



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA  
SOBRE LA FUNCIÓN Y LA ORGANIZACIÓN DEL  
RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO EN  
MEMBRANAS Y EN SISTEMAS MODELOS SIMPLES

VANESA LILIANA PERILLO

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

## **Directores de Tesis**

Dra. Silvia S. Antollini

Dr. Francisco J. Barrantes

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 22 de Septiembre de 2010 y el        de        de 2014, bajo la dirección de la Dra. Silvia S. Antollini, Docente de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Independiente de CONICET, y el Dr. Francisco J. Barrantes, Investigador Superior de CONICET en el Laboratorio de Neurobiología Molecular de la Universidad Católica Argentina.

Vanesa Liliana Perillo



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

*Hoy, mañana, el Sábado, ahora y siempre*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar mis agradecimientos con la Universidad Nacional del Sur por admitirme como alumna y darme la posibilidad de realizar mis estudios en tan prestigiosa universidad.

Gracias al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por darme los fondos como para dedicarme a tiempo completo a mi doctorado con las becas de Posgrado tipo I y tipo II que me otorgó.

Gracias al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, sus miembros por alojarme todo este tiempo y no sólo brindarme amistad sino también por darme la oportunidad de aprender tantas técnicas y lecciones de vida.

Gracias al Dr. Francisco J. Barrantes por sus enseñanzas y las oportunidades que me brindó.

Gracias a Gaspar Fernández Nievas, a Sofía Vallés y a Alejandro Peñalva por los experimentos que realizaron y la ayuda que me brindaron.

Gracias especialmente a Alejandro Vitale por su tiempo y ayuda: sin su presencia, apoyo y desarrollo tecnológico gran parte de esta tesis hubiera sido irrealizable.

Gracias Silvia Antollini por ser tan especial como persona y como directora. Gracias todo el cariño, el apoyo, el trabajo y la dirección, tanto en los tiempos difíciles como en los que todo iba encaminado: sin su presencia **toda** esta tesis no hubiera sido posible.

Gracias Leticia Cabral, Ana María Roccamo, Viviana Soler y Gabriela Salvador por todos los ánimos y cariño que me dieron durante todo este tiempo. Además gracias a Constanza Kamerbeek, Hugo Calderoni, Virginia Borroni y Pablo Milano por todas las charlas mañaneras que hacían que el sueño se disperse y dieran ganas de empezar el día de trabajo.

Gracias a Constanza Kamerbeek, Virginia Borroni, Virginia Gaveglio, Melina Mateos, Paola Natalini, Ana Clara Pascual, Sofía Vallés y Jorgelina Buschiazzo por todo. Simplemente no hay palabras para describir todos los almuerzos, los viajes, las caminatas, las charlas, las risas y hasta las lágrimas que compartimos. Sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

Gracias a Clarisa Alonzi, Estefanía Tenconi, Georgina Herrera, Paula Costilla, Erika Smith, Ana Laura Oliva, Noelia Lacolla, Magalí Ramadori, Belén Santos y Mercedes Longás por su amistad y por su apoyo siempre.

Gracias a mis padres, mi hermano y Luján: gracias por todo! Gracias por estar y acompañarme en todo momento. Gracias por cada instante, por cada charla, por cada abrazo, por cada sonrisa y llanto. Gracias por el amor incondicional que me tienen que me permite avanzar sin tener miedo a fallar.

## RESUMEN

En esta Tesis doctoral se profundizó en el estudio de la interacción lípido-receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) en dos aspectos: por un lado, el mecanismo de inhibición de ácidos grasos libres (AGLs), antagonistas no competitivos del AChR, y por el otro, la ubicación del AChR en dominios líquido-ordenados ( $L_o$ ) condicionada por dos características particulares de la membrana.

Con la finalidad de dilucidar el mecanismo de antagonismo de los AGLs sobre el AChR, se utilizaron AGLs con un doble enlace único en diferentes posiciones de una cadena acílica de 18 átomos de carbono. Estudios funcionales realizados con la técnica de *patch-clamp* han mostrado que solo el *cis*-6-18:1 y el *cis*-9-18:1 reducen la duración del estado de canal abierto del receptor, sugiriendo, por lo tanto, un mecanismo de bloqueo alostérico del canal. Mediante espectroscopía de fluorescencia se comprobó que todos los AGLs se ubican en la interfase lípido-AChR, quedando el *cis*-6-18:1 restringido a los sitios denominados sitios anulares, mientras que el resto de los AGLs ocupa también sitios no-anulares. Por otro lado, estudios de polarización de fluorescencia mostraron que el AGLs *cis*-9-18:1 es el que ocasiona el mayor desorden en la membrana. Se comprobó i) que todos los *cis*-AGLs generan cambios conformacionales del AChR a nivel transmembrana, ii) que los *cis*-9-18:1, *cis*-11-18:1 y *cis*-13-18:1 perturban al AChR en su estado de reposo e iii) que los *cis*-6-18:1 y *cis*-9-18:1 son los que causan una mayor perturbación del estado desensibilizado. De esta manera, la posición e isomería del ángulo de torsión de los AGLs insaturados serían un factor clave en el bloqueo del AChR, sugiriendo entonces que los AGLs con un único doble enlace y ubicados superficialmente en la membrana inhiben en forma directa la función del AChR, posiblemente al perturbar una secuencia aminoacídica

transmembrana involucrada en los cambios alostéricos necesarios para la apertura del canal iónico.

Se postula que en la membrana plasmática el AChR se encuentra en dominios lipídicos denominados “balsas” (“*rafts*”). Sin embargo, el AChR no muestra preferencia por dominios  $L_o$  en sistemas modelo compuestos por esfingomieline (SM), colesterol (Col) y POPC (1:1:1), pero sí lo hace un segmento transmembrana ( $\gamma$ M4) que exhibe mayor contacto con los lípidos. Es decir, su distribución no dependería exclusivamente de sus propiedades intrínsecas sino también de señales extrínsecas a la proteína. En este trabajo de Tesis se estudió la posible partición diferencial del AChR en los dominios  $L_o$  en dos sistemas modelo diferentes en función de: a) la presencia de diferentes especies puras de SM en la membrana, y b) la existencia de asimetría transbica en el sistema modelo, mediante el agregado de SM de cerebro (bSM) en la hemicapa externa. Tanto la existencia de asimetría como la presencia de 16:0-SM o 18:0-SM, en comparación con las bSM y 24:1-SM, producen una partición preferencial del AChR en los dominios  $L_o$ . De este modo, la localización del AChR en estos dominios depende no solo de sus propiedades sino también de las características propias de la membrana en la que se encuentra.

Entender la interacción lípido-AChR es de gran importancia para determinar tratamientos que puedan mejorar o inhibir la función del AChR y tratar enfermedades que lo involucren.

## ABSTRACT

In this Ph. D. thesis the understanding of the lipid-nicotinic acetylcholine receptor (AChR) interaction was furthered in two aspects, namely the inhibition mechanism of free fatty acids (FFA), non-competitive AChR antagonists, and AChR location in liquid-ordered ( $L_o$ ) domains conditioned by two membrane characteristics.

To elucidate FFA's antagonism mechanism, FFA with only one double bond in different positions of an 18-carbon acyl chain were tested on AChR. Patch-clamp functional studies showed that only *cis*-6-18:1 and *cis*-9-18:1 reduce the duration of the AChR open state, thus suggesting an allosteric blocking mechanism. Fluorescence spectroscopy measurements demonstrated that all FFA locate in the AChR-lipid interphase, with *cis*-6-18:1 restricted to anular sites, while the rest of the FFA tested also occupy non-anular sites. Fluorescence polarization studies showed that *cis*-9-18:1 causes the highest membrane disorder of all FFA tested. It was determined that i) all *cis*-FFA generate AChR conformational changes at a transmembrane level, ii) only *cis*-9-18:1, *cis*-11-18:1 and *cis*-13-18:1 disturb AChR resting state and iii) *cis*-6-18:1 and *cis*-9-18:1 are the ones that cause the highest disturbance of the desensitized state. Thus, the position and isomerism of the torsion angle of unsaturated FFAs are probably a key factor in terms of AChR blockage, possibly by perturbing a transmembrane aminoacidic sequence involved in the allosteric changes necessary for ion channel gating.

In the plasma membrane, AChR is postulated to be located in lipid domains known as rafts. However, AChR shows no preference for  $L_o$  domains in model systems – composed of sphingomyelin (SM), cholesterol (Chol) and POPC (1:1:1) –, but a transmembrane segment ( $\gamma$ M4) that in closest contact with lipids does have



preference for them. This means that AChR distribution seems not to exclusively depend on its intrinsic properties but on signals external to the protein. In this Ph. D. thesis a possible differential AChR partitioning in  $L_o$  domains was studied in two model systems as a function of a) the presence of different pure SM species in the membrane and b) the existence of transbilayer asymmetry in the model system, by the addition of brain SM (bSM) in the external hemilayer. Both asymmetry and the presence of either 16:0-SM or 18:0-SM, in comparison with bSM or 24:1-SM, lead to an AChR preferential partitioning in  $L_o$  domains. AChR location in these domains depends not only on its properties but also on the characteristics of the membrane in which the ion channel is immersed.

Understanding lipid-AChR interaction is of great importance to determine treatments that can either improve or inhibit AChR function and, this, in turn, will help determining the treatment of diseases in which AChR is involved.

# ÍNDICE

<b>Prefacio.....</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>v</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>viii</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>La unión neuromuscular.....</b>	<b>5</b>
<b>El receptor de acetilcolina nicotínico .....</b>	<b>7</b>
<i>Estructura del receptor de acetilcolina nicotínico .....</i>	<i>8</i>
<i>Estados conformacionales del receptor de acetilcolina nicotínico .....</i>	<i>12</i>
<i>Disparo del receptor de acetilcolina nicotínico.....</i>	<i>15</i>
<b>El microentorno lipídico del receptor de acetilcolina nicotínico.....</b>	<b>17</b>
<i>Acción de los ácidos grasos libres sobre el receptor de acetilcolina nicotínico</i>	<i>20</i>
<b>Agregación del receptor de acetilcolina nicotínico en la membrana.....</b>	<b>22</b>
<i>La membrana plasmática.....</i>	<i>22</i>
<i>Balsas Lipídicas (“Rafts”) .....</i>	<i>26</i>
<i>Asimetría de membrana.....</i>	<i>29</i>
<i>Mecanismo de agregación del receptor de acetilcolina nicotínico en rafts .....</i>	<i>33</i>
<b>Objetivos .....</b>	<b>38</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>41</b>
<b>Materiales .....</b>	<b>41</b>

<b>Obtención de muestras</b> .....	<b>42</b>
1. <i>Obtención de membranas ricas en AChR</i> .....	42
2. <i>Obtención de Esfingomielinas</i> .....	45
3. <i>Obtención de proteoliposomas del AChR</i> .....	49
4. <i>Obtención de liposomas</i> .....	54
5. <i>Formación de vesículas gigantes unilamelares (GUVs)</i> .....	55
6. <i>Marcación de AChR con N-(1-pirenil)maleimida</i> .....	55
7. <i>Preparación de soluciones de ácidos grasos libres y titulación de membranas ricas en AChR con ácidos grasos libres</i> .....	56
8. <i>Formación de asimetría en la membrana de proteoliposomas</i> .....	56
9. <i>separación de fragmentos de membrana según la solubilidad a detergentes</i> .....	59
<b>Métodos</b> .....	<b>59</b>
1. <i>Determinación proteica por el método de Lowry</i> .....	59
2. <i>Determinación de fósforo por el método de Rouser</i> .....	60
3. <i>Caracterización de los lípidos de fracciones DRM y DSM</i> .....	60
4. <i>Determinación de Colesterol por el ensayo de la enzima colesterol-oxidasa</i> .....	61
5. <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (sds-page)</i> .....	62
6. <i>Mediciones de fluorescencia</i> .....	63
6.1. <i>Cálculo de la polarización generalizada</i> .....	64
6.2. <i>Medición de anisotropía</i> .....	66
6.4 <i>Mediciones de fluorescencia del colorante fluorescente Cristal Violeta</i> .....	73
6.5. <i>Extinción de fluorescencia con un AGL spin marcado</i> .....	74
7. <i>Comprobación de la inducción de asimetría transbica en proteoliposomas y liposomas</i> .....	75

8. <i>Observación al microscopio</i> .....	76
9. <i>Análisis estadístico</i> .....	77
<b>Parte I - Inhibición del AChR por la presencia de determinados ácidos grasos libres <i>cis</i>-monoinsaturados</b> .....	<b>78</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>79</b>
<b>Localización de los ácidos grasos libres en la interfase lípido-AChR</b> .....	<b>80</b>
<b>Inhibición del AChR por ácidos grasos libres</b> .....	<b>84</b>
<b>Perturbación de las propiedades biofísicas de las membranas ricas en AChR por ácidos grasos libres</b> .....	<b>85</b>
<b>Inducción de cambios conformacionales en el AChR por ácidos grasos libres</b> .....	<b>89</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>95</b>
<b>Parte II - Partición diferencial del AChR en dominios lipídicos en sistemas modelo</b> .....	<b>109</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>110</b>
<b>Efecto de la cadena acílica de la esfingomielina sobre la partición diferencial del AChR</b> .....	<b>110</b>
<b>Efecto de la asimetría transbicapa sobre la partición diferencial del AChR</b> .....	<b>118</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>128</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>137</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>140</b>
<b>Apéndice I</b> .....	<b>155</b>

Estudios de Inhibición del AChR Realizados por Medio de la Técnica de <i>Patch-Clamp</i> .....	155
Metodología .....	155
Resultados .....	157
<b>Publicaciones y comunicaciones a congresos originadas en esta Tesis.....</b>	<b>159</b>
<b>Publicaciones .....</b>	<b>159</b>
<b>Comunicaciones a congresos .....</b>	<b>159</b>

## ABREVIATURAS

### #

5-SLFA = 5-ácido esteárico spin marcado

16:0-SM = N-(hexadecanoil)-esfing-4-enina-1-fosfocolina

18:0-SM = N-(octadecanoil)-esfing-4-enina-1-fosfocolina

24:1-SM = N-(15Z-tetracosenoil)-esfing-4-enina-1-fosfocolina

### A, B, C

ACh = acetilcolina

AChR = receptor de acetilcolina nicotínico

AGLs = ácidos grasos libres

ANC = antagonistas no competitivos

*Buffer A = Buffer de Fluorescencia (NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,25 mM y Buffer HEPES 20 mM, pH 7,4)*

*Buffer D = Buffer de Diálisis (NaCl 100 mM, fosfato de sodio 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, pH 7,8)*

*Buffer E = Buffer de Elución (NaCl 250 mM, EDTA 0,1 mM, NaN<sub>3</sub> 0.02 %, fosfato de sodio 5 mM, pH 7,8, con colato 0,5 % y carbamilcolina (Carb) 10 mM)*

*Buffer* H = *Buffer* de homogeneización (*Buffer* de fosfato de sodio 10 mM pH 7,4, NaCl 0,4 M, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 3 mM y NaN<sub>3</sub> 0,02 % (p/v))

*Buffer* PBS = *Buffer* fosfato salino (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4)

*Buffer* S = *Buffer* de almacenamiento (ácido acético 0,57 % (v/v) y NaN<sub>3</sub> 4 % (p/v), pH 4)

C = cloroformo

Carb = carbamilcolina

Col = colesterol

CrV = cristal Violeta

## **D, E, F**

D = estado desensibilizado del receptor de acetilcolina nicotínico

DHE = dehidroergosterol

DMSO = dimetil sulfóxido

DPH = 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

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

DTT = ditioneitol

*E* = eficiencia de la transferencia de energía

ESR = estudios de resonancia de spin electrónico

FRET = transferencia de energía de resonancia de Förster

**G, H, I**

GABA = ácido y aminobutírico

GP = polarización generalizada

GUVs = vesículas unilamelares gigantes

ITO = óxido de indio y estaño

**J, K, L**

$K_D$  = constante de disociación

$K_{SV}$  = constante de Stern–Volmer

LGIC = superfamilia de canales iónicos gatillados por ligandos

$L_d$  = fase líquido-desordenada

$L_o$  = fase líquido-ordenada

**M, N, O**

M = metanol

MBCD = metil- $\beta$ -ciclodextrina

MLVs = vesículas multilamelares grandes

MuSK = tirosina quinasa específica de músculo

$N_2$  = gas nitrógeno

N-PyrM-AChR = receptor de acetilcolina marcado con N-(1-pirenil)maleimida

OH = grupo oxhidrilo



**P, Q, R**

PC = fosfatidilcolina

PE = fosfatidiletanolamina

PMSF = fenilmetanosulfonilfluoruro

POPA = palmitoil-oleoil-glicerofosfato

POPC = palmitoil-oleil-fosfatidilcolina

PS = fosfatidilserina

r = anisotropía

R = estado de reposo del receptor de acetilcolina nicotínico

**S, T, U, V, W, X, Y, Z**

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

SM = esfingomielina

TCA = ácido tricloroacético

TEMED = N, N, N', N'-tetrametiletildiamina

TLC = cromatografía en capa fina

TMA-DPH = 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-difenil-1,3,5-hexatrieno

Trp = triptofano

UV = ultravioleta (luz)

# INTRODUCCIÓN

## LA UNIÓN NEUROMUSCULAR

A mediados del siglo XIX, el fisiólogo francés Claude Bernard estudió el efecto de la nicotina y el curare, toxina comúnmente usada como veneno en las flechas de indígenas de América Central, sobre el músculo esquelético de ranas y sapos (Bernard, 1850). La nicotina, alcaloide natural sintetizado en plantas de la familia de las berenjenas, las papas y el tabaco, producía la contracción muscular al ser aplicado mientras que el curare generaba una parálisis muscular. Bernard concluyó que el curare es capaz de bloquear reversiblemente la acción de la nicotina ya que, al lavar la toxina de la zona de estudio y aplicar una dosis de nicotina, se producía nuevamente la contracción muscular. El trabajo de Bernard sobre la acción de la nicotina llevó al hallazgo de la naturaleza química de la transmisión nerviosa que desencadena la contracción muscular en la unión neuromuscular. Esta fue descrita en detalle en un artículo de revisión que hicieron Hughes *et al.* (2006).

La unión neuromuscular está compuesta por la sección terminal del axón de una neurona motora y la fibra muscular, donde estos fragmentos celulares están altamente especializados conteniendo determinadas moléculas y ciertas organelas en una concentración muy alta en comparación con otras partes de estas mismas células (Figura 1.1). La neurona motora (neurona presináptica) pierde su cubierta de mielina en la última porción de su axón y se ensancha, generando lo que se conoce como

terminal sináptico (esta denominación se aplica solo a la unión neuromuscular de mamíferos y a la sinapsis del SNC). En él se encuentran vesículas que contienen el neurotransmisor acetilcolina (ACh) y una gran cantidad de mitocondrias, que proveen la energía necesaria para la síntesis y liberación del neurotransmisor. Las mitocondrias se acumulan en la mitad superior del terminal sináptico en tanto que las vesículas se acumulan en la mitad inferior, concentrándose mayormente en ciertas regiones (sitios de liberación) muy cercanas a la membrana plasmática de la célula.

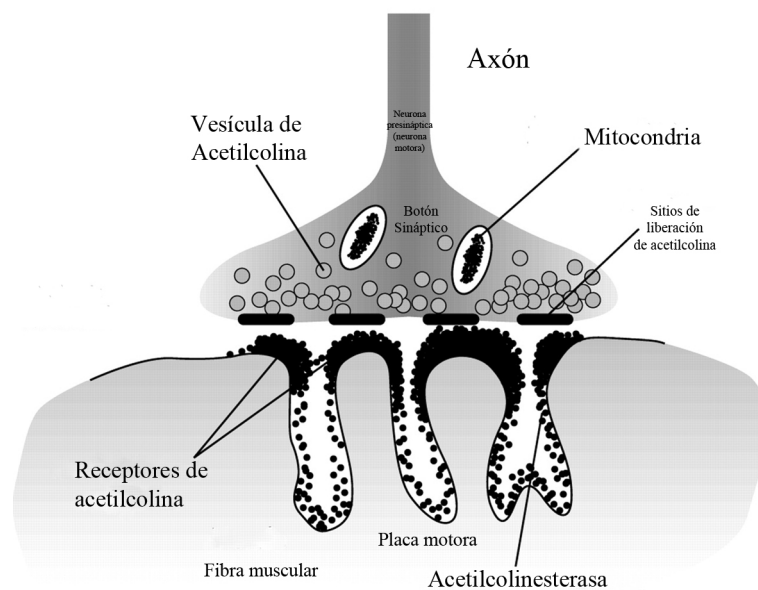


Figura 1.1: Diagrama de la unión neuromuscular. La llegada de un impulso nervioso genera la descarga de las vesículas del neurotransmisor ACh al espacio sináptico. Se unen dos moléculas de acetilcolina por el AChR en la placa motora de la fibra muscular, produciendo la apertura del canal iónico y la entrada de iones al músculo. Esto genera un potencial de acción en la fibra muscular, desencadenando su contracción. Imagen adaptada de Thanvi y Lo (2004).

La zona de la célula muscular que está en contacto con el botón sináptico se conoce como placa motora. La membrana plasmática en esta región tiene pliegues, en cuyas cavidades se ubica la enzima acetilcolinesterasa y, en la parte superior de los pliegues (picos), se encuentran clústeres del receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) (Sanes y Lichtman, 1999; Hughes *et al.*, 2006; Engel, 2008; Hurst *et al.*, 2012).

La contracción del músculo se inicia al recibirse una señal química proveniente del sistema nervioso central en la unión neuromuscular. Primeramente, la terminal pre-sináptica de la neurona motora se despolariza, generando la apertura de los canales de calcio sensibles al voltaje localizados en la superficie de la membrana. Esto aumenta la concentración intracelular de calcio que estimula la liberación del neurotransmisor acetilcolina por exocitosis. La acetilcolina circula por el espacio sináptico, uniéndose a los AChR presentes en la membrana postsináptica (dos moléculas de neurotransmisor por cada uno) y generando la apertura del canal iónico (Thanvi y Lo, 2004; Hall y Sanes, 1993; Hurst *et al.*, 2012). La entrada de iones en la célula muscular desencadena una cascada de señalización intracelular que, en términos macroscópicos, termina en la contracción muscular.

## **EL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO**

El AChR fue el primer receptor perteneciente a la superfamilia de canales iónicos gatillados por ligandos (LGIC) que ha sido descubierto. Se lo consideraba una sustancia receptora de nicotina y fue el primer receptor en ser estudiado tanto bioquímicamente como electrofisiológicamente (Langley, 1907; Katz y Thesleff, 1957; Changeux *et al.*, 1971; Raftery *et al.*, 1976; Karlin, 2002). Los miembros de esta superfamilia LGIC son también conocidos como receptores de lazo de cisteína (“*Cys-loop*”), ya que todas las subunidades de estos receptores tienen un par de cisteínas unidas por puentes disulfuro. Las dos cisteínas están separadas por 13 residuos que forman el lazo  $\beta 6\text{-}\beta 7$ , el cual se localiza en el extremo amino-terminal del dominio extracelular del AChR (Karlin, 2002).

Dentro de los receptores *de lazo de cisteína*, además del AChR, se encuentran los receptores de ácido  $\gamma$ aminobutírico (GABA) de tipo A y C, de glicina y de serotonina de tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>) (Schofield *et al.*, 1987; Ortells y Lunt, 1995; Thompson *et al.*, 2010). Los receptores de glicina y GABA (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>) son de tipo inhibitorio (selectivos a aniones) a diferencia del AChR y del receptor de serotonina que tienen carácter excitatorio (selectivos a cationes). En virtud de la alta homología entre las secuencias aminoacídicas de los receptores de esta familia (Ortells y Lunt, 1995; Ortells *et al.*, 1997; Changeux, 2012), entender la estructura y funcionamiento del AChR permitiría tener un mejor conocimiento sobre todos los miembros de la superfamilia LGIC.

#### *ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO*

El AChR es una proteína pentamérica transmembrana cuyo peso molecular es de aproximadamente 290 kDa. Hasta el momento se han identificado para los AChR nicotínicos 17 subunidades diferentes ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 10,  $\beta$ 1- $\beta$ 4,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\delta$ ). En base a su localización y composición se los subdivide en AChR neuronales y musculares. Los primeros se encuentran tanto en tejidos del sistema nervioso central y periférico como en tejido no neuronal. Están involucrados en actividades cognitivas como, por ejemplo, la atención y el aprendizaje, en enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer y el mal de Parkinson, y en la depresión, entre otras (Lindstrom, 1997; Lin *et al.*, 2014). Los AChR neuronales pueden ser homopentaméricos (por ej.  $\alpha$ 7 y  $\alpha$ 8) o heteropentaméricos con coexistencia de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Cooper *et al.*, 1991; Haydar y Dunlop, 2010).

En el caso de los AChR musculares, estos se encuentran en la unión neuromuscular y median la contracción muscular. Se han identificado cinco clases de

subunidades que los componen:  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\varepsilon$  y  $\delta$  (Karlín, 2002). En el músculo esquelético embrionario de vertebrados, así como también en el órgano eléctrico de rayas marinas (*Torpedo sp.*), el AChR está conformado por una combinación de subunidades  $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ . En el músculo adulto de vertebrados se reemplaza la subunidad  $\gamma$  por la subunidad  $\varepsilon$ , resultando una conformación  $(\alpha 1)_2\beta 1\varepsilon\delta$ . Las subunidades del AChR muscular embrionario se ubican de manera circular en el siguiente orden (Figura 1.2):  $\alpha\gamma\alpha\beta\delta$  (Karlín *et al.*, 1983; Hamilton *et al.*, 1985), quedando en la porción extracelular de la proteína un primer sitio de unión del neurotransmisor ACh entre las subunidades  $\alpha$  y  $\delta$ , y un segundo sitio entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  (Blount y Merlie, 1989; Changeux, 2012).

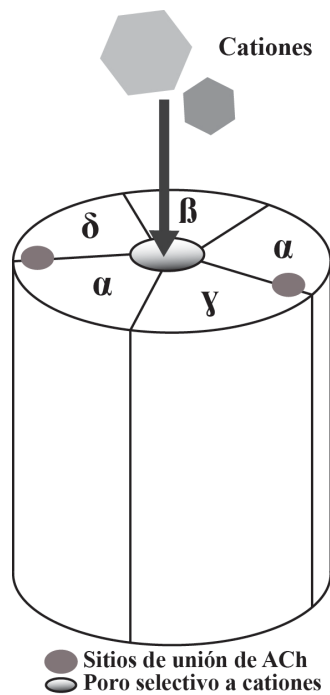


Figura 1.2: Organización de las subunidades del AChR muscular embrionario. Se aprecia la formación del canal iónico central y de los dos sitios de unión del neurotransmisor ACh en las interfases  $\alpha$ - $\delta$  y  $\alpha$ - $\gamma$ .

Cada subunidad del AChR consta de una gran porción extracelular formada mayoritariamente por láminas  $\beta$  ( $\approx 200$  aminoácidos) que posee los sitios de unión

de agonista, una porción transmembrana formada por cuatro hélices  $\alpha$  (llamadas M1 a M4, de 20-30 aminoácidos cada una) conectadas por lazos hidrofílicos (Barrantes, 1998) y una pequeña porción intracelular (Figura 1.3).

La interfase entre la estructura de lámina  $\beta$  de los sitios de unión al agonista y la sección transmembrana de tipo hélice  $\alpha$  de las subunidades tiene una transición muy abrupta y no se encuentra en la superficie de la membrana como es de esperar, sino a 10 Å del comienzo de la misma (Miyazawa *et al.*, 2003) (Figura 1.4), dado que los segmentos hidrofóbicos M1-M4 se extienden por encima de la superficie de la membrana del lado extracelular. Esta interfase se denomina región de acoplamiento y se le asigna un rol clave en la transmisión de la señal ocasionada por la presencia de las dos moléculas del neurotransmisor ACh a nivel extramembrana a la porción transmembrana donde se localiza el poro del canal iónico y donde se inicia el disparo del canal.

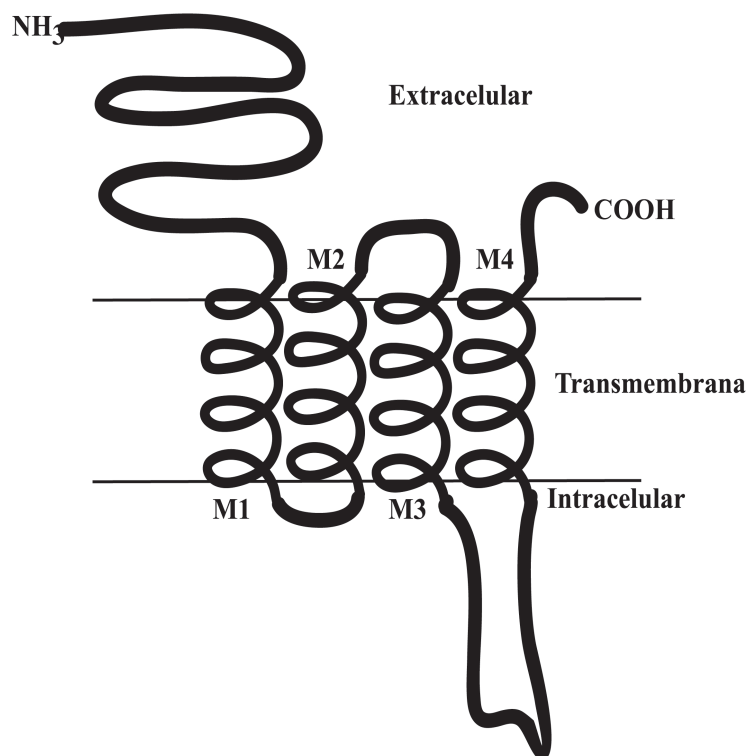
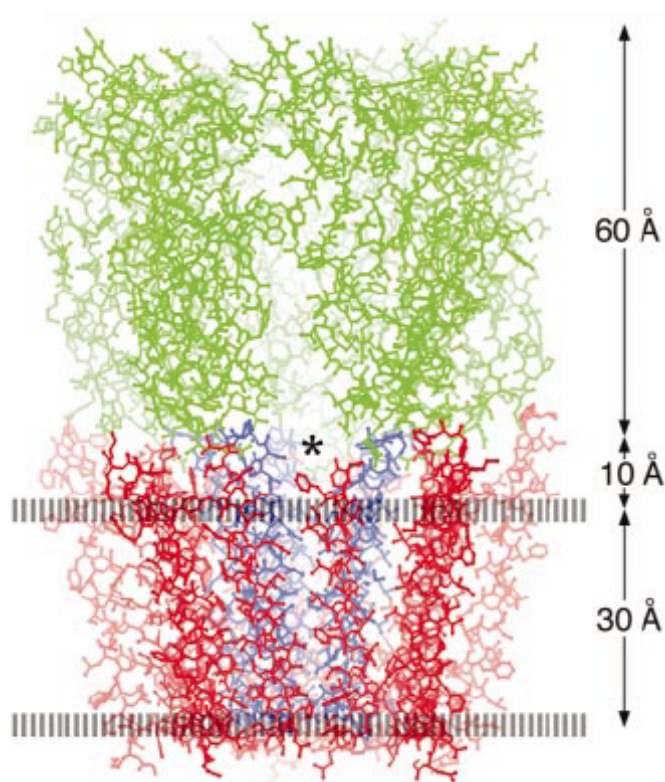


Figura 1.3: Estructura secundaria de una subunidad del AChR.

Cuando el AChR se encuentra en estado de reposo (el poro está cerrado), las hélices  $\alpha$  de los segmentos M2 de cada subunidad se inclinan hacia el eje central. La cercanía de los segmentos M2 y las cadenas aminoacídicas especializadas de esta hélice contribuyen a formar un sello altamente hidrofóbico que impide el paso de los iones. Los segmentos transmembrana M1, M3 y M4 se inclinan, a diferencia del segmento M2, hacia afuera. Las hélices M1 y M3 se retuercen siguiendo un patrón regular. Asimismo, estos segmentos transmembrana se encuentran separados en su sección extracelular por espacios suficientemente grandes como para que los iones puedan pasar por el lateral de la proteína, sin tener que pasar por el vestíbulo extracelular de láminas  $\beta$  del AChR para entrar al poro (Miyazawa *et al.*, 2013).



**Figura 1.4:** Estructura tridimensional del AChR. Las estructuras en azul muestran las hélices  $\alpha$  que delimitan el poro. Las estructuras rojas muestran las hélices que se encuentran en contacto con los lípidos de la membrana. Las dos líneas grises indican los límites de la membrana plasmática y la zona verde muestra las láminas  $\beta$  del dominio extracelular. El asterisco muestra un espacio abierto en la interfase de una de las subunidades. Figura tomada de Miyazawa *et al.* (2003).



Como se muestra en la Figura 1.5, los segmentos transmembrana de cada subunidad se ubican de manera regular, formando tres anillos concéntricos (Barrantes, 2003, 2004). Los segmentos M2 de cada subunidad delinean el canal iónico por donde pasan los cationes (en azul en la Figura 1.4), mientras que los segmentos M1 y M3 forman el anillo intermedio. Los segmentos M4 de cada subunidad forman el anillo externo y son estos los que se encuentran en mayor contacto con los lípidos de la membrana.

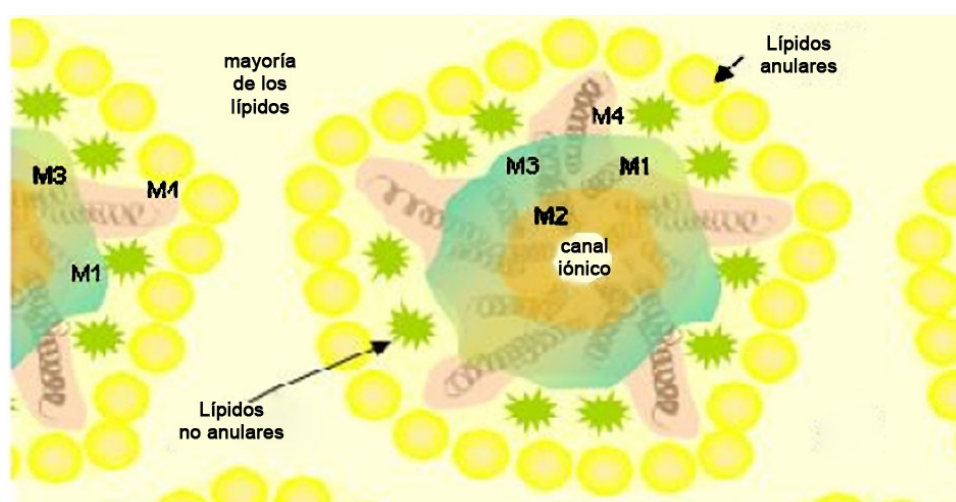


Figura 1.5: El microentorno lipídico del AChR se puede dividir en un anillo de lípidos anulares y una capa interior de lípidos no anulares. Estos últimos se encuentran en mayor contacto con el AChR, intercalándose entre los segmentos transmembrana M4 del AChR. Imagen adaptada de Antollini *et al.* (2009).

#### *ESTADOS CONFORMACIONALES DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO*

El AChR es una proteína que se modula de manera alostérica. El término alostérico proviene de las palabras griegas *allo*, que significa “otro”, y *stereos*, que significa “espacio”. Por tanto, “alostérico” quiere decir que frente a la unión de una molécula en un sitio de la proteína se generan cambios estructurales en una sección de la proteína alejada de ese sitio de unión. Este término comenzó a utilizarse en el

contexto de enzimas multiméricas que tienen múltiples sitios de unión a activadores. En el caso del AChR, el alosterismo se inicia con perturbaciones pequeñas y localizadas en la interfase de las subunidades que conforman los sitios de unión a agonista y concluye con cambios estructurales en un sitio completamente diferente del AChR, el canal iónico (Sine, 2012). Actualmente se considera que las interacciones alostéricas son de vital importancia para la activación o inhibición del AChR ya que cambia su conformación y su actividad dependiendo de su interacción específica con determinados ligandos. El hecho de tener tanto sitios de unión al agonista como sitios de unión para antagonistas no competitivos (ANC) es una evidencia adicional en apoyo de su naturaleza alostérica.

La conformación del AChR se intercambia entre estados abiertos ( $R^*$ ), cerrados y desensibilizados. La unión del ligando regula los cambios conformacionales de apertura y desensibilización del AChR a través de varios estados intermediarios (Karlin, 2002; Andreeva *et al.*, 2006; Baenziger y da Costa, 2013). El AChR tiene dos estados funcionales cerrados –el estado de reposo (R) en ausencia del agonista y el estado desensibilizado (D) de inicio lento que se genera en presencia del agonista– y dos estados metaestables funcionales –un estado desensibilizado de inicio rápido y un estado abierto ( $R^*$ ) (Edelstein *et al.*, 1996; Auerbach y Akk, 1998). El estado R tiene una baja afinidad por los agonistas del AChR, mientras que en el estado D el AChR tiene una mayor afinidad por agonistas como la ACh. La afinidad del estado  $R^*$  unido a varias moléculas del agonista ( $A_2R^*$ ) es intermedia entre la afinidad de los dos estados mencionados anteriormente (Corringer *et al.*, 2000).

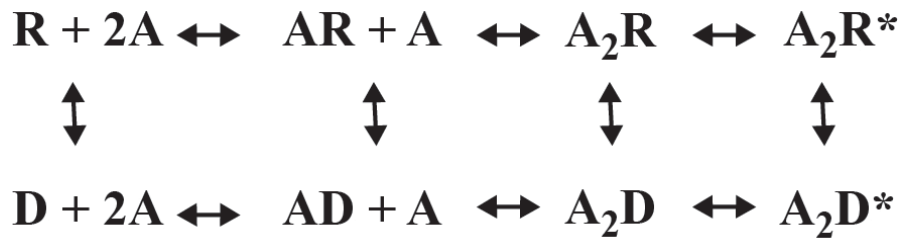


Figura 1.6: Representación del modelo cinético del AChR según Katz y Thesleff (1957), modificado por Dilger y Liu (1992) y por Giniatullin *et al.* (2005). En este modelo, A representa al agonista, y R, R\* y D representan al AChR en los estados de reposo, abierto y desensibilizado, respectivamente.

La desensibilización del AChR es dependiente del agonista mientras que la recuperación desde este estado D es independiente del agonista. En el modelo modificado de Katz y Thesleff (1957) se unen dos moléculas del agonista al receptor en estado R y se genera la activación del receptor ( $A_2R^*$ ) (Dilger y Liu, 1992; Giniatullin *et al.*, 2005) (Figura 1.6). La desensibilización puede ocurrir desde los estados AR y  $A_2R$ , en los que una o dos moléculas del agonista están unidas al receptor, sin que este se encuentre abierto, y desde el estado  $A_2R^*$ . Las mediciones de canal único del AChR muscular realizadas por medio de la técnica de *patch-clamp* confirman la existencia de múltiples estados desensibilizados (Elenes y Auerbach, 2002).

El estado D tiene un potencial considerable para controlar la actividad colinérgica e inducir cambios adaptativos en el cuerpo (Giniatullin *et al.*, 2005; Picciotto *et al.*, 2008; Buccafusco *et al.*, 2009). En períodos cortos, la desensibilización del AChR produce una breve parálisis del músculo esquelético causada por agentes utilizados durante la anestesia general (Tuba *et al.*, 2002), mientras que durante períodos largos, la desensibilización del AChR podría ser importante para entender la diferencia en términos de eficiencia terapéutica de distintas drogas que se usan en la actualidad para tratar la disfunción colinérgica en varios trastornos neurodegenerativos, como lo es el Alzheimer (Jonnala y

Buccafusco, 2001; Bertrand *et al.*, 2002; Schwartz, 2013). A su vez, una desensibilización sostenida, en el caso del AChR neuronal, podría ser importante para aliviar los síntomas de la abstinencia a la nicotina en fumadores (Brody *et al.*, 2006).

#### *DISPARO DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO*

Frente a la unión de dos unidades del agonista ACh a un AChR, se produce un cambio conformacional desde el estado R al estado A<sub>2</sub>R\*, abriéndose la puerta del canal mediante movimientos rotacionales que se comunican a través de las hélices que forman el poro (Unwin *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 2003; Unwin, 2005; Unwin y Fujiyoshi, 2012). El cambio conformacional de la estructura cuaternaria del AChR se ha estudiado a través de crio-microscopía electrónica del AChR de *Torpedo*. En estudios anteriores, las membranas de los órganos eléctricos de *Torpedo* fueron sometidas a un breve pulso del neurotransmisor ACh (5 ms) seguido de congelamiento rápido (Unwin, 1995; Unwin *et al.*, 2002; Unwin, 2013). Las estructuras obtenidas mostraron cambios en el dominio extracelular, tanto dentro como entre las subunidades. En ausencia del agonista, se observó que la estructura del dominio extracelular es asimétrica con las subunidades  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , adoptando estructuras compactas. Se observó también que, por el contrario, las dos subunidades  $\alpha$  adoptan una conformación tal que la región que abarca al lazo de cisteína protruye periféricamente desde los sitios de unión. Luego de la unión al agonista, las subunidades  $\alpha$  adoptan estructuras compactas similares a las de las otras tres subunidades, generando una estructura general simétrica. A partir de estos resultados, Unwin *et al.* (2002) postularon que la apertura del canal comienza con una rotación

de 15° de las láminas  $\beta$  extracelulares que miran al poro, orientándose de manera normal al plano de la membrana. A su vez, dos lazos importantes en la interfase entre los dominios transmembrana y extracelular (2 y 7, Figura 1.7) se desplazan, colapsando los segmentos transmembrana M2 contra las paredes del anillo medio del AChR y generando movimientos de las hélices M4, M3 y M1 (Zheng y Auerbach, 2011). De esta forma, se produce una transición alostérica global en la que la interacción entre los residuos hidrofóbicos que cierran el poro se desestabiliza, permitiendo el paso de los iones de sodio y potasio (Miyazawa *et al.*, 2003; Purohit *et al.*, 2013).a

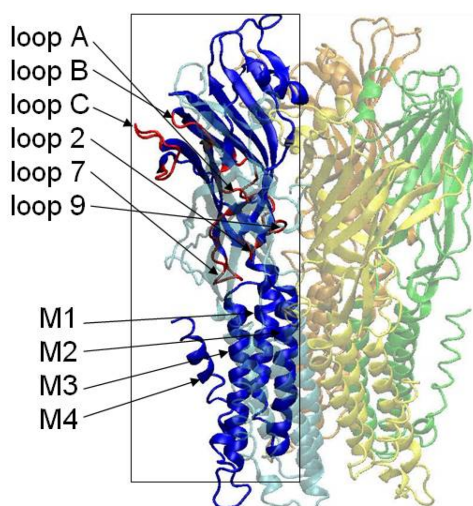


Figura 1.7: Detalle de la estructura del AChR mostrando la localización de los lazos y los segmentos transmembrana. Imagen adaptada de Zheng y Auerbach (2011).

