

Tesis de Posgrado

Distribución subcelular y propiedades de extracción de acetilcolinesterasa (E.C.3.1.1.7) y colinesterasa inespecífica (E.C.3.1.1.8) en corteza cerebral en desarrollo e hígado de rata

Berninsone, Patricia Mónica

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Berninsone, Patricia Mónica. (1990). Distribución subcelular y propiedades de extracción de acetilcolinesterasa (E.C.3.1.1.7) y colinesterasa inespecífica (E.C.3.1.1.8) en corteza cerebral en desarrollo e hígado de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2358_Berninsone.pdf

Cita tipo Chicago:

Berninsone, Patricia Mónica. "Distribución subcelular y propiedades de extracción de acetilcolinesterasa (E.C.3.1.1.7) y colinesterasa inespecífica (E.C.3.1.1.8) en corteza cerebral en desarrollo e hígado de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2358_Berninsone.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

" DISTRIBUCION SUBCELULAR Y PROPIEDADES DE EXTRACCION DE
ACETILCOLINESTERASA (E.C.3.1.1.7) Y COLINESTERASA
INESPECIFICA (E.C.3.1.1.8) EN CORTEZA CEREBRAL EN DESARROLLO
E HIGADO DE RATA "

Autor

Lic. Patricia Mónica Berninsone

Director de Tesis

Dr. Julio M. Azcurra

Lugar de Trabajo

Lab. de Biología Celular
Depto. de Ciencias Biológicas
FCEyN, UBA

- 2358 -
g.2

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1990

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Julio Azcurra, por su continuo estímulo, guía y confianza durante estos años de trabajo, y sobre todo, porque contribuyó a mi formación enseñándome a aprender en libertad y de la discusión.
- A la Dra. Claudia Abeijón, por su continuo apoyo e interés en mi trabajo, y porque sus sugerencias y críticas contribuyeron de manera decisiva para que esta Tesis se concretara.
- A la Lic. Eleonora Katz y al Lic. Gustavo Ibarra, por el entusiasmo con que brindaron su incondicional colaboración en la realización de experimentos, muchas veces trasnochados.
- A mis compañeros y ex-compañeros del Lab. de Biología Celular, especialmente a la Lic. Mónica Napp y al Dr. Juan L. Brusés, por el apoyo y estímulo brindado durante la realización de este trabajo.
- A Mónica, Eleonora, Gustavo y Elsa, por su paciente colaboración en la edición de esta Tesis.
- A mamá, Johnny y Santa, porque conté con su aliento y comprensión.
- A Guillermo y la familia Castro, porque me brindaron su ayuda.
- A mis amigos Maribé Espinosa, Claudia Alvarez, Silvia Pietrokovsky, Gerardo Mirkin, Emi Arndt, Mercedes Gómez González, Elsa Meinardi, Eleonora Katz y Mónica Napp, por haberme alentado y ayudado incondicionalmente.
- Al personal del Jardín Maternal de DOSUBA.
- Al Departamento de Ciencias Biológicas, donde se realizó la totalidad de este trabajo.

INDICE

	página
Capítulo 1	
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	1
TABLAS Y FIGURAS	40
Capítulo 2	
MATERIALES Y METODOS	48
FIGURAS	70
Capítulo 3	
RESULTADOS	77
TABLAS Y FIGURAS	86
Capítulo 4	
RESULTADOS	99
TABLAS Y FIGURAS	108
Capítulo 5	
RESULTADOS	119
TABLAS Y FIGURAS	139
Capítulo 6	
DISCUSION	158
LITERATURA CITADA	177

CAPITULO 1:

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

LAS COLINESTERASAS COMO MODELO DE PROTEINAS ANFITROFICAS:

Durante los últimos años se ha comenzado a acumular evidencias de que muchas proteínas no pueden ser calificadas estrictamente como citoplasmáticas o periféricas o integrales de membrana según los criterios descritos por Singer y Nicholson (1972) al formular su modelo de membranas biológicas. Entre ellas se encuentran: la protein kinasa C (pkC) (Nishizuka y cols., 1986); la proteína transformante del virus del sarcoma de Rous (pp60^{src}) (Buss y cols., 1984); una forma de la molécula de adhesión celular neural (N-CAM) (He y cols., 1986); la glicoproteína Thy-1 (Low y Kincade, 1985); así como proteínas del citoesqueleto tales como vinculina (Burn y Burger, 1987); actina (Stadler y cols., 1985); espectrina (Cohen y cols., 1986); ankirina (Staufenbiel y Lazarides, 1986), entre otras.

Estas proteínas pueden ser aisladas en una forma soluble citoplasmática, o bien en formas asociadas a membranas, exhibiendo por lo tanto propiedades mixtas. Para muchas de ellas se han demostrado interacciones (covalentes y no-covalentes) con lípidos específicos y/o membranas. Se ha propuesto que tales proteínas constituyen una nueva clase, denominada "**proteínas anfitróficas**", para cuya asociación a membranas tanto las interacciones lípido-proteína como proteína-proteína serían relevantes. (Burn P. 1988)

Como se describirá más adelante, las enzimas acetilcolinesterasa (E.C.3.1.1.7) y butirilcolinesterasa (E.C.3.1.1.8) existen como un número de formas moleculares (asociaciones cuaternarias oligoméricas, caracterizadas por su velocidad de sedimentación) que incluyen formas asimétricas (A) y globulares (G) con distinto grado de ensamblaje. La diversidad de estas proteínas es aún más amplia si se considera que las formas G pueden presentarse como formas hidrofílicas (G^h) y formas anfifílicas (G^a).

La secuencia completa de aquellas colinesterasas que han sido analizadas no presenta secuencias de aminoácidos que pudieran definir "dominios" de hidrofobicidad suficiente como para que permitan suponer que estas especies expanden el espesor de la membrana. Tanto la AchE como la ChE presentan una alta homología en su secuencia con el extremo C-terminal de la tiroglobulina y por esto alguno autores consideran que poseen una estructura típica de proteínas de secreción. En algunos casos se ha podido establecer que las especies de AchE "unidas a membranas" presentan modificaciones post-traduccionales que les confieren su carácter anfifílico -e.g. presencia de subunidad no catalítica hidrofóbica en la G4 de núcleo caudado de buey (Inestrosa y cols., 1987); anclaje glicolipídico unido covalentemente a la porción C-terminal de cada subunidad de la G2 en eritrocitos de mamíferos (Rosenberry y Scoggin, 1984), órgano eléctrico de *Torpedo* (Stieger y Brodbeck, 1985; Futerman y cols., 1985c) y cabeza de Insectos (Fournier y cols., 1988) .

El **polimorfismo estructural** y la **variedad en grado de hidrofobicidad** de las **colinesterasas** se refleja en su localización subcelular y grado de asociación a membranas.

Para colinesterasas de diversos orígenes, se ha encontrado que la solubilización cuantitativa de la actividad celular total no es factible cuando se extrae en soluciones acuosas en ausencia de detergentes; aunque usualmente una fracción significativa de la misma es extraída en estas condiciones (Bon y Massoulie, 1980; Massoulie y Toutant, 1988). En base a este criterio se han denominado "soluble" y "unida a membranas" las actividades de colinesterasas extraíbles en ausencia y presencia de detergentes no iónicos, respectivamente. Exhiben por lo tanto el comportamiento mixto que caracteriza a las proteínas anfitróficas tal como lo describiera Burn.

