *Bioessays* 27:1129-1135.
- Stüven E, Porat A, Shimron F, Fass E, Kaloyanova D, Brügger B, Wieland FT, Elazar Z y Helms JB (2003) Intra-Golgi protein transport depends on a cholesterol balance in the lipid membrane. *J Biol Chem* 278:53112–53122.
- Taha TA, Hannun YA y Obeid LM (2006) Sphingosine Kinase: Biochemical and Cellular Regulation and Role in Disease. *J Biochem Molec Biol* 39:113-131.
- Tandon N, Harmon JT, Rodbard D y Jamieson GA (1983) Thrombin receptors define responsiveness of cholesterol-modified platelets. *J Biol Chem* 258:11840-11845.
- Tani M, Sano T, Ito M y Igarashi Y (2005) Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *J Lipid Res* 46:2458-2467.
- Tewary P, Veena K, Pucadyil TJ, Chattopadhyay A y Madhubala R (2006) The sterol-binding antibiotic nystatin inhibits entry of non-opsonized *Leishmania donovani* into macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 339:661-666.
- Tooze SA, Martens GJ y Huttner WB (2001) Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol* 11:116-122.

- Tumkosit P, Kuryatov A, Luo J y Lindstrom J (2006) Beta3 subunits promote expression and nicotine-induced up-regulation of human nicotinic alpha6 nicotinic acetylcholine receptors expressed in transfected cell lines. *Mol Pharmacol* 70:1358-1368.
- Uno T, Nakada T, Okamaoto S, Nakamura M, Matsubara M, Imaishi H, Yamagata H, Kanamaru K y Takagi M (2007) Determination of phosphorylated amino acid residues of Rab8 from *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol* 66:89-97.
- Unwin N (1993) Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell* 72:31-41.
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J Mol Biol* 346:967-989.
- van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M y Borst J (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J* 369:199-211.
- van Meer G y Holthuis JCM (2000) Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1486:145-170.
- van Meer G y Simons K (1988) Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 36:51-58.
- Vandenbulcke F, Nouel D, Vincent JP, Mazella J y Beaudet (2000) A ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci* 113:2963-2975.
- Varma R y Mayor S (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394:798-801.
- Veatch SL y Keller SL (2005) Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes. *Biochim Biophys Acta* 1746:172-185.
- Venkataraman K y Futerman AH (2000) Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol* 10:408-412.

- Venkataraman K y Futerman AH (2001) Comparison of the metabolism of L-erythro- and L-threo-sphinganine and ceramides in cultured cells and in subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta* 1530:219-226.
- Vernino S, Low PA, Fealey RD, Stewart JD, Farrugia G y Lennon VA (2000) Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *N Engl J Med* 343:847-855.
- Vidugiriene J, Sharma DK, Smith TK, Baumann NA y Menon AK (1999) Segregation of glycosylphosphatidylinositol biosynthetic reactions in a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 274:15203-15212.
- Villar MT, Artigues A, Ferragaut JA y Gonzalez-Ros J (1988) Phospholipase A2 hydrolysis of membrane phospholipids causes structural alteration of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 938:35-43.
- Wanamaker CP, Christianson JC y Green WN (2003) Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. *Ann NY Acad Sci* 998:66-80.
- Wang H y Kazanietz MG (2006) The lipid second messenger diacylglycerol as a negative regulator of Rac signalling. *Biochem Soc Trans* 34:855-857.
- Wang JM, Zhang L, Yao Y, Viroonchatapan N, Rothe E y Wang ZZ (2002) A transmembrane motif governs the surface trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Neurosci* 5:963-970.
- Wang TY y Silvius JR (2000) Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers. *Biophys J* 79:1478-1489.
- Wang TY y Silvius JR (2003) Sphingolipid partitioning into ordered domains in cholesterol-free and cholesterol-containing lipid bilayers. *Biophys J* 84:367-378.
- Wang Y, Thiele C y Huttner WB (2000) Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* 1:952-962.

- Watson RT y Pessin JE (2000) Functional cooperation of two independent targeting domains in syntaxin 6 is required for its efficient localization in the trans-Golgi network of 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem* 275:1261-1268.
- Wenz JJ y Barrantes FJ (2005) Nicotinic acetylcholine receptor induces lateral segregation of phosphatidic acid and phosphatidylcholine in reconstituted membranes. *Biochemistry* 44:398-410.
- Wertz PW y Downing DT (1983) Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res* 24:759-765.
- Whetton AD, Gordon LM y Houslay MD (1983) Adenylate cyclase is inhibited upon depletion of plasmamembrane cholesterol. *Biochem J* 212:331-338.
- Whiting PJ, Schoepfer R, Conroy WG, Gore MJ, Keyser KT, Shimasaki S, Esch F y Lindstrom J (1991) Expression of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in brain and retina. *Brain Res Mol Brain Res* 10:61-70.
- Witzemann V (2006) Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res* 326:263-271.
- Wojtal KA, de Vries E, Hoekstra D y van Ijzendoorn SC (2006) Efficient trafficking of MDR1/P-glycoprotein to apical canalicular plasma membranes in HepG2 cells requires PKA-RIIalpha anchoring and glucosylceramide. *Mol Biol Cell* 17:3638-3650.
- Xia W, Zhang J, Perez R, Koo EH y Selkoe DJ (1997) Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8208-8213.
- Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role L, De Biasi M y Beaudet AL (1999) Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the  $\alpha 3$  neuronal nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5746-5751.

- Xu X, Bittman R, Duportail G, Heissler D, Vilcheze C y London E (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *J Biol Chem* 276:33540-33546.
- Yamaji-Hasegawa A, Makino A, Baba T, Senoh Y, Kimura-Suda H, Sato SB, Terada N, Ohno S, Kiyokawa E, Umeda M y Kobayashi T (2003) Oligomerization and pore formation of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. *J Biol Chem* 278:22762-22770.
- Yeagle, P. L. (1993) *The Membranes of Cells*, 2nd ed., Academic Press, New York.
- Yildiz D, Ercal N y Armstrong DW (1998) Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology* 130:155-165.
- Ying M, Grimmer S, Iversen TG, Van Deurs B y Sandvig K (2003) Cholesterol loading induces a block in the exit of VSVG from the TGN. *Traffic* 4:772-784.
- Zaal KJM, Smith C, Polishchuk RS, Altan N, Presley JF, Roberts TH, Siggia E, Phair RD y Lippincott-Schwartz J (1999) Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis. *Cell* 99:589-601.
- Zegers MM, Kok JW y Hoekstra D (1997) Use of photoactivatable sphingolipid analogues to monitor lipid transport in mammalian cells. *Biochem J* 328:489-498.
- Zha X, Pierini LM, Leopold PL, Skiba PJ, Tabas I y Maxfield FR (1998) Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J Cell Biol* 140:39-47.
- Zhang CF, Dhanvantari S, Lou H y Loh YP (2003) Sorting of carboxypeptidase E to the regulated secretory pathway requires interaction of its transmembrane domain with lipid rafts. *Biochem J* 369:453-460.

Zhang J, Kang DE, Xia W, Okochi M, Mori H, Selkoe DJ y Koo EH (1998) Subcellular distribution and turnover of presenelins in trasnfected cells. J Biol Chem 273:12436-12442

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