Dentro de la familia de los receptores de lazo de cisteína, Andersen *et al.* (2013) pudieron determinar que la relación de la ocupación de sitios de unión por el agonista y la activación de estos depende del tipo del receptor. En algunos miembros de la familia de receptores, la unión de un ligando permite una activación pobre del receptor aunque la unión de dos ligandos (o tres, según los sitios de unión a ligando que la proteína contenga) genera una activación correcta. Este mecanismo podría proteger contra la ocupación única de los sitios de unión cuando la liberación del

agonista ocurre muy cerca de los receptores postsinápticos (Andersen *et al.*, 2013). Otros, como el AChR neuronal  $\alpha 7$ , son capaces de responder a concentraciones bajas del agonista de manera gradual, de manera que la unión de una sola molécula del agonista es suficiente para estabilizar el cambio de estado cerrado a estado abierto del AChR.

## **EL MICROENTORNO LIPÍDICO DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO**

La posibilidad de reconstituir al AChR en sistemas modelos de composición lipídica definida, a partir de la purificación de la proteína a través de solubilización con detergentes y columnas de afinidad, permitió estudiar la importancia del entorno lipídico sobre la funcionalidad del AChR. Criado *et al.* (1982) y Ochoa *et al.* (1983) determinaron que se requiere colesterol (Col) y fosfolípidos cargados negativamente durante todo el procedimiento de purificación para que el AChR responda a la presencia del neurotransmisor ACh. Mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se observó que la presencia del Col estabiliza la estructura secundaria del AChR aumentando su contenido de  $\alpha$ -hélices en un 3 % (Fong y McNamee, 1987). A su vez, los lípidos cargados negativamente aumentan el porcentaje de láminas  $\beta$ . Por otro lado, dentro de la estructura del AChR se han determinado sitios de unión al Col a nivel del anillo intermedio (entre las hélices M1 y M3) (Brannigan *et al.*, 2008). La presencia de Col en la estructura interna del AChR le permite al canal iónico mantener su estructura cuaternaria. Estos resultados

indican que la presencia de ciertos lípidos estabilizan estructuras secundarias y cuaternarias del AChR necesarias para su correcto funcionamiento.

La funcionalidad del AChR no solo depende del tipo de lípido que lo rodea (da Costa *et al.*, 2013) sino también del número de lípidos a su alrededor: son necesarios como mínimo 45 lípidos por AChR (Jones *et al.*, 1988). No obstante, por debajo de 65 lípidos la funcionalidad decrece rápidamente (Hamouda *et al.*, 2006). Si bien el empaquetamiento de las cadenas acílicas de los fosfolípidos que rodean al AChR y una adecuada fluidez de la membrana juegan un papel significativo en la funcionalidad del receptor (Criado *et al.*, 1984; Fong y McNamee, 1986), la composición lipídica es la característica necesaria y determinante de la funcionalidad del AChR (Criado *et al.*, 1983, 1984; Sunshine y McNamee, 1994; Baenziger y da Costa, 2013).

Por otro lado, estudios de resonancia de spin electrónico (ESR) determinaron diferencias entre las señales provenientes de los lípidos de membrana que se encontraban “libres” y las de aquellos lípidos que rodean al AChR, es decir, inmovilizados por proteína, tanto en membranas nativas como en membranas reconstituidas (Marsh y Barrantes, 1978; Marsh *et al.*, 1981). De esta manera, fue posible distinguir una capa de lípidos en íntimo contacto con el receptor denominada “ánulo lipídico” (Marsh y Barrantes, 1978) que contiene lípidos *anulares* que rodean al AChR y lípidos *no anulares*, más internos, ubicados entre los diferentes dominios transmembrana del AChR (Figura 1.5). Posteriormente, Jones y McNamee (1988) determinaron que hay entre 5 y 10 sitios no anulares asociados al AChR. Dentro del ánulo lipídico, los sitios anulares y no anulares tienen composiciones lipídicas diferentes y, por ende, propiedades biofísicas distintas (Mantipragada *et al.*, 2003).

En sistemas modelos del AChR reconstituido, Jones y McNamee (1988) demostraron que la capa de lípidos anulares que rodea al AChR es fácilmente accesible a los fosfolípidos, mientras que el Col no puede competir efectivamente por su presencia en esa capa. Sin embargo, el Col muestra gran afinidad por los sitios no anulares, lo cual apoya la teoría de que el AChR tiene sitios de unión al Col no accesibles a los fosfolípidos (Jones y McNamee, 1988). Posteriormente, estos resultados fueron corroborados en membranas nativas de *Torpedo californica*. Utilizando la fluorescencia intrínseca del AChR y la sonda fluorescente Laurdan como par donante-aceptor en estudios de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) se observó que los lípidos cercanos al AChR son más rígidos (Antollini *et al.*, 1996). Además, se pudo comprobar la localización selectiva de los fosfolípidos en sitios anulares y del Col en sitios no anulares, y que los ácidos grasos compiten por ambos sitios (Antollini y Barrantes, 1998).

Estudios previos llevados a cabo con membranas reconstituidas demostraron que la proporción de receptores en los estados R y D depende de la composición lipídica, independientemente de la presencia o ausencia del agonista (Ryan *et al.*, 1996; Andersen, 2013), lo cual permite concluir que la modulación alostérica del AChR también tiene dependencia lipídica. A su vez, el receptor inactivado por lípidos no se encuentra ni en el estado R ni en el D sino que adopta una conformación nueva en la que se pierde el acoplado alostérico entre los sitios de unión del neurotransmisor y el poro transmembrana. El segmento transmembrana M4 podría funcionar como un “sensor lipídico”, transmitiéndole las propiedades de la membrana al AChR y afectando su función (Xu *et al.*, 2005; Fernández Nieves *et al.*, 2007, 2008; Baenziger y da Costa, 2013). A nivel transmembrana hay tres tipos de sitios alostéricos: sitios intrasubunidad, que se encuentran dentro de una subunidad única,



entre las cuatro hélices  $\alpha$ ; sitios en la luz del canal, que se localizan entre las cinco subunidades dentro del poro; y sitios de interfase, localizados en la interfase entre dos subunidades (Forman, 2011).

### *ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES SOBRE EL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO*

Se sabe que la exposición prolongada o repetida del AChR al agonista resulta en la inactivación y cierre del canal iónico (estado D) (Ochoa *et al.*, 1989). El pasaje del estado conformacional del AChR de un estado R o activo a uno desensibilizado puede ser modulado tanto por sustancias exógenas como por sustancias endógenas, como los ANC del AChR.

Marsh y Barrantes (1978) sugirieron una hipótesis de acuerdo con la cual el estado conformacional del AChR podría ser modificado no solo modulando la afinidad del AChR por ligandos colinérgicos, sino también alterando la capa de lípidos inmovilizados que rodea al AChR. En apoyo de esta hipótesis, un estudio experimental mostró que los anestésicos locales localizados en el microentorno lipídico del AChR a nivel transmembrana interaccionan con el AChR de manera directa inhibiendo su función (Horváth *et al.*, 1990).

Los lípidos aniónicos con cabezas polares pequeñas también ejercen su influencia sobre la funcionalidad del AChR, siendo capaces de estabilizarlo en el estado R activable por el agonista gracias a su estructura. Esto se debe a que una cabeza polar relativamente pequeña influye en gran medida sobre el empaquetamiento de los lípidos y las propiedades de la bicapa lipídica, fenómeno que evidentemente propicia la permanencia del AChR en un estado R y no en una conformación D (da

Costa *et al.*, 2009; Baenziger y da Costa, 2013).

En la naturaleza, los fosfolípidos de las membranas celulares son la fuente de ácidos grasos. Determinadas enzimas (por ej., las fosfolipasas), al activarse, liberan ácidos grasos a la membrana. Estos ácidos grasos libres (AGLs) pueden modular la función de distintos canales iónicos (Andreasen y McNamee, 1980; Kirber *et al.*, 1992). Ordway *et al.* (1991) postularon que los AGLs podrían ser un nuevo tipo de primer o segundo mensajero en la actividad de este tipo de proteínas.

En el caso del canal iónico en estudio en esta Tesis, se observó que los AGLs tienen una alta afinidad por el AChR (Ellena *et al.*, 1983) y se encontró que inhiben al receptor de manera no competitiva (Ryan *et al.*, 1996; Barrantes, 2004; Fernández Nievas *et al.*, 2007, 2008; da Costa y Baenziger, 2009). La inhibición del AChR por parte de los AGLs ocurriría a través de su acción en sitios alostéricos del AChR (Minota y Watanabe, 1997). Estos sitios podrían ubicarse en la interfase lípido-AChR (Andreasen y McNamee, 1980), donde los AGLs muestran mayor afinidad por el AChR de entre todos los lípidos estudiados hasta el momento (Mantipragada *et al.*, 2003; Baenziger *et al.*, 2000). El lugar preferido de acción de los AGLs a nivel transmembrana parece ser la capa no anular de lípidos que rodea al AChR (Jones y McNamee, 1988; Antollini y Barrantes, 1998; Fernández Nievas *et al.*, 2007), aunque los AGLs también se unen a otros sitios. Fernández Nievas *et al.* (2008) demostraron que los AGLs modulan la función del AChR a través de un mecanismo de acción diferente al de otros inhibidores hidrofóbicos como pueden ser los esteroides. El contacto directo entre AGLs y los segmentos transmembrana del AChR podría sacar al canal iónico de su estado R, inhibiendo su función.

Por otro lado, Antollini y Barrantes (2002) determinaron que todos los AGLs se ubican en el microentorno lipídico del AChR y que su presencia puede perturbar este

entorno dependiendo de su estructura. De este modo, la relación entre el estado conformacional del AChR y el estado físico de la membrana podría explicar cómo los cambios en el microentorno lipídico afectarían el equilibrio de activación del AChR (Fernández Nievas *et al.*, 2008).

## **AGREGACIÓN DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO EN LA MEMBRANA**

### *LA MEMBRANA PLASMÁTICA*

En 1972, Singer y Nicholson propusieron una interpretación distinta de la membrana plasmática. Presentaron un modelo de membrana de mosaico fluido en el que la membrana es una bicapa lipídica en la que las proteínas –moléculas anfipáticas– son parte integral de la membrana, algunas atravesándola completamente mientras que otras se adhieren a su superficie. En este modelo, los fosfolípidos de la membrana se encuentran organizados de manera fluida y una pequeña fracción interactúa específicamente con las proteínas (Singer y Nicholson, 1972). Es decir, en este modelo, las proteínas se encuentran inmersas en un mar de lípidos (Figura 1.8a).

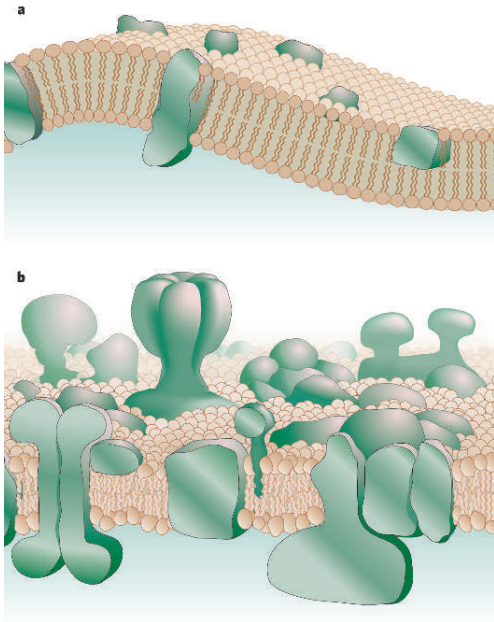


Figura 1.8: Modelos generales de estructura de membrana: (a) Modelo de mosaico-fluido de Singer-Nicholson (1975) y (b) modelo actualizado. Imagen de Engelman (2005).

Con el paso de los años, nuevas metodologías permitieron realizar estudios más profundos sobre la estructura de las proteínas y de los lípidos de membrana, lo cual generó nuevos conceptos sobre sus funciones y su papel biológico. Fue posible concluir que las membranas son bicapas irregulares, con regiones segregadas de distinto grosor, composición, estructura y función (Figura 1.8b) (Engelman, 2005; Goñi, 2014; Nicholson, 2014). El modelo de membrana de mosaico fluido fue actualizado en 2014 en una edición especial de la revista *Biochimica et Biophysica Acta* llamada *Membrane Structure and Function: Relevance in the Cell's Physiology, Pathology and Therapy* en la que participaron varios investigadores, entre ellos, el propio Nicholson, creador del modelo.

Entre las novedades incluidas en la actualización del modelo se incluyen los siguientes puntos (Goñi 2014; Nicholson 2014):

- ✓ La densidad de las proteínas en la membrana es mucho mayor de lo que se pensaba y muchas se encuentran segregadas dentro de dominios

específicos, con funciones que no podrían cumplirse si se localizan fuera de estos.

- ✓ Ciertas proteínas pueden unirse a la membrana ocasionalmente, a diferencia de lo que se pensaba anteriormente, estando estas proteínas parte del tiempo en la membrana mientras que el resto del tiempo se encuentran en el citosol.
- ✓ Las membranas, dentro de su heterogeneidad, en ciertas circunstancias y de manera transitoria, pueden presentar pequeñas porciones organizadas en una conformación distinta a la de bicapa, a diferencia del modelo original que requería la organización lipídica en bicapas en todo momento.
- ✓ El movimiento de los lípidos de una hemicapa de la membrana a otra, transferencia conocida comúnmente como *flip-flop*, se produce a diferente velocidad de acuerdo con las características del lípido.
- ✓ Las membranas presentan heterogeneidad lateral, es decir, dentro de la misma membrana distintos lípidos se encuentran en diferentes fases termodinámicas, y se postula que esta heterogeneidad es al mismo tiempo estructural y funcional.

A través del estudio de membranas modelos, se determinaron distintas fases termodinámicas de lípidos que se corresponden con membranas biológicas (revisado por Shipley (1973), Brown y London (1998) y Quinn (2004)): una fase gel  $L_{\beta}$ , en la que los lípidos se encuentran fuertemente compactados de una manera no fisiológica que aparecería en membranas enfriadas, con las cadenas acílicas altamente ordenadas y extendidas, confiriendo un mayor espesor de membrana; una fase líquido-desordenada ( $L_d$  o  $L_{\alpha}$ ) que es normalmente fluida y fisiológica, con un mayor

desorden a nivel de las cadenas acílicas lo que lleva a un menor espesor de membrana; y una fase líquido-ordenada ( $L_o$ ), en la que los lípidos se encuentran ordenados como en la fase  $L_\beta$  pero retienen la capacidad de difundirse lateralmente y de rotar como en la fase  $L_d$ . En estudios sobre estos modelos simples de membrana, de Almeida *et al.* (2003) y también Pokorny *et al.* (2006) lograron determinar diagramas de fases entre mezclas ternarias de lípidos de membrana a diferentes temperaturas (Figura 1.9).

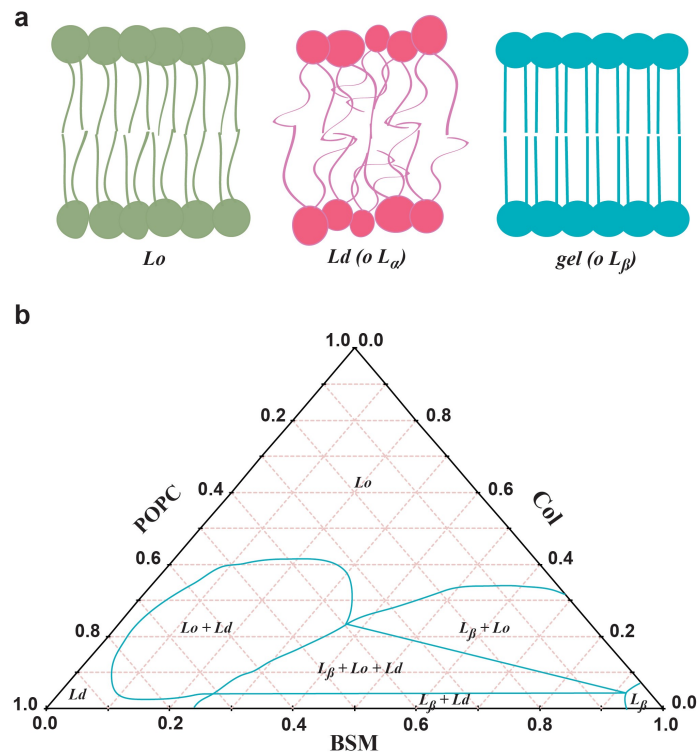


Figura 1.9: (a) Representación esquemática de los tres tipos de orden de membrana posibles: fase líquido-ordenada ( $L_o$ ), fase líquido-desordenada ( $L_d$ ) y fase gel ( $L_\beta$ ). (b) Triángulo de Gibbs o diagrama de fases para una mezcla ternaria de POPC, Col y bSM a 22 °C. Las líneas de color (*tie-lines*) marcan las zonas de equilibrio entre las distintas fases (Pokorny *et al.*, 2006).

Hace 30 años aproximadamente, Karnovsky *et al.* (1982) postularon la no homogeneidad de la distribución lateral de los lípidos de la membrana celular, indicando que estos estarían organizados en dominios de membrana y que esos dominios podrían tener no solo importancia estructural sino también, y más relevante

aún, importancia funcional. Jain y White (1977) postularon y comprobaron que la separación de los dominios lipídicos en las membranas depende de varios factores. Por un lado, las proteínas interactúan y modulan el empaquetamiento de sus lípidos vecinales a través de fuerzas cooperativas. Por otro lado, la segregación lipídica también se genera espontáneamente por los propios componentes lipídicos. Esta última hipótesis ya había sido defendida por Wu y McConnell (1975) y más recientemente por Silvius (2003) al observar que en los sistemas mixtos se producen separaciones laterales de fase entre dominios líquido-líquido y gel-líquido, en las cuales el Col juega un papel muy importante. Otra causa propuesta para la separación de los dominios lipídicos en las membranas es la alteración física de la estructura propia de la membrana (Tulenko *et al.*, 1998; Hammond *et al.*, 2005).

### *BALSAS LIPÍDICAS (“RAFTS”)*

Rajendran y Simons (2005) definieron a los *rafts* como ensamblajes submicroscópicos altamente dinámicos que flotan libremente dentro de la bicapa líquido-desordenada de las membranas celulares y que pueden unirse al clusterizarse sus componentes. Los *rafts* tienen una composición lipídica heterogénea y están altamente enriquecidos en Col y esfingolípidos en la hemicapa externa de la membrana (Brown y Rose, 1992; Simons y Vaz, 2004; Pike, 2006; Pike, 2009; Lingwood y Simons, 2010) aunque se desconoce la composición lipídica equivalente de la hemicapa interna. Se pensó a los *rafts* lipídicos como estructuras estabilizadas por interacciones lípido-lípido de 100-500 nm de diámetro que podrían alojar proteínas siempre que su estructura tenga afinidad por los lípidos que los componen (discutido en Pike, 2009), pudiendo variar tanto su composición lipídica como

proteica y no siendo necesariamente estables en el tiempo. Se postula que esta variación, tanto de tamaño como de composición, puede ser consecuencia de estímulos intra- o extracelulares, lo que favorecería la interacción específica de ciertas proteínas generando la activación de cascadas de señalización (Simons y Toomre, 2000; Diaz-Rohrer *et al.*, 2014). Durante el *Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function* realizado en 2006 se acordó la siguiente definición (Linda Pike, 2006): los *rafts* lipídicos son dominios pequeños (10-200 nm), heterogéneos, altamente dinámicos, enriquecidos en esteroides y esfingomielina (SM), que compartimentalizan procesos celulares. Los *rafts* pequeños pueden algunas veces formar plataformas grandes a través de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido.

Las moléculas de Col tienen tendencia a formar estructuras laterales distribuidas (Chong *et al.*, 2009), evitando el contacto directo Col-Col y formando un arreglo simétrico de tres moléculas de Col cercanas entre sí (Martínez-Seara *et al.*, 2010). Este arreglo, generado espontáneamente en presencia de proporciones de Col mayores a 10 mol %, es lo que determina la capacidad particular del Col para formar dominios *rafts*. Estudios recientes han demostrado que hay una interacción preferencial entre el Col y la SM cuando la membrana tiene un contenido de Col  $\leq 20$  mol % (Fritzscheing *et al.*, 2013). Esta interacción favorable se explica a través del efecto paraguas (en inglés, *umbrella effect*), en el que el Col, molécula apolar, depende de la cobertura de la cabeza polar de la SM (o del fosfolípido presente) para poder evitar la energía libre desfavorable que se produce al interactuar el Col con el agua (Huang y Feigenson, 1999; Lingwood y Simons, 2010). Las cadenas acílicas saturadas de la SM interaccionan fuertemente con el Col a través de fuerzas de van der Waal, mientras que la presencia de insaturaciones en las cadenas acílicas desestabilizan esta interacción (McIntosh *et al.*, 1992). Por otro lado, la estructura de la cadena acílica de



la SM es muy importante para su interacción con el Col. Por ejemplo, la ausencia del grupo oxhidrilo (OH) en la posición 3 de la cadena acíclica evita la formación de puentes hidrógeno con las moléculas de Col, impidiendo la formación de dominios ordenados ricos en esteroides y SM (Björkbom *et al.*, 2011). A su vez, la estructura de la SM también afecta la profundidad en la que se encuentra el Col dentro de la membrana (Björkbom *et al.*, 2011).

La membrana que rodea a los dominios *raft* es más fluida al estar compuesta mayoritariamente por fosfolípidos con cadenas acíclicas insaturadas y Col. Estudios de difracción de neutrones sugieren que el Col muestra gran aversión por estos fosfolípidos insaturados, llegando al extremo de que a altas concentraciones de estos fosfolípidos el Col prefiere ubicarse acostado en el centro hidrofóbico de la membrana, en lugar de orientarse verticalmente en la hemicapa lipídica (Kucerka *et al.*, 2010). Por ejemplo, los fosfolípidos que contienen ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso altamente insaturado, y Col tienen una fuerte aversión mutua, lo cual genera la segregación lateral de los fosfolípidos en los dominios  $L_d$  separados de dominios ricos en Col (Wassall y Stillwell, 2009).

La distribución de *rafts* lipídicos en la superficie celular depende del tipo de célula. En células altamente polarizadas, como las neuronas y las células epiteliales, se acumulan en la zona axonal y apical de la membrana, respectivamente (Simons y Ikonen, 1997). En el caso particular de los acúmulos del AChR muscular, se observó que se localizan en *rafts* ubicados en la zona apical de los pliegues de la membrana postsináptica de las células musculares (Zhu *et al.*, 2006).

Los dominios  $L_o$  son el modelo actual más cercano a los dominios *rafts* que se observan en las células, y es por ello que los dominios  $L_o$  son muy estudiados y están relacionados con los dominios *rafts* (Lichtenberg *et al.*, 2005; Bagatolli *et al.*, 2010).

Sin embargo, en la actualidad es difícil corroborar fehacientemente la equivalencia entre lo observado en sistemas modelo con la supuesta existencia de dominios *rafts in vivo* debido a la falta de una tecnología adecuada.

#### *ASIMETRÍA DE MEMBRANA*

Las membranas biológicas son estructuras vectoriales en las que sus componentes están asimétricamente distribuidos entre las dos hemicapas, característica que le confiere cierta funcionalidad. Tanto las proteínas como los carbohidratos presentan una asimetría absoluta en tanto que la mayoría de los lípidos están presentes en ambas hemicapas aunque en distintas concentraciones (Rothman y Lenard, 1977; Lin y London, 2014a). La hemicapa externa de la membrana se encuentra enriquecida principalmente en fosfatidilcolina (PC) y SM, mientras que los lípidos que contienen aminas –fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS)– se encuentran preferentemente en la hemicapa citoplasmática o interna de la membrana celular (Schroit y Zwaal, 1991). El ácido fosfatídico (PA), el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados (PIP y PIP2) se encuentran también en la cara citoplasmática de la membrana (Daleke, 2003). La modificación de estos lípidos por el agregado de sondas fluorescentes puede o no variar la ubicación de ellos en la membrana. El fosfolípido fluorescente rodamina-PE evidencia una preferencia de ubicación en la hemicapa externa de la membrana plasmática a diferencia de la PE, mientras que 6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil-PC mantiene la preferencia de la PC de mantenerse en la hemicapa externa de la membrana (Gutierrez-Merino *et al.*, 1995).

Un caso particular es la distribución del Col entre las hemicapas. Dado que el Col tiene una velocidad de *flip-flop* menor a 1 s (Steck *et al.*, 2002), debería tener una distribución simétrica. Sin embargo, se ha demostrado que, dependiendo del tipo celular estudiado, el Col se distribuye asimétricamente (McIntosh, 2003; Quinn, 2004). Esta distribución depende también de la afinidad del Col por los otros lípidos y proteínas que componen la membrana de cada célula. En eritrocitos jóvenes, el 75 % del Col se ubica en la hemicapa interna (Schroeder *et al.*, 1991) aunque a medida que se produce el envejecimiento aumenta el Col en la hemicapa externa (Wood *et al.*, 2011).

Tanto la diversidad como la asimetría de los fosfolípidos en la membrana son el resultado de la acción coordinada, y superpuesta en muchos casos, de múltiples enzimas. Estas enzimas reconocen la cabeza polar de los glicerofosfolípidos y de los varios acil-CoA, convirtiendo a los lisofosfolípidos en las distintas especies que se observan naturalmente en la membrana y viceversa (Hishikawa *et al.*, 2008). Las flipasas independientes de ATP, entre otras proteínas, son las encargadas de generar azarosamente la distribución lipídica en el retículo endoplasmático. Luego, en compartimientos posteriores al retículo endoplasmático, se establece la distribución asimétrica de estos lípidos según sea su estructura natural y según los compartimientos en los que estas proteínas se encuentran ausentes (Raggers *et al.*, 2000; Devaux, 1991). Si bien hay una difusión intrínseca (*flip-flop*) de glicerofosfolípidos y esfingolípidos extremadamente lenta (de horas de duración) entre las hemicapas de la membrana, hay proteínas ATPasas transportadoras de lípidos que se oponen a este movimiento.

De esta manera, es posible tener dos monocapas adyacentes que difieran en su organización lipídica. Es decir, no es necesario que en ambas capas haya dominios en

igual fase (Devaux y Morris, 2004). Por ejemplo, Kiessling *et al.* (2006) observaron que en modelos de bicapas asimétricas obtenidos sobre soportes, los dominios de fase  $L_o$  en una de las hemicapas no logran inducir la formación de estos dominios en la hemicapa opuesta cuando esta última monocapa está compuesta por POPC y Col. Cuando la hemicapa interna contiene PC de cerebro porcino, PE, PS y Col, sí es posible la inducción de dominios  $L_o$  en esta monocapa. Estos estudios señalan la importancia del tipo de lípido presente en cada hemicapa y, por ende, de la asimetría de la membrana, para la formación de dominios *rafts* en su hemicapa externa.

En general, los dominios de membrana *rafts* son muy pequeños y contienen solo unas pocas proteínas para los procesos que se postula que están asociados a ellos. Estudios de Homo-FRET<sup>1</sup> mostraron que estos dominios serían menores de 70 nm de diámetro (Varma y Mayor, 1998). Frente a este desafío, Subczynski y Kusumi (2003) propusieron un modelo de organización de *rafts* en las hemicapas de una membrana (Figura 1.10). Ambas hemicapas tendrían fases  $L_o$  con Col, pero al interaccionar el Col con diferentes fosfolípidos en cada una, las fases  $L_o$  resultantes serían distintas. De esta manera, el tamaño de los *rafts* en las dos hemicapas sería diferente y probablemente también lo sea su vida media. Subczynski y Kusumi (2003) sugirieron que la hemicapa externa tiene *rafts* inestables de una vida media en el rango de milisegundos que contendrían unas pocas proteínas. Frente a la activación de receptores y a la oligomerización de proteínas, estos *rafts* podrían formar dominios más grandes y estables con una vida media de minutos. Por el contrario, la hemicapa interna mantendría sus dominios pequeños e inestables. La superposición de *rafts*

---

<sup>1</sup> En estudios de Homo-FRET (FRET, transferencia de energía resonante de Förster) se utiliza la misma sonda fluorescente tanto como molécula donante como aceptora, realizándose mediciones de anisotropía (Varma y Mayor, 1998).

entre ambas capas requeriría de la mediación de una proteína transmembrana y esta asociación de *rafts* podría ser fortuita y temporaria.

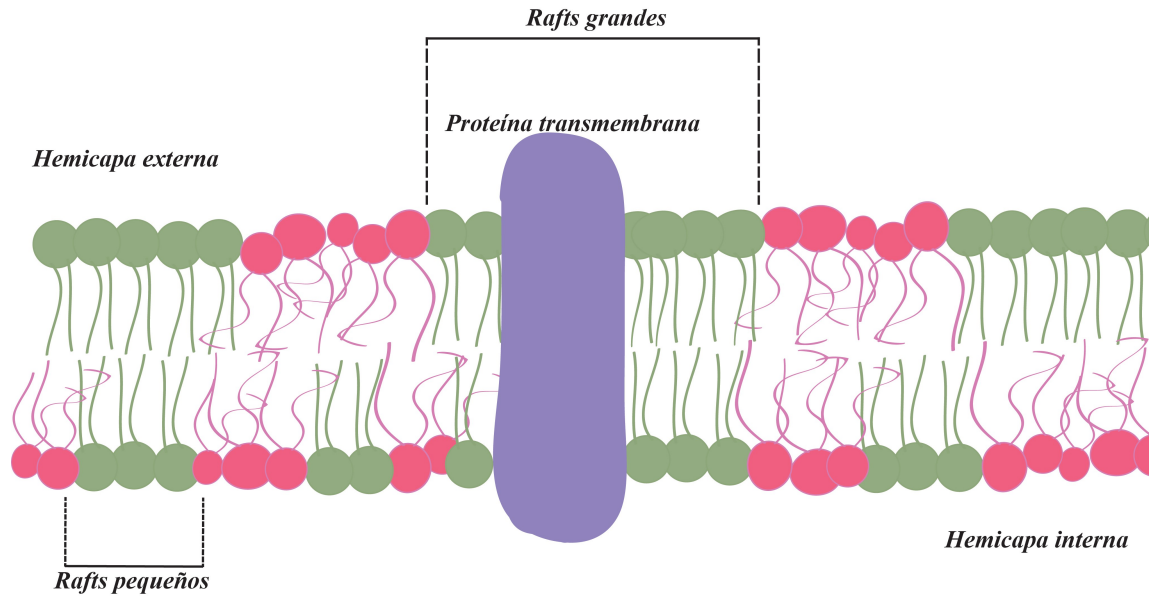


Figura 1.10: Representación esquemática del modelo de *rafts* de membrana propuesto por Subczynski y Kusumi (2003). Se puede apreciar la asimetría de los dominios en ambas hemicapas y el efecto de una proteína transmembrana sobre la sincronización de dominios *rafts* en ambas hemicapas.

Para cumplir sus funciones, los *rafts* podrían formar agregados de mayor tamaño, agrupándose en supra-estructuras que denominaremos acúmulos o clústeres. Hay cada vez más evidencia de que los dominios de ambas hemicapas se acoplan a partir de la mediación de proteínas transmembrana (Gri *et al.*, 2004; Diaz-Rohrer *et al.*, 2014). Esta supraestructura de *rafts* puede generarse a partir de ambos lados de la membrana y de esta forma secuestrar varias proteínas específicas que participan en diferentes procesos, como pueden ser la señalización intracelular y la polarización celular (Simons y Toomre, 2000; Harder y Engelhardt, 2004; Rajendran y Simons, 2005).

Además de la asimetría de la membrana resultante de la diferencia de dominios, es importante la asimetría transbica de los distintos componentes de la membrana, ya que esta cumple un papel muy importante en la función celular. Por ejemplo, cuando se pierde la asimetría de algún tipo de componente de la membrana, la célula puede perder no solo funcionalidad, sino que además puede llegar a la muerte celular. Un ejemplo de esto es la exposición de la PS, lípido característico de la hemicapa interna, en la hemicapa externa. Cuando se produce la aparición de este fosfolípido en la hemicapa externa de la membrana, la célula comienza el camino hacia el proceso de muerte celular conocido como apoptosis (Fadok *et al.*, 1992).

#### *MECANISMO DE AGREGACIÓN DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO EN RAFTS*

La regulación de la oligomerización del AChR tiene un papel importante en la formación, remodelación y eliminación de la sinapsis de la UNM (Froehner, 1991). A pesar de que se han estudiado muchas sustancias que generan la agregación del AChR, tanto en cultivo de miotubos como *in vivo*, se ha observado que solo el proteoglicano agrina neural es capaz de realizar la agregación tanto del AChR como también de otros componentes del aparato postsináptico muscular (Wallace, 1989). La agrina neural es un proteoglicano de la lámina basal secretado por las motoneuronas para direccionar la formación de la UNM (McMahan, 1990; Gautam *et al.*, 1996; Zong *et al.*, 2012). La proteína receptora de agrina es la tirosina quinasa específica de músculo (MuSK) (Glass *et al.*, 1996) y la unión de la agrina neural a MuSK desencadena una cascada de señalización que termina en la activación de la proteína

periférica rapsina (Sanes y Lichtman, 2001; Piguet *et al.*, 2011). Esta proteína de músculo esquelético sería la responsable de la agregación del AChR en alta densidad (Ramarao y Cohen, 1998). A su vez, la agrina neural induce la polimerización de los filamentos de actina en los sitios donde ocurren los acúmulos del AChR (Dai *et al.*, 2000), permitiendo que luego se produzca la inmovilización de la proteína receptora.

Desde hace varios años se relaciona a los acúmulos de AChR con los dominios *rafts* debido a que la depleción del Col y el consecuente desarreglo de estos dominios resulta en una disminución del tamaño de los agregados de AChR (por debajo de 4-5  $\mu\text{m}$ ) tal que ya no se considerarían acúmulos de AChR. En la literatura se ha utilizado como criterio de identificación de clústeres de AChR y de su asociación a *rafts* lipídicos, el tamaño de tales agregados (Stetzkowski-Marden *et al.*, 2006; Willmann *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006) o el cambio de su forma (Campagna y Fallon, 2006; Barrantes, 2007).

Sin embargo, a pesar de la generalmente aceptada asociación de agrina con acúmulos de AChR, la ubicación del AChR en dominios *raft* o *no-raft* anterior a la estimulación por agrina neural ha generado cierta controversia. Algunos investigadores sugieren que el AChR se localiza en dominios *raft* de manera independiente de la señalización por agrina neural (Marchand *et al.*, 2002), mientras que otros sugieren que el AChR se localiza en dominios *no-raft* y se trasloca a *rafts* luego de la activación de MuSK (Zhu *et al.*, 2006).

Dado que los dominios *raft* han sido propuestos como parte del mecanismo de agregación del AChR (Zhu *et al.*, 2006), es importante estudiar la preferencia del AChR por estos dominios. ¿Cómo llega el AChR a estos dominios en primer lugar? ¿Se encuentra en la membrana directamente en estos dominios o depende de

la señal de la agrina neural para traslocarse a estos dominios más gruesos y rígidos?

Para responder a algunas de estas preguntas, nuestro grupo estudió primero el comportamiento del péptido transmembrana M4 correspondiente a la subunidad  $\gamma$  (de Almeida *et al.*, 2003; 2004), utilizando sistemas modelo simples. Así fue posible demostrar que el péptido tiene una alta preferencia por ubicarse en dominios  $L_o$  (fase en sistemas modelo equivalente a *rafts in vivo*). Más recientemente, Bermúdez *et al.* (2010) compararon este comportamiento con el del AChR completo, en presencia o ausencia de rapsina, y observaron que el péptido transmembrana M4 no tiene preferencia alguna y se particiona tanto en dominios  $L_o$  como  $L_d$ .

Se sabe que algunas proteínas transmembrana son dirigidas a dominios *raft* por sus secuencias aminoacídicas, ya sea en sus dominios transmembrana (Scheiffele *et al.*, 1997; Diaz-Rohrer *et al.*, 2014), intracelular (Crossthwaite *et al.*, 2005) o extracelular (Yamabhai y Anderson, 2002). Sin embargo, en este caso, a pesar de que el segmento transmembrana M4 tendría la potencialidad de dirigir al AChR a dominios *raft*, evidentemente es necesaria alguna señal externa para influir sobre el perfil de partición del AChR.

En virtud de que gracias a la metodología actual de formación de membranas simples unilamelares se obtienen sistemas modelo de membrana simétricos con respecto a las dos hemicapas, y dado que los dominios *raft* serían porciones de membrana enriquecidas en SM y Col principalmente de la hemicapa externa (Brown y Rose, 1992; Simons y Vaz, 2004; Pike, 2006; Pike, 2009; Lingwood y Simons, 2010), se podría pensar que en los estudios realizados por Bermúdez *et al.* (2010) la falta de asimetría transbica pa impidió la distribución correcta del AChR en estos dominios. En otras palabras, la presencia de asimetría de la membrana en sistemas



modelos podría ser necesaria para la partición preferencial del AChR en esos dominios.

Por otro lado, se ha observado que el Col no solo es importante para la formación de dominios  $L_o$ , sino que juega un papel significativo en la agregación del AChR, ya que su depleción genera una reducción muy drástica ( $\approx 50\%$ ) de los clústeres de AChR en la membrana celular (Borroni *et al.*, 2007). Esta disminución en el número de nano-agregados es concomitante con el aumento del tamaño de los nano-agregados de AChR, visible mediante microscopía de superresolución (Kellner *et al.*, 2007; Barrantes, 2010; Barrantes, 2012). A su vez, se sabe que la presencia de Col y de SM (lípidos enriquecidos en estos dominios) es necesaria para la regulación de la conformación y función de los receptores de neurotransmisores, como lo es el AChR (Fantini y Barrantes, 2009; 2013). Un estudio más reciente ha demostrado que el Col es además necesario para la partición de las proteínas en estos dominios de tipo *rafts* (Jiménez-Garduño *et al.*, 2014). Teniendo esto en cuenta, y considerando que la longitud de las cadenas acílicas de la SM puede producir asimetrías en la molécula, hecho que cambia su interacción con las moléculas de Col (Jaikishan y Slotte, 2011), los lípidos de la membrana podrían actuar como una señal externa que llevaría al AChR a ubicarse en estos dominios. Por ejemplo, la N-(hexadecanoil)-esfing-4-enina-1-fosfocolina (16:0-SM) tiene una mayor capacidad de interacción con el Col, generando la formación de dominios  $L_o$  más grandes en comparación con otros análogos de la SM (Jaikishan y Slotte, 2011). Dado que los dominios más grandes darían mejor cabida a grandes acúmulos de AChR, es posible que el tipo de SM presente en la membrana, y particularmente los dominios de tipo *rafts*, tengan algún efecto sobre la capacidad de distribución del AChR.

Debido a la alta implicancia del AChR tanto en la contracción muscular como en enfermedades en las que se modifican las capacidades cognitivas, resulta de gran importancia avanzar en nuestro conocimiento sobre la estructura y funcionamiento del receptor. Esto permitirá encontrar a futuro tratamientos más efectivos para las enfermedades asociadas a este canal iónico, y también permitirá generar estrategias para mejorar el aprendizaje y la atención. A su vez, su alta homología con los receptores de la superfamilia LGIC, permitirá que los resultados obtenidos en este trabajo de investigación puedan ser extrapolados a los otros miembros de la familia y, por ende, mejorar los tratamientos para las enfermedades relacionadas. Es por ello que este trabajo de Tesis doctoral se enfocó, a partir de los conocimientos actuales sobre el AChR, en obtener mayor información sobre la interacción lípido-AChR.

## OBJETIVOS

Los conocimientos obtenidos desde el descubrimiento del AChR a la fecha y presentados en esta Introducción fueron los disparadores de este trabajo de Tesis doctoral, que busca cumplir dos objetivos generales, los cuales se presentan por separado para su mejor comprensión.

PARTE I – Objetivo General: *caracterizar el efecto de la posición del doble enlace en la cadena acílica de AGLs cis-monoin saturados sobre la función del AChR en membranas nativas de *Torpedo californica*.*

Para ello, se propusieron los siguientes Objetivos Particulares:

- 1- Analizar el efecto de estos AGL sobre la funcionalidad del AChR. Se realizaron estudios funcionales de *patch-clamp* en la configuración unida a la célula, en presencia o ausencia de AGLs.
- 2- Conocer el efecto de estos AGLs sobre la modulación de la conformación del AChR. El desarrollo experimental de este objetivo involucró la utilización de dos técnicas que permiten estudiar los estados conformacionales del AChR a distintos niveles. En primer lugar, se utilizó el colorante fluorescente Cristal Violeta (CrV) que mide cambios conformacionales globales del AChR por tener mayor afinidad por el estado D que por el estado R del AChR. En segundo lugar, se realizaron

experimentos de extinción de fluorescencia de un AChR marcado con pireno a nivel transmembrana y reconstituido en sistemas modelo, lo cual permitió obtener información conformacional de la región transmembrana del AChR.

- 3- Estudiar la ubicación de los AGLs en la interfase lípido-AChR, tanto en sitios anulares como no-anulares. Se utilizó la técnica de transferencia de energía de resonancia entre la fluorescencia intrínseca del AChR y la sonda fluorescente Laurdan.
- 4- Analizar las perturbaciones del orden de membrana por los AGLs exógenos agregados. Se utilizaron las sondas fluorescentes DPH y Laurdan.

PARTE II – Objetivo General: *identificar los factores lipídicos de la membrana celular que ayudan a una partición preferencial del AChR en los dominios de membrana conocidos como rafts.*

Para ello, se propusieron los siguientes Objetivos Particulares:

- 1- Estudiar la influencia de distintas especies de SM en la partición del AChR en dominios  $L_o$  de sistemas modelo. Se reconstituyó el AChR –obtenido a partir de membranas crudas del órgano eléctrico de *T. californica*– en sistemas modelo que contienen especies puras de SMs.
- 2- Evaluar la importancia de la asimetría transbica para la segregación del AChR en dominios  $L_o$  de sistemas modelo. Para llevar a cabo este objetivo, se puso a punto un protocolo que permitió el enriquecimiento de la hemicapa externa de liposomas simétricos con SM de cerebro (bSM).