Por otra parte, se ha encontrado que la actividad catalítica de las colinesterasas no se ve modificada por el grado de ensamblaje ni por la adquisición del carácter anfifílico, por lo que la adquisición de estas características serían relevantes sólo a la distribución subcelular o destino de cada molécula (Taylor y cols., 1987). En el caso de AchE, se han demostrado una variedad de modificaciones post-traduccionales que determinan su diversidad, entre las que se encuentran oligomerización, glicosilación y adición de dominio glicolipídico (Massoulie y Toutant, 1988). La simplicidad y sensibilidad con que su actividad catalítica puede ser detectada, les confiere una ventaja operativa para ser consideradas como modelo de proteínas anfitróficas en estudios de síntesis, ensamblaje y transporte,

así como para estudiar los eventos moleculares que determinan su señalización y localización subcelular y los factores que regulan los mismos.

Como se reseñará a continuación, la AchE ha sido extensivamente estudiada, en gran medida por su conocido rol funcional en el contexto de la transmisión colinérgica. Tejidos en los cuales la acetilcolina es el principal neurotransmisor contienen elevadas actividades de AchE, y por lo tanto han sido una fuente privilegiada para estudios bioquímicos, fisiológicos e histoquímicos de esta enzima. Entre estos se encuentran el sistema nervioso central de Insectos y los órganos eléctricos de algunos peces (*Electrophorus*, teleósteo -anguila eléctrica de agua dulce- y *Torpedo*, condrósteo -raya eléctrica marina-). La estructura y tipos de interacción de AchE han sido elucidados en algunos casos y estudios de síntesis y transporte han sido realizados en cultivos celulares de músculo y nervio. En contraste, la ChE ha sido objeto de menos atención, a pesar de su distribución ubicua en vertebrados, en gran medida debido a que no se han descrito sistemas apropiados para su estudio.

En este trabajo se exploró la posibilidad de encontrar un sistema en el cual fuera factible estudiar el grado de asociación a membranas y distribución subcelular de AchE y ChE, y que además reuniera las condiciones apropiadas para realizar estudios acerca de los factores dinámicos que determinan la localización subcelular o señalización (targeting) de estas proteínas.

PROPIEDADES CATALITICAS - MECANISMO DE HIDROLISIS

Los vertebrados e invertebrados poseen esterasas denominadas **colinesterasas** que hidrolizan preferentemente ésteres de colina, a diferencia de otras esterasas (arilesterasas, esterasas aromáticas) .

Las colinesterasas son serina-hidrolasas, que hidrolizan uniones ésteres por un mecanismo de acilación-deacilación. Por lo tanto son sensibles a inhibidores alquilantes irreversibles, tales como organofosforados y pueden ser marcadas específicamente en el sitio activo con diisopropilfosforofluoridato (DFP) radioactivo (revisado por Toutant J.P., 1989).

El centro catalítico de la AChE se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Consiste de un subsitio esterático que contiene la serina activa y un sistema de relay de carga que involucra el OH de serina, el imidazol de histidina y el COO⁻ de aspartato, y un subsitio aniónico (COO⁻ libre de asp y/o glu) que une por interacciones electrostáticas el amonio cuaternario de la colina y de inhibidores reversibles tales como edrofonium.

La AChE contiene además uno o varios sitios aniónicos adicionales que no se encuentran en ChE.

A pesar de la hidrólisis preferencial de ésteres de colina por las colinesterasas, estas también hidrolizan otros ésteres, tales como sus análogos no cargados (3,3-dimetilbutilester), a una velocidad correspondiente a 1/3 de la velocidad de los ésteres de colina correspondientes.

Diferencias entre AchE y ChE:

En vertebrados se han descripto básicamente dos variedades **acetilcolinesterasa** (AchE, E.C.3.1.1.7) y **butiril-colinesterasa** o **pseudocolinesterasa** o **colinesterasa inespecífica** (ChE, E.C.3.1.1.8).

Estas enzimas difieren fundamentalmente en su especificidad de sustrato (Augustinsson 1963; revisado por Silver 1974). AchE hidroliza preferentemente acetilcolina y no hidroliza butirilcolina a velocidades significativas. ChE hidroliza otros ésteres de colina además de acetil y butirilcolina, razón por la que se la denomina "inespecífica". Otra diferencia importante es que AchE es inhibida por altas concentraciones de acetilcolina ($>3\mu\text{M}$), fenómeno que no ocurre para ChE y que se atribuye a la unión de sustrato a sitios aniónicos periféricos, presentes en AchE y no en ChE.

Además de las velocidades relativas de hidrólisis de sustratos, AchE y ChE pueden ser distinguidas por la sensibilidad a inhibidores específicos: así AchE es inhibida reversiblemente por bajas concentraciones (aproximadamente 10^{-7} M) de inhibidores biscuaternarios como BW 62 C 47 (ioduro de 1,5-bis(4-tetrametilamoniofenil)pentano 3-ona). ChE es inhibida por bajas concentraciones de ethopropazina (10^{-6} -[2-(dietilamino)propil]fenotiazina) y por el organofosforado iso-OMPA tetra-mono-isopropil-pirofosfo-tetramida.

Ambas enzimas presentan un notable paralelismo en cuanto a estructura, mecanismo de acción, naturaleza de sitios activos y asociaciones cuaternarias, lo que llevó a plantear la hipótesis

de que ChE podría ser un precursor biosintético de AchE (Koelle y cols. 1977). Estudios posteriores aportaron evidencias de que son entidades diferentes y que provienen de genes distintos (Vigny y cols. 1978; Edwards y Brimijoin 1981; Brimijoin y cols. 1983; Mintz y Brimijoin, 1985) En la Figura 2 se reseñan las características comunes que presentan ambas enzimas así como aquellas características más usadas para discriminarlas.

ESTRUCTURA Y TIPOS DE INTERACCION.

Formas moleculares: Nomenclatura. Valor y limitaciones del esquema general.

En las especies estudiadas hasta el presente se observa que tanto AchE como ChE presentan en cada organismo en particular una multiplicidad de formas, que si bien poseen la misma actividad catalítica (especificidad de sustratos e inhibidores, parámetros cinéticos), difieren en otros parámetros moleculares.

Basándose en propiedades hidrodinámicas de las moléculas -el coeficiente de sedimentación y radio de Stokes- se definieron las formas moleculares, sobre la base de las asociaciones oligoméricas encontradas en organo eléctrico de *Electrophorus* y sus derivados líticos, y que consisten de asociaciones cuaternarias de subunidades catalíticas y en algunos casos de subunidades no catalíticas (Bon y cols. 1979).

Las formas globulares (G1, G2 y G4) corresponden a monómeros, dímeros y tetrámeros de la subunidad catalítica.

Las formas asimétricas (A4, A8 y A12) corresponden a la asociación covalente de 1, 2 o 3 tetrámeros a una subunidad

colagénica no catalítica que le confiere asimetría a las moléculas. El polimorfismo estructural de AchE de vertebrados se representa esquemáticamente en la Figura 3.

El valor de esta nomenclatura propuesta por Bon en 1979 reside en que las colinesterasas de las diferentes especies estudiadas presentan una multiplicidad de asociaciones oligoméricas que en términos generales se corresponden con las formas moleculares descritas para *Electrophorus*.

Si bien esta sistematización considera el grado de ensamblaje de las moléculas y la presencia o ausencia de cola de colágeno; no describe la estructura detallada de las mismas. Propone un medio operacional conveniente para identificar formas similares en diferentes situaciones.

De hecho hay dos factores del polimorfismo de las colinesterasas que no son considerados con esta nomenclatura:

a- cada forma molecular no está formada necesariamente por una población homogénea de moléculas, sino que posee variantes que se detectan mediante otros procedimientos analíticos, por ejemplo: formas anfifílicas e hidrofílicas; formas que difieren en la unión a lectinas o a anticuerpos determinados, como se observó en los tejidos de *Torpedo* y algunos Insectos. Estos aspectos del polimorfismo serán discutidos más adelante.

b- se ha demostrado que existen ensamblajes oligoméricos de subunidades catalíticas y en algunos casos de subunidades no catalíticas que no corresponden al esquema general de Figura 3. Debe tenerse en consideración que las estructuras cuaternarias de AchE han sido caracterizadas en detalle sólo en unos pocos casos,

y enzimas derivadas de otros organismos podrían no ajustarse al esquema general.

Formas asimétricas (A): Estructura y tipos de interacción.

Las formas A de AchE han sido estudiadas en detalle en órganos eléctricos de *Electrophorus* y *Torpedo* (Anglister y Silman, 1978; Rosenberry y Richardson, 1977; Lee y Taylor, 1982).

En *Electrophorus* consisten de 1,2 o 3 tetrámeros asociados con las 3 hebras de una "cola". La estructura propuesta para la forma A12 se representa esquemáticamente en la Figura 4.

Tiene un elevado radio de Stokes (> 9 nm) y es sensible a la colagenasa. La digestión extensiva con colagenasa o tripsina produce tetrámeros aislados.

Las 12 subunidades catalíticas de A12 parecen ser idénticas, 6 de ellas forman dímeros unidos por puentes disulfuro, y las 6 restantes se unen de a pares a los extremos no colagénicos de los péptidos de la cola.

La cola consiste de un dominio sensible a pepsina, no colagénico; y un dominio resistente a pepsina con propiedades espectroscópicas de colágeno triple-hélice que contiene hidroxiprolina, hidroxilisina y elevado contenido de glicina. La masa de la subunidad colagénica se estima en 32 kDa, pero en SDS-PAGE empleando patrones no colagénicos presenta propiedades de migración de 41 kDa.

- Interacciones iónicas de las formas Asimétricas.

Las propiedades de solubilidad de las formas A son variables en los distintos tejidos y estas diferencias podrían atribuirse a distintas localizaciones subcelulares de las formas A.

En general, las formas A no son solubilizables a baja fuerza iónica, pero se solubilizan en presencia de sal, usualmente NaCl 1M. Precipitan o forman agregados polidispersos en condiciones de baja concentración salina. Esta agregación aparentemente involucra interacciones iónicas por grupos amino con cargas positivas; y se revierte por tratamiento con colagenasa, lo que involucra el dominio colagénico de la "cola" (revisado por Toutant y Massoulie, 1987).

En el caso de la unión neuromuscular, las formas A parecen interactuar con componentes polianiónicos endógenos, y posiblemente se encuentren *in situ* como complejos glicosaminoglicanos-enzima, a juzgar por la solubilización selectiva de estas formas por la heparina (Torres e Inestrosa, 1983) y por la retención selectiva y cuantitativa en columnas de heparina-Agarosa de las formas A de músculo de rata y o.e. de Discopyge (Brandan e Inestrosa, 1984). El polianión que une las formas A *in situ* podría ser un proteoglicano heparan sulfato (Brandan e Inestrosa, 1986) o un proteoglicano dermatan sulfato (Brandan e Inestrosa, 1987).

En algunos tejidos (músculo de rata, o.e. de *Torpedo*) se han encontrado dos poblaciones de formas A que difieren en su capacidad de ser solubilizadas por alta concentración salina, dependiendo de la presencia o ausencia de EDTA (Ramirez y cols., 1984).

Formas globulares: Propiedades fisico-químicas.

- Solubilidad de formas G. Procedimientos:

En general, no es posible obtener una solubilización cuantitativa de las colinesterasas en un buffer acuoso en ausencia de detergentes, aunque una fracción significativa de la actividad (que varía de acuerdo al tejido) se solubiliza usualmente en estas condiciones (Bon y Massoulie, 1980).

Con el fin de determinar la distribución de la actividad de las colinesterasas en relación con las membranas, se realizan usualmente extracciones sucesivas en soluciones que por sus características afecten determinado tipo de interacciones de las proteínas con las membranas. En este tipo de extracciones secuenciales, el significado de cada uno de los extractos está en principio determinado por el orden en que se obtuvieron.

- Formas G anfifílicas y no-anfifílicas. Criterios.

Las moléculas anfifílicas se caracterizan por interactuar con detergentes no-iónicos. El carácter anfifílico se define operativamente por los cambios en propiedades hidrodinámicas de las moléculas que acompañan la unión de detergentes no iónicos: se reduce el coeficiente de sedimentación (Bon y Massoulie, 1980; Grassi y cols. 1982); aumenta el radio de Stokes (Bon y Massoulie 1980; Grassi y cols. 1982; Rosenberry y Scoggin 1984); y dependiendo de la naturaleza del detergente, se modifica la movilidad electroforética de la enzima (Helenius y Simons 1977; Arpagaus y Toutant 1985; Stieger y Brodbeck, 1985). Asimismo, las

moléculas anfifílicas de AchE pueden ser incorporadas a vesículas fosfolipídicas (Romer-Luthi y cols. 1980; Ott y Brodbeck 1984).

En contraste, las formas no-anfifílicas o hidrofílicas no interactúan con detergentes, y el criterio para su identificación es que sus propiedades hidrodinámicas no varían en presencia o ausencia de estos.

Las formas G no-anfifílicas se encuentran nativas en el suero de muchos vertebrados, el tipo más estudiado es la ChE de suero humano, que se encuentra como G4 hidrofílica (Lockridge y cols., 1979; Masson 1979. Asimismo se ha encontrado AchE hidrofílica en: plasma de fetos de mamíferos (Ralston y cols. 1985; Toutant y Massoulie 1988), posiblemente de tejido nervioso en diferenciación; plasma de adultos de algunos mamíferos (conejo, humano)(Rackonczay y Brimijoin 1985; Sorensen y cols. 1986); CSF de conejo y humano (Hodgson y Chubb 1983), tejido nervioso y músculo (Toutant y col. 1985; Toutant 1986).

Las formas no anfifílicas también pueden obtenerse como productos líticos de disociación de formas A o por digestión de formas G anfifílicas por proteasas o lipasas (Grassi y cols. 1982; Germani y Brodbeck 1985; Bon y col. 1986).

- Solubilidad e hidrofobicidad: Criterios operacionales y significado.

Como se describió, las formas G pueden ser clasificadas de acuerdo a su solubilidad en ausencia y presencia de detergente o

de acuerdo a sus propiedades de interacción con detergentes no desnaturalizantes.