Para ambos objetivos particulares se siguieron las mismas estrategias experimentales. La ubicación preferencial del AChR se estudió por dos caminos

alternativos: a) utilizando la solubilización de los liposomas con Tritón X-100 y posterior separación de membranas solubles y resistentes a detergentes; y b) recurriendo al cálculo de la eficiencia de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre moléculas donantes yceptoras, que no requiere la separación de membranas. La caracterización de los lípidos de cada fracción luego de la solubilización por detergente se realizó mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cuantificación de cada especie molecular. El estudio de las propiedades biofísicas de los dominios se realizó con las sondas fluorescentes Laurdan, DPH y TMA-DPH. El tamaño de los dominios se analizó por medio de la formación de liposomas unilamelares gigantes y de microscopía de fluorescencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

Los órganos eléctricos de *T. californica* se obtuvieron de la costa de California, Estados Unidos (Aquatic Research Consultants, San Pedro, CA). Los peces se sacrificaron por ablación quirúrgica y los órganos eléctricos se disecaron y almacenaron a -70 °C hasta su uso. Las sondas fluorescentes Laurdan, dehidroergosterol (DHE), 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), pireno-maleimida y 1-(4-Trimetilamoniofenil)-6-difenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) se compraron en Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.). El gel Affi-Gel® 10 se obtuvo de Bio-Rad. Los lípidos sintéticos y el 5-ácido esteárico spin marcado (5-SLFA) se compraron en Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL, EE.UU.). La sonda fluorescente Cristal Violeta (CrV) y todas las demás drogas usadas en este trabajo de Tesis se obtuvieron en la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

### *I. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS RICAS EN ACHR*

Para los estudios del AChR en sistemas nativos, se prepararon fragmentos de membranas plasmáticas ricas en AChR a partir del órgano eléctrico de *T. californica* siguiendo un protocolo tradicional (Barrantes, 1982) con ciertas modificaciones. El tejido, almacenado a -70 °C, se descongeló lentamente a 4 °C en presencia de *Buffer* de Homogeneización (BH) (*Buffer* fosfato de sodio 10 mM pH 7,4, NaCl 0,4 M, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 3 mM y NaN<sub>3</sub> 0,02 % (p/v)). El tejido eléctrico descongelado se cortó en pedazos pequeños y se homogeneizó en frío utilizando un homogeneizador Virtis 60 K (The Virtis Company, Inc., Gardiner, NY, EE.UU.) con tres ciclos de 30 segundos cada vez. El homogenado se centrifugó a 5000 rpm (3434,8 g) durante 10 minutos a 4 °C con el rotor Beckman Coulter JA-17 en la centrífuga preparativa Beckman Coulter J-6B. El sedimento obtenido se descartó y el sobrenadante se filtró y centrifugó a 17000 rpm (39706 g) durante 2 horas a 4 °C con el rotor JA-17 en la centrífuga preparativa Beckman Coulter J2-21. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se homogeneizó en el homogeneizador manual vidrio-teflón A 740 (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EE.UU.). La fracción subcelular obtenida corresponde al total de las membranas plasmáticas del órgano eléctrico de *T. californica* que se conocen como membranas crudas.

Para la obtención de la fracción de membranas plasmáticas enriquecidas en AChR, la preparación de membranas crudas se resuspendió en BH con sacarosa al 20-25 % y se sembró en un gradiente de sacarosa (50 %, 39 % y 35 % (p/v)) que se centrifugó a alta velocidad (131101,2 g) en una centrífuga Beckman Coulter Optima

L-90K, utilizando el rotor Beckman Coulter SW28 2,5 horas a 4 °C. Luego de la centrifugación se observaron tres bandas en el gradiente (Figura 2.1), las cuales han sido caracterizadas ampliamente por Elliott *et al.* (1980). Tanto la banda inferior como la superior (denominadas *Top* y *Bottom*, respectivamente) corresponden a fracciones de membrana plasmática pobres en AChR. La banda central (denominada *Middle*) corresponde a la fracción de membrana plasmática rica en AChR, con una actividad específica del orden de 1,0-1,5 nmol de sitios de  $\alpha$ -bungarotoxina/mg de proteína (Barrantes, 1982). Una vez aislada la fracción *Middle*, se procedió a eliminar el exceso de sacarosa: el volumen total obtenido se diluyó dos veces y se centrifugó a 46600 rpm (185477,8 g) durante 45 minutos a 4 °C utilizando el rotor Beckman Coulter 90 Ti. El sedimento obtenido se resuspendió en *Buffer H*, se separó una alícuota para su caracterización y el resto se fraccionó y guardó a -70 °C.

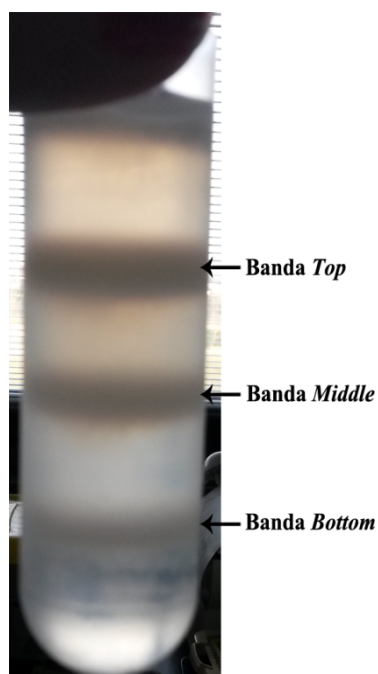


Figura 2.1: Gradiente de sacarosa (50 %, 39 % y 35 % (p/v)) luego de la centrifugación. Se pueden apreciar las bandas correspondientes a la membrana *Top*, *Middle* y *Bottom* provenientes de membranas crudas de las células del órgano eléctrico de *T. californica*. Las bandas *Top* y *Bottom* se descartan y se utiliza la banda *Middle* ya que esta es la que contiene las membranas ricas en AChR.



Para verificar que el AChR en las vesículas de membrana obtenidas esté correctamente orientado (es decir, que los sitios de unión de agonistas, y por ende también del agonista competitivo  $\alpha$ -bungarotoxina, estén dirigidos hacia el exterior de la vesícula) se realizó una comparación de los sitios de unión de agonista medidos por marcación con  $^{125}\text{I}$   $\alpha$ -bungarotoxina en presencia y ausencia de Tritón X-100, tal como fue descrito por Hartig y Raftery (1979) y Gutiérrez-Merino *et al.* (1995). La concentración proteica de la fracción *Middle* se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951). La Figura 2.2 muestra un resumen de este protocolo.

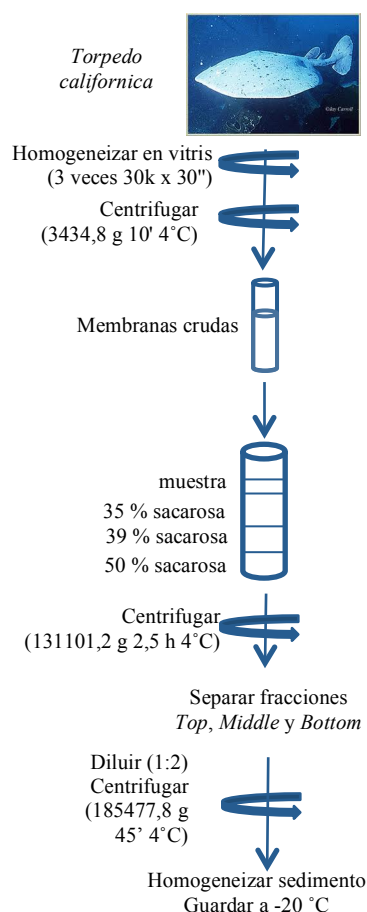


Figura 2.2: Protocolo de obtención de membranas crudas y de membranas ricas en AChR (*Middle*) a partir del órgano eléctrico de *T. californica* siguiendo el protocolo de Barrantes (1982) con modificaciones.

## 2. OBTENCIÓN DE ESFINGOMIELINAS

Dos de las SM que se utilizaron para este trabajo de tesis, N-(hexadecanoil)-esfing-4-enina-1-fosfocolina (16:0-SM) y N-(octadecanoil)-esfing-4-enina-1-fosfocolina (18:0-SM), se obtuvieron en el laboratorio a partir de la yema de huevo de gallina. Para ello, se hirvió un huevo durante 10 minutos y se aisló la yema que se desmenuzó con un disruptor de tejidos. Los lípidos de la yema se extrajeron por el método de Bligh y Dyer (1959). Brevemente, se incubó la yema desmenuzada con Cloroformo:Metanol (C:M) 1:2 durante una noche. Luego se agregó C:agua bidestilada (H<sub>2</sub>O) (calidad MilliQ, Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.) hasta llegar a una proporción de C:M:H<sub>2</sub>O 2:2:1,8 y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, utilizando una centrífuga Beckman Coulter TJ-6 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.). Se separaron tres fases (Figura 2.3): fase acuosa superior que se descartó, fase clorofórmica inferior que se reservó y fase proteica intermedia, que se lavó con C:M:H<sub>2</sub>O (2:2:1,8) y se volvió a centrifugar. La nueva fase clorofórmica se juntó con la obtenida anteriormente, descartándose las fases acuosa y proteica.

La fase clorofórmica se evaporó bajo nitrógeno (N<sub>2</sub>) y se resuspendió en C:M 2:1. Para separar la SM del resto de los lípidos del extracto se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel H con acetato de magnesio 3 % activadas a 100 °C durante 15 minutos. Como fase móvil, se utilizó C:M:hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) 65:25:5. La placa se reveló con diclorofluoresceína y luego se incubó brevemente en amoníaco (NH<sub>3</sub>) seguido por un lavado con agua calidad MilliQ. Las bandas obtenidas se observaron bajo luz ultravioleta (UV) (Figura 2.4), se identificó y raspó la banda correspondiente a la SM y se procedió a su elución.

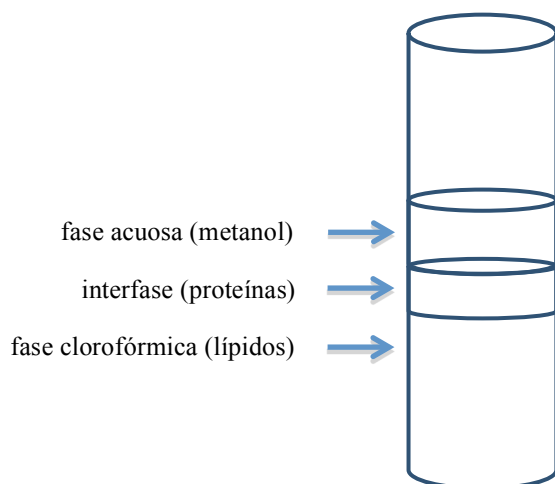


Figura 2.3: Fracciones obtenidas en el proceso de extracción de lípidos luego de la centrifugación. La fase superior acuosa se descarta; la inferior (fase clorofórmica) se reserva y la interfase proteica se lava con una mezcla C:M:H<sub>2</sub>O (2:2:1.8).

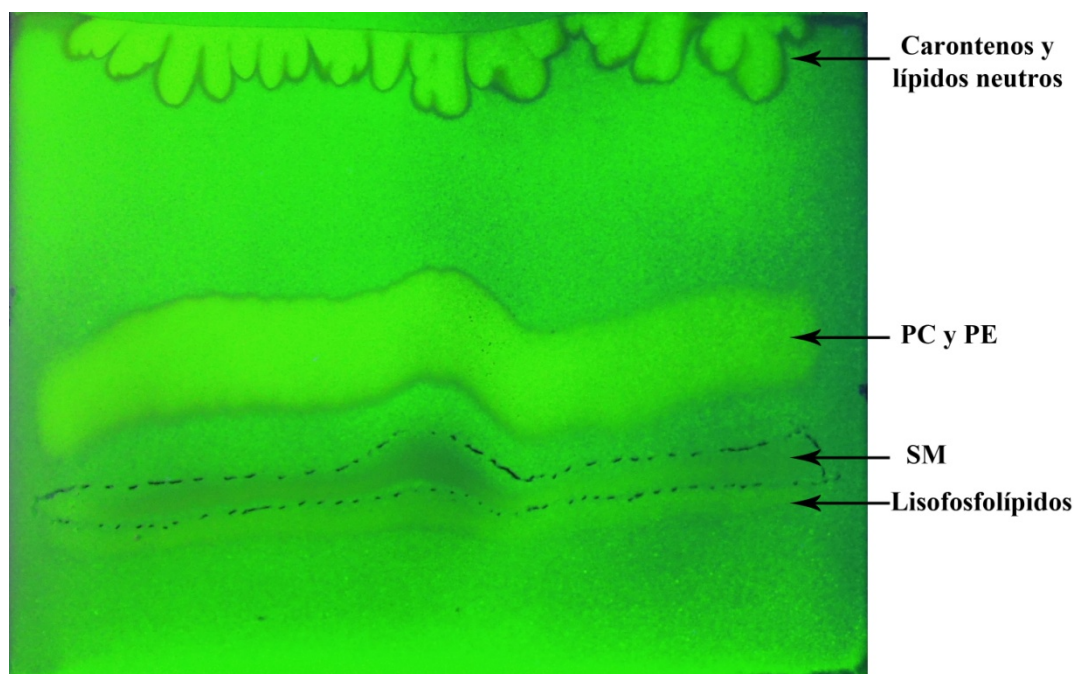


Figura 2.4: Resolución de los lípidos contenidos en la yema de huevo en una placa de sílica gel H vista bajo luz UV. PC = fosfatidilcolina. PE = fosfatidiletanolamina. SM = esfingomielina.

A la banda correspondiente a la mezcla de SM se la colectó en un tubo y se le agregó C:M:H<sub>2</sub>O 5:5:1 hasta cubrir la sílica. Se vortexeó un mínimo de 30 segundos para permitir la extracción de la SM de la sílica y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se reservó mientras que, para una óptima extracción, el sedimento se lavó dos veces con C:M:H<sub>2</sub>O 5:5:1, guardando en cada ocasión el sobrenadante. Posteriormente, cada uno de los sobrenadantes se particionó

con agua bidestilada quedando la diclorofluoresceína en la fase acuosa superior (fase que se descarta) y la SM en la fase clorofórmica inferior. La fase clorofórmica se llevó primero a sequedad bajo  $N_2$  y luego se realizó el siguiente tratamiento alcalino para eliminar impurezas. Se agregó 1 mL de metanol alcalino a la muestra y se incubó durante 10 minutos a 50 °C, siempre bajo  $N_2$ . Luego se agregó 1 mL de cloroformo y 1 mL de HCl 0,5 N y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Se descartó la fase superior acuosa y la fase remanente, conteniendo la mezcla de SM, se secó y guardó a -20 °C hasta su uso.

Las distintas especies de SM presentes en el extracto obtenido a partir de la yema de huevo se evaluaron por cromatografía gaseosa. A una alícuota de la muestra se le realizó el siguiente protocolo de metanólisis a fin de convertir los ácidos grasos de las SM en metil ésteres. Brevemente, se agregó una pizca de  $Na_2SO_4$  para prevenir la presencia de  $H_2O$  ya que esta interfiere en la reacción de metanólisis. Luego se agregó 1,5 mL de reactivo de metanólisis ( $H_2SO_4$  en metanol) y se dejó reaccionar durante 24 horas en estufa a 50 °C. Una vez pasadas las 24 horas de reacción, se dejó enfriar el extracto y se agregó 1,5 mL de Cloroformo y la misma cantidad de  $H_2O$  obteniéndose una partición que permitió eliminar la fase superior acuosa y, por ende, los restos acuosos de los reactivos de la metanólisis. La fase clorofórmica se llevó a sequedad con  $N_2$  y se resuspendió en 300  $\mu L$  de éter.

Paralelamente, unas horas antes de que terminara la incubación de 24 horas, se lavó una placa de sílica gel G con M:éter 75:25 y se activó en una estufa durante 15-20 minutos a 100 °C. Una vez enfriada la placa, la muestra se sembró en forma de gota y se corrió con el sistema de solventes hexano:éter 95:5. Los puntos de interés se rasparon y los lípidos se eluyeron de la sílica de la siguiente manera: se agregó 500  $\mu L$  de hexano, 500  $\mu L$  de  $H_2O$  y 500  $\mu L$  de metanol generándose una partición. Se

guardó la fase superior conteniendo los metil ésteres de los ácidos grasos disueltos en hexano. Una alícuota se inyectó en el cromatógrafo gaseoso Varian 3700 para determinar la composición de los ácidos grasos de la muestra (Tabla 2.1).

El cromatógrafo está provisto de 2 columnas de vidrio (2 m de longitud x 2 mm de diámetro) empaquetadas con una fase estacionaria polar 10 % SP2330 (Supelco), y emplea N<sub>2</sub> como gas portador (30 mL/min). Consta a su vez de dos detectores de ionización de llama operados en el modo dual-diferencial desde el electrómetro. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 193 °C y 240 °C, respectivamente. Las separaciones de los distintos ácidos grasos se realizaron sometiendo el horno de las columnas a gradientes de temperatura: en la mayoría de los casos se realizaron incrementos lineales de 5 °C por minuto desde una temperatura inicial de 150 °C a una temperatura final de 240 °C, la cual se mantuvo constante durante el tiempo necesario para permitir la elución completa de los ácidos grasos de la columna.

Tabla 2.1: Composición de los ácidos grasos de la esfingomielina de yema de huevo.

Ácido graso	Porcentaje de composición (%)
14:0	0,02
15:0	0,24
16:0	75,81
17:0	0,04
18:0	8,42
18:1	3,14
Otros varios	12,33

Una vez conocida la composición de los ácidos grasos de la muestra de SM obtenida, se utilizó la metodología de Peñalva *et al.* (2013) para separar las especies de SM elegidas mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La

cromatografía se realizó a 40 °C usando una columna (250 x 4,6 mm) empaquetada con partículas esféricas de 5  $\mu\text{m}$  recubiertas con octilsilano (C8) (Microsorb-MV, Rainin LC). El solvente empleado fue M:Buffer fosfato 3 mM (pH 7,4) 96:4, bombeado isocráticamente a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones de SM obtenidas anteriormente fueron filtradas para remover las trazas de material particulado, llevadas a sequedad y redisueltas en la fase móvil. Las alícuotas que contenían menos de 5  $\mu\text{g}$  de Fósforo fueron inyectadas sucesivamente. Los picos eluidos del HPLC fueron detectados con un espectrofotómetro UV de longitud de onda variable, calibrado a 203 nm. Después de ser colectadas, las especies moleculares de SM fueron recuperadas por partición del eluido metanólico con C:H<sub>2</sub>O 2:1,8 (Bligh y Dyer, 1959) y posterior evaporación del solvente de la fase inferior. Las alícuotas de cada una de las fracciones colectadas fueron reinyectadas en el HPLC en las mismas condiciones, con el fin de determinar su pureza, la cual en todos los casos fue mayor al 95 %. Las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

### 3. OBTENCIÓN DE PROTEOLIPOSOMAS DEL AChR

Para la realización de estudios con el AChR purificado y reconstituido en sistemas modelo de composición lipídica definida, se prepararon proteoliposomas conteniendo el AChR con diferentes mezclas de lípidos sintéticos (palmitoil-oleoil-glicerofosfato (POPA), palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), Col y distintas SM (obtenidas de extracto de huevo o comercialmente), a saber:

- POPC:POPA:Col (3:1:1) 0,13 mM
- POPC:Col:SM de cerebro (1:1:1) 0,5 mM
- POPC:Col:SM de cerebro (0,35:0,87:1) 0,5 mM
- POPC:Col:16:0-SM (1:1:1) 0,5 mM

- POPC:Col:16:0-SM (0,35:0,87:1) 0,5 mM
- POPC:Col:18:0-SM (1:1:1) 0,5 mM
- POPC:Col:18:0-SM (0,35:0,87:1) 0,5 mM
- POPC:Col (1:1) 0,5 mM

#### PREPARACIÓN DE LA COLUMNA DE AFINIDAD

La columna de afinidad se preparó a 4 °C en cámara fría (Figura 2.5). El soporte utilizado fue Affi-Gel 10. Como primer paso se lavó intensamente la solución de Affi-Gel 10 con agua calidad MilliQ para eliminar el isopropanol con el que se lo conserva. A continuación se agitó el Affi-Gel 10 con hidrocloreuro de cistamina 2 % (p/v) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 7,4 por 1 hora bajo atmósfera de N<sub>2</sub> luego de lo cual se drenó y lavó nuevamente con agua desionizada. El Affi-Gel 10 se agitó con una solución de ditioneitol (DTT) 2,8 % (p/v) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 8 por 1 hora bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Luego la columna se lavó nuevamente con agua desionizada para eliminar el exceso de DTT, midiéndose en el eluato la presencia de grupos sulfhidrilos mediante su titulación con 5'5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) hasta que el ensayo dio negativo (ausencia de color), demostrando tanto la ausencia de sulfhidrilos libres como de DTT.

Luego se tomó una muestra del Affi-Gel 10 y se repitió el ensayo de DTNB, dando en esta instancia positivo (color amarillo), indicando la presencia de grupos sulfhidrilos libres. Este ensayo es también conocido como prueba de Ellman (1959). Para unir a los grupos sulfhidrilos libres de la columna el ligando específico a fin de obtener la columna de afinidad, el Affi-Gel 10 se agitó con 0,17 g de bromuro de bromoacetilcolina en *buffer* fosfato pH 7,4 por 1 hora. La columna se lavó nuevamente con agua bidestilada y se guardó a 4 °C con *buffer* de almacenamiento

(*Buffer S*) (ácido acético 0,57 % (v/v) y  $\text{NaN}_3$  4 % (p/v), pH 4) hasta su uso. El tiempo de vida útil de la columna conservada en cámara fría fue de 4 semanas.

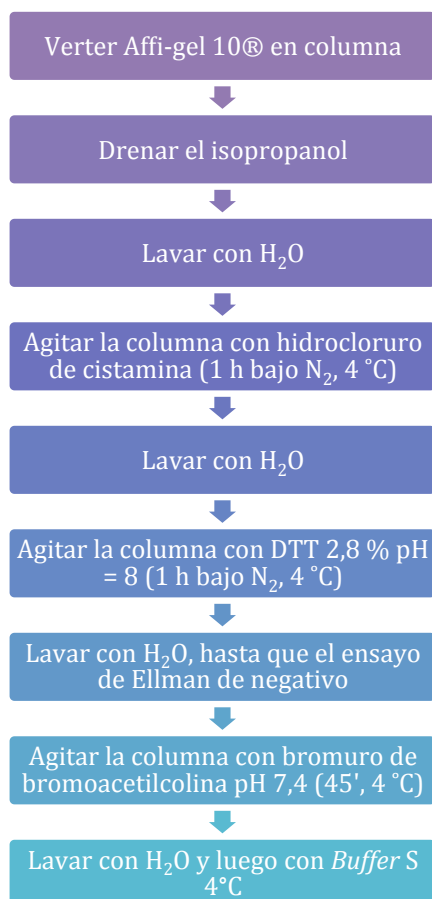


Figura 2.5: Protocolo de obtención de la columna de afinidad para purificar el AChR.

#### PURIFICACIÓN DE AChR Y RECONSTITUCIÓN DE PROTEOLIPOSOMAS

La purificación del AChR se realizó a 4 °C en cámara fría (Figura 2.6). Las membranas crudas de *T. californica* se solubilizaron con colato de sodio al 1 % con una concentración proteica de 2 mg/mL por 45 minutos a 4 °C. Para descartar el material insoluble, el solubilizado se centrifugó a 33500 rpm (74000 g) por 1 hora a 4 °C en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K utilizando el rotor 90 Ti. El sobrenadante obtenido se pasó dos veces consecutivas a través de la columna de afinidad para asegurar la adhesión de la mayor cantidad de AChR posible a la columna. Para facilitar el intercambio de los lípidos endógenos retenidos en la



estructura del AChR por aquellos lípidos exógenos definidos para el sistema modelo a obtener, la columna se lavó con un gradiente lineal de lípidos (POPC:Col (1:1) o POPC:POPA:Col (3:1:1), según la condición lipídica buscada) disueltos en *Buffer* de diálisis (*Buffer D*) (NaCl 100 mM,  $\text{PO}_4^{3-}$  0,1 mM, EDTA 0,1 mM,  $\text{NaN}_3$  0,02 %, pH 7,8) conteniendo 1 % de colato, desde una concentración lipídica de 1,3 a 3,2 mM y luego descendiente hasta 0,13 mM (da Costa *et al.*, 2002).

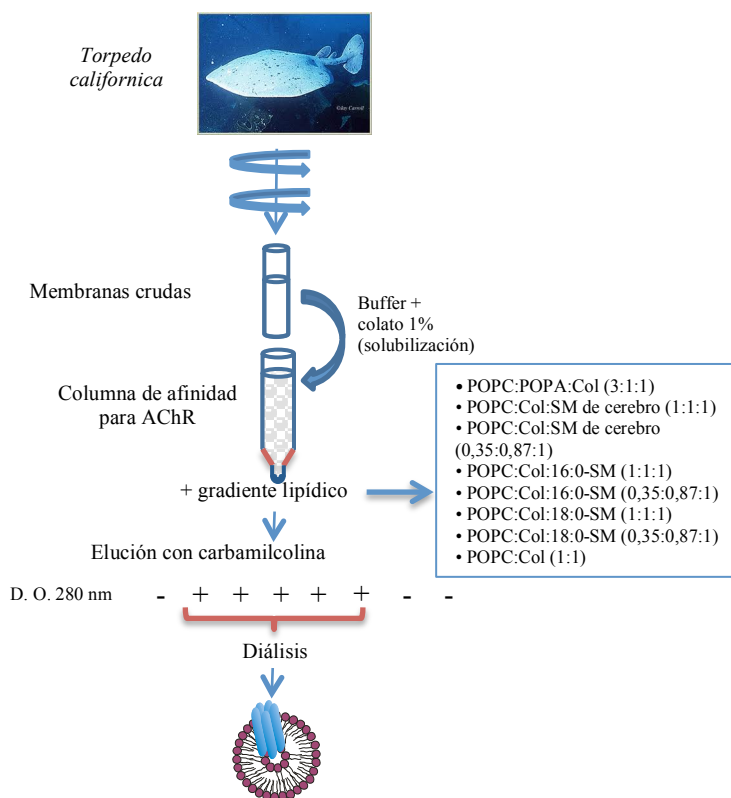


Figura 2.6: Protocolo de purificación y reconstitución del AChR en columna de afinidad, mencionando todas las mezclas de lípidos sintéticos utilizadas para reconstituir al AChR en este trabajo de Tesis.

El AChR se eluyó de la columna con una solución de concentración lipídica de 0,13 mM en *Buffer* de elución (*Buffer E*) (NaCl 250 mM, EDTA 0,1 mM,  $\text{NaN}_3$  0,02 %, fosfato 5 mM, pH 7,8, con colato 0,5 % y carbamilcolina (Carb) 10 mM). Se recolectaron 12 fracciones de 1 mL cada una (Figura 2.7). Para determinar las fracciones que contenían el AChR eluido se midió la absorbancia de cada fracción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm. Se seleccionaron y juntaron las fracciones que

presentaron un valor de absorbancia igual o superior al valor de absorbancia basal en más 0.05 unidades. Luego de la elución se determinó la concentración proteica del eluato por el método de Lowry *et al.* (1951) (ver ítem 1 de Métodos) y se procedió a la reconstitución de los proteoliposomas mediante diálisis contra 1 L de *Buffer D* a 4 °C, realizando cinco cambios de *buffer*, uno cada 12 horas. La pureza del AChR se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su uso.

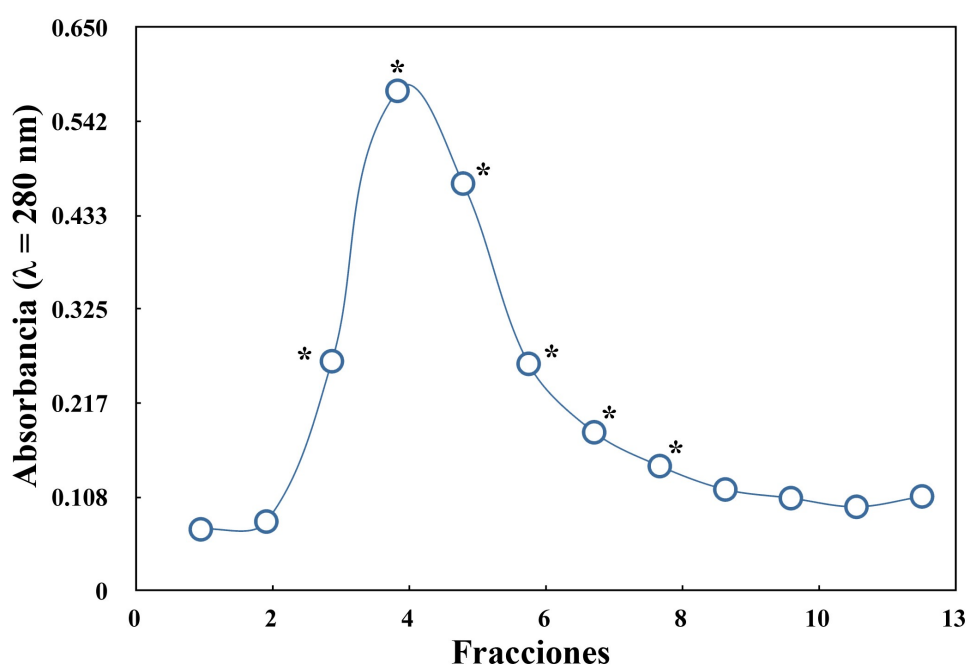


Figura 2.7: Perfil de elución típico de una purificación de AChR por agregado de Carb en cantidades saturantes. Las fracciones de 1 mL con un valor de absorbancia mayor en 0,05 unidades con respecto al valor mínimo basal obtenido fueron seleccionadas (\*) y dializadas.

En ciertos experimentos se utilizaron proteoliposomas con concentraciones lipídicas diferentes a las descritas arriba, con la intención de obtener sistemas modelos con coexistencia de dominios tipo *raft* (POPC:Col:SM 1:1:1) y sistemas modelos con la composición lipídica típica de dominios *raft* (DRM-like,

POPC:Col:SM 0,35:0,87:1). Todas estas condiciones, a diferencia de lo detallado más arriba, se llevaron a una concentración lipídica final de 0,5 mM.

Para obtener estos proteoliposomas, previo a la diálisis se adicionó una mezcla lipídica determinada a fin de llevar las proporciones de lípidos a la proporción final deseada según el caso. Esta mezcla lipídica se preparó de la siguiente manera: en un tubo de vidrio se adicionó cada uno de los lípidos disueltos en solvente orgánico en la cantidad correspondiente, la mezcla se llevó a sequedad bajo N<sub>2</sub> por 1 hora y la capa lipídica se resuspendió con *Buffer E* obteniéndose la mezcla lipídica a agregar. Luego del agregado al AChR purificado se procedió a la diálisis contra 1 L de *Buffer D* a 4 °C con cinco cambios de buffer, uno cada 12 horas. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su uso.

#### 4. OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS

Para la obtención de liposomas lipídicos, 0,6 mg de la mezcla lipídica deseada disuelta en solvente orgánico (POPC:SM:Col 1:1:1, –variando la especie de SM–, POPC:Col:bSM 1:1:2 y 1:1:3 o POPC:Col 1:1) se secaron bajo N<sub>2</sub> por 1 hora. Luego, los liposomas se resuspendieron en *Buffer PBS* a 45 °C (0,5 mg/mL) y se vortexearon por 1 minuto obteniéndose vesículas multilamelares (MLV), finalmente por sonicación de 30 minutos los MLV se transformaron en vesículas unilamelares pequeñas (SUV). En el caso particular de los liposomas que luego serían sometidos al protocolo de generación de asimetría, la película lipídica se resuspendió en *Buffer PBS* con 25 % de sacarosa. En todos los casos, como era necesario que los liposomas fueran unilamelares y de tamaño uniforme, los SUV obtenidos se extruyeron en una jeringa LiposoFast-Basic (Avestin Inc., Canadá), utilizando filtros con poros de 100 nm.

### 5. FORMACIÓN DE VESÍCULAS GIGANTES UNILAMELARES (GUVs)

Para observar la formación de dominios *raft* por parte de las distintas esfingomielinas estudiadas se prepararon vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Con ese fin, se secó una película de lípidos (5  $\mu$ L (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) en cloroformo), compuesta por POPC:Col:SM (1:1:1) y la sonda fluorescente DiI-C<sub>12</sub> en concentración menor a 0,2 %, sobre portaobjetos cubiertos con una capa de óxido de indio y estaño (ITO) del equipo de preparación de GUVs, Vesicle PrepPro (Nanion, Munich, Alemania). Rápidamente se le agregó 200  $\mu$ L de solución 0,5 M de sacarosa y se sometió por 4,33 horas a un voltaje de 1,3 V y una frecuencia de 500 Hz a 45 °C. Las SM utilizadas para este estudio fueron las siguientes: mezcla de SM de cerebro porcino (bSM), N-(15Z-tetracosenoil)-esfing-4-enina-1-fosfocolina (24:1-SM) (ambas adquiridas comercialmente), 16:0-SM y 18:0-SM.

### 6. MARCACIÓN DE AChR CON N-(1-PIRENIL)MALEIMIDA

La sonda lipofílica N-(1-pirenil)maleimida (N-PyrM) reacciona selectivamente con grupos sulfhidrilos. Para el caso de marcación de proteínas con esta sonda, la N-PyrM se une covalentemente a los residuos de cisteína. En el AChR, esta sonda fluorescente se une en la región transmembrana, específicamente a la cisteína 451 del segmento transmembrana M4 de la subunidad  $\gamma$ , y se ha demostrado que esta marcación es de mucha utilidad para estudiar interacciones lípido-proteína a nivel transmembrana (Li *et al.*, 1990).

La marcación de las cisteínas transmembrana del AChR se realizó siguiendo lo descrito por Li *et al.* (1990) y Narayanaswami *et al.* (1993) con algunas modificaciones descritas en el trabajo de Barrantes *et al.* (2000) y Fernández

Nievas *et al.* (2008). El AChR purificado en proteoliposomas (composición lipídica: POPC:POPA:Col (3:1:1) 0,13 mM) se solubilizó en colato 1 % (1 mg de proteína/mL) y se incubó agitando suavemente en presencia de N-PyrM 1 mM por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la solución se centrifugó a 70000 g por 45 minutos para sedimentar posibles agregados. El sobrenadante se reconstituyó nuevamente por diálisis contra 1 L de *Buffer D* con cinco cambios de buffer, uno cada 12 horas, a 4 °C. Una alícuota se reservó para caracterizar la muestra obtenida y el resto se guardó a -20 °C hasta su uso. El N-PyrM-AChR obtenido se corrió en un SDS-PAGE y la marca de la N-PyrM se observó con un transiluminador UV comprobándose que la marca estaba localizada mayoritariamente en la subunidad  $\gamma$  del AChR.

#### *7. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES Y TITULACIÓN DE MEMBRANAS RICAS EN ACHR CON ÁCIDOS GRASOS LIBRES*

Los ácidos grasos libres (AGL) petroselénico (*cis*-6-18:1), oleico (*cis*-9-18:1), vaccénico (*cis*-11-18:1), *cis*-13-octadecenoico (*cis*-13-18:1) y eláidico (*trans*-9-18:1) se disolvieron en etanol. Luego de la adición de cada AGL, las muestras se mantuvieron a 25 °C por 45 minutos para permitir el equilibrio de los AGL en la membrana. En todos los casos la concentración de etanol agregada a la muestra se mantuvo por debajo del 0,5 %.

#### *8. FORMACIÓN DE ASIMETRÍA EN LA MEMBRANA DE PROTEOLIPOSOMAS*

Para la formación de asimetría lipídica en el sistema modelo obtenido, se realizó un intercambio lipídico utilizando metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) de acuerdo a la

metodología descrita por Cheng *et al.* (2009) y Cheng y London (2011). Primero se generaron MLVs del lípido que posteriormente se utilizó para generar asimetría y que en este caso fue bSM. Para tal fin, se gaseó bSM bajo N<sub>2</sub> por 1 hora, luego se agregó *Buffer* Fosfato Salino caliente (PBS) (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) en cantidad suficiente para obtener una concentración lipídica de 8 mM y se vortexeó por 15 minutos a 55 °C. Los MLVs de bSM obtenidos se centrifugaron a 14200 rpm (11000 g) por 8 minutos a 25 °C en la ultracentrífuga Beckman TLX con un rotor TLA 100.4 para eliminar las posibles vesículas pequeñas que se pudieran haber formado. El sobrenadante se eliminó y el sedimento conteniendo los MLVs se resuspendió en un volumen adecuado para obtener una concentración lipídica 2 mM. Se incubaron 250 µL de solución de MLVs con 47,5 µL de una solución de MβCD 195 mM a 55 °C por 2 horas con vortexeo continuo. De esta manera se formaron complejos lípido/MβCD (MLVs/MβCD) junto con MLVs remanentes.

Para generar asimetría en los proteoliposomas (Figura 2.8), se agregaron 250 µL de una solución de proteoliposomas (0,5 mM de lípidos totales) (ítem 3 de la sección Obtención de Muestras) a la solución mezcla de MLVs/MβCD y se vortexeó por 20 minutos a 37 °C. Si bien el protocolo original sugiere más tiempo y mayor temperatura, en este caso se modificaron las condiciones a fin de minimizar la posible desnaturalización de la proteína. Para eliminar en primer lugar las MLVs sobrantes se centrifugó a 30000 rpm (49000 g) por 8 minutos a 4 °C en la ultracentrífuga Beckman TLX utilizando el rotor TLA 100.4, descartándose el pellet. En un siguiente paso, y para eliminar la MβCD, se centrifugó el sobrenadante anterior a 50000 rpm (100400 g) por 1 hora a 4 °C en la ultracentrífuga Beckman TLX utilizando el rotor TLA 100.4 y se eliminó el sobrenadante.

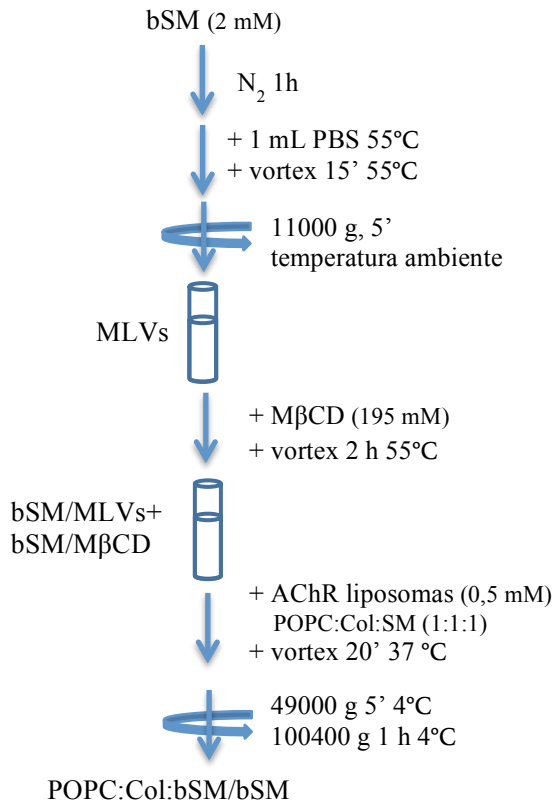


Figura 2.8: Protocolo de formación de asimetría en proteoliposomas.

En el caso de LUVs sin AChR, luego de enfrentarlos a la mezcla de MLVs/MβCD, la muestra se sembró sobre una solución de *Buffer* PBS con sacarosa 10 % y se centrifugó a 59000 rpm (188581,4 g) por 45 minutos a 4 °C en la ultracentrífuga Beckman TLX utilizando el rotor TLA 100.4. El sedimento se resuspendió en *Buffer* PBS con sacarosa 10 % y se repitió la centrifugación. Como los LUVs originalmente se formaron con una solución de sacarosa 25 %, contenían en el espacio interior dicha solución, y por tanto al estar en un medio con sacarosa 10 % se depositaron por su peso en el fondo del tubo de centrifugación. Por tanto, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en *Buffer* PBS para lograr la concentración deseada según los diferentes estudios. La muestra se utilizó el mismo día de preparación.

## 9. SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE MEMBRANA SEGÚN LA SOLUBILIDAD A

### DETERGENTES

Para obtener fragmentos de membranas resistentes y solubles a detergentes (DRM y DSM, respectivamente) se siguió la metodología descrita en trabajos anteriores (Gandhavadi *et al.*, 2002; Bermúdez *et al.*, 2010). Para ello, 50-300  $\mu\text{g}$  de AChR purificado, o liposomas sin proteína, se incubaron con 1 % Tritón X-100 durante 20 minutos a 4 °C con agitación suave. Luego, la muestra se centrifugó a 50000 rpm (100400 g) durante 4 horas a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman Coulter TLX utilizando el rotor TLA 100.4. El sobrenadante, correspondiente a la fracción DSM, se separó del sedimento, que corresponde a la fracción DRM. Este último se resuspendió con *Buffer D* en un volumen equivalente al de la fracción DSM. Ambas fracciones se conservaron a -20 °C hasta su uso.

## MÉTODOS

### 1. DETERMINACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE LOWRY

Se realizó una curva de calibrado con la proteína albúmina sérica bovina (concentración 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), tomando alícuotas de 5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{L}$ . Tanto a la curva de calibrado como a la muestra se les agregó hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N para llevar a un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  y se dejó durante toda la noche. Esta incubación se realizó para garantizar la desnaturalización completa de las proteínas de manera que los reactivos pudieran interactuar con la mayor cantidad de enlaces peptídicos posibles. *A posteriori* se agregó 1 mL de una solución formada por 1 parte de una mezcla en partes iguales de tartrato de sodio y potasio 2 % y sulfato de cobre



(Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 % y 49 partes de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % (p/v) y se incubó durante 10 minutos. A continuación se agregó 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se incubó durante media hora. En esta reacción colorimétrica, las condiciones alcalinas permiten que los nitrógenos de los enlaces peptídicos reduzcan el cobre Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> que a su vez reduce al reactivo de Folin-Ciocalteu, generando un color azul proporcional a la concentración proteica, en un rango de 0,01-1,0 mg de proteína/mL (Lowry *et al.*, 1951; Dunn, 1989). Las absorbancias de la curva de calibrado y de la muestra se leyeron a una longitud de onda de 750 nm.

## 2. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO POR EL MÉTODO DE ROUSER

Para la determinación de fósforo se evaporaron los solventes orgánicos de la muestra, se agregaron 260 µL de ácido perclórico y se calentó a 160-180 °C para digerir el carbón orgánico, quedando la muestra incolora al final del proceso. Se realizó una curva de calibrado con concentraciones conocidas de fósforo y, tanto a la curva de calibrado como a las muestras, se les agregó agua calidad MilliQ hasta llegar a los 920 µL de volumen final. Luego se agregaron 400 µL de molibdato 1,25 % y 400 µL de ácido ascórbico 5 %. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos, cortando la reacción con agua fría. La absorbancia de la curva de calibrado y de las muestras se leyeron a una longitud de onda de 800 nm.

## 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE FRACCIONES DRM Y DSM

Las fracciones DSM y DRM obtenidas de liposomas sin proteína se incubaron con SM-2 Biobeads (0,2 g/mL, método de lote) en un rotador de tubos durante 2 horas para eliminar el Tritón X-100 (Holloway, 1973).

La extracción lipídica de las fracciones DRM y DSM se realizó siguiendo el procedimiento desarrollado por Bligh y Dyer (1959) (ítem 2 de la Sección Obtención de Muestras). El extracto lipídico obtenido se resolvió en las diferentes clases lipídicas por TLC en sílica gel G. La cromatografía se realizó utilizando primero la mezcla C:M:ácido acético:NaCl 0,15M (20:10:3,2:1) como primera fase móvil para separar la SM de la POPC y luego éter como segunda fase móvil para separar el Col de los fosfolípidos.

Las manchas lipídicas se revelaron con diclorofluoresceína y observaron bajo luz UV. Las manchas correspondientes a la SM y a la POPC se rasparon de la placa y se determinó la concentración de fósforo lipídico por el método de Rouser *et al.* (1970) (ítem 2 de Sección Métodos). Las manchas coincidentes con el estándar de Col se rasparon y se eluyeron de la sílica mezclando esta con C:M:H<sub>2</sub>O (5:5:1) 2 veces y guardando el sobrenadante cada vez. Luego se realizó una partición con agua MilliQ recuperando el Col de la fase orgánica. La cuantificación de la cantidad de Col se realizó utilizando el ensayo de la enzima colesterol-oxidasa (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina) (ver ítem siguiente).

#### 4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL POR EL ENSAYO DE LA ENZIMA COLESTEROL-OXIDASA

Para determinar la cantidad de Col en las muestras eluidas de las placas de TLC, las muestras se evaporaron y resuspendieron con 100  $\mu$ L de alcohol isopropílico. Además, se realizó un blanco a partir de una banda de sílica de la placa de TLC utilizada para la separación de las muestras a fin de restar posibles rastros de la fluoresceína que pudieran quedar remanentes. Se realizó una curva de calibrado con el estándar aportado por el *kit* de Colestat (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina). A

todas las muestras se les agregó el reactivo A proporcionado por el *kit* y, luego de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia de la curva de calibrado y de las muestras a una longitud de onda de 505 nm.

##### 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

Las muestras con un mínimo de 50  $\mu$ g de proteína se incubaron con ácido tricloroacético (TCA) al 20 % y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga de mesa (Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante obtenido se eliminó y el sedimento se lavó dos veces con 1 mL de acetona, centrifugándose a 14000 rpm durante 10 minutos luego de cada lavado, descartándose el sobrenadante y dejando evaporar la acetona remanente luego de los lavados. A continuación, el sedimento se resuspendió en *Buffer* de siembra Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) (Tris-Cl 50 mM, DTT 100 mM, docedilsulfato sódico (SDS) 2 %, azul de bromofenol 0,1 %, glicerol 10 %, pH 6,8). En el caso de que la resuspensión adquiriera un color violáceo-anaranjado, producto de la acidez, se le agregó una alícuota de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) para revertir el color a violeta intenso. Posteriormente, la muestra disuelta se desnaturalizó calentando a 100 °C durante 5 minutos.

Paralelamente a los pasos anteriores, se preparó un gel de poliacrilamida al 10 % con SDS en el que se corrieron las muestras. Este consiste en un gel de corrida al 10 % (inferior) (acrilamida 30 %, bis-acrilamida 1 %, *Buffer* Tris 1,5 M (pH 8,7), SDS 10 %, persulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 10 %,  $\text{N,N,N',N'}$ -Tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,04 %) y un gel de apilamiento (*stacking gel*) al 5

% (superior) (acrilamida 30 %, bis-acrilamida 1 %, *Buffer* Tris 1 M (pH 6,8), SDS 10 %,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  10 %, TEMED 0,04 %).

Las muestras desnaturalizadas se sembraron en el gel de poliacrilamida. La corrida por el gel de apilamiento se realizó a 40 V hasta que la muestra pasó al gel de corrida. Luego se continuó con 15 mA de corriente constante. El gel se reveló de manera irreversible con una solución de Coomassie Blue (Coomassie Blue R 0,025 % (disuelto en metanol), M 23 % (v/v) y ácido acético 9,2 % (v/v)) durante toda la noche y se decoloró con una solución M:ácido acético:H<sub>2</sub>O 1:1,5:17,5 hasta el momento de la visualización y distinción de las bandas de proteína. Posteriormente, el gel se conservó en solución fijadora (ácido acético glacial 7,5 % (v/v)). La distribución proteica entre las distintas bandas en los geles se analizó por densitometría óptica utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) (Abràmoff *et al.*, 2004).

#### 6. MEDICIONES DE FLUORESCENCIA

Las membranas ricas en AChR, el N-PyrM-AChR y los proteoliposomas de AChR con distintas composiciones lipídicas se resuspendieron en *Buffer* A (NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,25 mM, *Buffer* HEPES 20 mM, pH 7,4) en una concentración final de 50-100  $\mu\text{g}$  de proteína/mL (0,2-0,4  $\mu\text{M}$ ), 20  $\mu\text{g}$  de proteína/mL y 12  $\mu\text{g}$  de proteína/mL, respectivamente. En todos los casos, la densidad óptica de la suspensión de membrana a 290 nm se mantuvo por debajo de 0,1 para minimizar la dispersión de la luz. Todas las medidas fluorimétricas se realizaron en un espectrofluorímetro SLM modelo 4800 (SLM Instruments, Urbana, IL, EE.UU.) utilizando un rayo de luz polarizada verticalmente de una lámpara de arco de mercurio/xenón obtenido con un polarizador Glan-Thompson (ranuras de excitación y emisión de 4 nm).

Los experimentos con membranas ricas en AChR y con N-PyrM-AChR se realizaron en cubetas de cuarzo de 2 mL, mientras que en el caso de los proteoliposomas de AChR y de los liposomas se usaron cubetas de cuarzo de 1 mL. En todos los casos la temperatura se reguló con un baño termostatzado de circulación de agua (Haake, Darmstadt, Alemania).

### 6.1. CÁLCULO DE LA POLARIZACIÓN GENERALIZADA

La sonda fluorescente Laurdan, cuya estructura se ilustra en la Figura 2.9, es un derivado del naftaleno y posee un momento dipolar debido a la separación de cargas parciales entre los residuos 2-dimetilamino y los residuos 6-carbonilos (Parasassi *et al.*, 1998). Este momento dipolar aumenta al excitar a la molécula y genera la reorientación de los dipolos de las moléculas del solvente (en este caso, del agua). La energía requerida para la reorientación del solvente disminuye el estado de energía excitado, hecho que se refleja en un cambio del espectro de emisión del Laurdan. El uso de Laurdan para el estudio del AChR fue introducido en nuestro laboratorio (Antollini *et al.*, 1996; Zanello *et al.*, 1996; Antollini y Barrantes, 1997).

Las muestras de membranas ricas en AChR y de proteoliposomas con distintas concentraciones lipídicas se marcaron con Laurdan. Para tal fin, a cada muestra se le agregó una alícuota de una solución de Laurdan disuelta en etanol, lo cual dio una concentración final de la sonda de 0,6  $\mu\text{M}$ . La concentración de solvente orgánico se mantuvo en todos los casos por debajo de 0,2 %. Las muestras marcadas se incubaron en la oscuridad durante 45 minutos para que la sonda fluorescente llegara al equilibrio en las membranas antes de proceder a realizar las mediciones de fluorescencia. En el caso particular del estudio del efecto de los AGLs sobre el AChR, las membranas ricas en AChR marcadas con Laurdan se incubaron a continuación con diferentes

alícuotas de una solución etanólica de AGL durante 45 minutos antes de efectuar las mediciones, para permitir el equilibrio de los AGL en la membrana (en todos los casos la concentración de etanol agregada a la muestra se mantuvo por debajo del 0,5 %).

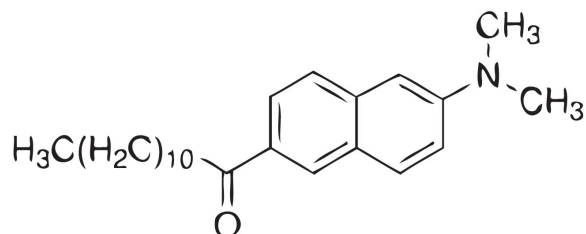


Figura 2.9: Estructura química de la sonda fluorescente Laurdan.

Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia de la sonda Laurdan utilizando dos condiciones de excitación según el objetivo: excitación por transferencia de energía de resonancia desde la proteína a la sonda Laurdan o excitación directa de la sonda (longitud de onda de excitación de 290 nm o de 360 nm, respectivamente). Con cada uno estos espectros se calculó un valor de polarización generalizada ( $GP$ ) utilizando la siguiente fórmula,

$$GP = \frac{I_{434} - I_{490}}{I_{434} + I_{490}} \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde  $I_{434}$  y  $I_{490}$  son las intensidades de emisión a la longitud de onda característica de las fases gel y líquido-cristalina, respectivamente (Parasassi *et al.*, 1990, 1991).

Un valor alto de  $GP$  se asocia usualmente con una baja fluidez, baja polaridad y/o alto contenido de Col en las membranas. Un valor bajo de  $GP$  indica precisamente lo contrario (Yu *et al.*, 1996).

## 6.2. MEDICIÓN DE ANISOTROPÍA

Las muestras de membranas ricas en AChR de proteoliposomas con AChR, o de liposomas sin proteína receptora, se marcaron con la sonda fluorescente DPH o con la sonda TMA-DPH cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 2.10. Para tal fin, a cada muestra se le agregó una alícuota de una solución de DPH o de TMA-DPH disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener en ambos casos una concentración final de  $0,6 \mu\text{M}$ , tal como en Antollini y Barrantes (1998). Las muestras de membranas ricas en AChR se incubaron en la oscuridad durante 45 minutos para lograr el equilibrio de la sonda en las membranas, mientras que las muestras de proteoliposomas con AChR o de liposomas se incubaron durante al menos 5 minutos.

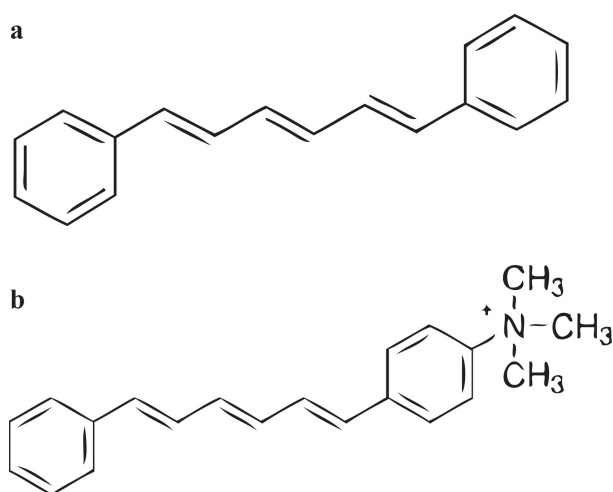


Figura 2.10: Estructura química del 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (a) y 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-difenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) (b). El segundo tiene un grupo amonio que le confiere la polaridad necesaria como para permanecer anclado a la superficie de la hemicapa de la membrana en la que se inserta, a diferencia del DPH que se ubica en el centro hidrofóbico de la membrana.

Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 365 y 425 nm, respectivamente. Las mediciones de fluorescencia para calcular la anisotropía de la sonda fluorescente ( $r$ ) se realizaron en un formato T con filtros Schott KV418 en los canales de emisión. El valor de  $r$  se obtuvo de acuerdo con Shinitzky y Yuli (1982) según la siguiente fórmula:

$$r = \frac{(I_v/I_h)_v - (I_v/I_h)_h}{(I_v/I_h)_v + (I_v/I_h)_h} \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde  $(\frac{I_v}{I_h})_v$  y  $(\frac{I_v}{I_h})_h$  son la relación entre la luz emitida vertical u horizontalmente polarizada y la luz de excitación vertical u horizontalmente polarizada, respectivamente. El valor de  $r$  puede variar entre -0,2 y 0,4, donde los valores más altos indican un orden estructural mayor de los lípidos (Lakowicz, 2006).

Para el estudio del efecto de los AGLs sobre el AChR, las membranas ricas en AChR marcadas con DPH o TMA-DPH se incubaron con diferentes alícuotas de una solución etanólica de AGL a temperatura ambiente durante 45 minutos antes de efectuar las mediciones de anisotropía, para permitir el equilibrio de los AGL en la membrana (en todos los casos la concentración de solvente orgánico agregado a la muestra se mantuvo por debajo del 0,5 %).

### 6.3 Determinaciones de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)

Cuando una molécula en estado excitado se encuentra con una molécula capaz de aceptar la energía que la primera libera, se observa la presencia de un fenómeno de transferencia de energía de resonancia de Förster, mejor conocido como proceso de *FRET*. La molécula en estado excitado se conoce como molécula donante y la segunda se conoce como molécula aceptora ya que, como se señaló anteriormente, esta molécula es capaz de recibir la energía que libera la molécula donante (Lakowicz, 2006). Al momento de recibir la energía donada, la molécula aceptora se encuentra en su estado basal. Esta metodología es útil tanto para estudiar las asociaciones y/o disociaciones entre dos moléculas como para analizar las relaciones existentes entre dos moléculas en una membrana. Para tal fin, un parámetro



importante es la eficiencia de esta transferencia de energía ( $E$ ), que es función de la sexta potencia de la inversa de la distancia entre el donante y el aceptor (Lakowicz, 2006) y depende de varios factores. Uno de los factores es el solapamiento entre el espectro de emisión de la molécula donante (correspondiente en este caso al espectro de emisión de los aminoácidos aromáticos del AChR, principalmente los triptófanos) y del espectro de absorción del aceptor, que en este trabajo corresponden a Laurdan o dehidroergosterol (DHE, molécula con comportamiento análogo al Col cuya estructura química se muestra en la Figura 2.11). Otros factores importantes para  $E$  son el rendimiento cuántico del donante, la orientación relativa de los dipolos de transición, tanto de las moléculas donantes como aceptoras, y la distancia entre las moléculas donante y aceptora, siendo este último factor determinante para la utilización de esta técnica en el trabajo de Tesis.

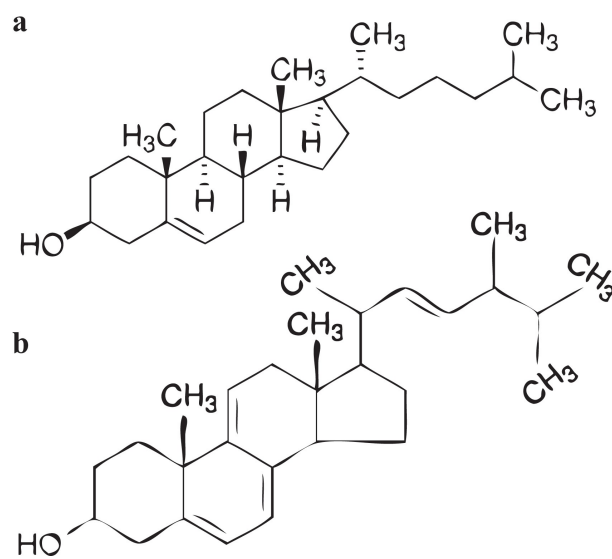


Figura 2.11: Estructura química del Col (a) y de su análogo fluorescente dehidroergosterol (DHE) (b). Si bien la estructura del DHE difiere de la del Col en la presencia de enlaces y grupos adicionales (dos enlaces dobles adicionales en los anillos aromáticos, un grupo metilo y otro enlace doble en la cadena carbonada), sus estructuras son lo suficientemente similares como para permitir un comportamiento análogo.

$E$  se calculó siguiendo a la teoría de Förster (Förster, 1955), de la siguiente manera:

$$E = 1 - \frac{I}{I_0} \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde  $I$  e  $I_0$  son las intensidades de emisión de la molécula donante en presencia y ausencia del aceptor, respectivamente. En este caso, la longitud de onda de excitación fue 290 nm e  $I$  correspondió a la intensidad máxima de la emisión intrínseca de la proteína, que es a 330 nm.

Para los valores de  $I$  e  $I_0$ , se obtuvieron espectros de fluorescencia de muestras de membranas ricas en AChR, o de proteoliposomas con distintas concentraciones lipídicas, antes y después de incubarlas con la sonda fluorescente Laurdan o con DHE (concentración final 0,6  $\mu$ M) durante 45 minutos, respectivamente.

✓ Para el estudio del efecto de los AGL sobre el AChR, luego de la obtención de  $I_0$  e  $I$  se agregaron secuencialmente alícuotas de una solución etanólica de AGL, seguidas de una incubación de 45 minutos luego de cada agregado para permitir el equilibrio de los AGL en la membrana (en todos los casos, la concentración de solvente orgánico agregado a la muestra se mantuvo por debajo del 0,5 %), obteniéndose un nuevo valor de  $I$  luego de cada agregado. Teniendo en cuenta que la presencia de los AGLs podría afectar de alguna manera la fluorescencia intrínseca del AChR por cualquier otro mecanismo de extinción, estos experimentos se realizaron en cubetas paralelas, una con y otra sin la molécula aceptora, obteniendo para cada agregado de AGL valores de  $I$  de ambas cubetas y realizando la siguiente corrección:

$$E_{\text{corr}} = E_{(+)\text{aceptor}} - E_{(-)\text{aceptor}} \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde  $E_{\text{corr}}$  corresponde a los valores de  $E$  obtenidos luego de la corrección y siendo los utilizados para el análisis posterior, y  $E_{(+)\text{aceptor}}$  y  $E_{(-)\text{aceptor}}$ , son los valores de  $E$  medidos en presencia y ausencia de la sonda aceptora, respectivamente, para cada agregado de AGL.

✓ Para el estudio de la partición diferencial del AChR en dominios lipídicos en proteoliposomas conteniendo distintas especies de SM, en proteoliposomas modelo RAFT, en proteoliposomas modelo DRM, o en proteoliposomas con asimetría transbicapa, se calculó un valor de  $E$  entre la fluorescencia intrínseca del AChR y las sondas Laurdan y DHE como las sondas aceptoras. Con la intención de poder realizar una comparación entre los distintos resultados obtenidos, fue necesario tener en cuenta las siguientes condiciones adicionales a las ya explicadas:

➤ El valor de  $E$  calculado en el modelo DRM es el valor de mayor magnitud que es posible obtener dado que solo hay una fase y, por ende, tanto las moléculas donantes como las aceptoras se mezclan y comparten una misma localización (Figura 2.12). Además, se asumió que los dos pares donante-aceptor tienen la misma probabilidad de FRET en este modelo DRM y, por tanto, la relación  $E_{DHE}/E_{laurdan}$  debería ser cercana a la unidad. Sin embargo, dado que tanto el solapamiento entre el espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca del AChR y el de absorción de fluorescencia de la sonda aceptora como el rendimiento cuántico es diferente según la sonda sea Laurdan o DHE (Figura 2.13), dicha razón refleja las diferencias entre ambas sondas y, por tanto, se la utilizó como factor de corrección para realizar comparaciones en el modelo RAFT.

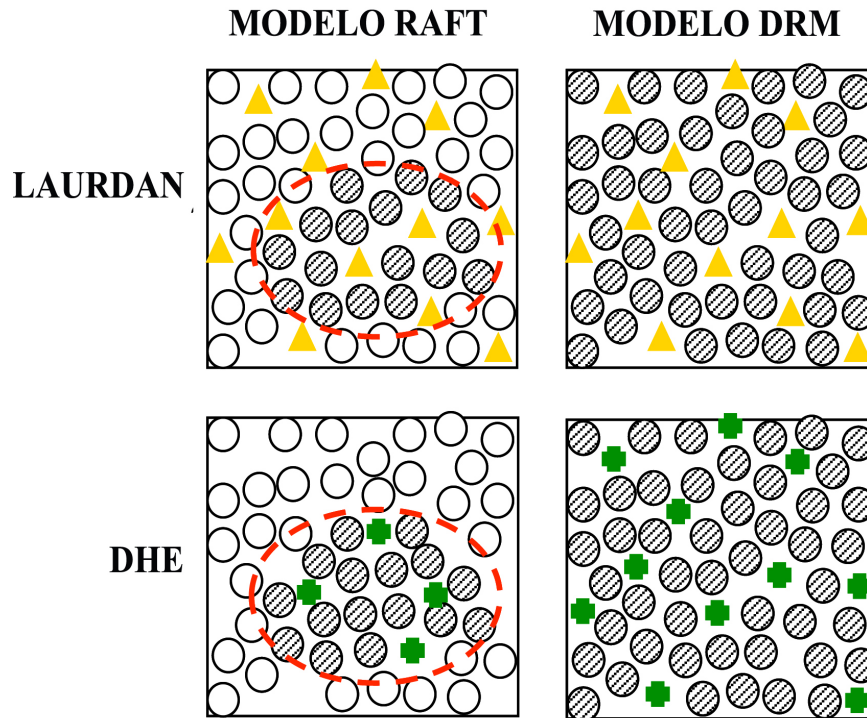


Figura 2.12: Sistemas modelo utilizados en estudios de *FRET*: modelo *RAFT* (POPC:SM:Chol 1:1:1) presenta coexistencia de dos dominios lipídicos ( $\circ$  y  $\otimes$ , dominios  $L_o$  o DRM y dominios  $L_d$  o DSM, respectivamente), y modelo DRM (POPC:SM:Chol 0,35:1:0,87) compuesto de un solo dominio lipídico ( $\otimes$ ). La sonda fluorescente Laurdan ( $\blacktriangle$ ) no particiona diferencialmente en un dominio particular, mientras que la sonda DHE ( $\oplus$ ), utilizada como un mimético fluorescente del Col, se localiza preferentemente en los dominios DRM. Las mediciones de *FRET* se realizaron entre el AChR, molécula donante, y el Laurdan o DHE como aceptores. Imagen adaptada de Bermúdez et al. (2010).

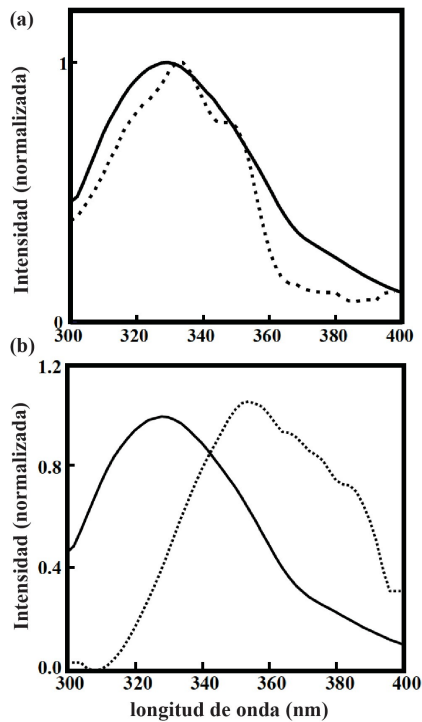


Figura 2.13: Solapamiento del espectro de absorción de cada una de las sondas aceptoras (a) DHE o (b) Laurdan (líneas punteadas) con el espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca del AChR (línea continua). Imagen adaptada de Bermúdez (2011).

➤ En el modelo RAFT, con coexistencia de dominios líquido-ordenado ( $L_o$ ) o DRM y líquido-desordenado ( $L_d$ ) o DSM, la sonda DHE se encuentra predominantemente en los dominios  $L_o$  por su comportamiento análogo al del Col (de Almeida *et al.*, 2004) (Figura 2.11) por lo que, dependiendo de la ubicación de la molécula donante, el valor de  $E$  puede variar (Figura 2.12). A diferencia del DHE, la sonda Laurdan no presenta afinidad por ninguno de los dos dominios. A partir de las  $E$  obtenidas con ambas sondas aceptoras se calculó la razón ( $E_{DHE}/E_{laurdan}$ ) del modelo RAFT en las diferentes condiciones experimentales. Para independizarse del comportamiento diferencial de ambas sondas explicado en el ítem anterior, esta razón se dividió por la razón calculada en el modelo DRM.

➤ Una vez corregidos los valores de la razón  $E_{DHE}/E_{laurdan}$  para el modelo RAFT, se realizaron las siguientes interpretaciones: cuando las moléculas donantes se localizan en ambos tipos de dominios,  $E_{DHE}$  debería aproximarse a la mitad de  $E_{laurdan}$  y, por ende, el valor de  $E_{DHE}/E_{laurdan}$  debería aproximarse a 0,5 (Figura 2.12). Por el contrario, si las moléculas donantes muestran preferencia por los dominios  $L_d$ , el AChR no estaría lo suficientemente cerca de la sonda DHE (que muestra preferencia por dominios  $L_o$  (de Almeida *et al.*, 2004)), con lo cual el valor de  $E_{DHE}$  sería muy bajo y el valor de  $E_{DHE}/E_{laurdan}$  se acercaría a cero 0. Por último, si el donante se localiza en los dominios  $L_o$ , situación opuesta a la anterior, el AChR estaría en contacto con la totalidad de las moléculas de DHE mientras que solo con la mitad de las moléculas de Laurdan.  $E_{DHE}$ , en este caso, sería significativamente mayor que  $E_{laurdan}$  y el valor de  $E_{DHE}/E_{laurdan}$  sería entonces mayor a 1.

#### 6.4 MEDICIONES DE FLUORESCENCIA DEL COLORANTE FLUORESCENTE CRISTAL

##### VIOLETA

El colorante fluorescente Cristal Violeta (CrV) pertenece a la familia de compuestos amino-triarilmetano (Figura 2.14) y tiene la ventaja de no emitir fluorescencia detectable en solución, mientras que una vez unida al AChR la emisión de fluorescencia se incrementa 200 veces (Lurtz y Pedersen, 1999). A una suspensión de membranas ricas en AChR en *Buffer A* (100  $\mu\text{g}$  de proteína/mL) se agregó una alícuota de una solución etanólica de AGL, seguidas de una incubación de 45 minutos para permitir el equilibrio de los AGL en la membrana. Para realizar las mediciones con el AChR en su estado desensibilizado, luego de la incubación con los AGL, las membranas de *T. californica* se incubaron con 0,5 mM de carbamilcolina (Carb) durante 15 minutos. Posteriormente, las membranas se titularon con concentraciones crecientes de CrV disuelto en *Buffer A*. Después de cada agregado de CrV, las muestras se incubaron durante 15 minutos y se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia del CrV. La longitud de onda de excitación fue 600 nm y los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron desde 605 a 700 nm. Antes del primer agregado del CrV, se obtuvo un espectro de emisión de fluorescencia basal para cada muestra. Este espectro luego se le restó a los espectros de emisión obtenidos en presencia del CrV. Para determinar las constantes de disociación ( $K_D$ ) del CrV del AChR, se midió la intensidad máxima del CrV (a 623-625 nm) de cada uno de los espectros con concentración creciente de CrV y estos valores se graficaron en función de la concentración logarítmica del CrV (M) agregado. La curva sigmoidea resultante se ajustó con la función de Boltzmann y se calcularon las  $K_D$ .

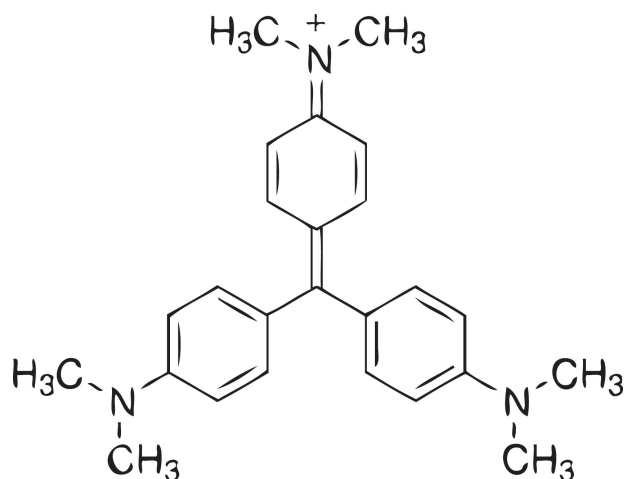


Figura 2.14: Estructura química de la sonda fluorescente Cristal Violeta.

### 6.5. EXTINCIÓN DE FLUORESCENCIA CON UN AGL SPIN MARCADO

Las muestras de N-PyrM-AChR (20  $\mu\text{g/mL}$ ) se incubaron con una alícuota de una solución etanólica de AGL (concentración final de AGL en membrana = 60  $\mu\text{M}$ ), seguida de una incubación de 45 minutos para permitir el equilibrio de los AGL en la membrana. A continuación, las muestras con o sin AGL se titularon con concentraciones crecientes del ácido graso spin marcado 5-SLFA, o solo con su vehículo (etanol), y se incubaron durante 30 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$  previo a cada medición de fluorescencia para permitir que el 5-SLFA alcance el equilibrio en la membrana. Luego de cada agregado se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia de la sonda N-PyrM. La longitud de onda de excitación fue 345 nm y los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron desde 350 a 520 nm. Frente a la presencia de cantidades crecientes de 5-SLFA en comparación con el espectro de emisión basal, la intensidad de la emisión de fluorescencia de la sonda N-PyrM fue disminuyendo (Figura 2.15).

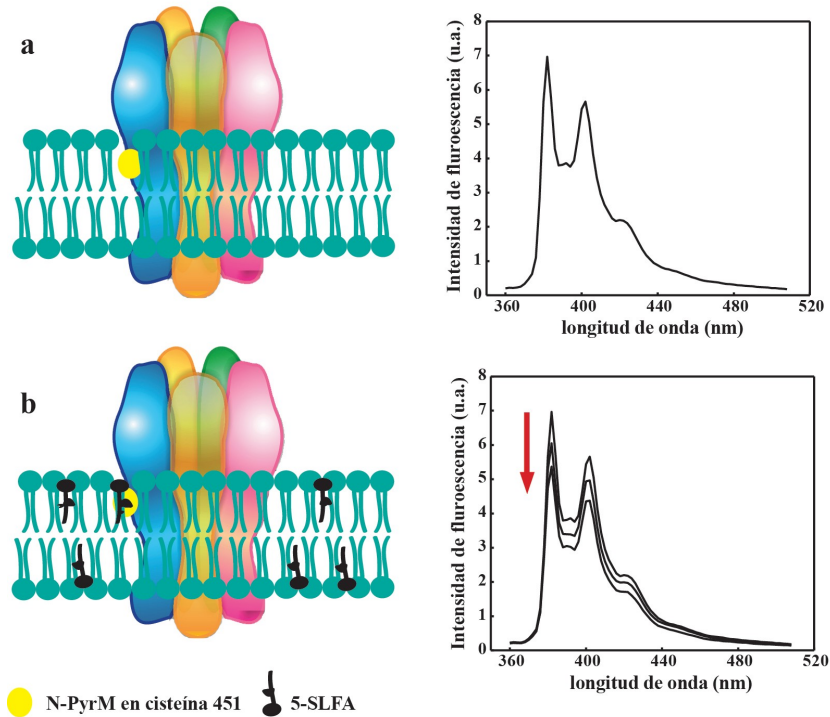


Figura 2.15: Extinción de la fluorescencia de la sonda N-PyrM unida al AChR por el agregado de concentraciones crecientes del extintor de fluorescencia 5-SLFA. a) En ausencia de 5-SLFA, situación basal, se obtiene el espectro de la emisión de fluorescencia total del pireno. b) En presencia de cantidades crecientes de 5-SLFA, la intensidad de los espectros de la emisión de fluorescencia del pireno va disminuyendo.

En cada espectro se midió la intensidad máxima de fluorescencia del pireno (373 nm). De los datos obtenidos surgieron los gráficos de Stern–Volmer de acuerdo con:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde  $F_0$  y  $F$  corresponden a la intensidad de emisión de fluorescencia de N-PyrM-AChR en ausencia y presencia de 5-SLFA, respectivamente,  $[Q]$  es la concentración del extintor, y  $K_{sv}$  es la constante de Stern-Volmer (Stern y Volmer, 1919).

## 7. COMPROBACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ASIMETRÍA TRANSBICAPA EN PROTEOLIPOSOMAS Y LIPOSOMAS



Para asegurarnos de que el protocolo de generación de asimetría fuese exitoso, se generaron vesículas simétricas con la misma composición lipídica que las vesículas asimétricas obtenidas (Cheng *et al.*, 2009) dado que, a pesar de tener la misma concentración molar de cada lípido, se espera que las vesículas simétricas tengan propiedades distintas de las vesículas asimétricas. Para ello, los liposomas asimétricos sin AChR (preparados de acuerdo con ítem 8 de la sección de Obtención de Muestras) formados con POPC:Col:bSM/bSM o POPC:Col/bSM se dividieron en dos fracciones. Una parte se reservó a 4 °C para mediciones posteriores. La segunda fracción de LUVs asimétricos se secó bajo una corriente de N<sub>2</sub>, se agregaron 200 µL de C:M (2:1) para solubilizar las vesículas asimétricas y mezclar los lípidos, y se volvió a secar durante 1 hora con N<sub>2</sub>. Luego se agregaron 200 µL de *Buffer* PBS a 55 °C y se vortexeó durante 1 min. Finalmente la muestra se enfrió hasta una temperatura de 4 °C. Tanto las muestras reservadas (LUVs asimétricos) como las que se resuspendieron se dividieron en dos. Una parte se incubó con DPH y la otra parte se incubó con TMA-DPH durante al menos 5 minutos y se procedió a realizar mediciones de anisotropía de fluorescencia.

#### 8. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

Los GUVs generados según lo explicado en la sección 5 de Obtención de Muestras se observaron en un microscopio Nikon E-600 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EE.UU.) con un objetivo de 40x. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004).

### 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones entre los grupos de resultados de este trabajo de Tesis se realizaron utilizando la prueba estadística de análisis de varianza unidireccional, popularmente conocido como *one-way* ANOVA. Solo en el caso de las mediciones de canal único, el análisis estadístico se realizó utilizando el test de Student. Todos los datos están expresados como promedio  $\pm$  desvío estandar (D.S.) de experimentos independientes.

PARTE I

INHIBICIÓN DEL AChR POR LA PRESENCIA DE  
DETERMINADOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES *CIS*-  
MONOINSATURADOS

## RESULTADOS

Tal como se ha señalado en la Introducción de este trabajo de Tesis, los AGLs inhiben al AChR de manera no competitiva (Barrantes, 2004; Fernández Nieves *et al.*, 2007; 2008; da Costa y Baenziger, 2009; Baenziger y da Costa, 2013), lo cual sugiere que esta acción puede ocurrir a nivel transmembrana a través de sitios alostéricos encontrados en el AChR (Minota y Watanabe, 1997). Fernández Nieves *et al.* (2008) postularon que el mecanismo de acción de los AGLs podría producirse por dos caminos posibles: 1) el contacto directo entre los AGLs y los segmentos transmembrana del AChR remueve al AChR de su estado de reposo (R), o bien 2) hay una relación entre el estado físico de la membrana y el estado conformacional del AChR, de tal manera que su equilibrio de activación se ve afectado por cambios en el microentorno lipídico del AChR.

Para estudiar estas dos posibilidades, en este trabajo de Tesis se utilizó un grupo de AGLs monoinsaturados de igual longitud de cadena (*cis*-6-18:1, *cis*-9-18:1, *cis*-11-18:1, *cis*-13-18:1 y *trans*-9-18:1), observando la posible relación entre la posición del doble enlace de estos ácidos grasos y la perturbación de la funcionalidad y conformación del AChR y el orden de membrana. La Figura 3.1 muestra las estructuras químicas representativas de los cinco AGLs estudiados. A simple vista se puede observar el desplazamiento gradual del quiebre en la cadena acílica con la variación de la posición del único doble enlace de los AGLs y la significativa

divergencia entre la cadena quebrada de los AGL *cis*-insaturados y el *trans*-insaturado.

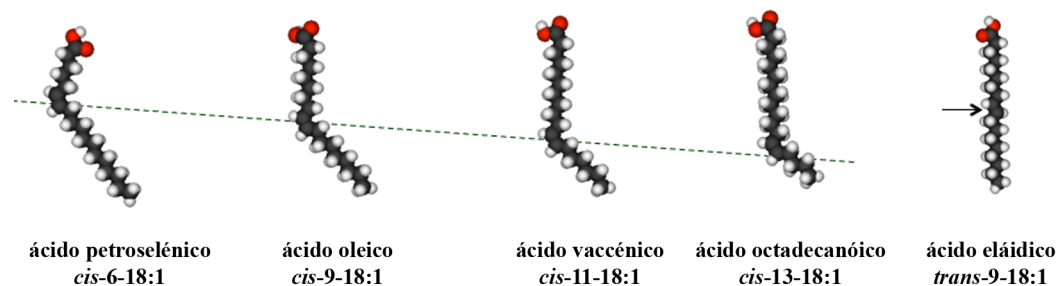


Figura 3.1: Estructuras moleculares de los AGLs estudiados. La línea punteada muestra la posición del doble enlace *cis* y la flecha indica la posición del doble enlace *trans*. Imagen presentada en Perillo *et al.* (2012).

## LOCALIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN LA INTERFASE

### LÍPIDO-AChR

Para determinar la localización de los AGLs estudiados en las membranas ricas en AChR de *T. californica* y su relación con el AChR, se realizaron estudios de eficiencia de FRET entre la fluorescencia intrínseca de los triptófanos del AChR como donante y la sonda fluorescente Laurdan como aceptor. La utilización de FRET con Laurdan como aceptor fue introducida en nuestro laboratorio, así como el uso de este par donante-aceptor para el estudio de la interfase lípido-AChR (Antollini *et al.*, 1996). El análisis de la eficiencia ( $E$ ) de este proceso permite conocer en mayor detalle la interacción de moléculas en la interfase lípido-AChR debido a que la molécula de Laurdan se ubica en dicha interfase (Figura 3.2). Se postuló que una disminución del valor de  $E$  sería consecuencia del desplazamiento de las moléculas de Laurdan de la interfase (Antollini y Barrantes, 1998). Se observó que el agregado de

moléculas de PC o de Col a la membrana genera desplazamientos de la sonda fluorescente Laurdan de la interfase lípido-AChR, siendo esos desplazamientos no solo independientes entre sí, sino también aditivos. Además, Antollini y Barrantes (1998), trabajando con el ácido oleico (*cis*-9-18:1), concluyeron que el desplazamiento del Laurdan generado por este AGL es equivalente a la suma de los efectos del Col y las PC juntos.

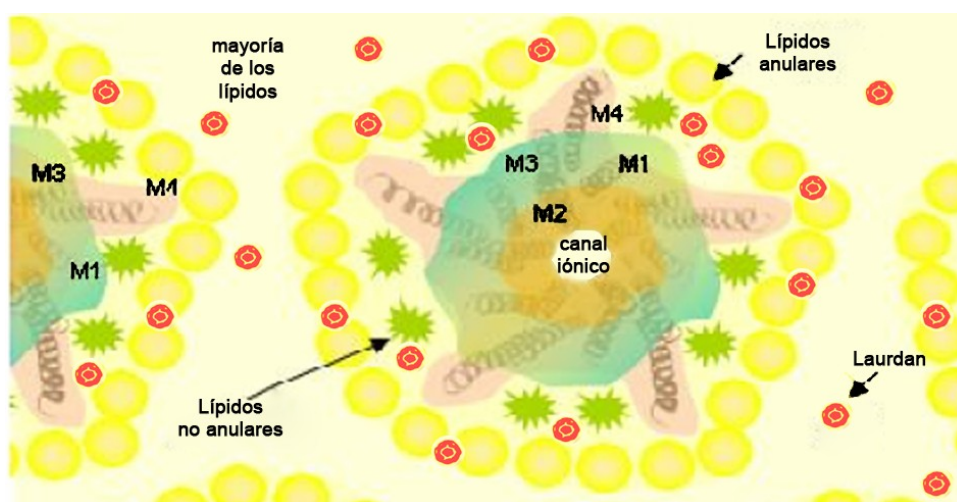


Figura 3.2: Ubicación de las moléculas de Laurdan (●) en una membrana rica en AChR. La estructura de la molécula del AChR se representa con los tres anillos concéntricos que darían origen a los distintos sitios para lípidos. El Laurdan se puede ubicar tanto en la interfase lípido-AChR (sitios anulares (●, moléculas de PC), y sitios no anulares (●, moléculas de Col)) como en la membrana en general. Imagen adaptada y modificada de Antollini y Barrantes (2002) y Antollini *et al.* (2009).

Teniendo en cuenta que las PC y el Col son típicos ejemplos de lípidos anulares y no anulares, respectivamente, Antollini y Barrantes (1998) argumentaron (a) que si la sonda Laurdan puede detectar los diferentes sitios lipídicos en la interfase lípido-receptor en las membranas nativas ricas en AChR entonces se espera que la sonda se ubique en ambos lugares; y (b) que los dos sitios distintos que detecta el Laurdan pueden corresponder a los sitios anulares y no anulares, tal como Jones y McNamee (1988) y Narayanaswami *et al.* (1993) postularon originalmente siguiendo una

metodología diferente y trabajando en sistemas modelo (AChR marcado covalentemente con N-(1-pirenil)maleimida y lípidos brominados como extintores de fluorescencia).

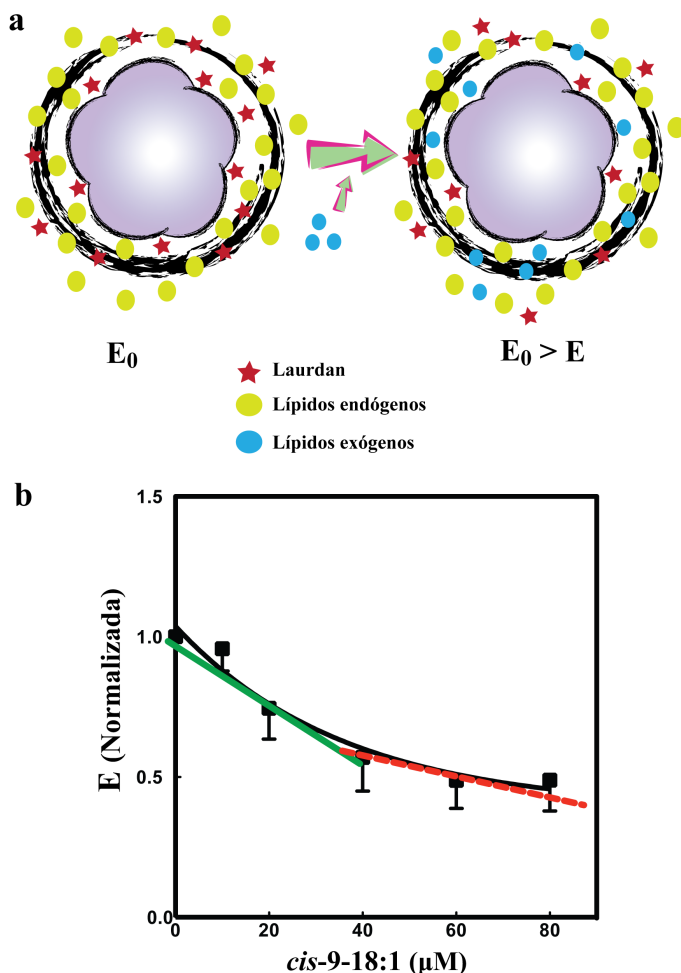


Figura 3.3: (a) La sonda fluorescente Laurdan se ubica tanto en sitios anulares como en sitios no anulares en el microentorno lipídico del AChR, obteniéndose un valor de eficiencia de transferencia de energía de resonancia de Förster basal  $E_0$ . Frente al agregado de lípidos exógenos, la sonda Laurdan es desplazada de estos sitios, disminuyendo el valor de  $E$  en comparación con el valor basal. (b) Curva de decaimiento de  $E$  en función de concentraciones crecientes de lípido exógeno. Una pendiente abrupta, como la indicada con una línea continua verde, sugiere la ubicación de la molécula exógena en sitios no anulares. Por el contrario, una pendiente más suave, como la indicada por la línea roja discontinua, sugiere la ubicación de la molécula exógena en sitios anulares.