Estos dos tipos de propiedades no necesariamente coinciden; la primera refleja las propiedades de solubilidad y de alguna forma es indicativa de la disposición de las moléculas respecto a las membranas (Bon y Massoulie, 1980; Bon 1982; Grassi y cols, 1982; Toutant y Massoulie, 1987). De hecho ha sido empleada como criterio para definir poblaciones de moléculas "solubles" y "unidas a membrana".

Las propiedades de interacción con detergentes no iónicos en cambio, reflejan el carácter anfifílico o hidrofílico de las moléculas, que es una propiedad fisico-química de las mismas.

En un tejido determinado pueden coexistir poblaciones de formas G con diferente carácter anfifílico. Por ejemplo, en núcleo caudado de buey se ha encontrado en la fracción "soluble" G1 anfifílica (evidenciada por cambio en coeficiente de sedimentación - de 5 a 4 S- y radio de Stokes - de 4.0 a 6.5 nm- al añadir Triton X-100), G2 anfifílica y G4 anfifílica y no anfifílica. (Grassi y cols. 1982).

Sólo muy recientemente se han realizado estudios en o.e. de *Torpedo* y SNC de Insectos (Toutant y cols., 1988; Bon y cols., 1988) comparando ambos tipos de propiedades, y al menos para estos casos, existen evidencias que sugieren que las propiedades de interacción no determinan unívocamente la solubilidad de una determinada especie de colinesterasas.

Formas G2 anfifílicas de AchE : Caracterización:

Las propiedades de interacción y naturaleza del dominio hidrofóbico de formas anfifílicas han sido estudiadas en detalle para la AchE G2 de órgano eléctrico de *Torpedo* y la AchE G2 de membrana de eritrocitos humanos. Ambas especies son dímeros unidos por puentes disulfuro.

-Interacción con micelas de detergentes.

En presencia de detergentes no desnaturalizantes, como Triton X-100, forman complejos bien definidos (1 micela de detergente con 1 subunidad catalítica) que sedimenta a 6 S, con $R_s \approx 8$ nm. El coeficiente de sedimentación depende del detergente: 5.4 S en presencia de Brij 96, y 7.4 S en presencia de DOC (Bon y Massoulie 1980; Futerman y cols. 1983, 1984).

En ausencia de detergentes, y dependiendo de su grado de purificación y concentración, la enzima sedimenta como asociaciones más pesadas con otras proteínas, formas múltiples poliméricas o agregados polidispersos (Bon y cols., 1988). En contraste con los agregados de formas A, las propiedades de agregación de formas G no se ven afectadas significativamente por la fuerza iónica y no son sensibles a colagenasa. Estas moléculas anfifílicas se asocian a vesículas de fosfolípidos al retirarse el detergente.

Un comportamiento similar se ha observado para la G4 anfifílicas de nervios y médula espinal de *Torpedo*.

-Naturaleza del dominio hidrofóbico.

Las formas G2 de eritrocitos humanos y de o.e. de *Torpedo* pierden sus propiedades anfifílicas por digestión limitada con pronasa, proteinasa K o papaína (Bon y Massoulie 1980; Weitz y col. 1984; Stieger y col. 1984; Kim y Rosenberry 1985).

Las enzimas resultantes son totalmente activas, sedimentan a 7 S y tienen un radio de Stokes de 5,9 nm (Bon y Massoulie 1980; Weitz y col. 1984) (independientemente de la presencia o ausencia de detergente) y no pueden reasociarse en liposomas, lo que muestra la pérdida del carácter anfifílico (Futerman y col. 1984; Kim y Rosenberry 1985; Stieger y Brodbeck 1985).

La disminución del PM por proteólisis (determinada por SDS-PAGE) es muy reducida (69 a 68 kDa para *Torpedo*, 75 a 73 kDa para eritrocitos humanos) (Massoulie y col. 1984; Stieger y col. 1984); de lo que se deduce que la forma anfifílica nativa consiste de un dominio hidrofílico globular grande y un dominio hidrofóbico pequeño que es removible por clivaje proteolítico. Por esto la enzima nativa se denomina anfifílica o anfipática en vez de hidrofóbica (Rosenberry y Scoggin 1984).

Estas especies G2 anfifílicas también pueden ser solubilizadas por fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol (PI-PLC); sugiriendo que la proteína está anclada por un fosfatidilinositol covalentemente unido. La forma así solubilizada se comporta como la resultante de proteólisis (e.g. no interactúa con detergentes o liposomas) (Low y Finean, 1977; Futerman y cols., 1983, 1985).

El análisis químico de la AchE de eritrocitos humanos reveló que el dominio hidrofóbico unido al extremo COOH terminal de la molécula tiene un PM de 3 kDa y contiene sólo dos residuos de

aminoácidos (Rosenberry y col. 1985; Roberts y Rosenberry 1986). Estos autores representaron hipotéticamente esta estructura como His-Gly-etanolamina-Z, donde Z contiene glucosamina y dos moles de ácidos grasos (saturado e insaturado). En el caso de AchE G2 de *Torpedo*, Futerman y cols. (1985) demostraron la presencia de 1 mol de inositol por monómero.

Este tipo de dominio hidrofóbico glicolipídico ha sido detectado también en: AchE G2 de *Drosophila*, fosfatasa alcalina y 5'nucleotidasa de membrana (Low y Finean 1977), proteína Thy-1 (Campbell y col. 1981; Tse y col. 1985), una forma de N-CAM (He y cols., 1986), trehalasa, DAF (decay accelerating factor) involucrado en la protección de células por lisis por complemento (Davitz y col. 1986; Medof y col. 1986), VSG en *Trypanosoma* sp. de torrente sanguíneo (en los que se encontró también PI-PLC endógena que libera VSG soluble)(Holder 1983; Baltz y col. 1983; Ferguson y col. 1985), SG de *Leishmania* (Etges y col. 1986) y VSG de *Paramecium* (Capdeville y col. 1986).

La estructura del dominio hidrofóbico origina interrogantes acerca de su biosíntesis y significado fisiológico (revisado por Low y cols., 1986). Es posible que el precursor contenga un péptido hidrofóbico C-terminal como lo sugiere la secuencia peptídica deducida del ADNc en el caso de la VSG de *Trypanosoma*, que se intercambiaría por glicolípido durante su procesamiento. (Haas y col 1986).

De operar un mecanismo similar para AchE, la persistencia de tal anclaje peptídico hidrofóbico en algunas moléculas explicaría las

fracciones de AChE unida a membrana no solubilizable por PI-PLC descriptas en algunos tejidos.

Formas G4 con subunidad hidrofóbica:

El anclaje de las formas G4 anfifílicas de AChE parece ser diferente al descrito anteriormente para G2 anfifílicas, en base a lo demostrado por Rosenberry y col. La forma G4 de núcleo caudado bovino posee una subunidad no catalítica pequeña (20 kDa) que está unida por puentes disulfuro a dos de las subunidades catalíticas, formando un dímero "pesado". En la forma tetramérica, este dímero pesado está unido a un dímero liviano por interacciones cuaternarias. La naturaleza química de la subunidad de 20 kDa aún no se conoce (Inestrosa y col. 1987). La estructura propuesta para G4 anfifílica se muestra esquemáticamente en la Figura 6.

Artefactos de solubilización. Modificación de formas solubilizadas:

En general, la actividad de AChE y ChE es extremadamente estable tanto en tejidos como en extractos, siendo las características y proporciones de FM aparentemente más estables en el tejido intacto (Atack y col. 1986; Massoulie y Toutant 1988).

Las condiciones de extracción son críticas para la composición de los extractos. Se ha encontrado que las extracciones repetidas aumentaron el rendimiento de G1 en buffer de baja fuerza iónica, aparentemente a expensas de G4 soluble en detergente (Grassi y col. 1982).

Una vez solubilizadas, las FM pueden sufrir diferentes modificaciones. Por ejemplo, la proteólisis endógena disocia formas A y cliva el dominio hidrofóbico de las formas G anfifílicas produciendo formas G hidrofílicas (Vigny y col. 1979; Allemand y col. 1981; Landauer y col. 1984).

Otro tipo de modificación es la generación de formas más pesadas a partir de las livianas, ya sea durante el almacenamiento de las muestras o por agregación al quitar el detergente (Grassi y col. 1982; Landauer y col. 1984).

Actividad catalítica e interacciones hidrofóbicas:

Para la G2 de eritrocitos humanos se ha encontrado que el mantenimiento de la actividad catalítica depende de un entorno anfifílico (Wiedmer y cols. 1979, Di Francesco y cols. 1981). Tal entorno puede ser proporcionado in vitro por detergentes no desnaturalizantes, proteínas como la albúmina de suero bovino o por la misma AChE en forma de agregados hidrofóbicos. El mismo comportamiento se ha observado para la G1 obtenida por reducción de G2 nativa y G4 de GCS de rata.

También los detergentes pueden inhibir la actividad de AChE en condiciones que no parecen reflejar interacciones hidrofóbicas. Birman (1985) mostró que el DDC y en menor medida el colato inactivan la AChE de *Torpedo*, tanto la hidrofílica como la hidrofóbica, pero no inactivan la AChE de *Electrophorus*. Esta última se encontró inhibible reversiblemente por elevadas concentraciones de Triton X-100, efecto que fue explicado por Miller (1979) como debido a la unión de 2 micelas de Triton X-100 por subunidad catalítica.

Estabilidad térmica:

Se ha encontrado que AchE y ChE se comportan de manera diferente frente al incremento de temperatura (Vigny y cols. 1978; Edwards y Brimijoin 1983; Pavlic 1988), siendo la AchE más sensible a temperaturas relativamente bajas (reducción de 40-50% de la actividad a 45°C). A 50-55°C ambas enzimas se inactivan, aunque para ganglio cervical superior de rata se ha demostrado que la estabilidad de ChE se ve modificada por la presencia de Mg^{2+} (Vigny y cols. 1978).

Inmunorreactividad cruzada entre AchE y ChE:

A pesar del elevado grado de homología que sugieren su polimorfismo estructural paralelo y las secuencias peptídicas disponibles (ver más adelante), no se ha encontrado inmunorreactividad cruzada entre AchE y ChE con antisueros policlonales en: *Torpedo* (Toutant y col 1985), rata (Vigny y cols. 1978), pollo (Rotundo 1984b) y hombre (Gennari y Brodbeck 1985; Sorensen y cols. 1986); ni con anticuerpos monoclonales en *Torpedo* (Musset y cols. 1987), rata (Rackonczay y Brimijoin 1986), hombre (Brimijoin y cols. 1983), conejo (Mintz y Brimijoin 1985b) y pollo (Rotundo 1984b).

Variabilidad de las subunidades catalíticas:

Las propiedades hidrodinámicas de formas homólogas de AchE y ChE son similares en peces, reptiles y mamíferos; indicando que las subunidades catalíticas de estas enzimas son de PM comparable.

En contraste, las características de sedimentación de estas enzimas en pollo, y de AchE en codorniz y paloma sugiere que el PM en aves es considerablemente mayor (Silman y cols. 1979; Rotundo 1984a; Chatonnet y Bacon 1983).

Los PM aparentes de AchE y ChE han sido analizados por SDS-PAGE en algunas especies, aunque los valores obtenidos deben ser considerados con precaución ya que son glicoproteínas y una fracción significativa de su PM se debe a carbohidratos: 15% para AchE de *Electrophorus* (Bon y cols. 1976) y eritrocitos de mamíferos (Niday y cols. 1977); 25% para ChE de suero humano. (Lockridge y col. 87).

Los PM de las subunidades catalíticas de AchE de *Electrophorus*, rata, conejo, buey y humano estan entre 70 y 80 kDa (revisado por Massoulie y Toutant, 1988).

En el caso del pollo, Rotundo (1984) encontró que la AchE de cerebro tiene 2 subunidades catalíticas de 100-105 y 98-108 kDa. Una digestión triptica limitada convierte la AchE de aves en moléculas que sedimentan como sus homólogos de mamíferos (Allemand 1981), reduciendo su masa en un 30%, sin modificar sus propiedades catalíticas ni sus interacciones moleculares. Parece probable que las subunidades catalíticas de las colinesterasas de aves sean homólogas a las de los otros vertebrados, pero posean un dominio peptídico adicional y prescindible.

Estudios moleculares de AchE y ChE:

a- Caracterización de los ARNm de AchE y sus productos de traducción:

Varios estudios (Soreq y col. 1982, 1983, 1984; Meedel y Whittaker 1983; Sikorav y col. 1984; Méndez y col. 1984) demostraron la multiplicidad de especies de ARNm que codifican para las subunidades catalíticas de AchE.

Cuando se tradujo *in vitro* ARNm de o.e. y se analizaron los precursores de las subunidades catalíticas sintetizados por inmunoprecipitación con antisueros a-AchE y posterior SDS-PAGE; se encontró la presencia de un único precursor de 65 kDa en *Electrophorus* y múltiples precursores en los Torpedinidos: 60 y 62 kDa en *Discopyge tschudii* (Mendez y cols. 1984) y 61 y 65 kDa en *Torpedo marmorata* (Sikorav y cols 1984). Como los o.e. de *Electrophorus* contienen casi exclusivamente formas A de AchE y los de los Torpedinidos contienen cantidades comparables de formas A y G, es tentador suponer que la presencia de 2 formas en las últimas especies se correlaciona con la existencia de múltiples precursores. Esta posibilidad se considera altamente probable ya que las subunidades de las formas A y G difieren en sus PM, estas diferencias no son abolidas por deglicosilación y difieren en algunos péptidos generados por digestión proteolítica; por lo que no parecen derivar unas de otras por modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación o clivaje.

b- Caracterización de clones de ADNc de AchE:

Se han caracterizado plásmidos recombinantes conteniendo inserciones de ADNc correspondientes a ARMn de AchE. En el caso de *T. californica* (Schumacher y cols. 1986) el ADN plasmídico se hibridizó con sondas oligonucleotídicas construidas a partir de la secuencia de aminoácidos de las subunidades catalíticas de AchE de *Torpedo* (MacPhee-Quigley y cols 1985). Soreq y cols identificaron un clon de ADNc de colinesterasa humana (Prody y cols. 1987) usando una sonda construida a partir de la secuencia de BuchE humana determinada químicamente.

Análisis por Southern blots con fragmentos de restricción genómicos sugirieron la existencia de un gen de AchE único en *Torpedo* (Sikorav y cols 1987). Considerando la identidad en las secuencias peptídicas N-terminales, las diferencias entre subunidades catalíticas de formas A y G probablemente reside en los extremos C-terminales de las proteínas, y podría generarse por splicing alternativo de un transcripto primario.