Fernández Nievas *et al.* (2007) demostraron que el perfil de las curvas obtenidas con los valores de eficiencia de FRET normalizada ( $E$ ) en función de la concentración de una molécula hidrofóbica exógena se relaciona con su unión a sitios distintivos en la interfase lípido-AChR. Tal como se indicó anteriormente, esto se debe al desplazamiento de las moléculas del aceptor (Laurdan) del microentorno del AChR por la adición de una molécula exógena (Figura 3.3a). Se propuso que la diferente afinidad de las moléculas por los sitios de la interfase lípido-AChR se pone de

manifiesto en pendientes diferentes de las curvas permitiendo diferenciar la disminución en  $E$  en dos regiones características. La pendiente abrupta inicial observada cuando se agrega Col a la membrana es una consecuencia de la alta afinidad de estos lípidos exógenos por los sitios no anulares, lo cual provoca el desplazamiento rápido y efectivo del Laurdan de estos sitios (Lee, 2004). En el caso del agregado de PC, se observa una disminución lineal en  $E$ , que se relaciona con los sitios anulares, implicando el desplazamiento gradual y continuo de la sonda Laurdan por los lípidos exógenos. En la Figura 3.3b se muestra un caso en el que el lípido exógeno se ubica tanto en sitios anulares como no anulares y esto se observa en el cambio de pendiente que tiene la curva frente al agregado del lípido.

En este trabajo de Tesis, las membranas ricas en AChR que se marcaron previamente con Laurdan se titularon con los diferentes AGLs estudiados, realizándose la medición de la fluorescencia intrínseca luego de cada agregado. La presencia de la mayoría de los ácidos *cis*-monoinsaturados (*cis*-9-18:1, *cis*-11-18:1 y *cis*-13-18:1) dentro de la membrana produjo una disminución significativa en el valor de  $E$  normalizada (Figura 3.4). En algunos casos se observó más de un 50 % de disminución con respecto a los valores control.

Solo el AGL *cis*-6-18:1 produjo una disminución pequeña en los valores de  $E$  (menos del 15 % de disminución con respecto a los valores control). Si comparamos los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis con los publicados por Fernández Nievas *et al.* (2007), se puede inferir que el perfil de disminución de la  $E$  normalizada producida por la presencia de *cis*-6-18:1 en la membrana, es indicativo de la localización de este AGL solo en sitios anulares, mientras que el perfil de disminución de la  $E$  observado para el resto de los *cis*-AGLs (*cis*-9-18:1, *cis*-11-18:1



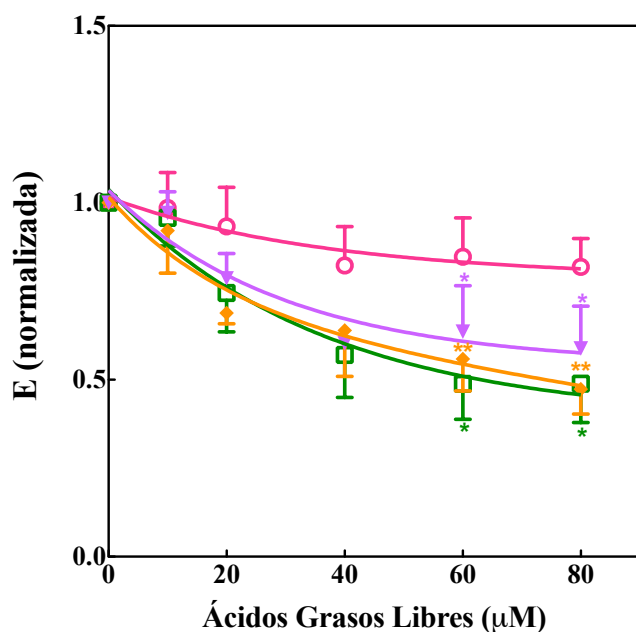


Figura 3.4: Cambios en la eficiencia de FRET normalizada ( $E$ ) entre la fluorescencia intrínseca en membranas ricas en AChR de *T. californica* y Laurdan, luego de la adición de concentraciones crecientes de *cis*-6-18:1 (○), *cis*-9-18:1 (□), *cis*-11-18:1 (◆) y *cis*-13-18:1 (▼). Los valores de  $E$  obtenidos en presencia de AGLs se normalizaron con su correspondiente valor de  $E$  en ausencia de AGL (100%). Cada punto corresponde al promedio  $\pm$  D.S. de más de cuatro experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas resultan de la comparación con los valores control (\*,  $p < 0,05$  y \*\*,  $p < 0,01$ ). Imagen presentada en Perillo *et al.* (2012).

y *cis*-13-18:1) estaría indicando que estos AGLs se localizan tanto en sitios anulares como en sitios no anulares.

## INHIBICIÓN DEL AChR POR ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Utilizando la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*<sup>2</sup>, Bouzat y Barrantes (1993b) demostraron que el AGL *cis*-9-18:1 se comporta como un inhibidor del AChR. En un trabajo posterior (Perillo *et al.*, 2012) se analizó el efecto

<sup>2</sup> La configuración *cell-attached* se obtiene al apoyar la punta de una pipeta de vidrio (electrodo) de 0,5-2 mm de diámetro sobre la superficie de una membrana celular y mediante suave succión se forma un sello con una resistencia del orden de los MΩ de manera que la corriente iónica fluye a través de la membrana contenida en la punta de la pipeta (“parche”) y no a través del sello (Sakmann y Neher, 1976). Dependiendo del tamaño de la punta de la pipeta, pueden registrarse corrientes que pasen por uno o varios canales.

de los AGLs monoinsaturados estudiados en este trabajo de Tesis sobre la cinética del canal único del AChR (Apéndice I). La Tabla 3.1 muestra los parámetros cinéticos obtenidos en tales condiciones.

Tabla 3.1. Parámetros cinéticos del AChR en presencia de una concentración fija de AGLs (60  $\mu$ M). Las corrientes se midieron en células CHO-K1/A5 que expresan al AChR adulto utilizando la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. Cada dato corresponde a valores promedio  $\pm$  D. S. Tabla presentada en Perillo *et al.* (2012).

	Amplitud (pA)	$\tau$ abierto (ms)	$\tau_{burst}^a$ (ms)	$\tau$ cerrado <sup>b</sup> (ms)	$\tau$ cerrado <sup>b</sup> (área)	n
Control	5,31 $\pm$ 0,64	0,85 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,14	0,14 $\pm$ 0,07	0,051 $\pm$ 0,016	10
<i>cis</i> -6-18:1	5,27 $\pm$ 0,39	0,60 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	0,67 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	0,14 $\pm$ 0,02	0,063 $\pm$ 0,040	5
<i>cis</i> -9-18:1	5,49 $\pm$ 0,23	0,60 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	0,72 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	0,07 $\pm$ 0,01	0,074 $\pm$ 0,032	4
<i>trans</i> -9-18:1	5,20 $\pm$ 0,44	0,80 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,10	0,09 $\pm$ 0,03	0,040 $\pm$ 0,020	6
<i>cis</i> -11-18:1	4,70 $\pm$ 0,35	0,80 $\pm$ 0,12	0,94 $\pm$ 0,14	0,10 $\pm$ 0,02	0,036 $\pm$ 0,019	6
<i>cis</i> -13-18:1	5,34 $\pm$ 0,45	0,89 $\pm$ 0,03	1,07 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,04	0,060 $\pm$ 0,021	5

<sup>a</sup>Los histogramas de tiempo de *burst* se componen, en todos los casos, de un único componente similar en duración al componente de tiempo de estado abierto, reflejando probablemente aperturas únicas.

<sup>b</sup>Componente más corto del histograma de tiempo de estado cerrado.

<sup>c</sup>Diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control ( $p < 0,003$ ).

## PERTURBACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LAS MEMBRANAS RICAS EN AChR POR ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Considerando que solo dos de los cinco AGLs testeados (los que tienen el doble enlace en una posición superficial dentro de la membrana) modificaron la función del AChR, se estudiaron las propiedades biofísicas de las membranas ricas en AChR en presencia de los distintos AGLs con la intención de poder explicar la inhibición selectiva del AChR observada. Es posible que el efecto que estos AGLs

tienen sobre la membrana, diferente según su estructura química, sea capaz de modificar la funcionalidad del AChR.

Gracias a un proceso de relajación dipolar, la sonda fluorescente Laurdan tiene la capacidad física de percibir las dinámicas moleculares y la polaridad de su entorno (Parasassi *et al.*, 1990, 1991). Los principales dipolos que percibe el Laurdan en la membrana son las moléculas de agua (Yu *et al.*, 1996), cuyo grado de penetración en el empaquetamiento local de la membrana da una medida del orden de los fosfolípidos. Esta presencia de dipolos ocasiona un proceso de relajación dipolar del Laurdan que se traduce en un corrimiento del máximo de emisión a longitudes de onda mayores (de aproximadamente 430 nm en fase gel a aproximadamente 490 nm en fase líquido-cristalina). A partir de estos espectros es posible calcular un valor de  $GP$  que relaciona ambas longitudes de onda de emisión (ver ítem 6.1 en la Sección Métodos) dando información sobre la polaridad de la membrana que de manera indirecta provee información sobre la fluidez de dicha membrana (Yu *et al.*, 1996; Antollini *et al.*, 1996; Antollini y Barrantes, 1998; Harris *et al.*, 2002).

Las membranas ricas en AChR se marcaron con Laurdan y luego se procedió a realizar una titulación con cada uno de los cinco AGLs monoinsaturados, obteniéndose un espectro de emisión de Laurdan luego de cada agregado. A partir de estos espectros se calcularon los valores de  $GP$  en las distintas condiciones experimentales. Se pudo observar una correlación directa entre la estructura del AGL y las perturbaciones de la membrana.

Una vez incorporado en la membrana, el AGL *trans*-monoinsaturado produjo una pequeña disminución en los valores de  $GP$ , rápidamente saturable, resultando en una curva similar a la del control, lo que indicaría que los AGLs con doble ligadura *trans* prácticamente no modifican la polaridad de la membrana (Figura 3.5). Por otra

parte, todos los AGLs *cis*-monoinsaturados testeados generaron perturbaciones en el orden de la membrana dependientes de la posición del doble enlace (Figura 3.6), siendo el AGL *cis*-9-18:1 el que mayor incremento de la fluidez de membrana generó. Dado que el Laurdan se ubica superficialmente en la membrana, se esperaba que el *cis*-6-18:1 fuera el AGL con mayor efecto sobre ella. Sin embargo, este AGL junto con el *cis*-11-18:1 tuvieron un efecto intermedio, mientras que el *cis*-13-18:1 fue el que menos perturbó los valores de *GP*.

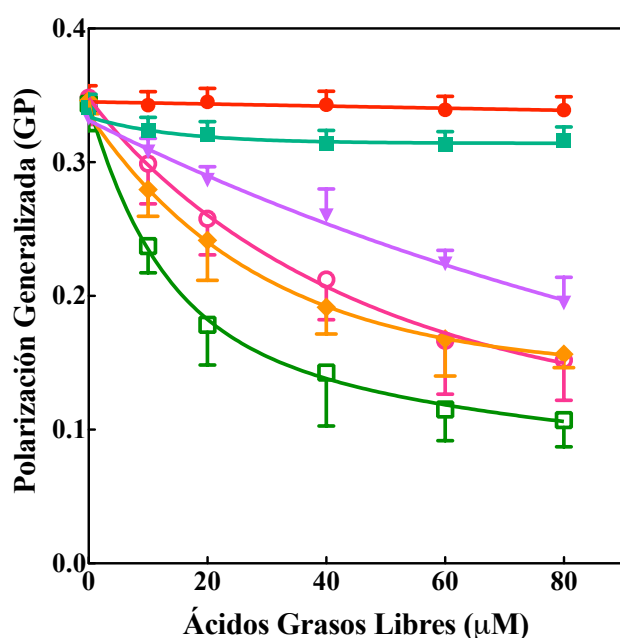


Figura 3.5: *GP* de Laurdan en presencia de concentraciones crecientes de *cis*-6-18:1 (○), *cis*-9-18:1 (□), *cis*-11-18:1 (◆), *cis*-13-18:1 (▼) y *trans*-9-18:1 (■), o con vehículo solo (condición control, ●). Cada punto corresponde al promedio  $\pm$  D. S. de más de cuatro experimentos independientes. Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) en todas las condiciones experimentales con respecto a la condición inicial. Imagen presentada en Perillo *et al.* (2012).

Como se acaba de señalar, la sonda Laurdan se ubica de manera superficial en el interior de la membrana. Más específicamente, el Laurdan se encuentra a 10 Å del centro de la bicapa lipídica, es decir, a 5 Å de la interfase agua-lípido (Antollini y Barrantes, 1998). Dada esta localización poco profunda dentro de la bicapa, es posible que la sonda no sea capaz de detectar la verdadera magnitud de la perturbación generada por los AGLs con su doble enlace en la posición 11 o 13. Para estudiar esta posibilidad se trabajó con otra sonda fluorescente, DPH, que se localiza

profundamente en el centro hidrofóbico de la bicapa lipídica (Kaiser y London, 1998). La sonda DPH se ha utilizado extensamente para realizar estudios sobre la estructura y las propiedades dinámicas de las membranas y para determinar fluidez y/u orden de membrana (Lentz y Burgess, 1989; Zolese *et al.*, 1990; Lentz *et al.*, 1996; Antollini y Barrantes, 1998; Valcarcel *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2007; Reiss *et al.*, 2011).

Se llevaron a cabo estudios análogos a los realizados con la sonda Laurdan, pero marcando las membranas con DPH y midiendo la anisotropía de fluorescencia ( $r$ ) de dicha sonda, como en Antollini y Barrantes (2004). Tal como en el caso de los resultados obtenidos anteriormente con Laurdan, la anisotropía del DPH disminuyó en mayor medida con el AGL *cis*-9-18:1, seguido por el AGL *cis*-11-18:1. El AGL *trans*-9-18:1 indujo pequeñas y constantes disminuciones de  $r$  (Figura 3.6). Al ubicarse el DPH profundamente en el interior de la membrana (Antollini y Barrantes, 1998) se encontró, tal como esperábamos, una mayor disminución de los valores de  $r$  con el AGL *cis*-11-18:1 de lo que se obtuvo con la medición de  $GP$ . Siguiendo el mismo razonamiento, cuando las membranas se trataron con el AGL que tiene su doble enlace en la posición más profunda de la cadena acíclica (*cis*-13-18:1) se pudo ver una mayor perturbación de  $r$ , a diferencia de lo observado en los estudios de  $GP$ , al tiempo que las perturbaciones de  $r$  ocasionadas por el *cis*-6-18:1 disminuyeron igualando el efecto del AGL *cis*-13-18:1. Probablemente en el caso del *cis*-6-18:1, la sonda DPH se encuentra muy distante del doble enlace del AGL para percibir perfectamente su efecto sobre los lípidos vecinos.

Tomando los valores de  $GP$  y de  $r$  como parámetros de perturbación del orden de la membrana por los AGLs *cis*-monoinsaturados, queda claro a) que la presencia de estas moléculas exógenas modifica el orden de membrana, b) que dicho efecto es dependiente de la isomería del doble enlace ya que el AGL *trans*-insaturado casi no

tuvo efecto, y c) que la modificación del orden de membrana depende de la posición del doble enlace en la cadena acílica del AGL, observándose el mayor efecto cuando el doble enlace se encuentra en la mitad de la cadena acílica.

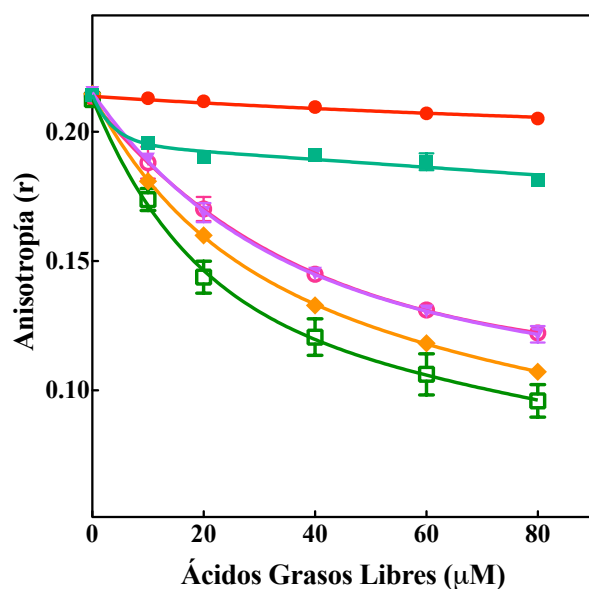


Figura 3.6: Anisotropía de la sonda fluorescente DPH, en presencia de concentraciones crecientes de *cis*-6-18:1 (○), *cis*-9-18:1 (□), *cis*-11-18:1 (◆), *cis*-13-18:1 (▼) y *trans*-9-18:1 (■), o con vehículo solo (condición control, ●). Cada punto corresponde al promedio  $\pm$  D. S. de más de cuatro experimentos independientes. Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) en todas las condiciones experimentales con respecto a la condición inicial. Imagen presentada en Perillo *et al.* (2012).

## INDUCCIÓN DE CAMBIOS CONFORMACIONALES EN EL AChR POR ÁCIDOS GRASOS LIBRES

El AChR es una proteína alostérica que tiene dos estados cerrados estables: uno en ausencia de agonista (estado R) y el otro inducido por una exposición prolongada a agonistas (estado desensibilizado, D). Ambos estados (R y D) se caracterizan por una conformación proteica distintiva (Auerbach y Akk, 1998). Se utilizó el valor de la constante de disociación ( $K_D$ ) del bloqueador de canal iónico del AChR Cristal Violeta (CrV), colorante fluorescente, para inferir el estado

conformacional del AChR (Fernández Nieves *et al.*, 2008), considerando el hecho de que el CrV muestra mayor afinidad por el estado D que por el estado R del AChR (Lurtz y Pedersen, 1999). En condiciones en las que el AChR se encuentra en estado de reposo, su  $K_D$  es de 100 nM, mientras que en condiciones en las que se encuentra desensibilizado, su  $K_D$  disminuye a 10 nM (Lurtz y Pedersen, 1999). De esta manera, la diferente afinidad por los estados conformacionales del CrV es una herramienta útil para el estudio de los cambios conformacionales en el AChR. Fernández Nieves *et al.* (2008) emplearon esta metodología para demostrar que tanto los esteroides como ciertos AGLs saturados o poliinsaturados inducen perturbaciones de los estados conformacionales del AChR. En este trabajo de Tesis estudiamos los cambios conformacionales del AChR generados a partir de su interacción con los AGLs monoinsaturados.

Para estos estudios se trabajaron en paralelo dos grupos de suspensiones de membranas ricas en AChR de *T. californica*, ambas incubadas con una concentración determinada de AGLs (hasta 80  $\mu$ M). Posteriormente, a uno de los grupos de suspensiones se les agregó Carb para tener el AChR en el estado D mientras que al otro se le agregó solo *Buffer* manteniendo al AChR en el estado R. A continuación, en cada preparación se realizó una titulación con CrV, obteniendo el espectro de emisión del CrV luego de cada agregado. El CrV es un compuesto muy útil ya que su fluorescencia aumenta 200 veces al unirse al AChR por lo que se pueden hacer agregados sucesivos sin necesidad de lavados intermedios. De cada espectro se obtuvo el valor de intensidad máxima y se obtuvieron curvas con la emisión de fluorescencia normalizada de la sonda CrV en función de la concentración molar del CrV, tanto para el AChR en el estado R como en el estado D (Figura 3.7).

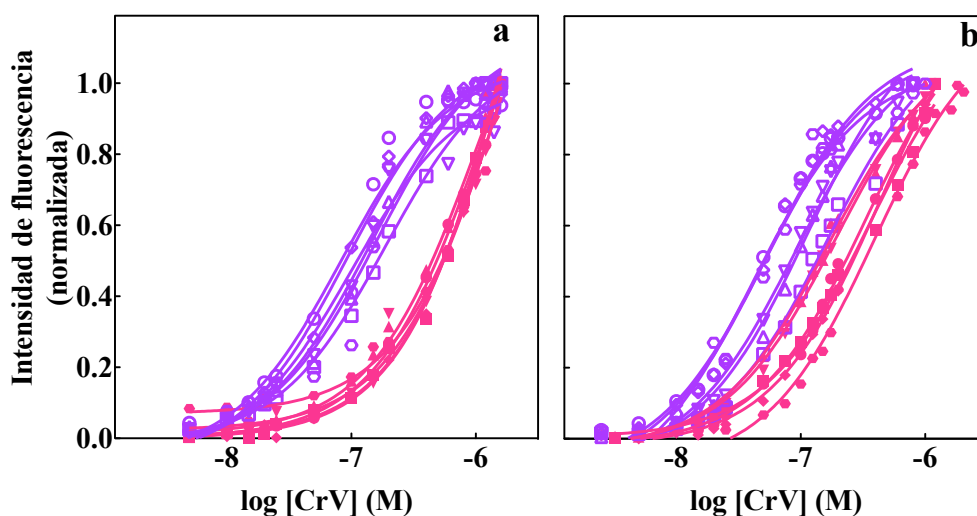


Figura 3.7: Titulación de las membranas ricas en AChR con CrV. Las membranas se incubaron previamente durante 45 minutos con concentraciones crecientes de (a) *cis*-6-18:1 y (b) *cis*-9-18:1 (control,  $\circ$ ; 10  $\mu$ M,  $\diamond$ ; 20  $\mu$ M,  $\square$ ; 40  $\mu$ M,  $\triangle$ ; 60  $\mu$ M,  $\nabla$ ; 80  $\mu$ M,  $\square$ ), en presencia o ausencia de 1 mM de Carb (símbolos cerrados y abiertos, respectivamente). Imagen presentada en Perillo *et al.* (2012).

En la situación control, las curvas correspondientes al estado D se desplazaron a la izquierda con respecto a las obtenidas para el estado R por la mayor afinidad del CrV por ese estado. Cuando las membranas se expusieron a diferentes concentraciones de los distintos AGLs, la posición de las curvas obtenidas tanto para el estado R como para el estado D fue diferente entre ambos estados y con respecto a los controles, mostrando desplazamientos entre ellas de variadas magnitudes según el AGL estudiado. En presencia de *cis*-6-18:1, las curvas de titulación obtenidas en ausencia de agonista fueron muy similares a la curva control, mientras que en presencia de agonista las curvas obtenidas se desplazaron hacia la derecha, de manera dependiente de la concentración, acercándose a la curva control en el estado R (Figura 3.7a). Cuando el AGL agregado fue *cis*-9-18:1, las curvas obtenidas en ausencia de agonista se desplazaron hacia la izquierda, hacia aquellas obtenidas con el AChR en el estado D. Por el contrario, en presencia de agonista las curvas se desplazaron



hacia la derecha, hacia aquellas obtenidas con el AChR en el estado R. En ambos casos se pudo observar que mayores concentraciones de AGL produjeron mayores desplazamientos (Figura 3.7b).

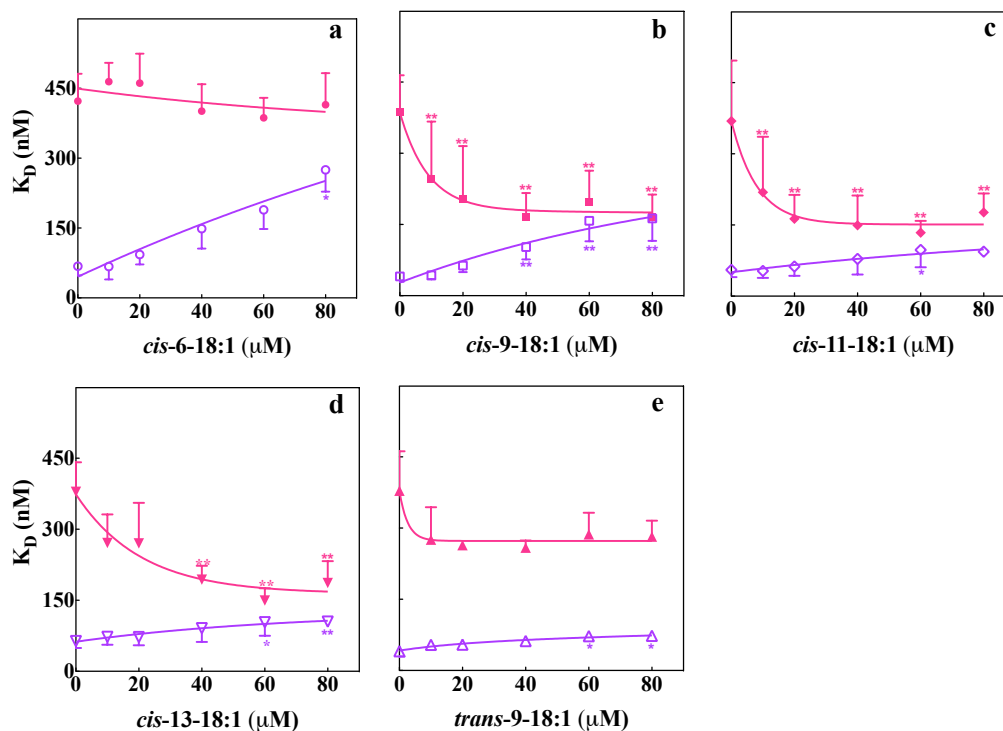


Figura 3.8: Cambios en los valores de  $K_D$  del CrV como función de la concentración creciente de a) *cis*-6-18:1 (●), b) *cis*-9-18:1 (■), c) *cis*-11-18:1 (◆), d) *cis*-13-18:1 (▼) y e) *trans*-9-18:1 (▲), en ausencia y presencia de 1 mM Carb (símbolos cerrados y abiertos, respectivamente). Los valores de  $K_D$  fueron calculados a partir de las curvas de titulación (Figura 3.8). Cada punto corresponde al promedio  $\pm$  D. S. de más de cuatro experimentos independientes. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (\*,  $p < 0,05$  y \*\*,  $p < 0,01$ ) en todas las condiciones experimentales con respecto a la condición inicial (ausencia de AGLs). Imagen presentada en Perillo *et al.* (2012).

A partir de cada una de las curvas obtenidas, se obtuvieron los valores de KD del CrV para cada concentración de AGL agregada. Estos valores, en presencia o ausencia de Carb, se muestran en la Figura 3.8. Todos los AGLs insaturados aumentaron los valores de KD cuando las membranas ricas en AChR se incubaron en presencia de agonista (estado conformacional D en la condición control), siendo los AGLs *cis*-6-18:1 y *cis*-9-18:1 los que tuvieron un efecto mayor. En el caso del estado R, se pudo observar que solo el agregado de los AGLs *cis*-9-18:1, *cis*-11-18:1 o *cis*-

13-18:1 modificó el valor de KD, mientras que los ácidos cis-6-18:1 y trans-9-18:1 no generaron ningún efecto sobre este estado conformacional.

Para obtener evidencia complementaria sobre los cambios conformacionales causados por los AGLs en el AChR, se realizaron experimentos de extinción de fluorescencia con el AChR purificado de membranas crudas de *T. californica* marcado con una sonda fluorescente lipofílica (pireno-maleimida) específica para grupos sulfhídricos en un entorno hidrofóbico, siguiendo el protocolo utilizado por Narayanaswami y McNamee (1993). El pireno unido al AChR se localizó en una posición superficial, cercana a la interfase agua-membrana (Narayanaswami y McNamee, 1993; Barrantes *et al.*, 2000). Igual a lo realizado en los experimentos de CrV con membranas ricas en AChR, los liposomas con N-PyrM-AChR se preincubaron con los distintos AGLs (60  $\mu$ M) y posteriormente se realizó una titulación con un ácido esteárico que tiene unido un grupo nitróxido en el carbono cinco (5-SLFA). La Figura 3.9a muestra el perfil de extinción de la fluorescencia del pireno en función de concentraciones crecientes de los AGLs. Con cada una de las curvas obtenidas se calcularon las constantes de extinción de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) que se grafican en la Figura 3.9b.

Cuando la membrana se preincubó con AGLs *cis*-monoinsaturados, la extinción de la fluorescencia del pireno disminuyó, tal como lo refleja la disminución de los valores de  $K_{SV}$ . El AGL *cis*-6-18:1 ejerció el menor efecto. Por el contrario, el AGL *trans*-monoinsaturado no alteró el perfil de extinción observado en la situación control, obteniéndose en ambos casos valores de  $K_{SV}$  similares. Estos resultados marcan una relación directa entre la presencia de AGLs *cis*-monoinsaturados en la membrana y un cambio en la posición del pireno dentro de la membrana, sugiriendo

que los AGLs ocasionan un cambio topológico en el segmento transmembrana  $\gamma$  del AChR.

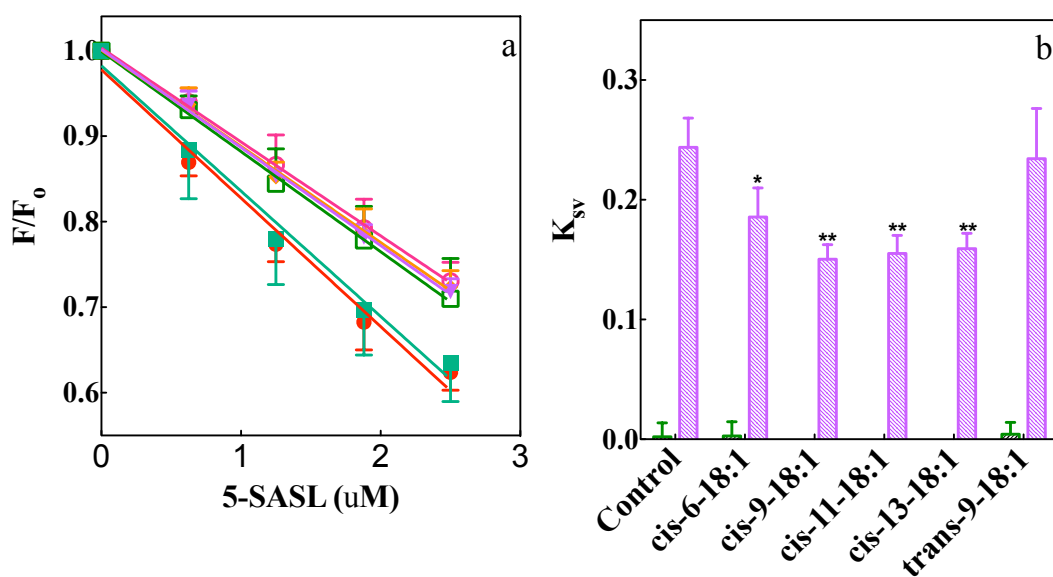


Figura 3.9: Extinción de fluorescencia con un AGL spin-marcado. a) Gráfica de  $F/F_0$  de liposomas con N-PyrM-AChR previamente tratados con vehículo (condición control, ●) o con  $60 \mu\text{M}$  de *cis*-6-18:1 (○), *cis*-9-18:1 (□), *cis*-11-18:1 (◆), *cis*-13-18:1 (▼) y *tran* -9-18:1 (■) seguida de una incubación con concentraciones crecientes de 5-SLFA. b) Constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) obtenida de las gráficas de Stern-Volmer ( $F/F_0$ ) de los datos de (a). Las barras llenas y vacías corresponden a  $K_{SV}$  obtenidas de muestras tratadas con el vehículo para el 5-SLFA (etanol) o con 5-SLFA, respectivamente. Cada punto/barra corresponde al promedio  $\pm$  D. S. de más de cuatro experimentos independientes. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (\*,  $p < 0,05$  y \*\*,  $p < 0,01$ ) en todas las condiciones experimentales con respecto a la condición inicial (ausencia de AGLs). Imagen presentada en Perillo *et al.* (2012).

## DISCUSIÓN

En esta primera parte del trabajo de Tesis se estudió el posible mecanismo por el cual los AGLs inhiben la función del AChR. Estudios previos han demostrado que las moléculas altamente hidrofóbicas, como los AGLs y los esteroides, pueden actuar como antagonistas no competitivos (ANC) del AChR (Andreasen y McNamee, 1980; Bouzat y Barrantes, 1993a; Minota y Watanabe, 1997; Blanton *et al.*, 1999). Los AGLs ejercerían dicho efecto sobre el AChR a través de la interfase lípido-proteína, tras particionarse dentro de la membrana (Bouzat y Barrantes, 1993b; Blanton *et al.*, 1999; Fernández Nieves *et al.*, 2007, 2008). El contacto directo entre estos lípidos y los segmentos transmembrana del AChR genera un mecanismo que remueve al AChR de su estado R, pero que no parece alcanzar el estado D en su totalidad, sino que probablemente queda en uno de los estados D intermedios (Fernández Nieves *et al.*, 2008).

Utilizando la técnica de *patch-clamp* se demostró que, indistintamente de su estructura química, cuatro AGLs (dos AGL insaturados, ácidos araquidónico y docosahexanoico, y dos AGL saturados, ácidos palmítico y nonadecanoico) inhiben la función del AChR (Bouzat y Barrantes, 1993; 1993b). Sin embargo, su mecanismo de acción es todavía desconocido. En párrafos subsiguientes se discuten las implicancias funcionales de estos hallazgos.

Para avanzar en el conocimiento sobre la manera en la que los AGLs afectan la función del AChR, se decidió estudiar en profundidad la relación entre el AChR y los AGLs con un único doble enlace localizado en distintas posiciones de una cadena acílica de 18 átomos de carbono: ácido petroselénico (*cis*-6-18:1), ácido oleico (*cis*-9-18:1), ácido vaccénico (*cis*-11-18:1), ácido *cis*-13-octadecenoico (*cis*-13-18:1) y ácido eláídico (*trans*-9-18:1). Se utilizaron diferentes metodologías experimentales para identificar las propiedades principales que condicionan la función del AChR a nivel de la interfase lípido-proteica. La Tabla 4.1 resume los resultados en función de la posición del doble enlace de los AGLs estudiados.

Tabla 4.1: Resumen de los datos experimentales obtenidos con diferentes AGLs. Tabla obtenida de Perillo *et al.* (2012).

	<i>cis</i> -6-18:1	<i>cis</i> -9-18:1	<i>cis</i> -11-18:1	<i>cis</i> -13-18:1	<i>trans</i> -9-18:1
<b>Sitios en la interfase lípido-AChR</b>	A <sup>a</sup>	A + NA <sup>b</sup>	A + NA	A + NA	A + NA
<b>Inhibición de la función del AChR</b>	+	++	–	–	–
<b>Modificación de GP</b>	++	+++	++	+	–
<b>Modificación de r</b>	+	+++	++	++	–
<b>Perturbación estado R</b>	–	++	++	++	–
<b>Perturbación M4</b>	+	++	++	++	–
<b>Perturbación estado D</b>	++	++	+	+	+

<sup>a</sup> A = sitio anular; <sup>b</sup> NA = sitio no anular.

1) *Sitios en la interfase lípido-AChR*. El triptofano (Trp) y el Laurdan constituyen un buen par donante-aceptor para mediciones de FRET, con una distancia mínima de donante-aceptor de 14 Å que corresponde aproximadamente al diámetro de la primera capa de lípidos que rodean la región transmembrana del AChR (Antollini *et al.*,

1996). Aquello que mueva a las moléculas de Laurdan lejos del entorno del AChR disminuirá la eficiencia de FRET, tal como es el caso de las moléculas hidrofóbicas exógenas (Antollini *et al.*, 1996). Sin embargo, dependiendo de la localización de estos compuestos exógenos en la interfase lípido-AChR (por ej., sitios anulares y/o no anulares) el perfil de disminución de la eficiencia varía. Utilizando esta estrategia metodológica observamos que **todos los AGLs estudiados se particionan en el microentorno del AChR**, localizándose tanto en sitios anulares como no anulares, excepto el AGL *cis*-6-18:1, cuyo doble enlace, al localizarse de manera más superficial dentro de la membrana, determina que esté restringido a ubicarse en los sitios anulares (Figura 3.4).

2) *Inhibición de la función del AChR*. Perillo *et al.* (2012) realizaron experimentos electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp* con los AGLs estudiados en este trabajo de Tesis (Apéndice I). Los registros del canal obtenidos con 1  $\mu$ M de ACh en la pipeta y en presencia de 60  $\mu$ M de *cis*-9-18:1 en la membrana celular mostraron diferencias estadísticamente significativas en la duración del estado abierto del canal con respecto al control (Tabla 3.1), confirmando resultados derivados de estudios anteriores (Bouzat y Barrantes, 1993b). Se encontraron hallazgos similares en presencia de 60  $\mu$ M de *cis*-6-18:1. Sin embargo, no se observaron cambios en la duración del tiempo de estado abierto del canal cuando las incubaciones se realizaron con AGLs cuyos dobles enlaces se encontraban en posiciones más profundas dentro de la bicapa lipídica (*cis*-11-18:1 o *cis*-13-18:1). De igual modo, la presencia del AGL *trans*-9-18:1, con una doble ligadura en conformación *trans*, no afectó la funcionalidad del AChR (Tabla 3.1). En comparación con la situación control, en presencia de los AGLs estudiados las distribuciones del tiempo de estado cerrado del

canal no mostraron modificaciones tanto en su duración como en el área de su componente más corto. Tampoco la amplitud del canal se modificó significativamente por exposición a los AGLs. Por último, el tiempo del estallido (*burst*) obtenido para cada situación correspondió al tiempo de apertura, y, por tanto, se observó una disminución estadísticamente significativa de este parámetro solo cuando las células se pre-incubaron con *cis*-6-18:1 o *cis*-9-18:1. Estos resultados indican que no todos los AGLs monoinsaturados alteran la funcionalidad del AChR muscular de la misma manera: solo el *cis*-6-18:1 y el *cis*-9-18:1 alteran las corrientes de canal único (Perillo *et al.*, 2012). El efecto neto de la presencia de estos dos AGLs es una disminución del tiempo de apertura y de la duración del tiempo del *burst* (Tabla 3.1). Esta última modificación concuerda con un acortamiento de la duración del componente de apertura principal, reflejando, como se dijo antes, aperturas únicas. El sitio de acción de estos dos AGLs parece ser distante al poro del canal ya que no se observó ningún comportamiento intermitente en los registros de canal único, efecto característico producido por los bloqueadores del canal. Más aún, al no observarse modificaciones de ningún otro parámetro cinético luego de la pre-incubación con ambos AGLs, se puede inferir que el receptor experimenta una transición desde el estado inhibido a su conformación cerrada (Perillo *et al.*, 2012). Los otros dos AGLs monoinsaturados estudiados, *cis*-11-18:1 y *cis*-13-18:1, no ejercieron efecto sobre la función del AChR (Perillo *et al.*, 2012). La diferencia clave entre los diferentes AGLs estudiados reside en el doble enlace. Los AGL *cis*-6-18:1 y *cis*-9-18:1 se comportan como inhibidores del AChR y tienen el doble enlace localizado en una posición más superficial. Los AGLs *cis*-11-18:1 y *cis*-13-18:1, sin efecto inhibitorio, tienen el doble enlace localizado en una posición más profunda en la membrana. Se destaca que el AGL *trans*-9-18:1, con un doble enlace en la misma posición que el *cis*-9-18:1

pero con una isomería que lleva a una distribución espacial diferente, no modifica la cinética del canal. Estudios previos demostraron que otros AGLs con estructuras químicas diferentes (18:0, 20:0, *cis*-18:2, *cis*-18:3, *cis*-20:4 y *cis*-22:6) se localizan en sitios anulares y no anulares (Antollini y Barrantes, 1998; Fernández Nieves *et al.*, 2008) y que los AGLs 20:0, *cis*-20:4 y *cis*-22:6 actúan como inhibidores del AChR (Bouzat y Barrantes, 1993b). Teniendo en cuenta que no todos los AGLs inhiben la función del AChR pero que todos los AGLs se localizan en la interfase lípido-AChR, aunque no todos se ubican en los mismos sitios, se concluye que *la localización de los AGLs en sitios no anulares no es un pre-requisito para la inhibición del AChR*.

3) *Modificación de las propiedades biofísicas de la membrana.* Los AGLs son capaces de intercalarse rápidamente en la membrana plasmática de las células y por períodos cortos de tiempo permanecen como tales para luego ser esterificados ya sea formando parte de fosfolípidos o de lípidos neutros. Los AGLs se originan mayormente a partir de la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Murakami y Kudo, 2002) y aproximadamente un 10 % de los AGLs liberados se mantendrían como tales sin modificarse (Klausner *et al.*, 1980). La presencia de AGLs en la membrana produce una perturbación significativa de la misma, dependiente de la estructura del ácido graso (Klausner *et al.*, 1980). Los ácidos grasos *cis*-insaturados, a diferencia de los *trans*-insaturados y los saturados, tienen una estructura más voluminosa gracias a la torsión de la cadena acílica insaturada. Esta diferencia estructural permite que los AGLs *cis*-insaturados tengan la capacidad de modificar el orden de las membranas de manera diferente a los otros AGLs. Por lo tanto, se estudió si la inhibición del AChR – o la falta de ella – por ciertos AGLs puede ser explicada por alteraciones en las propiedades biofísicas del entorno lípido-AChR ocasionadas por su



presencia. Se analizó el efecto de cada AGL sobre las propiedades biofísicas de las membranas ricas en AChR. Los experimentos de *GP* de Laurdan y de anisotropía de DPH muestran que todos los AGLs cis-monoin saturados modifican el orden de la membrana, aunque con diferentes alcances, dependiendo de su estructura química. El ácido oleico (*cis*-9-18:1) es el AGL estudiado que más afecta esta propiedad, resultado que se relaciona directamente con el hecho de que este AGL es también el que ejerce el mayor efecto inhibitorio sobre el AChR. El ácido petroselénico (*cis*-6-18:1) tiene prácticamente el mismo efecto que el ácido vaccénico (*cis*-11-18:1) sobre el orden de membrana según los valores de *GP*, y el mismo que el ácido *cis*-13-octadecanoico (*cis*-13-18:1) según los estudios de anisotropía. Considerando que estos últimos dos AGLs no inhiben al AChR pero sí modifican el orden de membrana de la misma manera que el *cis*-6-18:1, concluimos que *los cambios en la fluidez de membrana como consecuencia del agregado de los AGLs no serían responsables de la inhibición del AChR.*

4) *Cambios conformacionales del AChR.* Teniendo en cuenta que los lípidos afectan la actividad del AChR cuando este es reconstituido en membranas modelo, hecho explicado por una estabilización del canal en proporciones diferentes de los estados de reposo o desensibilizado (Criado *et al.*, 1984; da Costa *et al.*, 2009), se efectuaron estudios complementarios sobre los cambios conformacionales del AChR en presencia de AGL. La sonda fluorescente CrV muestra afinidades diferentes por los estados R y D del AChR. Una concentración desensibilizante de agonista disminuye el valor de  $K_D$  del CrV, indicando que el AChR experimenta un cambio conformacional llevándolo a un estado de alta afinidad por el CrV (estado D). Cuando las membranas ricas en AChR en el estado R se incubaron con los AGLs *cis*-

monoinsaturados se observó que todos, excepto el *cis*-6-18:1, disminuyeron los valores de  $K_D$  acercándose a los observados en el estado D inducido por el agonista. Este resultado indica que ciertos AGLs, en ausencia de agonista, inducen un cambio conformacional en el AChR. Dado que el *cis*-6-18:1 es el único de los AGLs estudiados que se localiza exclusivamente en sitios anulares, podría postularse una correlación directa entre la localización de los AGLs en sitios no anulares y la perturbación del receptor en su estado R. Esta perturbación podría indicar un desplazamiento del equilibrio del AChR desde el estado R hacia un estado D (Figura 4.1). Por otro lado, el AGL *trans*-9-18:1 no generó modificaciones de los valores de  $K_D$  por más que se ubica tanto en sitios anulares como no anulares. Esto sugeriría que es el quiebre de la cadena acílica producido por el doble enlace en isomería *cis* el responsable de las perturbaciones del estado R del AChR. Sin embargo, la perturbación del estado R del AChR por la presencia de *cis*-AGLs en sitios no anulares no sería suficiente para explicar el efecto inhibitorio de los AGLs sobre el AChR. Esto se debe a que en el estado R, el AGL *cis*-9-18:1 produce un cambio conformacional del estado R mientras que el *cis*-6-18:1 no, siendo ambos inhibidores del AChR.