Por Northern blot de ARNm de o.e. de *Torpedo*, se encontraron varios transcriptos diferentes (Sikorav y cols. 1985; Schumacher y Cols. 1986a); aunque hasta el momento no es posible atribuir estos transcriptos a diferentes subunidades catalíticas, existen evidencias de que corresponderían a ARNm maduros y no serían precursores nucleares.

c- Estructura primaria de las colinesterasas:

La secuencia de 6 aminoácidos que contiene la serina del sitio activo de las colinesterasas (Phe-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly) está altamente conservada, inclusive un segmento de 30 aminoácidos que

contiene este péptido se conserva en variantes alélicas de BuChE humana en las cuales la actividad catalítica está modificada o suprimida (Lockridge y La Du 1986).

Las secuencias N-terminales fueron determinadas para AchE de o.e. de *Torpedo* (MacPhee Quigley y cols.1985; Bon y cols. 1986), cerebro bovino (Bon y cols. 1986) y eritrocitos humanos (Haas y Rosenberry 1985). Asimismo se determinó la estructura primaria completa de BuChE de suero humano (Lockridge 1984; Lockridge y cols. 1987). Todas las secuencias N-terminales analizadas presentan un elevado grado de homología, que inclusive se manifiesta entre todas las formas de AchE de *Torpedo* analizadas (incluyendo las formas G2 anfifílicas LSS y DS y las formas asimétricas) (MacPhee-Quigley 1985; Bon y cols. 1986)

Análisis más recientes de las secuencias de ADNc han aportado elementos relevantes al conocimiento de la estructura primaria de AchE. El residuo N-terminal de la subunidad catalítica madura de AchE de *Torpedo* está precedido por una secuencia hidrofóbica, que correspondería al péptido señal que es removido durante el procesamiento de la enzima (Sikorav y cols.1987). La estructura primaria de esta enzima presenta un grado considerable de homología con la BuChE humana (Lockridge y cols 1987), y la de AchE de *Drosophila* (Hall y Spierer 1986). Resulta interesante señalar que estas colinesterasas probablemente correspondan a tres formas enzimáticas diferentes: Las secuencias de *Torpedo* corresponderían a la subunidad catalítica de formas A; la secuencia de BuChE humana representa una enzima G4 soluble y la AchE de *Drosophila* sería una forma G2 anclada a través de glicolípido.

Por otra parte, las colinesterasas de vertebrados parecen estar más relacionadas entre sí que con la AchE de *Drosophila*, que entre otras diferencias, contiene dos inserciones. Suponiendo que estas no sean inserciones secundarias sino que sean evolutivamente significativas, esto sugiere que la divergencia entre AchE y BuchE de vertebrados ocurrió en el linaje deuterostomiado, quizás simultáneamente con la emergencia de los vertebrados. Asimismo parece probable que ambas enzimas deriven de una colinesterasa ancestral que también poseía formas A, ya que estas estructuras se han encontrado sólo en vertebrados.

Homología entre colinesterasas y tiroglobulina:

La secuencia del dominio C-terminal de la tiroglobulina de mamíferos presenta una clara homología con AchE (Schumacher y cols. 1986). Esta homología conserva el perfil de hidropatía, así como los residuos de cisteína involucrados en las uniones intra-subunidades, y por lo tanto parece mantener el plegado terciario de la proteína, pero no se conservan ni el sitio catalítico de la enzima ni los sitios hormonogénicos.

La homología con tiroglobulina es mayor con colinesterasas de vertebrados que con AchE de *Drosophila*, lo que sugiere que el dominio C-terminal de la tiroglobulina evolucionó de una proteína tipo colinesterasa después de la divergencia entre insectos y vertebrados.

El mantenimiento de esta homología, particularmente en el plegado, origina interrogantes acerca de su posible significado funcional. Sikorav y cols. (1987) postulan que podría estar

involucrado en interacciones proteína-proteína específicas, probablemente con componentes unidos a membranas.

Por otra parte, no se encontraron homologías entre las colinesterasas y las proteasas de serina, aparte de una secuencia peptídica corta que contiene la serina del sitio activo.

DISTRIBUCION TISULAR DE AchE y ChE

-Consideraciones generales:

En las especies en que ha sido analizado en detalle (aves de corral, *Torpedo*), se encontró que cada órgano presenta un patrón definido de formas moleculares de AchE y ChE. (Lyles y cols. 1982; Toutant y Massoulie 1985).

Las formas globulares (G) de AchE y ChE son ubicuas; se encuentran en tejidos colinérgicos así como no-colinérgicos, donde podrían tener funciones diferentes a la hidrólisis de ésteres de colina. Por ejemplo, los eritrocitos contienen dímeros de AchE unidos a membrana (*Torpedo*, rata, humano, buey)(Toutant y Massoulie 1988). Se encuentran formas globulares de ChE (esencialmente G4) en el plasma de todos los vertebrados. En conejo, el plasma también contiene un elevado nivel de AchE G4. El plasma de *Torpedo* contiene AchE G2 y ChE G4.(Massoulie y col. 1984).

En contraste con las formas globulares, la presencia de las formas asimétricas (A) parece estar limitada al contexto de la transmisión colinérgica: aparecen en músculos, sistema nervioso central y nervios periféricos (Fernández y cols. 1979; Kasa y Rackonczay 1982a; Toutant y Massoulie 1988).

- Distribución Subcelular de colinesterasas:

Por su relevancia en el contexto de la transmisión colinérgica, la AchE ha sido ampliamente estudiada, principalmente en células musculares y nerviosas; a diferencia de la ChE.

Se han empleado diferentes estrategias, tanto a células mantenidas en cultivo, como *in vivo*.

Determinación de actividades enzimáticas endo- y ectocelulares:

La distinción entre la AchE celular externa e interna y su significado fisiológico fue establecida hace casi 3 décadas (Koelle 1957, Koelle 1959). Es posible evaluar la actividad de AchE externamente accesible (compartimiento ectocelular) mediante el monitoreo de la hidrólisis de un sustrato no permeante a través de la membrana plasmática, (e.g. acetiltiocolina) por células intactas y determinar la actividad total luego de la lisis por adición de Triton X-100. Este método fue aplicado a células musculares de ratón y aves en cultivo (Rotundo y Fambrough 1980, Rubin y col. 1985, Vallette y col. 1986). El compartimiento ectocelular corresponde a 40-60% de la actividad total de AchE, dependiendo de la edad del cultivo y del estadio de diferenciación.

Distribución de Formas Moleculares en los compartimientos endo- y ectocelulares:

El uso de inhibidores con diferente grado de permeabilidad permitió el análisis de los compartimientos endo- y ectocelulares (Lazar y Vigny 1980; Brockman y cols. 1982; Vallette y cols. 1986).

En células musculares *in vitro* (cultivos primarios de rata, codorniz, ratón, ganso y línea C2 de ratón)(Brockman y cols. 1982, 1984; Inestrosa y cols. 1982, 1985; Rotundo 1984a; Rubin y cols. 1985; Valette y cols. 1986) se encontró que las formas A12 y G4 son predominantemente ectocelulares, mientras que A8, G1 y G2 son esencialmente endocelulares; siendo la forma A12 ensamblada intracelularmente y luego externalizada (Rotundo 1984a).

Estudios similares de AchE en células musculares *in vivo* mostraron que en músculos inervados de rata adulta, la distribución es equivalente a la encontrada *in vitro*. Luego de la denervación, la cantidad de G1 intracelular se reduce rápidamente, y la G4 externa más lentamente (Collins y Younkin 1982). Esto sugeriría que la denervación resulta en principio en una reducción de la síntesis de AchE más que un aumento de su secreción, en contraste con observaciones de otros autores (Inestrosa y cols. 1977; Carter y Brimijoin 1981).

Biosíntesis y renovación de AchE.

Empleando células musculares en cultivo, Rotundo y Frambrough (1980a) estimaron la vida media de la AchE ectocelular, unida a membrana en 50 hs, y la de AchE intracelular en 2-3 hs.

Rotundo (1984) estudió el metabolismo de AchE marcada radiactivamente en células musculares de codorniz en cultivo mediante inmunoprecipitación y SDS-PAGE, obteniendo evidencias de que el 80% de las subunidades recién sintetizadas no adquieren actividad catalítica y son degradadas en 1 hora.

El método del marcado con isótopos pesados se usó para analizar el metabolismo de AChE en cultivos estacionarios de células T28 que contienen G1 intracelular y G4 unida a membranas (Lazar y Vigny 1980). Mediante un análisis cuantitativo asistido por computadora de los perfiles de sedimentación se estudió el reemplazo de las moléculas livianas preexistentes por moléculas pesadas recién sintetizadas. Las conclusiones más importantes acerca del destino metabólico de las moléculas de AChE catalíticamente activas fueron: 1) El retardo en la aparición de enzima marcada indicaba la existencia de precursores inactivos, de vida media de aproximadamente 30 minutos. 2) Las formas G1 se renovaban más rápidamente que las G4, con vidas medias de renovación de 5 y 40 horas respectivamente, y ambas formas presentaban múltiples compartimientos metabólicos. 3) Las moléculas pesadas (G4) se secretaban al medio de cultivo con un retardo de 3 horas aproximadamente.

La cinética de marcaje con isótopos pesados observada fue ajustada por diferentes modelos teóricos suponiendo compartimientos metabólicos de G1 dispuestos en cascada o en paralelo. Los dos modelos comparten las siguientes características: a) La forma G4 deriva de un pool de moléculas rápidamente renovables, probablemente G1. b) G1 presenta al menos pools diferentes, con vidas medias de 1, 5 y 10 hs. c) aproximadamente un 80% de las moléculas G1 recién sintetizadas son rápidamente degradadas y nunca alcanzan la superficie celular, ya sea como producto de secreción o como moléculas unidas a membranas. d) tanto G1 como una fracción de G4 parecen ser secretadas de un pool celular de G1.

De esta forma, como las células musculares en cultivo estudiadas por Rotundo, las células T28 producen una gran proporción de moléculas de AchE que no se ensamblan en tetrámeros activos y son rápidamente degradadas.

Brockman y cols. (1986) establecieron las relaciones metabólicas entre G1, G4 y A12 en miocitos de rata en cultivo, encontrando que la enzima activa recientemente sintetizada era en su mayor parte degradada, y que sólo una pequeña fracción de los monómeros G1 se ensamblaban en formas G4 y A12.

Transporte intracelular y secreción de AchE:

Recientemente, Rotundo (1984) monitoreó los diferentes estadios de transporte intracelular de AchE en cultivo de células musculares de codorniz determinando la unión a lectinas específicas a sus carbohidratos N-linked (que representan aproximadamente 20 kDa). Empleando ConA, WGA y RCA -que reconocen residuos de manosa, N-acetilglucosamina y galactosa, respectivamente, y aprovechando que se conoce el sitio subcelular de adición de cada residuo, encontró que:

a- las formas extracelulares unen a las tres lectinas, indicando que contienen cadenas de hidratos de carbono complejos y totalmente maduros.

b- al inhibir irreversiblemente la AchE preexistente con DFP, se encontró que todas las moléculas recién sintetizadas unian ConA, pero la unión a WGA aparecía gradualmente y sólo para una fracción de la enzima, y la unión a RCA apareció después de 1 hora. El mismo retardo se encontró para la aparición de

resistencia a endoglicosidasa H (que refleja la remoción de 2 residuos de manosa terminales del core de manosa).

c- los análisis de sedimentación mostraron que las formas G eran sintetizadas inmediatamente, mientras que las formas A aparecían con un retardo de 1 hora. Después de 2 horas, las formas G1, G2 y G4 eran sólo parcialmente unidas por WGA, indicando que la polimerización de las subunidades tiene lugar antes de que las moléculas alcancen el aparato de Golgi. En contraste, las formas A eran reconocidas en su totalidad por WGA y sólo parcialmente por RCA, indicando claramente que su sitio de ensamblaje se localiza en elementos distales del aparato de Golgi.

La Figura 7 muestra la relación biosintética hipotética entre las formas moleculares de AchE propuesta por Toutant y Massoulie (1988b) que incorpora las características derivadas de estudios de Rotundo (1982, 1984, 1988, 1989) en cultivos primarios de células musculares de aves en cultivo; de Lazar y col (1984) en una línea neural de ratón y de Brockman y col (1986) en cultivos primarios de músculo de ratón.

Las características más importantes son:

- Se supone que una fracción importante de la enzima sintetizada es degradada, ya sea como precursor inactivo o como monómero intracelular.

Los monómeros G1 y probablemente también los dímeros G2 y tetrameros G4; comprenden varios pools metabólicos que podrían corresponder a diferentes destinos.

La secreción de AchE se ha demostrado en células musculares y nerviosas tanto *in vitro* como *in situ*, y es estimulada por actividad celular espontánea o evocada (Greenfield y cols., 1983). La secreción de AchE posiblemente involucra exocitosis de vesículas intracelulares (Kása y Rackonczay, 1982). Rotundo y Frambrough (1980) y Lucas y Kreutzberger (1985) mostraron que la tunicamicina reduce la secreción de AchE así como la actividad de AchE intracelular, sugiriendo que uno o varios de los pasos de transporte intracelular previos a la secreción requiere la adición de azúcares específicos. Si bien la colchicina bloquea la secreción, la citochalasin B no tiene efectos; por lo que se ha sugerido que la tubulina, y no la actina, está involucrada en el proceso de secreción, probablemente mediante la regulación de la motilidad de las vesículas exocíticas por microtúbulos (Rotundo y Frambrough 1982; Lucas y Kreutzberger, 1985).

Según las evidencias hasta ahora disponibles, la AchE parece seguir la vía clásica: RER - aparato de Golgi-cis - aparato de Golgi-trans - vesículas de Golgi - exocitosis. (revisado por Toutant y Massoulie, 1988).

Sin embargo, algunos de los aspectos del procesamiento de las formas unidas a membrana y secretadas aún no se han esclarecido. Así, aún no se conoce el modo de adición del anclaje glicolipídico en el extremo C-terminal de subunidades solubles, aunque como se mencionó previamente, podría reemplazar un péptido terminal hidrofóbico. Tampoco se ha esclarecido la estructura de la subunidad hidrofóbica no catalítica de las formas G4

anfifilicas, ni el sitio subcelular en que ésta se adiciona a las especies solubles.

Funciones no-colinérgicas de las colinesterasas:

Tejidos adultos: nuevos sustratos para las colinesterasas.