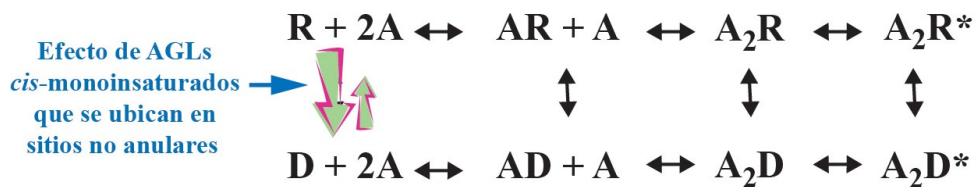


Figura 4.1: En este modelo, A representa al agonista, y R, R\* y D representan al AChR en los estados de reposo, abierto y desensibilizado, respectivamente. Los AGLs *cis*-monoinsaturados que se ubican en sitios no anulares perturban el estado de reposo (R) del AChR, desplazando el equilibrio hacia un estado conformacional desensibilizado (D).

Cuando se realizaron estudios similares en presencia de cantidades desensibilizantes de agonista (Carb), todos los AGLs monoinsaturados modificaron el estado D del AChR, incrementando los valores de  $K_D$ . Sin embargo, se observó una marcada diferencia en la magnitud del incremento causado por los AGLs *cis*-6-18:1 y *cis*-9-18:1, por un lado, y el causado por el resto de los AGLs estudiados, por el otro. Este mayor efecto sugiere que en presencia de estos AGLs el AChR no lograría acceder a su conformación D, alterando el flujo normal entre estados conformacionales y, por ende, la función del AChR. Concluimos que *las perturbaciones mayores del estado D del AChR pueden estar relacionadas con AGLs cis-monoinsaturados que tengan el doble enlace en posiciones relativamente superficiales en la interfase lípido-AChR. Independientemente de los sitios donde se localicen estos AGLs, los que poseen un doble enlace localizado superficialmente en la membrana pueden correlacionarse con la inhibición del AChR.*

Los segmentos M4 de las distintas subunidades del AChR son los que exhiben mayor contacto con la bicapa lipídica (Barrantes, 2003), encontrándose relativamente alejados tanto del lumen del canal como de los sitios de unión de los neurotransmisores. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado su participación activa en la funcionalidad del AChR. Análisis funcionales del AChR han demostrado que mutaciones en residuos aminoacídicos de segmentos M4 correspondientes a diferentes subunidades del AChR alteran la constante de equilibrio del gatillado del canal (Lee *et al.*, 1994; Ortiz-Miranda *et al.*, 1997; Tamamizu *et al.*, 1999; Bouzat *et al.*, 2000; Garbus *et al.*, 2001). Estos y otros resultados semejantes permitieron postular que los residuos del segmento M4, divididos en bloques, experimentan un movimiento sincronizado durante el gatillado que conecta el acoplamiento del agonista al sitio de unión con la apertura final del canal (Bouzat *et al.*, 1993; Ortiz-

Miranda *et al.*, 1997; Bouzat *et al.*, 1998; Tamamizu *et al.*, 1999, 2000; Bouzat *et al.*, 2000; Garbus *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2006). De acuerdo con el modelo estructural actual del AChR, los últimos aminoácidos del extremo carbonilo terminal del segmento M4 se extienden por fuera de la membrana, más allá de las otras hélices transmembrana que componen cada subunidad, y se localizan próximos a varios residuos de la porción extracelular del AChR altamente conservados en los miembros de la familia de receptores de lazo de cisteína. Esto es importante ya que experimentos previos han demostrado que esa extensión del largo de la hélice M4 es un requerimiento absoluto para la función del AChR (Tobimatsu *et al.*, 1987).

Dada la importancia del segmento M4 en la funcionalidad del AChR, su extenso contacto con los lípidos del microentorno del AChR y el hecho de que la presencia de AGLs gatille cambios conformacionales globales de la proteína, nos focalizamos en el estudio de la posición topológica de los segmentos transmembrana M4 en presencia de los distintos AGLs monoinsaturados estudiados. Para ello, se trabajó con el AChR purificado de membranas de *T. californica* y marcado con N-PyrM. Se estudió la magnitud de la extinción de la fluorescencia del pireno en presencia de AGLs utilizando un ácido esteárico marcado con un grupo nitróxido en la posición 5 de su cadena hidrocarbonada. Un estudio anterior de nuestro laboratorio, en el que se utilizaron sondas análogas de lípidos marcados con radicales nitróxido en distintas posiciones de la cadena acílica (C5, C7 y C12), demostró que el análogo del ácido esteárico marcado en el carbono 5 de la cadena acílica era el más eficiente para extinguir la fluorescencia del AChR marcado con N-PyrM (Barrantes *et al.*, 2000). En este trabajo de Tesis se encontró que la presencia de todos los AGLs *cis*-monoinsaturados disminuye la magnitud de extinción de la fluorescencia del pireno por el ácido spin-marcado, señalando un cambio en la posición del pireno en la

interfase lípido-AChR, hecho que informa acerca de un cambio conformacional en la porción transmembrana del AChR. Una evaluación de la magnitud del efecto, basándose en el nivel de significancia estadística, permite diferenciar dos grupos de compuestos: el AGL *cis*-6-18:1 ( $p < 0,05$ ), por un lado, y el resto de los AGLs *cis*-insaturados ( $p < 0,01$ ), por el otro. Estos se pueden relacionar con las distintas ubicaciones en la interfase lípido-AChR: niveles de significancia mayores corresponden a perturbaciones topológicas tanto en sitios anulares como no anulares, mientras que perturbaciones topológicas menores podrían indicar la presencia de los AGLs solo en posiciones anulares. El hecho de que la presencia de *trans*-9-18:1 en la membrana no modifique la  $K_{SV}$  por más que se localiza tanto en sitios anulares como no anulares permite explicar con mayor profundidad el mecanismo correspondiente: el quiebre en la cadena acílica producido por el doble enlace de los AGL *cis*-insaturados sería el causante de las perturbaciones topológicas del segmento M4, mientras que la magnitud de dicha perturbación se relacionaría con la localización del doble enlace en las cadenas acílicas de los AGLs. Aún así, tal como se señaló anteriormente, las perturbaciones conformacionales como consecuencia de la localización de los AGLs en diferentes sitios de la interfase lípido-AChR no son suficiente razón para explicar completamente el efecto inhibitorio de estos compuestos sobre la función del AChR.

Claramente, los diferentes efectos que los AGLs ejercen sobre el estado conformacional del AChR son dependientes de sus características estructurales: la presencia, la posición y la isomería del doble enlace. Estas juegan un rol importante en la modificación del estado conformacional del AChR, tanto en su estado R como en su estado D. Hay una correlación directa entre la localización de ciertas moléculas en sitios no anulares y la perturbación del estado R del AChR, sin embargo, las

perturbaciones en el estado R no modificarían la función del receptor. Por el contrario, las perturbaciones en el estado D como consecuencia de la presencia de AGLs en sitios anulares y/o no anulares, dependientes de la posición del ángulo de torsión de AGLs *cis*-insaturados, están directamente relacionadas con la inhibición de la función del AChR. Por tanto, si bien es necesario la presencia de al menos un doble enlace con isomería *cis*, de las tres características estructurales de los AGLs, *la posición superficial del doble enlace en la cadena acíclica sería un factor clave para el mecanismo inhibitorio de estos compuestos.*

Proponer un posible mecanismo inhibitorio para estos AGLs requiere relacionar los resultados presentados con el mecanismo de activación del AChR. La secuencia de eventos estructurales que desencadena la apertura del canal del AChR luego de la unión del ligando se considera un mecanismo altamente conservado. Mitra *et al.* (2004) y Auerbach (2005) postularon que esta secuencia comienza con movimientos en los lazos que unen al ligando, seguido por el desplazamiento de los lazos localizados en la interfase entre el dominio de unión de ligando extracelular y el dominio transmembrana  $\approx 10$  Å sobre la superficie de la bicapa. Esta interfase está compuesta por varios *lazos*: el  $\beta 1$ - $\beta 2$ , el  $\beta 6$ - $\beta 7$  o lazo de cisteína, *p* y el  $\beta 8$ - $\beta 9$ , provenientes del dominio de unión al agonista, y el segmento pre-M1, el lazo M2-M3 y el extremo final de M4, provenientes del dominio transmembrana. La interacción entre estos lazos es crítica para la comunicación efectiva entre ambos dominios (Sine y Engel, 2006). Se ha hipotetizado que la secuencia de eventos continúa con la inclinación/torsión de las hélices que rodean al poro del canal (segmentos M2), y termina con los movimientos de las hélices M4, M3 y M1 del dominio transmembrana (Auerbach, 2005).

Se sabe que la composición lipídica de la membrana en la que está inmerso el AChR afecta la funcionalidad del receptor (Barrantes, 2004, 2010), considerándose que su inactivación resulta de rearrreglos estructurales de la conformación del AChR generados por estos lípidos. A través del estudio de las diferencias entre las características estructurales del AChR en membranas modelos compuestas por lípidos que permiten o no la funcionalidad de la proteína, se ha podido diseccionar la contribución de lípidos específicos que modulan la función de ligazón del agonista y la de permeabilidad iónica del receptor (revisiones en Barrantes, 2003, 2004, 2007). Da Costa y Baenziger (2009) propusieron que los posibles rearrreglos del AChR, como consecuencia de la presencia de ciertos lípidos en la membrana, interrumpirían las interacciones en la región de acoplamiento entre los dominios extracelular y transmembranal, desacoplándolos alostéricamente.

*En esta primera parte del trabajo de Tesis llegamos a la conclusión de que los AGLs ejercen su acción por medio de un mecanismo alostérico, a través de la interfase lípido-AChR. Demostramos que todos los AGLs se localizan efectivamente en el entorno de la proteína, no todos en los mismos sitios, y que todos son detectados por el AChR de acuerdo con los cambios observados en la topología del segmento M4 por su presencia. Demostramos, además, que solo aquellos AGLs que tienen un doble enlace en una posición superficial relativa a la bicapa lipídica actúan como inhibidores del AChR. Por tanto, sugerimos que el doble enlace con isomería cis en una posición superficial dentro de la membrana probablemente se encuentra a la altura de alguno de los bloques/lazos claves de la estructura conservada para el gatillado del AChR y, por lo tanto, molesta/perturba este mecanismo sincronizado.*

El estudio de la interacción lípido-AChR es relevante no solo a nivel estructural y funcional del AChR en sí y de la familia de canales iónicos a la que este pertenece, sino también como posible blanco de sustancias diseñadas que puedan usarse para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con este tipo de receptores. Para el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de síntomas y/o causas de estas enfermedades asociadas al AChR, se debe tener en cuenta que una estructura similar a los AGLs *cis*-monoinsaturados con insaturaciones superficiales en la molécula es capaz de inhibir al AChR a través de un mecanismo alostérico que desequilibra el estado funcional del canal iónico.

Los síndromes miasténicos congénitos (CMS) son enfermedades heterogéneas que están causadas por defectos en proteínas presinápticas, sinápticas o postsinápticas y la mayoría de los CMS postsinápticos resultan de mutaciones en diferentes subunidades del AChR. Estas mutaciones pueden alterar la cinética del receptor, reducir su expresión, o ambos procesos al mismo tiempo (Engel y Sine, 2005). Para tratar los síntomas de estas enfermedades se necesita encontrar fármacos que aumenten la expresión del AChR o bien estimulen o inhiban la actividad del canal iónico según el tipo de CMS que se padezca. Específicamente, un tipo de CMS postsináptico cuyo tratamiento podría beneficiarse de este estudio es el CMS de canal lento, en el que el AChR permanece más tiempo del necesario en su estado abierto. Las drogas utilizadas actualmente no han demostrado gran potencial terapéutico dependiendo del defecto congénito (Milone y Engel, 1996; Fukudome *et al.*, 1998; Harper *iet al.*, 2003; Schara *et al.*, 2012) por lo que la búsqueda de nuevos fármacos es esencial para obtener un tratamiento más efectivo que alivie este tipo de enfermedades. Para ello, es importante determinar el mecanismo por el cual las sustancias afectan al AChR y determinar la estructura de la molécula que causa dicho



efecto. El hecho de que los AGL monoinsaturados como el *cis*-6-18:1 y *cis*-9-18:1 inhiben al receptor alterando la cinética del AChR (Perillo *et al.*, 2012) nos acerca al conocimiento de que las moléculas que tengan esta estructura podrían conducir al diseño y síntesis de fármacos más efectivos para tratar el CMS de canal lento.

## PARTE II

PARTICIÓN DIFERENCIAL DEL AChR EN DOMINIOS

LIPÍDICOS EN SISTEMAS MODELO

EFFECTO DE LA ESPECIE DE ESFINGOMIELINA PRESENTE EN LA MEMBRANA

Y

DE LA ASIMETRÍA TRANSBICAPA DE LA MEMBRANA

## RESULTADOS

Durante la formación de la unión neuromuscular se produce la aglomeración de AChRs en acúmulos anclados al citoesqueleto y ubicados en los dominios lipídicos conocidos como *rafts* (Marchand *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006). Sin embargo, tal como se señaló en la Introducción de este trabajo de Tesis, todavía hay cierta controversia sobre la ubicación del AChR en estos dominios antes de que se active la cascada de señalización iniciada por el proteoglicano agrina neural. Bermúdez *et al.* (2010) observaron que si bien el AChR tiene la potencialidad intrínseca de ubicarse en dominios *rafts*, necesitaría de factores externos que ejerzan su influencia sobre la partición preferencial del AChR en estos dominios. Para continuar con esta hipótesis, en esta segunda parte de este trabajo de Tesis nos enfocamos en determinar dos posibles factores intrínsecos de membrana que pudieran influir sobre la ubicación del AChR en dominios *rafts*: la presencia de distintas especies de SM y la presencia de asimetría transbica.

### **EFFECTO DE LA CADENA ACÍLICA DE LA ESFINGOMIELINA SOBRE LA PARTICIÓN DIFERENCIAL DEL AChR**

El Col juega un papel importante en la formación y estructura de dominios de membrana  $L_o$  debido a sus interacciones con otros lípidos. Estas interacciones varían

significativamente con la estructura de la cabeza polar y la columna carbonada de estos últimos (Silvius, 2003).

Siguiendo esta línea de pensamiento, estudios recientes mostraron que el largo de las cadenas acílicas de la SM puede producir asimetrías en la molécula que cambian su interacción con el Col como consecuencia de un desajuste hidrofóbico<sup>3</sup>. Específicamente, una molécula de SM que posea una cadena acílica de 16 átomos tiene mayor capacidad para interactuar con el Col que otros análogos de SM (Jaikishan y Slotte, 2011). Es probable que una mayor interacción entre el Col y la SM permita la formación de dominios  $L_o$  de mayor tamaño. Esto nos llevó a conjeturar la siguiente hipótesis: la formación de dominios más grandes en membrana favorece la segregación del AChR en ellos. Por lo tanto, en este trabajo de Tesis nos propusimos estudiar si el tipo de especie de SM presente en una membrana modelo, condicionando la formación de dominios de distinto tamaño, afecta la partición del AChR en dichos dominios.

Para probar esta hipótesis se purificó el AChR a partir de membranas crudas del órgano eléctrico de *T. californica* y se lo reconstituyó en liposomas de composición lipídica definida (POPC:Col:SM 1:1:1, cambiando el tipo de SM). Las especies de SM utilizadas fueron 16:0-SM, 18:0-SM, 24:1-SM y SM de cerebro porcino (bSM). Esta última mezcla de SM fue obtenida comercialmente y se compone principalmente de 18:0-SM y 24:1-SM (50 % y 21 %, respectivamente).

Un pre-requisito fundamental de la hipótesis de trabajo es que las diferentes especies de SM generen dominios de membrana de diferentes tamaños. Para verificar

---

<sup>3</sup> El desajuste o *mismatch* hidrofóbico fue definido inicialmente como la diferencia entre el largo hidrofóbico de proteínas integrales de membrana y el grosor hidrofóbico de la membrana en la que están embebidas (Duque *et al.*, 2001). Este término luego se generalizó a la diferencia entre el largo de las secciones hidrofóbicas de dos moléculas, generalmente lípido-proteína y lípido-lípido.

esta condición, se prepararon vesículas unilamelares gigantes (GUVs) con las composiciones lipídicas indicadas y se observaron por microscopía de fluorescencia los tamaños de los dominios de membrana generados con las diferentes SMs mediante su marcación con la sonda fluorescente DiI-C12. Si bien se sabe que una membrana compuesta por POPC:Col:bSM (1:1:1) contiene dominios  $L_o$  (de Almeida *et al.*, 2003), estos dominios no son lo suficientemente grandes como para ser visibles por microscopía óptica y, por tanto, mediante esta técnica no se observó coexistencia de dominios (Figura 5.1a). Un resultado similar se obtuvo con la 24:1-SM (Figura 5.1b). Por otro lado, las GUVs con 16:0-SM (Figura 5.1c) mostraron la presencia de dominios grandes y altamente visibles, mientras que las GUVs con 18:0-SM (Figura 5.1d) produjeron dominios mucho más pequeños cuya presencia se apreció al mover la perilla de enfoque fino del microscopio. Estos resultados validaron el pre-requisito de que las SM con cadenas de diferente longitud inducen la formación de dominios de diferente tamaño, siendo las que contienen 16 y 18 átomos de carbonos las que favorecerían los dominios de mayor tamaño.

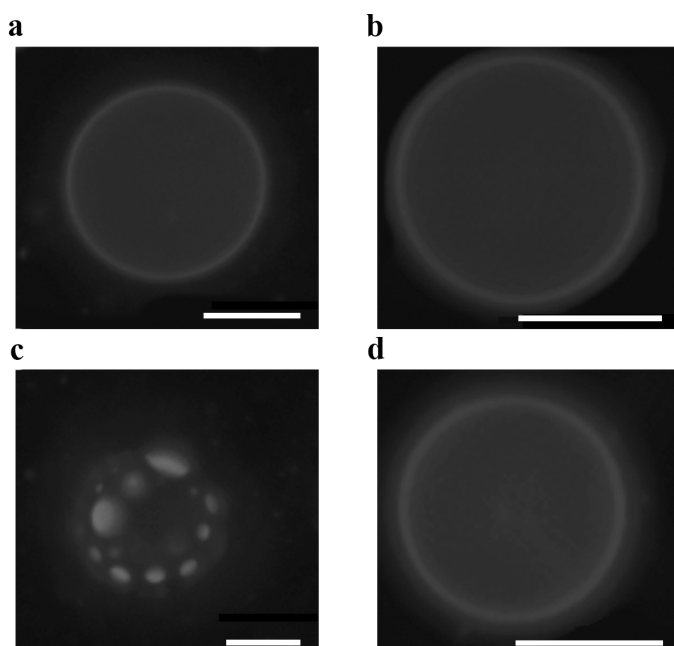


Figura 5.1: Microscopía de fluorescencia de vesículas gigantes unilamelares (GUVs) de composición lipídica definida (POPC:SM:Col 1:1:1), variando la especie de SM: (a) bSM, (b) 24:1-SM, (c) 16:0-SM y (d) 18:0-SM. Los dominios  $L_o$  (liquido-ordenados) y  $L_d$  (liquido-desordenados) se visualizan por marcación con la sonda fluorescente DiIC12 en negro y gris, respectivamente. Las líneas blancas representan  $10 \mu\text{m}$ .

Seguidamente se estudió cómo estas diferentes especies de SM impactan en el orden de membrana de los proteoliposomas conteniendo AChR (liposomas unilamerares grandes, LUVs). Para ello, los LUVs obtenidos con diferentes especies de SM se incubaron con la sonda fluorescente Laurdan y se calculó el valor de *GP* en cada caso. En la Figura 5.2 se muestra que a 4 °C las muestras con 16:0-SM y 18:0-SM tienen un orden de membrana significativamente mayor que las muestras con bSM y 24:1-SM, corroborando una mayor prevalencia de dominios  $L_o$ .

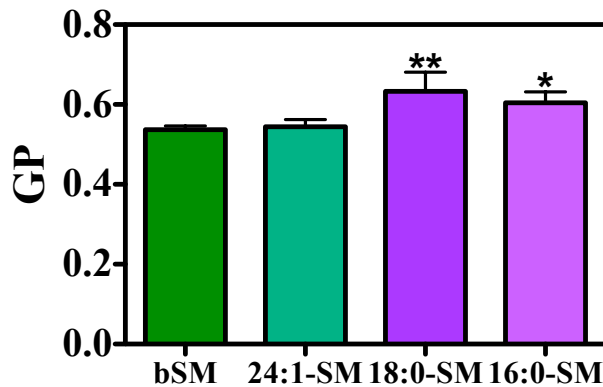
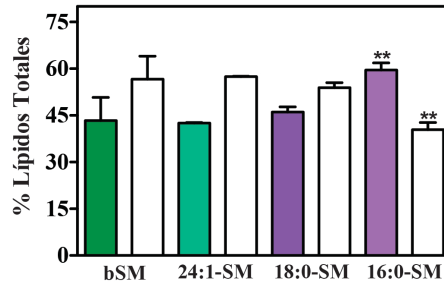


Figura 5.2: Determinación de la Polarización Generalizada (*GP*) de la sonda fluorescente Laurdan a 4 °C. Cada barra corresponde al menos a tres experimentos distintos. \*, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) y \*\*, diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) con respecto a la situación control (bSM).

A continuación estudiamos los dominios inducidos con las diferentes SM. Para separar estos dominios, se trataron los LUVs conteniendo el AChR y diferentes especies de SMs con 1 % Tritón X-100 obteniéndose las fracciones de membrana resistentes y solubles a detergente (DRM y DSM, respectivamente). A cada una de estas fracciones se les se midió su contenido lipídico (Figura 5.3). El análisis de la distribución de lípidos totales entre ambas fracciones muestra que en presencia de bSM, 24:1-SM y 18:0-SM hay una pequeña prevalencia de la fracción DSM, mientras que la 16:0-SM indujo un incremento en la fracción de DRM (Figura 5.3a).

a



b

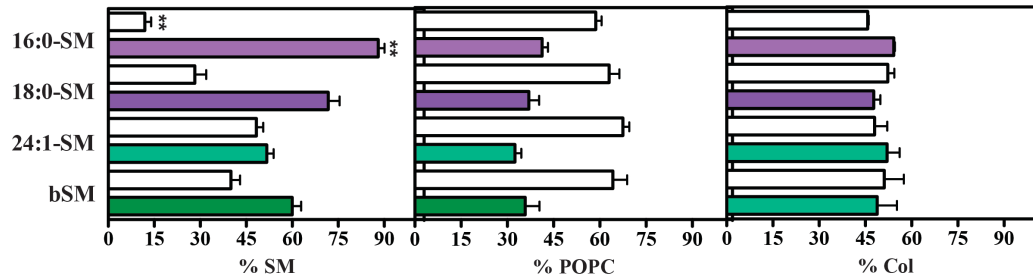
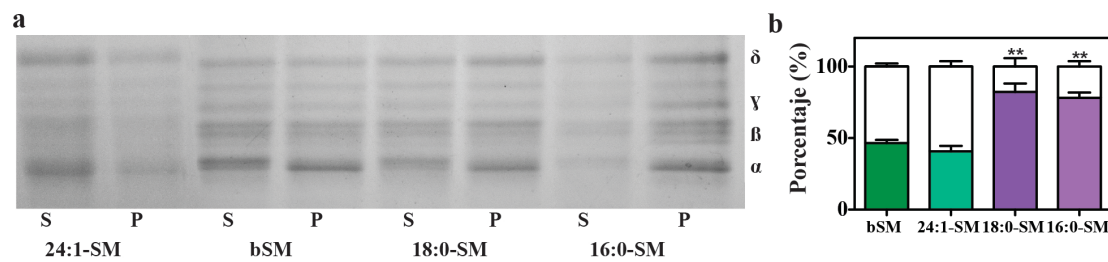


Figura 5.3: (a) Comparación de los lípidos totales de las fracciones DRM y DSM obtenidas a partir de LUVs conteniendo diferentes especies de SM. Las barras llenas y vacías corresponden a las fracciones DRM y DSM, respectivamente. (b) Comparación de la composición lipídica de las fracciones DRM y DSM obtenidas a partir de LUVs conteniendo diferentes especies de SM. Cada barra corresponde al menos a dos experimentos distintos. \*\*, diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) con respecto a la situación control (bSM).

Cuando se analizó la composición lipídica individual, todos los LUVs mostraron una partición preferencial de la SM en la fracción DRM, sin embargo, el mayor incremento fue el observado en los LUVs con 16:0-SM. Llamativamente, no hubo un incremento simultáneo de POPC o de Col. Este resultado, junto al diagrama de fase de Almeida *et al.* (2003), indica que un incremento en la SM, sin cambiar la proporción de los otros dos lípidos, lleva a una fase más rígida, hecho que explica los resultados obtenidos con la sonda Laurdan. Por lo tanto, la presencia de 16:0-SM principalmente, y en menor proporción la presencia de 18:0-SM, indujo fracciones DRM bioquímica y biofísicamente distintas a las formadas con bSM o 24:1-SM.

Para determinar la mayor o menor partición del AChR en estas fracciones de membrana biofísicamente distintas a las obtenidas con bSM, se estudió la distribución del AChR tanto en DRM como DSM en los diferentes LUVs. Los liposomas se incubaron con 1 % Tritón X-100 a 4 °C. Luego la proteína se precipitó con TCA 0,5

% y se realizó un SDS-PAGE para observar la distribución del AChR en las diferentes fracciones. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 5.4a y 5.4b. En presencia de 16:0-SM y 18:0-SM en los LUVs, el AChR mostró una partición preferencial en las fracciones DRM, mientras que en presencia de 24:1-SM, el AChR no mostró preferencia alguna por ambas fracciones, al igual que en el caso de los LUVs con bSM.



**Figura 5.4:** Distribución del AChR en dominios DRM y DSM de LUVs conteniendo AChR y diferentes especies de SM a 4 °C. (a) SDS-PAGE de las fracciones DRM y DSM (P y S, respectivamente) de LUVs luego del tratamiento con 1 % Tritón X-100. (b) Cuantificación de la banda del SDS-PAGE correspondiente a la subunidad  $\alpha$  del AChR de cada dominio. Las fracciones P y S se corresponden a las columnas llenas y vacías, respectivamente. Cada barra corresponde al menos a tres experimentos distintos. \*\*, diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) con respecto a la situación control (bSM).

Dada la tremenda complejidad de lípidos y proteínas en una membrana, su estudio se ha tildado de subjetivo en cierta medida, incluso Lingwood y Simons (2010) llegan a compararlo con el principio de incertidumbre de Heisenberg<sup>4</sup>, según el cual podemos cambiar o inducir la heterogeneidad de membrana simplemente al tratar de observarla. Teniendo esto en cuenta, estos autores, entre otros, mencionan la necesidad de alejarse de la utilización de detergentes en el estudio de los dominios

<sup>4</sup> En el estudio de Mecánica Cuántica, el principio de incertidumbre de Heisenberg involucra una variedad de ecuaciones matemáticas que demuestran un límite fundamental en la precisión con la que cierto par de propiedades físicas de una partícula se pueden conocer simultáneamente. El ejemplo clásico es la inhabilidad de determinar a un mismo tiempo la posición y la velocidad de un electrón.



*rafts* de membrana ya que la introducción del Tritón para obtener las fracciones DRM podría hacer que estas no necesariamente correspondan a los dominios tipo  $L_o$  o *raft* de membranas celulares (Lichtenberg *et al.*, 2005). Debido a la controversia planteada con la técnica de solubilización mediada por detergentes, realizamos un estudio complementario que no involucró ni el uso de detergentes ni la separación de fracciones de membrana. En este análisis se determinó la eficiencia de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), utilizando la fluorescencia intrínseca del AChR como la molécula donante y dos sondas fluorescentes diferentes como las moléculas aceptoras. Una de las sondas fluorescentes aceptoras que se usó fue el dehidroergosterol (DHE), un análogo del Col que se comporta de manera similar al Col y tiene preferencia por ubicarse en dominios  $L_o$  (de Almeida *et al.*, 2004; Garvik *et al.*, 2009). La segunda sonda utilizada fue la molécula fluorescente Laurdan que se distribuye homogéneamente en la membrana (Dietrich *et al.*, 2001). Se calculó la eficiencia de FRET ( $E$ ) entre el donante y el aceptor ( $E_{DHE}$  y  $E_{Laurdan}$ , dependiendo de la sonda aceptora) a 4 °C. Se obtuvieron las relaciones entre estas eficiencias ( $E_{DHE}/E_{Laurdan}$ ) para cada condición experimental, interpretándose de acuerdo con lo detallado en la sección 6.3 de *Métodos* y esquematizado en la Tabla 5.1 Estas relaciones nos permitieron determinar la partición del AChR en los diferentes modelos de membrana.

Todas las SM promovieron efectos semejantes a los observados en el estudio de solubilización de membrana con detergente: la presencia de bSM o 24:1-SM en los LUVs no tuvo efecto alguno sobre la preferencia del AChR de localizarse en cualquiera de los dos tipos de dominios, mientras que la presencia de 18:0-SM o 16:0-SM llevó al AChR a tener preferencia por dominios  $L_o$  (Figura 5.5). Los LUVs con cualquiera de estas dos últimas SM presentaron valores de  $E_{DHE}/E_{Laurdan}$  de 0,75 y 0,8,

respectivamente; valores significativamente diferentes a los correspondientes con bSM y 24:1-SM (0,42 y 0,52, respectivamente).

Tabla 5.1: Significancia del análisis de la razón  $E_{DHE}/E_{Laurdan}$

Valor de $E_{DHE}/E_{Laurdan}$	Significado
$> 1$	AChR en dominios $L_o$
$> 0,5$	Preferencia del AChR por dominios $L_o$
$\approx 0,5$	Sin preferencia del AChR por dominios $L_o$
$\approx 0$	AChR en dominios $L_d$

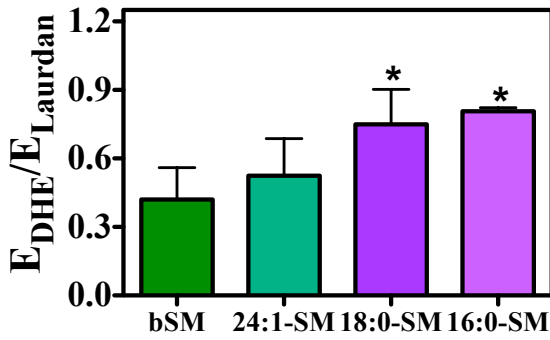


Figura 5.5: Relación de las eficiencias de la transferencia de energía de resonancia de Förster ( $E$ ) entre la fluorescencia intrínseca del AChR y las sondas fluorescentes dehidroergosterol (DHE) ( $E_{DHE}$ ) y Laurdan ( $E_{Laurdan}$ ). Cada barra corresponde al menos a tres experimentos distintos. \*, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control (bSM).

Los estudios anteriores se realizaron a 4 °C, situación en que ocurre una segregación de dominios. Como control, se realizaron los mismos estudios a 42 °C, temperatura en la que no habría coexistencia de dominios y, por lo tanto, ambas sondas aceptoras estarían dispersas homogéneamente en el LUV. De esta manera, todas las relaciones  $E_{DHE}/E_{Laurdan}$ , independientemente de la SM utilizada en la formación del LUV, deberían ser cercanas a 1 ya que ambas sondas tendrían igual probabilidad de encontrarse en el entorno del AChR. Como se muestra en la Figura 5.6, la razón para cada una de las muestras toma valores cercanos a 1.

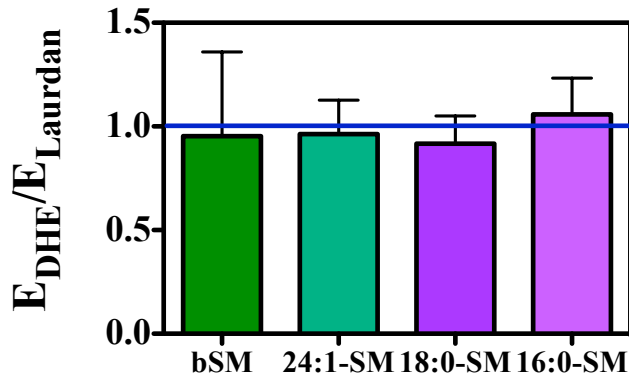


Figura 5.6: Relación de la eficiencia de la transferencia de energía de resonancia de Förster ( $E$ ) entre la fluorescencia intrínseca del AChR y las sondas fluorescentes dehidroergosterol (DHE) ( $E_{DHE}$ ) y Laurdan ( $E_{Laurdan}$ ) en LUVs conteniendo AChR y diferentes especies de SM a 42 °C.

## EFFECTO DE LA ASIMETRÍA TRANSBICAPA SOBRE LA PARTICIÓN

### DIFERENCIAL DEL AChR

Los liposomas, como modelos de membrana, son herramientas muy útiles pues simplifican el sistema de estudio. Es decir, permiten analizar una o varias variables características del sistema de interés, aquellas consideradas pertinentes al efecto estudiado, sin considerar toda la compleja maquinaria proteica y lipídica que naturalmente se encuentra en la membrana celular. De esta manera, se pueden obtener resultados de causa-efecto directamente relacionados con las variables manipuladas.

Una desventaja de estos modelos de membrana es que, debido a las metodologías con las que se obtienen, generalmente carecen de asimetría de cualquier tipo (asimetría lipídica y proteica transbicapa). Este es un punto débil de los sistemas modelos, especialmente cuando se planea estudiar los dominios de membrana equivalentes a *rafts*, ya que las membranas nativas tienen asimetría transbicapa.

Bermúdez *et al.* (2010) determinaron que el AChR carece de preferencia por los dominios  $L_o$  cuando se lo reconstituye en un sistema modelo simétrico compuesto de la mezcla ternaria POPC:Col:bSM (1:1:1). Por lo tanto, para analizar más

profundamente lo que ocurre en una membrana natural, se decidió investigar si la existencia de asimetría lipídica transbica en la membrana es una de las señales requeridas por el AChR para ubicarse en los dominios  $L_o$ . El primer paso en este estudio fue obtener sistemas de membranas asimétricos. Para ello, se indujo asimetría transbica mediante la adición de bSM a la hemicapa externa de los LUVs simétricos que contenían el AChR (Cheng *et al.*, 2009). Se partió de dos sistemas modelos distintos: el utilizado por Bermúdez *et al.* (2010) (POPC:Col:bSM, 1:1:1) y uno que carece de bSM (POPC:Col, 1:1). La mezcla ternaria de lípidos presenta coexistencia de dominios  $L_o$  y  $L_d$  mientras que la mezcla binaria mantiene una organización de membrana de tipo  $L_o$  (de Almeida *et al.*, 2003). Esta última mezcla ya fue utilizada en nuestro laboratorio en conjunción con estudios de FRET con DHE como aceptor para determinar la partición del péptido  $\gamma$ M4 (de Almeida *et al.*, 2004). En esta Tesis, también sirvió para evaluar el procedimiento de enriquecimiento de la hemicapa externa con bSM.

Luego de la obtención de LUVs asimétricos por enriquecimiento en SM en la hemicapa externa de la membrana, y como una medida indirecta de dicho enriquecimiento, se midió la anisotropía de fluorescencia de dos sondas fluorescentes que se localizan a diferentes niveles dentro de la membrana. Esto permitió la comparación del orden de membrana a distintas alturas de la membrana. Una de las sondas utilizadas fue el DPH, molécula apolar que se inserta profundamente dentro del centro hidrofóbico de la membrana. La otra sonda fue el TMA-DPH, que, por tener un grupo amino cargado positivamente, queda anclada cerca de la superficie de la hemicapa externa (Antollini y Barrantes, 1998; Kaiser y London, 1998). Estas mediciones se realizaron tanto en los sistemas simétricos preparados como en los transformados en asimétricos luego del enriquecimiento con bSM.

Los dos sistemas modelo simétricos no mostraron diferencias significativas en los valores de la anisotropía de fluorescencia, tanto para la sonda DPH como para TMA-DPH (Figura 5.7). Luego del tratamiento con bSM, en ambos sistemas modelos se observó que los valores de la anisotropía de DPH aumentaron (Figura 5.7a) mientras que, por el contrario, los valores de anisotropía de TMA-DPH disminuyeron (Figura 5.7b).

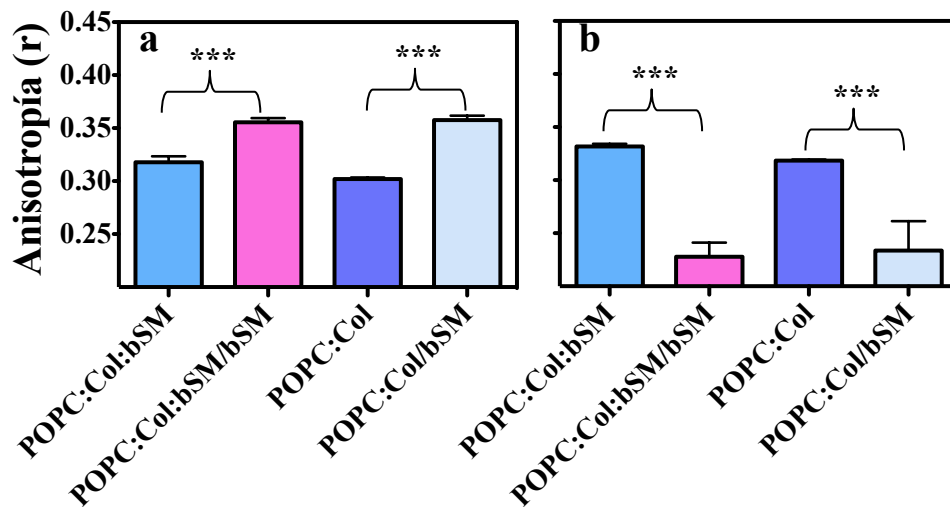


Figura 5.7: Anisotropía de fluorescencia ( $r$ ) de las sondas DPH (a) y TMA-DPH (b) obtenidas en sistemas modelo a 4 °C. Cada barra corresponde al menos a tres experimentos distintos. \*, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). \*\* y \*\*\*, diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ).

Este último resultado fue llamativo y contrario a lo esperado. Pensamos que posiblemente el tratamiento con SM- $M\beta$ CD remueva Col de la hemicapa externa y, por ende, disminuye específicamente el orden de esta hemicapa. Condición esta que por otro lado sería difícil de conservar dada la alta tasa de recambio transbica del Col, lo que redundaría en una disminución del orden total de membrana, hecho que no concuerda con los valores mayores observados con la sonda DPH. Para testear esta posibilidad, se analizó el contenido lipídico del sobrenadante conteniendo la  $M\beta$ CD obtenida luego de enfrentarla a LUVs conteniendo solamente lípidos, sin AChR,

mediante cromatografía en capa fina (TLC). La placa obtenida mostró que durante el tratamiento de los LUVs con M $\beta$ CD solo se extrae una muy pequeña cantidad de Col (Figura 5.8). Estos resultados descartarían la potencial extracción de Col de la hemicapa externa por la M $\beta$ CD como la causa de la discordancia entre los resultados de anisotropía.

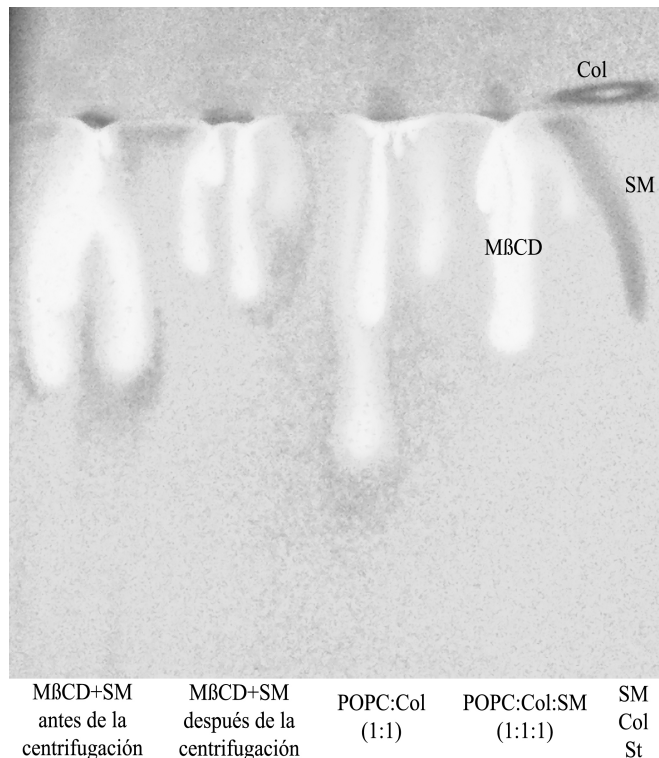


Figura 5.8: La cantidad de SM y Col presente en distintas muestras se comparó cualitativamente por TLC, desde la izquierda: la primera y la segunda calle corresponden a la mezcla de M $\beta$ CD + SM sin contacto con LUVs antes y después de los pasos de centrifugación requeridos, respectivamente (son controles de la cantidad total de SM y de la posible pérdida de SM, respectivamente); la tercera y la cuarta calle corresponden a M $\beta$ CD después del contacto con LUVs de POPC:Col:SM (1:1:1) o POPC:SM (1:1), respectivamente (son controles de la SM remanente cargada en la M $\beta$ CD y de la posible extracción de Col por la M $\beta$ CD, respectivamente); y la quinta calle corresponde a estándares de Col y SM.

A su vez, estos mismos liposomas sin AChR se utilizaron para comprobar si el protocolo utilizado efectivamente generó asimetría transbica. Como se señala en la sección *Métodos*, idealmente una membrana simétrica es biofísicamente distinta a una membrana asimétrica con una misma composición lipídica (Cheng *et al.*, 2009), por lo que se buscó verificar esta diferencia en las muestras. Parte de los liposomas asimétricos obtenidos se desarmaron con C:M (2:1) y volvieron a armar. De esta forma, al rehidratar nuevamente la capa lipídica, las membranas modelo reconstituidas son simétricas y tienen la misma composición lipídica que las

membranas asimétricas de partida. Se midió el orden de membrana de las vesículas asimétricas de partida y de las vesículas simétricas obtenidas utilizando las sondas fluorescentes TMA-DPH y DPH. La Figura 5.9 muestra que efectivamente el orden de membrana de la vesícula simétrica reconstituida disminuyó significativamente con respecto al de su correspondiente vesícula asimétrica. Estos resultados se observaron tanto en vesículas provenientes de LUVs con bSM como sin bSM en su composición original.

Para corroborar el resultado observado, es decir, que vesículas simétricas con alto contenido en bSM mostraron valores de anisotropía menores que cuando eran asimétricas, se midió el orden de membrana de vesículas simétricas de composición POPC:Col:bSM 1:1:2 y 1:1:3. Esta composición lipídica sería representativa de las vesículas simétricas obtenidas por reconstitución de vesículas asimétricas obtenidas luego del contacto con el complejo SM-M $\beta$ CD. Efectivamente, el orden de membrana de estas vesículas fue similar al obtenido al desarmar las vesículas asimétricas y reconstituirlas (Figura 5.9). Cabe recalcar que tanto las vesículas reconstituidas como los controles tienen un orden de membrana menor que el de las vesículas asimétricas, lo que sustenta la hipótesis de que los dominios de membrana que se forman en membranas asimétricas tienen características biofísicas diferentes a los de membranas simétricas.

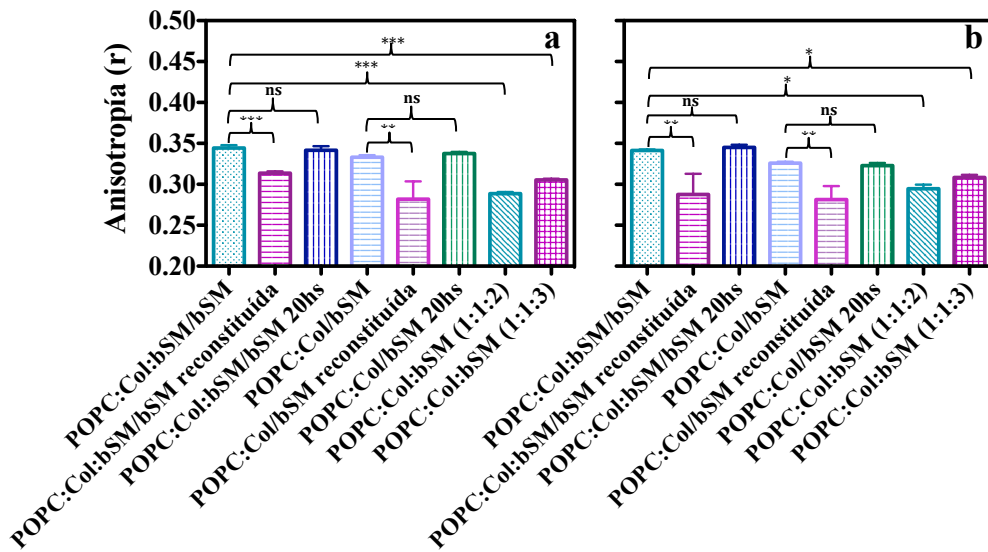


Figura 5.9: Anisotropía de fluorescencia ( $r$ ) de las sondas DPH (a) y TMA-DPH (b) obtenida a 4 °C en diferentes sistemas modelo: *POPC:Col:bSM/bSM* y *POPC:Col/bSM*, liposomas asimétricos; *POPC:Col:bSM/bSM reconstituida* y *POPC:Col/bSM reconstituida*, liposomas asimétricos reconstituidos en vesículas simétricas; *POPC:Col:bSM/bSM 20hs* y *POPC:Col/bSM 20hs*, liposomas asimétricos medidos 20 hs más tarde (control de la estabilidad de la asimetría); y *POPC:Col:bSM 1:1:2* y *POPC:Col:bSM 1:1:3*, liposomas simétricos enriquecidos en bSM. Cada barra corresponde al menos a dos experimentos distintos. ns, diferencias estadísticamente no significativas, \*, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), \*\* y \*\*\*, diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ).

La serie de experimentos arriba detallados indica que efectivamente se produce una asimetría lipídica que le confiere a la membrana propiedades biofísicas propias de esa asimetría. Una posible explicación para comprender los valores bajos de anisotropía de TMA-DPH en sistemas asimétricos con respecto a los obtenidos en sistemas simétricos es que esta sonda quede excluida de los nuevos dominios de la hemicapa externa, que se encuentran enriquecidos en SM y, por ende, tienen un aumento en el orden de membrana de acuerdo con de Almeida *et al.* (2003). Para probar este argumento se usó una tercera sonda fluorescente, Laurdan, que se localiza superficialmente en ambas hemicapas, y se calcularon los valores de  $GP$  de la sonda en las diferentes muestras. La Figura 5.10 muestra que los valores de  $GP$  se incrementaron luego del tratamiento con SM, indicando que la membrana aumentó su



orden por la adición de SM a la hemicapa externa, resultado opuesto al obtenido con TMA-DPH y en acuerdo con el observado con DPH. De esta manera, probablemente la sonda TMA-DPH no puede detectar estos nuevos dominios, tal vez por ser excluida de los mismos, y el incremento de los valores de  $GP$  y de anisotropía de DPH debe provenir principalmente de la hemicapa externa ya que la SM es un lípido polar con un movimiento de *flip-flop* entre hemicapas muy lento (Bai y Pagano, 1997).

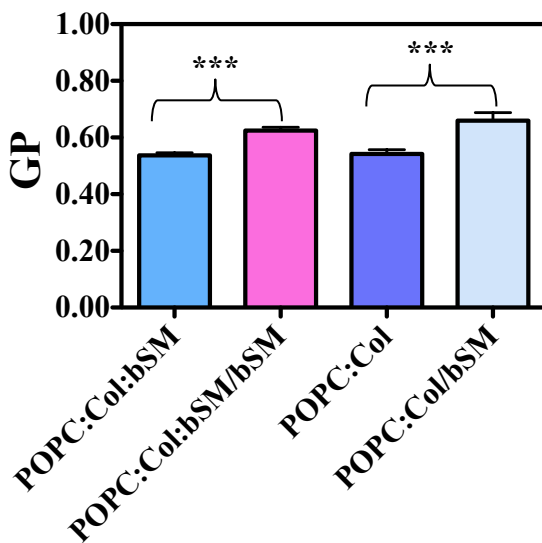


Figura 5.10: Polarización Generalizada ( $GP$ ) de la sonda fluorescente Laurdan obtenida en sistemas modelo a 4 °C. Cada barra corresponde al menos a tres experimentos distintos. \*\*\*, diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ) con respecto a cada situación control.

Una medida adicional se realizó con DPH y TMA-DPH a 42 °C, temperatura en la cual estos dominios se desorganizan y todos los lípidos adoptan una fase desordenada (de Almeida *et al.*, 2003). Considerando que en esta condición la existencia de dominios es de 0 %, se calculó un valor que exprese la variación de dominios ( $\Delta_{\text{dominios}}$ ) a 4 °C entre la condición control, simétrica, ( $r_{\text{cont}}$ ) y la condición asimétrica ( $r_{\text{as}}$ ) a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta_{\text{dominios}} = \frac{(r_{\text{as } 4^{\circ}\text{C}} - r_{\text{as } 42^{\circ}\text{C}})}{(r_{\text{cont } 4^{\circ}\text{C}} - r_{\text{cont } 42^{\circ}\text{C}})} \quad \text{Ec. 5.1}$$

La relación obtenida para la condición POPC:SM:Col (1:1:1) con DPH fue 1,66, indicando que la asimetría causó un incremento en la cantidad de dominios

rígidos con respecto a la condición control, mientras que con la sonda TMA-DPH el valor fue 1,12. Este último valor refuerza el argumento de que esta sonda no es eficiente para detectar los nuevos dominios que se formaron (Tabla 5.2). Este mismo análisis se realizó para la condición POPC:Col (1:1). El valor para DPH fue 1,95, indicando que la adición de un tercer lípido causa una segregación efectiva de dominios. Sin embargo, al analizar para TMA-DPH, el valor obtenido fue 0,72, mostrando una preferencia clara de esta sonda por los dominios  $L_d$  inducidos, que no se encuentran presentes en la situación inicial.

Tabla 5.2: Razón del orden de membrana después de la inducción de la asimetría transbica.

	$\Delta_{\text{dominios}}$	
	DPH	TMA-DPH
POPC:Col:bSM (1:1:1)	1,66	1,12
POPC:Col (1:1)	1,95	0,72

Una vez caracterizado el sistema por confirmación de la ocurrencia de asimetría transbica y aumento del número de dominios rígidos en la hemicapa externa, se retomó la pregunta inicial: ¿Cómo afecta la presencia de asimetría transmembrana a la localización del AChR? Para responderla se recurrió a las mismas técnicas utilizadas en la sección anterior, es decir, solubilización de membranas mediada por detergente y estudios de FRET. Ambos estudios mostraron que al enriquecer la hemicapa externa de liposomas compuestos por POPC:Col:bSM (1:1:1) con bSM, la distribución del AChR cambió significativamente (Figura 5.11). En los estudios realizados con 1 % Tritón X-100, el AChR mostró una marcada preferencia por los dominios DRM de sistemas asimétricos (82 %) a diferencia de la falta de preferencia del AChR por los dominios DRM de sistemas simétricos (47 %). Los estudios de FRET confirmaron estos resultados, obteniéndose para sistemas asimétricos un valor de la relación

$E_{DHE}/E_{Laurdan}$  mayor a uno, indicativo de una marcada preferencia del AChR por dominios rígidos, frente a un valor de 0,42 para sistemas simétricos.

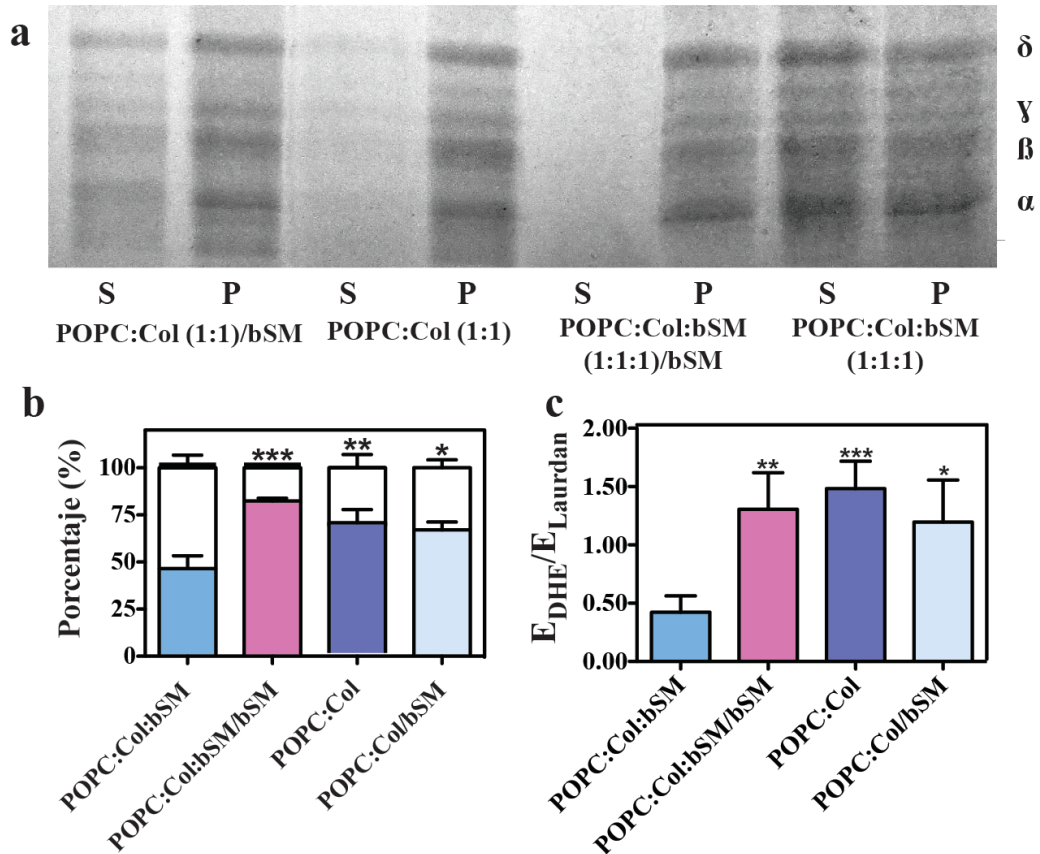


Figura 5.11: Distribución del AChR en dominios DRM y DSM de liposomas simétricos y asimétricos conteniendo AChR. (a) SDS-PAGE de fracciones DRM y DSM de liposomas simétricos y asimétricos (/bSM) luego del tratamiento con 1 % Tritón X-100 a 4 °C (P y S, respectivamente). (b) Cuantificación de las bandas del SDS-PAGE correspondientes a la subunidad  $\alpha$  del AChR de cada dominio. Las fracciones P y S corresponden a columnas llenas y vacías, respectivamente. (c) Relación de la eficiencia de la transferencia de energía de resonancia de Förster ( $E$ ) entre la fluorescencia intrínseca del AChR y las sondas fluorescentes dehidroergosterol (DHE) ( $E_{DHE}$ ) y Laurdan ( $E_{Laurdan}$ ) a 4 °C. Cada barra corresponde al menos a tres experimentos distintos. \*, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). \*\* y \*\*\*, diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ) comparadas con respecto a la situación control (POPC:Col:bSM 1:1:1).

En el caso de liposomas de POPC:Col (1:1), la muestra simétrica mostró una marcada preferencia del AChR por ubicarse en DRM o en dominios  $L_o$ , según se estudió por tratamiento con detergente o mediante estudios de FRET, respectivamente. En este sistema, al generar asimetría se produce la incorporación de un tercer lípido en el sistema, bSM, lo que conlleva a un cambio importante en la

compartimentalización de la membrana. Sin embargo, este cambio no alteró la distribución del AChR, permaneciendo la proteína principalmente en dominios DRM (69 % y 67 % en sistemas simétricos y asimétricos, respectivamente) o en dominios  $L_o$  ( $E_{DHE}/E_{Laurdan} > 1$  en sistemas simétricos y asimétricos).

Finalmente, se repitieron los estudios a 42 °C. Tal como se explicó anteriormente, a esta temperatura no hay coexistencia de dominios y, por lo tanto,

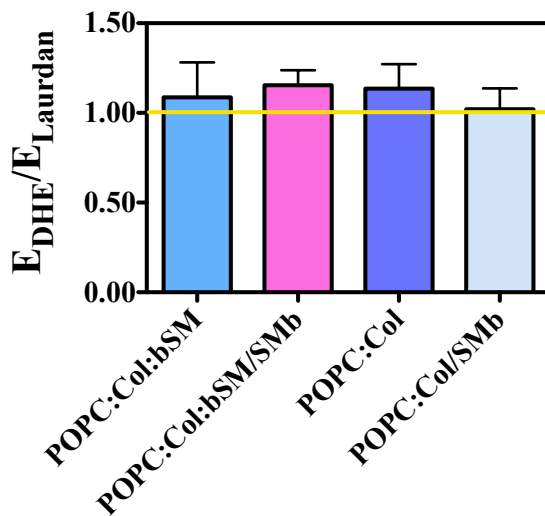


Figura 5.12: Relación de la eficiencia de la transferencia de energía de resonancia de Förster ( $E$ ) entre la fluorescencia intrínseca del AChR y las sondas fluorescentes dehidroergosterol (DHE) ( $E_{DHE}$ ) y Laurdan en liposomas simétricos y asimétricos conteniendo AChR ( $E_{Laurdan}$ ) a 42 °C

ambas sondas aceptoras se encuentran dispersas homogéneamente en el liposoma teniendo igual probabilidad de encontrarse en las cercanías del AChR por lo que se esperaría en todos los casos un valor de la relación  $E_{DHE}/E_{Laurdan}$  cercano a 1. La Figura 5.12 muestra que, independientemente de la composición lipídica o de la existencia o no de asimetría transbica, los valores obtenidos de la relación  $E_{DHE}/E_{Laurdan}$  fueron del orden de la unidad.

## DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha descubierto que los lípidos y las proteínas de la membrana son capaces de segregarse lateralmente de manera heterogénea y que los dominios que forman pueden llegar a ser estructuralmente diferentes. A partir de dichos hallazgos se ha hipotetizado que la generación de estos dominios no es aleatoria, sino que cumple una función específica.

Un ejemplo de una de las posibles funciones de la segregación de dominios es la ubicación estratégica de ciertas proteínas y lípidos específicos en los dominios laterales conocidos como *rafts*. Esta ubicación diferencial sería clave para acercar los componentes involucrados en los mecanismos de señalización. De esta forma, una vez que el primer mensajero llega a la membrana, todas las moléculas involucradas en el mecanismo tienen la proximidad necesaria como para poder interactuar y desencadenar la cascada de señalización.

Tal como se ha detallado en la literatura, el caso del AChR es característico porque su organización natural en las membranas postsinápticas del músculo esquelético es en forma de acúmulos de muy alta densidad (Barrantes, 1979) en las crestas de los pliegues de la membrana especializada de la UNM (Sanes y Lichtman, 1999, 2001). Estudios realizados en células C2C12 han llevado a sugerir que estos se ubican en dominios *rafts* (Zhu *et al.*, 2006 y revisiones en Engel, 2008; Hurst *et al.*, 2012). Sin embargo, el mecanismo por el cual inicialmente el AChR en este caso

particular, o cualquier otra proteína en general, se localiza en estos dominios no está completamente determinado aún.

Se sabe que ciertas secuencias aminoacídicas y modificaciones lipídicas juegan un rol importante en la segregación de las proteínas en ciertos tipos de dominios (Scheiffele *et al.*, 1997; Yamabhai y Anderson, 2002; Zacharias *et al.*, 2002; Smotrys y Linder, 2004; Crossthwaite *et al.*, 2005; Pike, 2009). En el caso del AChR, se han identificado dominios o “motivos” que unen Col con alta afinidad (Baier *et al.*, 2011; Fantini y Barrantes, 2013). A su vez, los mismos lípidos que componen estos dominios tendrían una gran influencia en esta segregación. Un ejemplo muy reciente de una proteína cuya distribución en dominios de membrana plasmática es afectada por lípidos es el canal de potasio  $K_{V10.1}$ , que depende del Col, entre otros factores, para ubicarse en DRM (Jiménez-Garduño *et al.*, 2014).

Bermúdez *et al.* (2010) determinaron que el AChR no logra “decidir” por sí mismo dónde ubicarse en una membrana, ya que si bien sus dominios transmembrana de mayor contacto con lípidos (segmentos M4) tienen una marcada tendencia a segregarse en dominios  $L_o$  (de Almeida *et al.*, 2004, Bermúdez *et al.*, 2010), no ocurre lo mismo con la proteína entera (Bermúdez *et al.*, 2010) que no presenta preferencia o rechazo por los dominios equivalentes a *rafts* en sistemas modelos. En virtud de esta falta de preferencia, Bermúdez *et al.* (2010) concluyeron que debe haber señales externas al AChR que lo dirijan a dominios específicos en la membrana y es por esto que, en la segunda parte de este trabajo de Tesis nos propusimos avanzar en la caracterización de la interacción AChR-microentorno lipídico y el efecto de este último sobre la ubicación preferente del AChR en dominios de membrana. Ciertamente deben de ser muchos los factores extrínsecos que afectan la localización del AChR, tanto a nivel de cascadas de señalización como a nivel de la membrana

celular. En esta investigación nos centramos en el estudio de algunos de estos posibles factores a nivel de la membrana.

Las membranas celulares presentan asimetrías tanto laterales como transbica (Devaux y Morris, 2004). Asimismo, las proteínas transmembrana tienen afinidad por ciertos lípidos de membrana, lo que induce un reacomodamiento de lípidos alrededor de sus dominios transmembrana (Devaux y Seigneuret, 1985; Marsh y Horváth, 1998). Por el contrario, los sistemas modelos presentan simetría de membrana. Este es el caso del trabajo de Bermúdez *et al.* (2010) en el que usaron solo sistemas simétricos y una mezcla de SM. Es por ello que resulta interesante determinar si ciertas características de una membrana nativa, como el tipo de SM o su asimetría, podrían formar parte de las condiciones necesarias para que el AChR se localice preferencialmente en dominios ordenados; es decir, si podrían ser aquellos los factores externos necesarios para la segregación del AChR.

En primer lugar se estudió la SM, uno de los dos componentes lipídicos principales de los dominios  $L_o$  (Pike, 2006), siendo el Col el otro lípido que se encuentra en gran cantidad. La estructura química de la SM se representa en la Figura 6.1. Las diferentes especies de SM con cadenas acílicas de diferentes largos o grados de insaturación pueden formar dominios ordenados. En las membranas nativas, la SM contiene esfingosina como la base de cadena larga y mayormente 16:0, 18:0 o 24:1 como la cadena acílica asociada al grupo amida (Barenholz y Thompson, 1980). En membranas de *Torpedo*, las SM, compuestas por cadenas acílicas de entre 14 a 26 carbonos, se ubican predominantemente en la hemicapa externa de la membrana (Rotstein *et al.*, 1987; Barrantes, 1989; Bonini *et al.*, 2002).

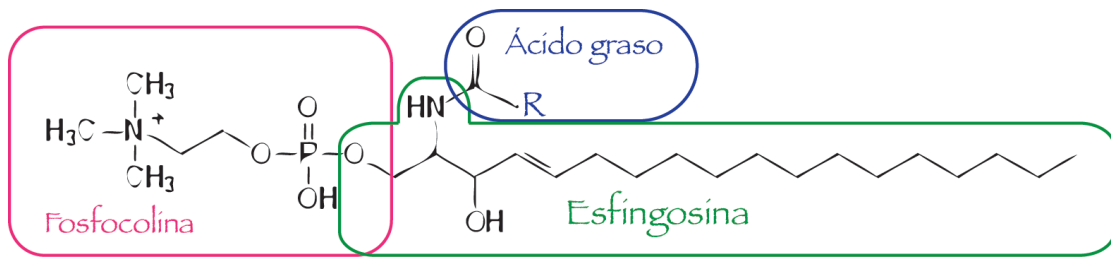


Figura 6.1: Estructura química general de una molécula de esfingomielina (SM). La cabeza polar de la SM está formada por el grupo fosfocolina y la porción hidrofóbica está formada por una cola de la esfingosina, estructura propia de los esfingolípidos y un ácido graso (cuya cadena hidrocarbonada está representada en forma genérica por la letra “R”). En este trabajo de Tesis se utilizó esta molécula con distintos ácidos grasos que forman parte de su estructura.

Las SM pueden presentar asimetría molecular debido al *mismatch* en la longitud hidrofóbica entre la cadena de la esfingosina (de 18 átomos de carbono) y la cadena acílica unida al grupo amida (como por ejemplo, cadenas de 20 a 24 átomos de carbono). A su vez, esta cadena larga también puede presentar *mismatch* molecular con la molécula de Col y con las cadenas hidrocarbonadas de los glicerofosfolípidos presentes como componente minoritario en dominios  $L_o$  (Jaikishan y Slotte, 2011). De cualquier manera, dicho *mismatch* no impide la asociación de las SM con esteroides en las bicapas modelo, entre ellos, el Col. En membranas ternarias, el Col muestra preferencia por interactuar más con las SM que con las moléculas más fluidas de PC, aunque el encaje no sea del todo adecuado. En el caso de las tres especies estudiadas en el presente trabajo, todas confieren un alto grado de orden a la membrana a pesar de las diferencias estructurales que hay entre ellas (Niemelä *et al.*, 2004), aunque los estudios de Jaikishan y Slotte (2011) indican que de todas ellas la 16:0-SM es la que tiene un mejor encaje hidrofóbico con el Col.

Según la cadena acílica presente en la SM, se pueden afectar las relaciones interlipídicas, y si bien todas interaccionarían con el Col, dichas interacciones pueden ser de diferente calidad, y por tanto, no es extraño que generen dominios de membrana  $L_o$  diferentes. En este trabajo observamos que diferentes especies de SM en



sistemas ternarios (POPC:SM:Col 1:1:1) inducen la coexistencia de dominios; sin embargo, tal como se muestra en las Figuras 5.1 y 5.3, el tamaño de los dominios varía según la SM presente. Los dominios  $L_o$  formados con 16:0-SM son los de mayor tamaño, seguidos por los formados con 18:0-SM. El orden lipídico de la membrana también es diferente según la especie de SM presente. En este caso, la 18:0-SM es la SM que genera el mayor orden de membrana seguida por la 16:0-SM (Figura 5.2). En el caso de liposomas con bSM, que es considerablemente más rica en 18:0-SM que en 24:1-SM (Jungalwala *et al.*, 1979), se observó un comportamiento similar al de los liposomas con 24:1-SM. Ello se puede explicar por la longitud de las cadenas acílicas unidas al grupo amida. Estudios de análisis de difracción de rayos X y del perfil de densidad electrónica resultante, sugieren que las SM asimétricas, como las 20:0-SM, 22:0-SM y 24:0-SM, muestran interdigitación con la hemicapa opuesta (McIntosh *et al.*, 1992; Niemelä *et al.*, 2006), postulando que dicha interdigitación perturbaría la fase  $L_o$ . Por lo tanto, es probable que las cadenas largas de la 24:1-SM, también presentes en la bSM, además del desorden que propiamente generan por poseer un doble enlace, se interdigiten con la hemicapa opuesta, ayudando a desestabilizar aun más el orden de la membrana.

Esta relación entre las especies de SM, con sus asimetrías y *mismatch* moleculares, y las propiedades de los dominios  $L_o$  nos llevó a pensar en la SM como un potencial factor externo que condiciona la ubicación del AChR en dominios de membrana. Las Figuras 5.4 y 5.5 muestran una correlación directa entre las diferencias en el tamaño, cantidad y/u orden lipídico de los dominios  $L_o$  con distintas especies de SM y la tendencia del AChR a distribuirse preferencialmente en estos dominios. Claramente se observa un cambio en el patrón de distribución del AChR entre los dominios  $L_o/L_d$  (o DRM/DSM) en función de la SM utilizada. El cambio de

bSM por 16:0-SM o 18:0-SM, que genera variaciones importantes en las propiedades de los dominios, lleva a un incremento sustancial del AChR en ellos. Por otro lado, el reemplazo de la bSM por 24:1-SM no altera la distribución del AChR en los dominios, reforzando el hecho de que la 24:1-SM se comporta de manera similar a la bSM.

Las SM con cadenas acílicas más cortas y saturadas, moléculas simétricas, como las 16:0-SM y 18:0-SM que tienen una mayor afinidad por el Col (Jaikishan y Slotte, 2011), juegan un papel importante en la distribución preferencial del AChR en los dominios *rafts*. Las SM con cadenas insaturadas más largas, como la 24:1-SM, llevan a la ausencia de una preferencia por un dominio específico por parte del AChR.

De acuerdo con el conocimiento actual, esta es la primera vez que una proteína transmembrana cambia su afinidad por ciertos dominios de membrana al cambiar un especie lipídica que altera las condiciones de uno de los dominios presentes. De esta manera, concluimos que *el tipo de SM presente en la membrana puede ser considerado una señal para el reclutamiento del AChR a dominios rafts en membranas celulares nativas*.

En segundo lugar, se estudió la asimetría transbica como otro posible factor extrínseco al canal iónico condicionante de la presencia del AChR en dominios *rafts* (Devaux y Morris, 2004; Simons y Vaz, 2004). No obstante, ¿cómo podría la asimetría transmembrana generar el desplazamiento del AChR hacia dominios más ordenados?

Las proteínas transmembrana muchas veces tienen una carga positiva más alta del lado citosólico, hecho conocido como la regla “de carga positiva del lado interno” (en inglés, *positive-inside*) (Shahidullah *et al.*, 2010). Esta regla pone de manifiesto el

hecho de que las proteínas en sus porciones transmembranas no son simétricas, aunque la estructura secundaria sí lo sea. Recientemente se observó además que los segmentos transmembrana también poseen asimetría de residuos aminoacídicos de modo tal que en la hemicapa externa tienen cadenas laterales más pequeñas que en el lado citosólico (Sharpe *et al.*, 2010). Estas asimetrías deberían corresponderse con un entorno lipídico también asimétrico entre ambas hemicapas para que la proteína pueda acomodarse correctamente en la membrana. De hecho, la hemicapa externa de la membrana, rica en SM, se encuentra, al menos en parte, en un estado  $L_o$ , mientras que la hemicapa interna, rica en los fosfolípidos insaturados, exista predominantemente en un estado  $L_d$  (Kaiser *et al.*, 2009). De esta manera, las membranas naturales tienen asimetría transbicapa, postulándose, por tanto, que los dominios *rafts* se ubican principalmente en la hemicapa externa de la membrana. Recientemente, Lin y London (2014b) demostraron que la composición lipídica de cada hemicapa de la membrana ejerce su influencia a su vez sobre el nivel de Col, siendo este último necesario para la unión, inserción y oligomerización de las proteínas. Ellos trabajaron, en particular, con la perfringolisina O, una proteína formadora de poros, y concluyeron que la asimetría lipídica influye fuertemente sobre el comportamiento de las proteínas transmembrana.

En este trabajo de Tesis estudiamos la influencia de la asimetría transbicapa en la localización del AChR en dominios  $L_o$ . Para tal fin, generamos sistemas modelos asimétricos altamente enriquecidos en bSM en la hemicapa externa, con AChR y con coexistencia de dominios  $L_o$ . Además, realizamos una serie de controles para asegurar la asimetría de la bicapa y caracterizar las propiedades biofísicas de estos sistemas (Figuras 5.8 y 5.9). El exceso de SM en la hemicapa externa, agregado durante la generación de asimetría transbicapa, resulta en un incremento en la cantidad de los

dominios lípido-ordenado y, por ende, en un mayor orden de membrana (Figura 5.7 y Tabla 5.1).

La comparación de la distribución en dominios  $L_o$  del AChR entre sistemas modelo simétricos y sistemas modelo asimétricos mostró que la inducción de asimetría transbicaapa lleva a un desplazamiento significativo del AChR hacia los dominios  $L_o$  (Figura 5.10). Este resultado junto con el hallazgo de Li y London (2014b) son un fuerte sustento a favor del *papel clave de la asimetría lipídica transbicaapa en la interacción lípido-proteína*.

En la primera parte de esta Discusión relacionamos la presencia en membrana de SM que generan dominios mayores y más ordenados con un marcado incremento del AChR en estos dominios. En esta última parte, nuevamente, un cambio en las propiedades de los dominios  $L_o$  impacta sobre la afinidad del AChR por estos dominios. En este caso, el enriquecimiento de SM en la hemicapa externa, acoplado a una reducción prácticamente nula del Col, produce un cambio en las características de los dominios. Si bien se desconoce cuáles son los cambios biofísicos exactos que ocurren en ambas situaciones, sí se sabe que el aumento en la cantidad de dominios con características más rígidas, junto a un aumento del orden de membrana, modifica la distribución del AChR.

Tanto ciertas especies de SM como la generación de asimetría de membrana por incremento de SM en la hemicapa externa produjeron un enriquecimiento importante del AChR en los dominios  $L_o$ , hecho que los señala como posibles factores externos al AChR y propios de una membrana nativa, partícipes del direccionamiento del AChR en la membrana. Estos dos factores externos a la proteína tienen en común

la formación en la membrana de dominios más rígidos. El enriquecimiento del AChR en la fase  $L_o$  sería atribuible, en última instancia, a un mayor orden de los dominios, aunque todavía se desconoce qué cambios específicos se producen en los dominios nuevos y en los ya presentes. Sharpe *et al.* (2010) propusieron que una hemicapa externa más empaquetada permitiría a su vez un mejor empaquetamiento de los segmentos transmembrana de las proteínas que se ubican en la membrana.

La identificación de los distintos tipos de SM y de la asimetría transmembrana como factores externos a la proteína puede trasladarse a lo que ocurriría en una membrana plasmática. En la membrana se segregaría microdominios ricos en 16:0-SM y 18:0-SM, posiblemente del lado externo de la bicapa, generando el entorno lipídico necesario como para que el AChR preferentemente se ubique en ellos. Estos resultados abren nuevas posibilidades y líneas de trabajo a futuro. El haber identificado señales lipídicas externas que pueden modificar la posición del AChR dentro de la membrana es un paso significativo para entender cómo es el funcionamiento de estas plataformas lipídicas y cómo es su relación con las proteínas de membrana.

## CONCLUSIONES

Las membranas naturales son entidades complejas, con asimetrías y gran variedad de lípidos y proteínas. A toda la extensión de la membrana llega una gran cantidad de señales extracelulares que deben ser transmitidas al interior celular y, sin lugar a dudas, las membranas participan en estos procesos de señalización (Kießling *et al.*, 2006; Lingwood y Simons, 2010). En este trabajo de Tesis se realizó un estudio sobre el efecto de lípidos, tanto endógenos como exógenos de la membrana, en la función y la organización del AChR en la membrana plasmática. El AChR es activado por una señal extracelular, desencadenando una cascada de señalización intracelular, particular de cada tipo de AChR y tipo celular en que este se encuentre.

En la primera parte de esta investigación se concluyó que la inhibición del AChR por los ácidos grasos libres a través de la membrana es resultado de la estructura de la cadena acílica del lípido. Los ácidos grasos que tengan un quiebre entre el carbono 6 y 9 de su cadena acílica interactúan con cierta porción transmembrana del AChR, teniendo un efecto inhibitorio sobre su función. Evidentemente la porción del AChR molestada sería crucial en el mecanismo de disparo sincronizado del receptor, impidiendo que se produzca una apertura correcta del canal iónico. La ubicación específica de los AGLs en torno al AChR no tendría importancia en su capacidad de inhibición sino que su efecto se ejercería modificando el equilibrio entre los estados conformacionales de la proteína. En este trabajo de

Tesis se avanzó en el estudio de la interacción del AChR con los lípidos de su entorno.

En la segunda parte de este trabajo de Tesis se avanzó en el estudio de la interacción del AChR con dominios lipídicos de membrana. Concluimos que la localización preferencial del AChR en dominios rígidos de la membrana sería el resultado de cumplir ciertas condiciones, a saber: (a) la propiedad intrínseca del AChR para permitir su localización en estos dominios, característica necesaria pero no suficiente; y (b) la presencia de factores extrínsecos a la proteína. Algunos de estos factores serían de naturaleza proteica y se relacionarían con la cascada de señales que lleva a la agregación del AChR en la unión neuromuscular; sin embargo, nosotros proponemos que hay otros factores que serían de naturaleza lipídica. En esta investigación postulamos la existencia de dos de estos factores: la especie de SM presente en los dominios y la asimetría transbica. Si bien la mayoría de las SM, junto con el Col, inducen dominios  $L_o$ , la presencia de determinadas especies produce un cambio en las preferencias del AChR por estos dominios. Es por ello que en una membrana natural, la existencia de diferentes especies de SM podría ser un factor externo para la localización del AChR en dominios *rafts*. Por otro lado, la asimetría transbica es una importante propiedad presente en las membranas naturales pero ausente en los sistemas modelos utilizados habitualmente. En este trabajo de Tesis observamos que la inducción de asimetría transbica en un sistema modelo modifica la ubicación del AChR en la membrana, resultando en una reubicación preferencial en los dominios  $L_o$ . Por tanto, postulamos que la existencia de asimetría sería un segundo factor externo para la localización del AChR en los dominios *rafts*. Estos resultados señalan, además, que para analizar un proceso de señalización de membrana en

términos de compartimentalización de proteínas en los dominios *rafts* sería necesario estudiar no solo las proteínas involucradas sino también la composición, asimetría y dinámica de los lípidos de la membrana.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abràmoff M., Magalhães P., y Ram S. Image processing with imagej. *Biophotonics International*, 11(7): 36–42, 2004.
- Andersen N., Corradi J., Sine S. M., y Bouzat C. Stoichiometry for activation of neuronal  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51):20819–20824, 2013.
- Andersen O. S. Membrane proteins: Through thick and thin. *Nature Chemical Biology*, 9:667–668, 2013.
- Andreasen T. y McNamee M. Inhibition of ion permeability control properties of acetylcholine receptor from *Torpedo californica* by long-chain fatty acids. *Biochemistry*, 19(20):4719–4726, 1980.
- Andreeva I., Nirthanan S., Cohen J., y Pedersen S. Site specificity of agonist-induced opening and desensitization of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 45(1):195–204, 2006.
- Antollini S., Soto M., de Romanelli I., Gutierrez-Merino C., Sotomayor P., y Barrantes F. Physical state of bulk and protein-associated lipid in nicotinic acetylcholine receptor-rich membrane studied by laurdan generalized polarization and fluorescence energy transfer. *Biophysical Journal*, 70(3):1275, 1996.
- Antollini S. S., y Barrantes F. J. Disclosure of discrete sites for phospholipid and sterols at the protein-lipid interface in native acetylcholine receptor-rich membrane. *Biochemistry*, 37(47):16653–16662, 1998.
- Antollini S. S., y Barrantes F. J. Unique effects of different fatty acid species on the physical properties of the torpedo acetylcholine receptor membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2):1249–1254, 2002.
- Antollini S. S., y Barrantes F. J. Laurdan Studies of Membrane Lipid-Acetylcholine Receptor Protein Interactions. Cap. 36. En: *Methods in Membrane Lipids* (A.M. Dopico, ed.). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, EE.UU., pp. 531–542, 2007.
- Antollini S., Wenz J., y Barrantes F. J. Cholesterol, fatty acids and nicotinic acetylcholine receptors. *Signal Transduction in Nervous Cells*, Research Signpost, Kerala, India, 3:39–61, 2009.
- Auerbach A. y Akk G. Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels a two-gate mechanism. *The Journal of General Physiology*, 112(2):181–197, 1998.
- Auerbach A. Gating of acetylcholine receptor channels: brownian motion across a broad transition state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5):1408–1412, 2005.
- Baenziger J., Morris M.-L., Darsaut T., y Ryan S. Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2): 777–784, 2000.

- Baenziger J. E., y da Costa C. J. B. Molecular mechanisms of acetylcholine receptor–lipid interactions: from model membranes to human biology. *Biophysical Reviews*, 5:1–9, 2013.
- Bagatolli L., Ipsen J., Simonsen A., y Mouritsen O. An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Progress in Lipid Research*, 49(4):378–389, 2010.
- Bai J. y Pagano R. Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of bodipy-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry*, 36(29):8840–8848, 1997.
- Baier C. J., Fantini J. y Barrantes F. J. (2011). Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. *Scientific Reports*, 1:0069, 2011.
- Barenholz Y., y Thompson T. Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 604(2):129–158, 1980.
- Barrantes F. J. Endogenous chemical receptors: Some physical aspects. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 8:287321, 1979.
- Barrantes F. J. Interactions between the acetylcholine receptor and the non-receptor, peripheral nu-peptide (mr 43000). *Neuroreceptors*, W. de Gruyter, Berlin, pp. 315–328, 1982.
- Barrantes F.J. (1989). The lipid environment of the nicotinic receptor in native and reconstituted membranes. En: Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 24 (G. Fassman, ed.) (CRC Press, Boca Raton, Fl., EE.UU.), pp. 437489.
- Barrantes F. J., Editor. *The Nicotinic Acetylcholine Receptor: Current Views and Future Trends*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg and Landes Publishing Co, 1998.
- Barrantes F. J., Antollini S. S., Blanton M. P., y Prieto M. Topography of nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37333–37339, 2000.
- Barrantes F. J. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 6(5):620–632, 2003.
- Barrantes F. J. Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Research Reviews*, 47(1):71–95, 2004
- Barrantes F. J. Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Neurochemistry*, 103(s1):72–80, 2007.
- Barrantes F. J. Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor: cellular aspects. *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*, Springer Verlag, Berlin, pp. 467–487, 2010.
- Barrantes F. J. Regulation of the nicotinic acetylcholine receptor by cholesterol as a boundary lipid. *Cholesterol Regulation of Ion Channels and Receptors*, John Wiley & Sons, NY, pp. 181–204, 2012.
- Bermúdez V., Antollini S. S, Fernandez Nieves G. A., Aveldaño M. I, y Barrantes F. J. Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstitution. *Journal of Lipid Research*, 51(9):2629–2641, 2010.
- Bermúdez V. Mecanismo de asociación del receptor de acetilcolina nicotínico a su microentorno lipídico. *Tesis Doctoral* bajo la dirección de los Dres. Barrantes F.J. y Aveldaño M.I., Universidad Nacional del Sur, 2011.
- Bernard C. Action du curare et de la nicotine sur le système nerveux et sur le système musculaire. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*, 2:195, 1850.

- Bertrand D., Picard F., Le Hellard S., Weiland S., Favre I., Phillips H., Bertrand S., Berkovic S., Malafosse A., y Mulley J. How mutations in the nachrs can cause adnfle epilepsy. *Epilepsia*, 43(s5):112–122, 2002.
- Björkbom A., Róg T., Kankaanpää P., Lindroos D., Kaszuba K., Kurita M., Yamaguchi S., Yamamoto T., Jaikishan S., Paavolainen L., Päivärinne J., Nyholm T. K. M., Katsumura S., Vattulainen I., Slotte J. P. N- and O-methylation of sphingomyelin markedly affects its membrane properties and interactions with cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1808(4):1179–1186, 2011.
- Blanton M., Xie Y., Dangott L., y Cohen J. The steroid promegestone is a noncompetitive antagonist of thetorpedo nicotinic acetylcholine receptor that interacts with the lipid-protein interfase. *Molecular Pharmacology*, 55(2):269–278, 1999.
- Bligh E. y Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8):911–917, 1959.
- Blount P. y Merlie J. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, 3(3):349–357, 1989.
- Bonini, I.C., Antollini, S.S., Gutiérrez-Merino, C. y Barrantes, F.J. Sphingomyelin composition and physical asymmetries in native acetylcholine receptor-rich membranes. *European Biophysics Journal*, 31:417427, 2002.
- Borroni V., Baier C. J., Lang T., Bonini I., White M. M., Garbus I., y Barrantes F. J. Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane. *Molecular Membrane Biology*, 24(1):1-15, 2007.
- Bouzat C. y Barrantes F. J. Hydrocortisone and 11-desoxycortisone modify acetylcholine receptor channel gating. *Neuroreport*, 4(2):143–146, 1993a.
- Bouzat C. y Barrantes F. J. Effects of long-chain fatty acids on the channel activity of the nicotinic acetylcholine receptor. *Receptors & Channels*, 1(3):251, 1993b.
- Bouzat C., Barrantes F. J., y Sine S. Nicotinic receptor fourth transmembrane domain hydrogen bonding by conserved threonine contributes to channel gating kinetics. *The Journal of General Physiology*, 115(5):663–672, 2000.
- Bouzat C., Lacorazza H., Jiménez Bonino M., y Barrantes F. J. Effect of chemical modification of extracellular histidyl residues on the channel properties of the nicotinic acetylcholine receptor. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 423(5):365–371, 1993.
- Bouzat C., Roccamo A. M., Garbus I., y Barrantes F. J. Mutations at lipid-exposed residues of the acetylcholine receptor affect its gating kinetics. *Molecular Pharmacology*, 54(1):146–153, 1998.
- Brannigan G., Hénin J., Law R., Eckenhoff R., y Klein M. Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38):14418–14423, 2008.
- Brody A. L., Olmstead R. E., London E. D., Farahi J., Meyer J.H., Grossman P., Lee G.S., Huang J., Hahn E.L., y Mandelkern M.A. Smoking-induced ventral striatum dopamine release. *American Journal of Psychiatry*, 161:1211-1218, 2004.
- Brown D. y London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14(1):111–136, 1998.
- Brown D. y Rose J. Sorting of gpi-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3):533–544, 1992.

- Buccafusco J. J., Beach J. W., y Terry Jr. A. V. Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2):364-370, 2009.
- Campagna J., y Fallon J. Lipid rafts are involved in c95 (4, 8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience*, 138(1):123-132, 2006.
- Changeux J.-P., Meunier J.-C., y Huchet M. Studies on the cholinergic receptor protein of *Electrophorus electricus* I. An assay *in vitro* for the cholinergic receptor site and solubilization of the receptor protein from electric tissue. *Molecular Pharmacology* 7(5):538-553, 1971.
- Changeux J.-P. The nicotinic acetylcholine receptor: The founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 287:40207-40215, 2012.
- Cheng H. y London E. Preparation and properties of asymmetric large unilamellar vesicles: interleaflet coupling in asymmetric vesicles is dependent on temperature but not curvature. *Biophysical Journal*, 100(11):2671-2678, 2011.
- Cheng H., Megha E., y London E. Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10):6079-6092, 2009.
- Chong P.-G., Zhu W., y Venegas B. On the lateral structure of model membranes containing cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(1):2-11, 2009.
- Cooper E., Couturier S., y Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature*, 350:235-238, 1991.
- Corringer P.-J., Novère N. L., y Changeux J.-P. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40(1):431-458, 2000.
- Criado M., Eibl H., y Barrantes F. J. Effects of lipids on acetylcholine receptor. essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. *Biochemistry*, 21(15):3622-3629, 1982.
- Criado M., Eibl H., y Barrantes F. J. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 259(14):9188-9198, 1984.
- Crossthwaite A. J., Seebacher T., Masada N., Ciruela A., Dufraux K., Schultz J. E., y Cooper D. M. F. The cytosolic domains of  $Ca^{2+}$ -sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8):6380-6391, 2005.
- da Costa C. J. B., Ogrel A. A., McCardy E. A., Blanton M. P., y Baenziger J. E. Lipid-protein interactions at the nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1):201-208, 2002.
- da Costa C. J. B., Wagg I., McKay M., y Baenziger J. E. Phosphatidic acid and phosphatidylserine have distinct structural and functional interactions with the nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15):14967-14974, 2004.
- da Costa C. J. B., Medaglia S., Lavigne N., Wang S., Carswell C., y Baenziger J. E. Anionic lipids allosterically modulate multiple nicotinic acetylcholine receptor conformational equilibria. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49):33841-33849, 2009.
- da Costa C. J. B. y Baenziger J. E. A lipid-dependent uncoupled conformation of the acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26):17819-17825, 2009.

- da Costa C. J. B., Dey L., Therien, J. P. D., y Baenziger, J. E. A distinct mechanism for activating uncoupled nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Chemical Biology*, 9(11):701–707, 2013.
- Dai Z., Luo X., Xie H., y Peng H. B. The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters. *The Journal of Cell Biology*, 150(6):1321–1334, 2000.
- Daleke D. L. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research*, 44(2):233–242, 2003.
- de Almeida R. F., Fedorov A., y Prieto M. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: Boundaries and composition of lipid rafts. *Biophysical Journal*, 85(4):2406–2416, 2003.
- de Almeida R. F., Loura L., Prieto M., Watts A., Fedorov A., y Barrantes F. J. Cholesterol modulates the organization of the  $\gamma$  m4 transmembrane domain of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Biophysical Journal*, 86(4):2261–2272, 2004.
- Devaux P. y Seigneuret M. Specificity of lipid-protein interactions as determined by spectroscopic techniques. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 822(1):63–125, 1985.
- Devaux P. F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, 30(5):1163–1173, 1991.
- Devaux P. F. y Morris R. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*, 5(4):241–246, 2004.
- Diaz-Rohrer B. B., Levental K. R., Simons K., y Levental I. Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization. *Proceedings of the National Academy of Science*, 111(23):8500–8505, 2014.
- Dietrich C., Bagatolli L., Volovyk Z., Thompson N., Levi M., Jacobson K., y Gratton E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal*, 80(3):1417–1428, 2001.
- Dilger J. P. y Liu Y. Desensitization of acetylcholine receptors in bc3h-1 cells. *Pflügers Archiv*, 420(5-6): 479–485, 1992.
- Dunn M. Determination of total protein concentration. *Protein Purification Methods*. Oxford IRL, 1989.
- Duque D., Li X.-j., Katsov K., y Schick M. Molecular theory of hydrophobic mismatch between lipids and peptides. *arXiv preprint cond-mat/0108237*, 2001.
- Edelstein S., Schaad O., Henry E., Bertrand D., y Changeux J.-P. A kinetic mechanism for nicotinic acetylcholine receptors based on multiple allosteric transitions. *Biological Cybernetics*, 75(5):361–379, 1996.
- Elenes S. y Auerbach A. Desensitization of diliganded mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor channels. *The Journal of Physiology*, 541(2):367–383, 2002.
- Ellena J. F., Blazing M. A., y McNamee M. G. Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 22(24):5523–5535, 1983.
- Elliott J., Blanchard S., Wu W., Miller J., Strader C., Hartig P., Moore H., Racs J., y Raftery M. Purification of Torpedo californica post-synaptic membranes and fractionation of their constituent proteins. *Biochemical Journal*, 185(3):667, 1980.
- Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82:70–77, 1959.
- Engel A. G. y Sine S. M. Current understanding of congenital myasthenic syndromes. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(3):308–321, 2005.

- Engel A. The neuromuscular junction. *Handbook of Clinical Neurology*, 91:103–148, 2008.
- Engelman D. M. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068):578–580, 2005.
- Fantini J., y Barrantes F. J. Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788:2345–2361, 2009.
- Fantini J., y Barrantes F. J. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Frontiers in Physiology*, 4, 2013.
- Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L., y Henson P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148(7):2207–2216, 1992.
- Fernández Nievas G., Barrantes F., y Antollini S. Conformation-sensitive steroid and fatty acid sites in the transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 46(11):3503–3512, 2007.
- Fernández Nievas G., Barrantes F., y Antollini S. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor conformational state by free fatty acids and steroids. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31):21478–21486, 2008.
- Fong T. M. y McNamee M. G. Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry*, 25(4):830–840, 1986.
- Fong T. M. y McNamee M. G. Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry*, 26(13):3871–3880, 1987.
- Forman S. A. Anesthetic sites and allosteric mechanisms of action on cys-loop ligand-gated ion channels. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien d'Anesthésie*, 58(2):191–205, 2011.
- Förster T. *Intermolecular energy transfer and fluorescence*. National Research Council of Canada, 1955.
- Fritzsche K. J., Kim J., y Holland G. P. Probing lipid-cholesterol interactions in DOPC/eSM/Chol and DOPC/DPPE/Chol model lipid rafts with DSC and <sup>13</sup>C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828:1889–1898, 2013.
- Froehner S. C. The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *The Journal of Cell Biology*, 114(1):1–7, 1991.
- Fukudome T., Ohno K., Brengman J. M., y Engel A. G. Quinidine normalizes the open duration of slow-channel mutants of the acetylcholine receptor. *Neuroreport*, 9(8):1907–1911, 1998.
- Gandhavadi M., Allende D., Vidal A., Simon S., y McIntosh T. Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophysical Journal*, 82(3):1469–1482, 2002.
- Garbus I., Bouzat C., y Barrantes F. Steroids differentially inhibit the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroreport*, 12(2):227–231, 2001.
- Garvik O., Benediktson P., Simonsen A. C., Ipsen J. H., y Wüstner D. The fluorescent cholesterol analog dehydroergosterol induces liquid-ordered domains in model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 159(2):114–118, 2009.
- Gautam M., Noakes P. G., Moscoso L., Rupp F., Scheller R. H., Merlie J. P., y Sanes J. R. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*, 85:525–535, 1996.

- Giniatullin R., Nistri A., y Yakel J. Desensitization of nicotinic ach receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends in Neurosciences*, 28(7):371–378, 2005.
- Glass D. J., Bowen D. C., Stitt T. N., Radziejewski C., Bruno J., Ryan T. E., Gies D. R., Shah S., Mattsson K., Burden S. J., *et al.* Agrin acts via a musk receptor complex. *Cell*, 85(4):513–523, 1996.
- Goñi F.M. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838:1467–1476, 2014.
- Gri G., Molon B., Manes S., Pozzan T., y Viola A. The inner side of t cell lipid rafts. *Immunology Letters*, 94(3):247–252, 2004.
- Gutierrez-Merino C., de Romanelli I., Pietrasanta L., y Barrantes F. Preferential distribution of the fluorescent phospholipid probes nbd-phosphatidylcholine and rhodamine-phosphatidylethanolamine in the exofacial leaflet of acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry*, 34(14):4846–4855, 1995.
- Hall Z. W. y Sanes J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, 72:99–121, 1993.
- Hamilton S., Pratt D., y Eaton D. Arrangement of the subunits of the nicotinic acetylcholine receptor of *Torpedo californica* as determined by  $\alpha$ -neurotoxin crosslinking. *Biochemistry*, 24(9):2210–2219, 1985.
- Hammond A., Heberle F., Baumgart T., Holowka D., Baird B., y Feigenson G. Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18):6320–6325, 2005.
- Hamouda A. K., Sanghvi M., Sauls D., Machu T. K., y Blanton M. P. Assessing the lipid requirements of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 45(13):4327–4337, 2006.
- Harder T. y Engelhardt K. R. Membrane domains in lymphocytes—from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic*, 5(4):265–275, 2004.
- Harper C. M., Fukudome T., y Engel A. G. Treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. *Neurology*, 60(10):1710–1713, 2003.
- Harris F., Best K., y Bell J. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1565(1):123–128, 2002.
- Hartig P. y Raftery M. Preparation of right-side-out, acetylcholine receptor enriched intact vesicles from *Torpedo californica* electroplaque membranes. *Biochemistry*, 18(7):1146–1150, 1979.
- Haydar S. N., y Dunlop J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors—targets for the development of drugs to treat cognitive impairment associated with schizophrenia and Alzheimer's disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(2):144–152, 2010.
- Hishikawa D., Shindou H., Kobayashi S., Nakanishi H., Taguchi R., y Shimizu T. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8):2830–2835, 2008.
- Holloway P. A simple procedure for removal of triton x-100 from protein samples. *Analytical Biochemistry*, 53(1):304–308, 1973.
- Horváth L., Arias H., Hankovszky H., Hideg K., Barrantes F., y Marsh D. Association of spin-labeled local anesthetics at the hydrophobic surface of the acetylcholine receptor in native membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry*, 29(37):8707–8713, 1990.

- Huang, J., y Feigenson, G. W. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 76(4):2142-2157, 1999.
- Hughes B. W., Kusner L. L., y Kaminski H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle & Nerve*, 33(4):445-461, 2006.
- Hurst R., Rollema H., y Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(1):22-54, 2013.
- Jaikishan S. y Slotte J. P. Effect of hydrophobic mismatch and interdigitation on sterol/sphingomyelin interaction in ternary bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(7):1940-1945, 2011.
- Jain M. K. y White H. Long-range order in biomembranes. *Advances in Lipid Research*, 15:160, 1977.
- Jiménez-Garduño A. M., Mitkovski M., Alexopoulos I. K., Sánchez A., Stühmer W., Pardo L. A., y Ortega A. Kv10.1 channel plasma membrane discrete domain partitioning and its functional correlation in neurons. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(3):921-931, 2014.
- Jones O. T. y McNamee M. G. Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 27(7):2364-2374, 1988.
- Jones O. T., Eubanks J. H., Earnest J. P., y McNamee M. G. A minimum number of lipids are required to support the functional properties of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 27(10):3733-3742, 1988.
- Jonnala R. R. y Buccafusco J. Relationship between the increased cell surface  $\alpha 7$  nicotinic receptor expression and neuroprotection induced by several nicotinic receptor agonists. *Journal of Neuroscience Research*, 66(4):565-572, 2001.
- Jungalwala F. B., Hayssen V., Pasquini J. M., y McCluer R. H. Separation of molecular species of sphingomyelin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, 20(5):579-587, 1979.
- Kaiser H.-J., Lingwood D., Levental I., Sampaio J. L., Kalvodova L., Rajendran L., y Simons K. Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39):16645-16650, 2009.
- Kaiser R. y London E. Location of diphenylhexatriene (dph) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry*, 37(22):8180-8190, 1998.
- Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2):102-114, 2002.
- Karlin A., Holtzman E., Yodh N., Lobel P., Wall J., y Hainfeld J. The arrangement of the subunits of the acetylcholine receptor of torpedo californica. *Journal of Biological Chemistry*, 258(11):6678-6681, 1983.
- Karnovsky M. J., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., y Klausner R. D. The concept of lipid domains in membranes. *The Journal of Cell Biology*, 94(1):1-6, 1982.
- Katz B. y Thesleff S. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *The Journal of Physiology*, 138(1):63-80, 1957.
- Kellner R. R., Baier C. J., Willig K. I., Hell S. W., y Barrantes F. J. Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy. *Neuroscience*, 144(1):135-143, 2007.
- Kiessling V., Crane J. M., y Tamm L. K. Transbilayer effects of raft-like lipid domains in asymmetric planar bilayers



- measured by single molecule tracking. *Biophysical Journal*, 91(9):3313–3326, 2006.
- Kirber M. T., Ordway R. W., Clapp L. H., Walsh Jr J. V., y Singer J. J. Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*, 297(1):24–28, 1992.
- Klausner R. D., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., y Karnovsky M. J. Lipid domains in membranes. evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 255(4):1286–1295, 1980.
- Kucerka N., Marquardt D., Harroun T. A., Nieh M. P., Wassall S. R., de Jong D. H., Schäfer L. V., Marrink S. J., y Katsaras J. Cholesterol in bilayers with PUFA chains: doping with DMPC or POPC results in sterol reorientation and membrane-domain formation. *Biochemistry*, 49(35):7485–7493, 2010.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- Lakowicz J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Volume 1. Springer, 2006.
- Langley J. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of “receptive” substances part i. *The Journal of Physiology*, 36(4-5):347–384, 1907.
- Lee A. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1666(1):62–87, 2004.
- Lee Y., Li L., Lasalde J., Rojas L., McNamee M., Ortiz-Miranda S., y Pappone P. Mutations in the m4 domain of torpedo californica acetylcholine receptor dramatically alter ion channel function. *Biophysical Journal*, 66(3):646–653, 1994.
- Lentz B. y Burgess S. A dimerization model for the concentration dependent photophysical properties of diphenylhexatriene and its phospholipid derivatives. dphppc and dphppa. *Biophysical Journal*, 56(4):723–733, 1989.
- Lentz B., Wu J., Zheng L., y Prevratil J. The interfacial region of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers is perturbed by fusogenic amphipaths. *Biophysical Journal*, 71(6):3302–3310, 1996.
- Li L., Schuchard M., Palma A., Pradier L., y McNamee M. Functional role of the cysteine 451 thiol group in the m4 helix of the  $\gamma$ -subunit of Torpedo californica acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 29(23):5428–5436, 1990.
- Lichtenberg D., Goñi F. M., y Heerklotz H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(8):430–436, 2005.
- Lin H., Hsu F. -C., Baumann B. H., Coulter D. A., y Lynch D. R. Cortical synaptic NMDA receptor deficits in  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor gene deletion models: Implications for neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of Disease*, 63:129–140, 2014.
- Lin Q. y London E. Preparation of artificial plasma membrane mimicking vesicles with lipid asymmetry. *PloS one*, 9(1):e87903, 2014a.
- Lin Q. y London E. The influence of natural lipid asymmetry upon the conformation of a membrane- inserted protein (perfringolysin o). *Journal of Biological Chemistry*, 289:5467–5478, 2014b.
- Lindstrom J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Molecular Neurobiology*, 15(2):193–222, 1997.
- Lingwood D. y Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961):46–50, 2010.

- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R., *et al.*. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1):265–275, 1951.
- Lurtz M. y Pedersen S. Aminotriarylmethane dyes are high-affinity noncompetitive antagonists of the nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular Pharmacology*, 55(1):159–167, 1999.
- Mantipragada S., Horvath L., Arias H., Schwarzmann G., Sandhoff K., Barrantes F., y Marsh D. Lipid- protein interactions and effect of local anesthetics in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry*, 42(30):9167–9175, 2003.
- Marchand S., Devillers-Thiéry A., Pons S., Changeux J.-P., y Cartaud J. Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *The Journal of Neuroscience*, 22(20):8891–8901, 2002.
- Marsh D. y Barrantes F. Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(9):4329–4333, 1978.
- Marsh D. y Horváth L. Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interphase. Perspectives from spin-labelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1376(3):267–296, 1998.
- Marsh D., Watts A., y Barrantes F. Phospholipid chain immobilization and steriod rotational immobilization in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 645(1):97–101, 1981.
- Martinez-Seara H., Róg T., Karttunen M., Vattulainen I., y Reigada R. Cholesterol induces specific spatial and orientational order in cholesterol/phospholipid membranes. *PloS one*, 5(6):e11162, 2010.
- McIntosh T. J., Simon S. A., Needham D., y Huang C. H. Structure and cohesive properties of sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Biochemistry*, 31(7):2012–2020, 1992.
- McIntosh T. J. Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophysical Journal*, 85(3):1675–1681, 2003.
- McMahan U. J. The agrin hypothesis. *Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology*, 55:407–418, 1990.
- Milone M. y Engel A. G. Block of the endplate acetylcholine receptor channel by the sympathomimetic agents ephedrine, pseudoephedrine, and albuterol. *Brain Research*, 740(1):346–352, 1996.
- Minota S. y Watanabe S. Inhibitory effects of arachidonic acid on nicotinic transmission in bullfrog sympathetic neurons. *Journal of Neurophysiology*, 78(5):2396–2401, 1997.
- Mitra A., Bailey T., y Auerbach A. Structural dynamics of the m4 transmembrane segment during acetylcholine receptor gating. *Structure*, 12(10):1909–1918, 2004.
- Miyazawa A., Fujiyoshi Y., y Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 423(6943):949–955, 2003.
- Murakami M., y Kudo I. Phospholipase A<sub>2</sub>. *Journal of Biochemistry*, 131:285–292, 2002.
- Narayanaswami V. y McNamee M. Protein-lipid interactions and *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor function. 2. Membrane fluidity and ligand-mediated alteration in the accessibility of  $\gamma$  subunit cysteine residues to cholesterol. *Biochemistry*, 32(46):12420–12427, 1993.
- Narayanaswami V., Kim J., y McNamee M. Protein-lipid interactions and *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor function. 1. Spatial disposition of cysteine

- residues in the  $\gamma$  subunit analyzed by fluorescence-quenching and energy-transfer measurements. *Biochemistry*, 32(46):12413–12419, 1993.
- Nicholson G. L. The fluid—mosaic model of membrane structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838:1451–1466, 2014.
- Niemelä P., Hyvönen M. T., y Vattulainen I. Structure and dynamics of sphingomyelin bilayer: insight gained through systematic comparison to phosphatidylcholine. *Biophysical Journal*, 87(5):2976–2989, 2004.
- Niemelä P. S., Hyvönen M. T., y Vattulainen I. Influence of chain length and unsaturation on sphingomyelin bilayers. *Biophysical Journal*, 90(3):851–863, 2006.
- Ochoa E. L. M., Dalziel A. W., y McNamee M. G. Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 727(1): 151–162, 1983.
- Ochoa E. L. M., Chattopadhyay A., y McNamee M. G. Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: Molecular mechanisms and effect of modulators. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 9(2):141–178, 1989.
- Ordway R. W., Singer J. J., y Walsh Jr J. V. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends in Neurosciences*, 14(3):96–100, 1991.
- Ortells M. O. y Lunt G. G. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends in Neurosciences*, 18(3):121–127, 1995.
- Ortells M. O., Barrantes G. E., Wood C., Lunt G. G., y Barrantes F. J. Molecular modelling of the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane region in the open state. *Protein Engineering*, 10(5):511–517, 1997.
- Ortiz-Miranda S. I., Lasalde J. A., Pappone P. A., y McNamee M. G. Mutations in the m4 domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor alter channel opening and closing. *Journal of Membrane Biology*, 158(1):17–30, 1997.
- Parasassi T., De Stasio G., d'Ubaldo A., y Gratton E. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 57(6):1179, 1990.
- Parasassi T., De Stasio G., Ravagnan G., Rusch R., y Gratton E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 60(1):179, 1991.
- Parasassi T., Krasnowska E. K., Bagatolli L., y Gratton E. Laurdan and Prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *Journal of Fluorescence*, 8(4):365–373, 1998.
- Peñalva D. A., Furland N. E., Lopez G. H., Avelano M. I., y Antollini S. S. Unique thermal behavior of sphingomyelin species with nonhydroxy and 2-hydroxy very-long-chain (c28-c32) polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research*, 54:2225–2235, 2013.
- Perillo V. L., Fernández-Nievas G. A., Vallés A. S., Barrantes F. J., y Antollini S. S. The position of the double bond in monounsaturated free fatty acids is essential for the inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(11):2511–2520, 2012.
- Picciotto M. R., Addy N. A., Mineur Y. S., y Brunzell D. H. It's not “either/or”: activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Progress in Neurobiology*. 84(4): 329–342, 2008.
- Piguet J., Schreiter C., Segura J.-M., Vogel H., y Hovius R. Acetylcholine receptor

- organization in membrane domains in muscle cells: evidence for rapsyn-independent and rapsyn-dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 286:363-369, 2011.
- Pike L. J. Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47(7):1597-1598, 2006.
- Pike L. J. The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement):S323-S328, 2009.
- Pokorny A., Yandek L. E., Elegbede A. I., Hinderliter A., y Almeida P. F. F. Temperature and composition dependence of the interaction of  $\delta$ -lysine with ternary mixtures of Sphingomyelin/Cholesterol/POPC. *Biophysical Journal*, 91(6):2184-2197, 2006.
- Purohit P., Gupta S., Jadey S., y Auerbach A. Functional anatomy of an allosteric protein. *Nature Communications*, 4:1-12, 2013.
- Quinn P. J. *Membrane dynamics and domains*, volume 37. Springer, Berlin, 2004.
- Rafferty M. A., Vandlen R. L., Reed K. L., y Lee T. Characterization of Torpedo californica acetylcholine receptor: its subunit composition and ligand-binding properties. En: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 40, pp. 193-202, 1976.
- Raggers R. J., Pomorski T., Holthuis J., Kälin N., y van Meer G. Lipid traffic: the abc of transbilayer movement. *Traffic*, 1(3):226-234, 2000.
- Rajendran L. y Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science*, 118(6):1099-1102, 2005.
- Ramarao M. K. y Cohen J. B. Mechanism of nicotinic acetylcholine receptor cluster formation by rapsyn. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7):4007-4012, 1998.
- Reiss K., Cornelsen I., Husmann M., Gimpl G., y Bhakdi S. Unsaturated fatty acids drive ADAM-dependent cell adhesion, proliferation and migration by modulating membrane fluidity. *Journal of Biological Chemistry*, 286:26931-26942, 2011.
- Rothman J. E. y Lenard J. Membrane asymmetry. *Science*, 195(4280):743-753, 1977.
- Rotstein N.P., Arias H.R., Barrantes F.J. y Avelaño M.I. Composition of lipids in elasmobranch electric organ and acetylcholine receptor membranes. *Journal of Neurochemistry*, 49:1333-1340, 1987.
- Rouser G., Fleischer S., y Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5(5):494-496, 1970.
- Ryan S., Demers C., Chew J., y Baenziger J. Structural effects of neutral and anionic lipids on the nicotinic acetylcholine receptor an infrared difference spectroscopy study. *Journal of Biological Chemistry*, 271(40):24590-24597, 1996.
- Sakmann B. y Neher E. Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature*, 260(799-802):7, 1976.
- Sanes J. R. y Lichtman J. W. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(11):791-805, 2001.
- Sanes J. y Lichtman J. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual Review of Neuroscience*, 22(1):389-442, 1999.
- Schara U., Della Marina A., y Abicht A. Congenital myasthenic syndromes: current diagnostic and therapeutic approaches. *Neuropediatrics*, 43(04):184-193, 2012.
- Scheiffele P., Roth M. G., y Simons K. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-

- cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *The EMBO Journal*, 16(18):5501–5508, 1997.
- Schofield P. R., Darlison M. G., Fujita N., Burt D. R., Stephenson F. A., Rodriguez H., Rhee L. M., Ramachandran J., Reale V., y Glencorse T. A. Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, 328:221–227, 1987.
- Schroeder F., Nemezc G., Gibson Wood W., Joiner C., Morrot G., Ayrault-Jarrier M., y Devaux P. F. Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1066(2):183–192, 1991.
- Schroit A. J. y Zwaal R. F. A. Transbilayer movement of phospholipids in red cell y platelet membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1071(3):313–329, 1991.
- Schwartz A. What's next for Alzheimer treatment? *Annals of Neurology*, 73(4):A7–A9, 2013.
- Shahidullah K., Krishnakumar S. S., y London E. The effect of hydrophilic substitutions y anionic lipids upon the transverse positioning of the transmembrane helix of the erbb2 *neu* protein incorporated into model membrane vesicles. *Journal of Molecular Biology*, 396(1):209–220, 2010.
- Sharpe H. J., Stevens T. J., y Munro S. A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell*, 142(1):158–169, 2010.
- Shen X.-M., Deymeer F., Sine S. M., y Engel A. G. Slow-channel mutation in acetylcholine receptor *am4* domain and its efficient knockdown. *Annals of Neurology*, 60(1):128–136, 2006.
- Shinitzky M. y Yuli I. Lipid fluidity at the submacroscopic level: determination by fluorescence polarization. *Chemistry and Physics of Lipids*, 30(2):261–282, 1982.
- Shipley, G. G. Recent X-ray diffraction studies of biological membranes and membrane components. *Biological Membranes*, 2:1–89, 1973.
- Silvius J. R. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610(2):174–183, 2003.
- Simons K. y Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633):569–572, 1997.
- Simons K. y Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1):31–39, 2000.
- Simons K. y Vaz W. Model systems, lipid rafts, and cell membranes 1. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33:269–295, 2004.
- Sine S. M. y Engel A. G. Recent advances in cys-loop receptor structure and function. *Nature*, 440 (7083):448–455, 2006.
- Sine S. End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease. *Physiological Reviews*, 92(3):1189–1234, 2012.
- Sine S. y Steinbach J. Activation of acetylcholine receptors on clonal mammalian bc3h-1 cells by low concentrations of agonist. *The Journal of Physiology*, 373(1):129–162, 1986.
- Singer G., S.J. and Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(23):720–731, 1972.
- Smotrys J. E. y Linder M. E. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1):559–587, 2004.
- Sousa C., Nunes C., Lúcio M., Ferreira H., Lima J., Tavares J., Cordeiro-da Silva A., y Reis S. Effect of nonsteroidal anti-

- inflammatory drugs on the cellular membrane fluidity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8):3195–3206, 2007.
- Steck T., Ye J., y Lange Y. Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. *Biophysical Journal*, 83(4):2118–2125, 2002.
- Stern O., y Volmer M. On the quenching-time of fluorescence. *Physik Zeitschr*, 20:183–188, 1919.
- Stetzkowski-Marden F., Recouvreur M., Camus G., Cartaud A., Marchand S., y Cartaud J. Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. *Journal of Molecular Neuroscience*, 30(1):37–38, 2006.
- Subczynski W. y Kusumi A. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse epr spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1610(2):231–243, 2003.
- Sunshine C. y McNamee M. Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1191(1):59–64, 1994.
- Tamamizu S., Lee Y., Hung B., McNamee M., y Lasalde-Dominicci J. Alteration in ion channel function of mouse nicotinic acetylcholine receptor by mutations in the m4 transmembrane domain. *Journal of Membrane Biology*, 170(2):157–164, 1999.
- Tamamizu S., Guzmán G. R., Santiago J., Rojas L. V., McNamee M. G., y Lasalde-Dominicci J. A. Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the  $\alpha$  m4 transmembrane domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 39(16):4666–4673, 2000.
- Thanvi B. y Lo T. Update on myasthenia gravis. *Postgraduate Medical Journal*, 80(950):690–700, 2004.
- Thompson A. J., Lester H. A. y Lummis S. C. R. The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43:449–499, 2010.
- Tobimatsu T., Fujita Y., Fukuda K., Tanaka K.-I., Mori Y., Konno T., Mishina M., y Numa S. Effects of substitution of putative transmembrane segments on nicotinic acetylcholine receptor function. *FEBS letters*, 222(1):56–62, 1987.
- Tuba Z., Maho S., y Sylvester V. Synthesis and structure-activity relationships of neuromuscular blocking agents. *Current Medicinal Chemistry*, 9(16):1507–1536, 2002.
- Tulenko T., Chen M., Mason P., y Mason R. Physical effects of cholesterol on arterial smooth muscle membranes: evidence of immiscible cholesterol domains and alterations in bilayer width during atherogenesis. *Journal of Lipid Research*, 39(5):947–956, 1998.
- Unwin N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*, 373(6509):37–43, 1995.
- Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 346(4):967–989, 2005.
- Unwin N., Miyazawa A., Li J., y Fujiyoshi Y. Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the  $\alpha$  subunits. *Journal of Molecular Biology*, 319(5):1165–1176, 2002.
- Unwin N., y Fujiyoshi Y. Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. *Journal of Molecular Biology*, 422(5):617–634., 2012.
- Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from Torpedo postsynaptic membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 46(4):283–322, 2013.
- Valcarcel C., Dalla Serra M., Potrich C., Bernhart I., Tejuca M., Martinez D., Pazos

- F., Lanio M., y Menestrina G. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin i and ii, two cytolysins of the sea anemone *stichodactyla helianthus*. *Biophysical Journal*, 80(6):2761–2774, 2001.
- Varma R., y Mayor S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, 394(6695):798-801, 1998.
- Wallace B. Agrin-induced specializations contain cytoplasmic, membrane, and extracellular matrix-associated components of the postsynaptic apparatus. *The Journal of Neuroscience*, 9(4):1294–1302, 1989.
- Wassall S. y Stillwell W. Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(1):24–32, 2009.
- Willmann R., Pun S., Stallmach L., Sadasivam G., Santos A., Caroni P., y Fuhrer C. Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *The EMBO Journal*, 25(17):4050–4060, 2006.
- Wood W. G., Igbavboa U., Müller W. E., y Eckert G. P. Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes. *Journal of Neurochemistry*, 116(5):684–689, 2011.
- Wu S. y McConnell H. Phase separations in phospholipid membranes. *Biochemistry*, 14(4):847–854, 1975.
- Xu Y., Barrantes F. J., Luo X., Chen K., Shen J., y Jiang H. Conformational dynamics of the nicotinic acetylcholine receptor channel: a 35-ns molecular dynamics simulation study. *Journal of the American Chemical Society*, 127(4):1291–1299, 2005.
- Yamabhai M. y Anderson R. G. W. Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28):24843–24846, 2002.
- Yu W., So P., French T., y Gratton E. Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach. *Biophysical Journal*, 70(2):626–636, 1996.
- Zacharias D. A., Violin J. D., Newton A. C., y Tsien R. Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, 296(5569):913–916, 2002.
- Zanello L. P., Aztiria E., Antollini S., y Barrantes, F. J. Nicotinic acetylcholine receptor channels are influenced by the physical state of their membrane environment. *Biophysical Journal*, 70(5), 2155-2164, 1996.
- Zheng W. y Auerbach A. Decrypting the sequence of structural events during the gating transition of pentameric ligand-gated ion channels based on an interpolated elastic network model. *PLoS Computational Biology*, 7(1):e1001046, 2011.
- Zhu D., Xiong W. C., y Mei L. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *Journal of Neuroscience*, 26(18):4841–4851, 2006.
- Zolese G., Gratton E., y Curatola G. Phosphatidic acid affects structural organization of phosphatidylcholine liposomes. A study of 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH) and 1-(4-trimethylammonium-phenyl)-6-phenyl, 1, 3, 5-hexatriene (TMA-DPH) fluorescence decay using distributional analysis. *Chemistry and Physics of Lipids*, 55(1):29–39, 1990.
- Zong Y., Zhang B., Gu S., Lee K., Zhou J., Yao G., Figueiredo D., Perry K., Mei L., y Jin R. Structural basis of agrin–LRP4–MuSK signaling. *Genes & Development*, 26: 247-258, 2012.

## APÉNDICE I

### ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DEL AChR REALIZADOS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE *PATCH-CLAMP*

Un paso fundamental para el desarrollo de este trabajo de Tesis fue determinar el efecto inhibitorio de los AGLs estudiados sobre el AChR. Para ello, la Dra. Ana Sofía Vallés realizó estudios de la funcionalidad del AChR en presencia de los distintos AGLs estudiados en este trabajo de Tesis utilizando la técnica de *patch-clamp*, cuyos resultados se encuentran publicados en Perillo *et al.* (2012). Este Apéndice detalla con mayor detalle la metodología utilizada y los resultados obtenidos.

#### METODOLOGÍA

Se realizó un cultivo de células CHO-K1/A5 en medio Ham F12 suplementado con suero fetal bovino al 10 % y 40 mg/mL del antibiótico G418 en el medio celular. Estas células expresan de manera estable al AChR muscular adulto.

Se realizaron mediciones de corrientes de canal único en la configuración *cell-attached* (Fig. 2.4) (Hamill *et al.*, 1981) con un potencial de membrana -70 mV a 20 °C utilizando un amplificador de *patch-clamp* Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc.,



Foster City, CA, EE.UU.), digitalizando a 94 kHz con una interfase ITC-16 (Instrutech Corporation, Long Island, New York, NY, EE.UU.).

La configuración *cell-attached* se obtiene al aplicar la punta de una pipeta de 0,5-2 mm de diámetro sobre la superficie de una membrana celular para establecer un sello  $M\Omega$  (Sakmann y Neher, 1976), de manera que la corriente iónica fluye hacia la pipeta y no a través del sello. Mientras la resistencia del sello se incrementa con la disminución del área de la superficie, la aislación eléctrica de ese pequeño "parche" de membrana reduce la fuga de la corriente de manera que permite la detección de las corrientes que pasan a través de un canal iónico único.

Las pipetas de *patch* se obtuvieron a partir de tubos capilares Kimax-51 (Kimble Products, Vineland, New Jersey, EE.UU.), cubierto con Coat D (M-Line accessories, Measurements Group, Raleigh, NC, EE.UU.) y pulidos con fuego. Las resistencias de las pipetas variaron desde 5 a 7  $M\Omega$ . Las soluciones para el baño y la pipeta estaban constituidos por KCl 142 mM, NaCl 5,4 mM,  $CaCl_2$  1,8 mM,  $MgCl_2$  1,7 mM y ácido N-2-hidroxil piperazina-N0-2-etano sulfónico 10 mM, pH 7,4. La concentración final de ACh presente en la solución de la pipeta fue de 1  $\mu M$ .

Los AGLs (*cis*-6-18:1, *cis*-9-18:1, *cis*-11-18:1, *cis*-13-18:1 y *trans*-9-18:1) se prepararon a partir de una solución *stock* de 20 mM y se conservaron a -20 °C hasta su uso. Los AGLs se disolvieron en el medio celular (60  $\mu M$ ) y agregaron a las células incubando 30 minutos a 37 °C antes de cada experimento para permitir el equilibrio de los AGLs en la membrana celular. Luego se reemplazó el medio con la solución de baño y se procedió a realizar los estudios de *patch-clamp*. Para la activación de los canales de AChR se aplicó a la célula 1  $\mu M$  de ACh a través de la punta de la pipeta. Las mediciones de corriente fueron transferidas a una computadora utilizando el programa Acquire (Bruxon Corporation, Seattle, WA, EE.UU.). La detección de

eventos de canal único se realizó con el programa TAC (Bruxton Corp.) siguiendo el criterio de umbral de amplitud media en un ancho de banda de 5 kHz. Con los datos analizados se construyeron los histogramas de tiempo de apertura, estallido (*burst*) y cerrado, los que se graficaron mostrando en la abscisa la duración de cada evento en escala logarítmica y en la ordenada la raíz cuadrada del número de eventos para cada duración. La resolución del tiempo de *burst* se obtuvo mediante retraso entre el componente principal de tiempo cerrado y el siguiente *burst*.

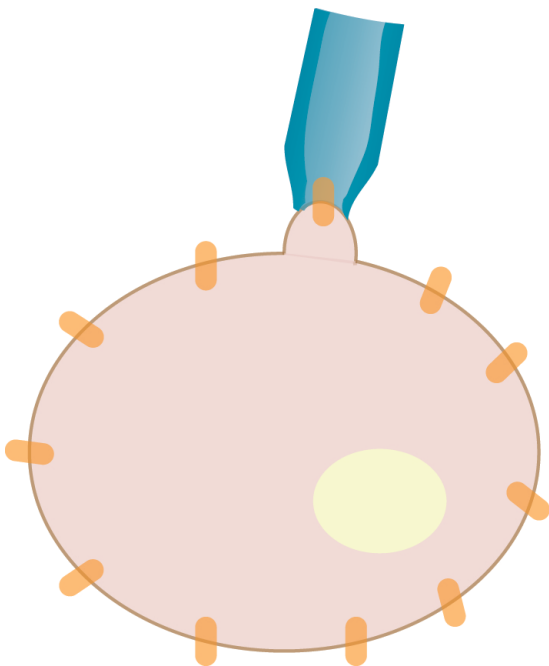


Figura 7.1: Configuración *cell-attached* para medir corrientes de un solo canal iónico ubicado en el parche de membrana succionado por la pipeta, sin perturbar el interior de la célula.

## RESULTADOS

Las grabaciones control obtenidas en presencia de una concentración baja de agonista en la pipeta ( $1 \mu\text{M}$  de ACh) mostraron las típicas y escasas aperturas del canal, ocasionalmente interrumpidas por cierres cortos (Figura 7.2). Tanto la distribución de los tiempos de las aperturas de canal único como de los tiempos de duración de los *bursts* se ajustaron correctamente a un único componente exponencial.

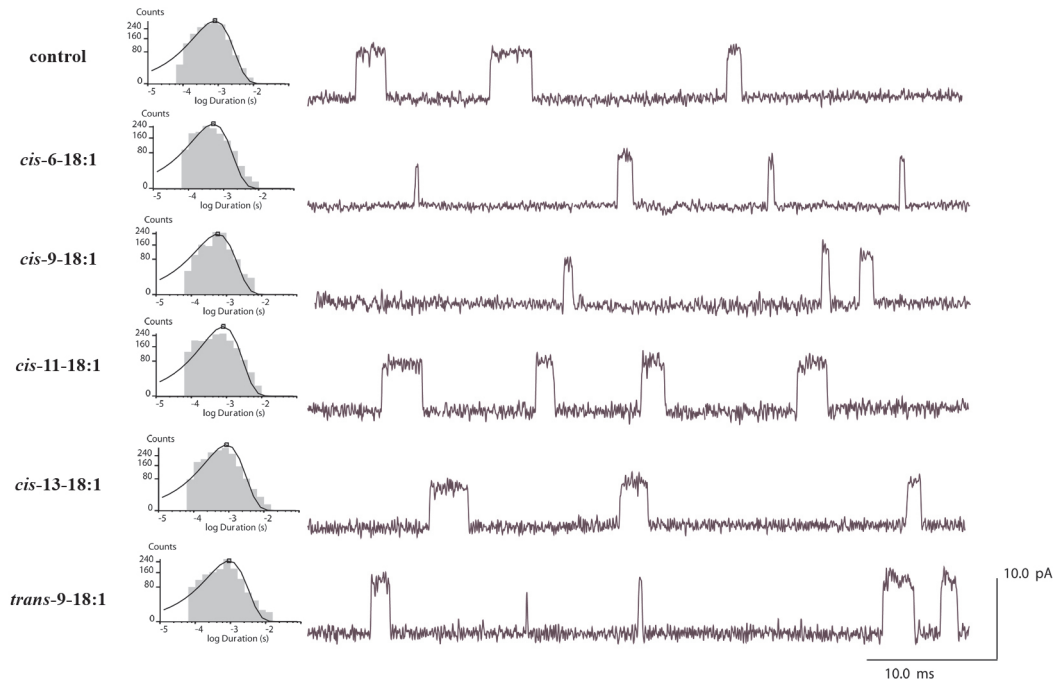


Figura 7.2: Mediciones de *patch-clamp*, en la configuración *cell-attached*, de células CHO-K1/A5 que expresan AChR adulto activado por el neurotransmisor ACh ( $1 \mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia del AGL indicado ( $60 \mu\text{M}$ ). Izquierda: histogramas de tiempo de apertura resultantes del análisis de las grabaciones de canal único. Derecha: trazas crudas de corrientes de canales únicos. Potencial de membrana:  $-70 \text{ mV}$ . Imagen obtenida de Perillo *et al.* (2012).

En la mayoría de las grabaciones, la distribución de la duración del tiempo cerrado se caracterizó por dos componentes. El componente más largo fue variable y dependiente de la cantidad de canales de AChR presentes en el *parche* de membrana evaluado, tal como lo describieron Sine y Steinbach (1986). El componente más corto fue menor, correspondiendo a la reapertura de un canal cerrado (Sine y Steinbach, 1986).

## PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS ORIGINADAS EN ESTA TESIS

### PUBLICACIONES

• V.L. Perillo, A.S. Vallés, F.J. Barrantes y S.S. Antollini. The position of the double bond in monounsaturated free fatty acids is essential for the inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(11):2511-2520, 2012.

• V.L. Perillo, D.A. Peñalva, A.J. Vitale, F.J. Barrantes y S.S. Antollini. To be or not to be in membrane domains: Transbilayer asymmetry and sphingomyelin modulate the preferential partitioning of the nicotinic acetylcholine receptor. En revisión en la revista *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*.

### COMUNICACIONES A CONGRESOS

• V.L. Perillo, F.J. Barrantes y S.S. Antollini. Effects of unsaturated fatty acids on the conformational state of nicotinic acetylcholine receptor. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB),

Puerto Madryn, Chubut, Argentina, 30 de Noviembre-3 de Diciembre. Presentación de Póster NS-05. PUBLICADO en: *Biocell* 34 (suppl.), p. 129, 2010.

- V.L. Perillo, A.S. Vallés, F.J. Barrantes y S.S. Antollini. Not just any free fatty acid inhibits the nicotinic acetylcholine receptor. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Potrero de los Funes, San Luis, Argentina, 30 de Octubre- 2 de Noviembre. Presentación de Póster NS-12. PUBLICADO en: *Biocell* 35 (suppl.), p. 123, 2011.

- V.L. Perillo, D.A. Peñalva, M.I. Alvedaño, F.J. Barrantes y S.S. Antollini. Sphingomyelin-dependent partition profile of nicotinic acetylcholine receptor in model lipid domains. 5th Special Conference of the International Society for Neurochemistry “Synapses and dendritic spines in health and disease”. ISN, Capital Federal, Buenos Aires, Argentina, 12-15 de Septiembre. Presentación de Póster P42, 2012.

- V.L. Perillo, D.A. Peñalva, M.I. Alvedaño, F.J. Barrantes y S.S. Antollini. ¿Estar o no estar? La presencia del receptor de acetilcolina en *rafts* dependería de varios factores, Segundas Jornadas de Biofísica, SBF.uy-SUB, Montevideo, Uruguay, 21-23 de Noviembre. Presentación oral y de póster, 2013.

- V.L. Perillo, D.A. Peñalva, M.I. Alvedaño, F.J. Barrantes y S.S. Antollini. To be or not to be in membrane domains: transbilayer asymmetry and sphingomyelin-dependent preferential partitioning of the acetylcholine receptor, 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, Biophysical Society, San Francisco, California, Estados Unidos, 15-19 de Febrero. Presentación de póster, 2014.