La presencia de las colinesterasas en tejidos no-colinérgicos ha llevado a que se sugiera que podrían estar involucradas en funciones no relacionadas a la transmisión colinérgica. En tejidos no nerviosos, se ha sugerido que la AchE podría estar involucrada en la regulación de la permeabilidad de la membrana en eritrocitos y la barrera hemato-encefálica, y en la motilidad de los espermatozoides (Silver 1974; Greenfield 1984; Chubb 1984). La BuchE del suero podría actuar en el control del metabolismo de lipoproteínas en mamíferos adultos (Kutty 1980) y en particular en la formación de LDL (low-density lipoproteins) (Kutty 1977).

Inclusive en tejido nervioso, la distribución de las colinesterasas no está restringida a regiones colinérgicas, como se evidencia por las discrepancias entre la distribución regional de AchE y ChAT (colina-acetil-transferasa) (Graybiel y Ragsdale, 1982; Kimura y cols., 1981). AchE es detectada intracelularmente en neuronas noradrenergicas de la sustancia nigra (Henderson y Greenfield, 1984) y del locus coeruleus donde coexiste con BuchE (Sket y Pavlin, 1985) y en neuronas serotoninérgicas del rafe (Mizukawa y cols., 1986). Greenfield y cols. (1983) mostraron que la sustancia nigra, región típicamente dopaminérgica, secreta activamente AchE y dopamina al ser estimulada eléctricamente o

despolarizada. La enzima también es secretada de las dendritas de las células nigroestriatales y podría actuar como neurotransmisor (Greenfield y cols., 1981) o bien ajustando la sensibilidad de estas células a neurotransmisores diferentes de la Ach, por ejemplo hidrolizando péptidos neuroactivos (Greenfield 1985; Chubb y Borstein, 1985).

La posibilidad de que las colinesterasas pudieran actuar sobre otros sustratos, además de la acetilcolina, ha sido considerada. Parece poco probable que tales sustratos sean homólogos superiores de ACh, excepto quizás en unos pocos tejidos (bazo bovino, glándulas hipobraquiales de algunos moluscos) donde estos existen (Whittaker 1963).

En 1975 Moore y Hess reportaron para AchE una actividad de amidasa, y George y Balasubramanian (1980,1981) demostraron que tanto la AchE de eritrocitos humanos como la BuchE del suero manifestaban esta actividad.

Preparaciones extensivamente purificadas de AchE y BuchE hidrolizan sustancia P (SP) (Chubb y cols. 1980; Lockridge 1982), aunque las uniones peptídicas hidrolizadas por las dos enzimas son diferentes (Lockridge 1982). Además, AchE también hidroliza encefalinas (Chubb y cols. 1980). El sitio esterático es diferente del sitio peptidásico tanto para AchE como para BuchE (Chubb y cols. 1980; Chatonnet y Masson, 1984) a juzgar por sus diferentes sensibilidades a DFP. Recientemente Chatonnet y Masson (1986) encontraron un incremento de la hidrólisis de SP en suero humano de mutantes "silenciosos" atípicos de BuchE, lo que sugiere que el alelo silencioso que no tiene actividad esterática, podría poseer actividad peptidásica.

De cualquier forma, debe considerarse que el o los sustratos naturales de la actividad de peptidasa asociada a colinesterasas, si existe, no ha sido aún identificado. La presencia de estas enzimas en tejidos no colinérgicos del sistema nervioso central se justificaría si estas participaran en la inactivación de péptidos neurotransmisores.

Colinesterasas "embrionarias": función colinérgica en ausencia de inervación?

Se han detectado actividades de AchE y BuchE en muchos tipos celulares en estadios tempranos del desarrollo embrionario. Durante la diferenciación de miembros en aves, se han encontrado actividad de AchE en células ectodérmicas del esbozo del miembro así como en el mesénquima subyacente (Drews 1975). Tanto AchE como BuchE se detectaron en la lámina basal entre ambos tejidos (Falugi y Raineri 1985) y en el núcleo condrogénico (Schroder 1980). Esta actividad de colinesterasa (denominada embrionaria) desaparece de las células al diferenciarse éstas y es independiente de la inervación.

En el sistema nervioso en desarrollo, AchE y BuchE están ampliamente distribuidas y muchas células que carecen de actividad en el adulto, contienen la enzima en algún estadio del desarrollo (Silver 1971). La formación de las sinapsis tálamo-corticales -especialmente en la corteza visual- coincide espacial y temporalmente con la presencia transitoria de Actividad de AchE en los terminales aferentes (Robertson y Mostamand 1988).

Layer (1983) considera que la expresión de AchE es un evento temprano de diferenciación en todo el cerebro. Basándose en

observaciones de un gradiente inverso de AchE y BuchE en la retina de embriones de aves durante la morfogénesis, sugirió que tal distribución de las colinesterasas podría contener la información necesaria para la organización de células retinales en desarrollo (Layer y cols. 1985).

Drews y cols. sugirieron que esta actividad "embrionaria" es parte de un sistema muscarínico primitivo ya que receptores de acetilcolina de tipo muscarínico (Schmidt 1981) y colina acetiltransferasa (Reich y Drews 1983) también son expresados en miembros durante el desarrollo embrionario. Mediante la estimulación por ACh o ligandos muscarínicos la célula embrionaria podría responder con movilización del calcio intracelular el cual podría regular movimientos celulares y quizás migraciones de las células. De esta forma, las colinesterasas embriónicas podrían manifestar una función colinérgica "transitoria" en la regulación de los eventos morfogenéticos, independientemente de la inervación colinérgica.

Que interrogantes plantea el conocimiento actual de la Biología de las Colinesterasas?

Como se reseñó en las Secciones precedentes, actualmente se cuenta con un considerable cúmulo de información acerca de la diversidad molecular de las colinesterasas, en particular de AchE. Asimismo, las poderosas técnicas de la Biología Molecular están siendo empleadas para estudiar el grado en que la diversidad genética y los fenómenos de splicing alternativo de mRNA contribuyen a tal diversidad.

Existen evidencias de que un número creciente de las variantes de las colinesterasas se originan por eventos post-traduccionales (entre los que se cuentan para AchE: oligomerización, glicosilación, adición de anclaje glicolipídico o subunidad hidrofóbica).

Sin embargo, los fenómenos celulares que regulan la distribución de las colinesterasas aún están prácticamente inexplorados.

Considerando las estructuras cuaternarias de las formas moleculares de AchE, resulta tentador imaginar que las subunidades catalíticas son progresivamente ensambladas a dímeros y tetrámeros, los cuales podrían asociarse a dominios colagénicos para producir las formas asimétricas. Aunque esto es básicamente cierto, la situación real es más compleja. Es necesario enfatizar que ninguno de estos pasos ha podido ser reproducido experimentalmente *in vitro*, sólo ha sido factible producir disociación de formas complejas a formas más simples.

La biosíntesis de AChE parece ser extremadamente antieconómica ("wasteful"), a juzgar por la considerable degradación de las moléculas recién sintetizadas. Se ha demostrado la existencia de múltiples compartimientos metabólicos, que podrían corresponder a múltiples compartimientos subcelulares, o a moléculas bioquímicamente diferentes, o ambas. Sin embargo se debe recalcar que los estudios en que se realizaron estas observaciones son sistemas experimentales de características particulares (cultivos celulares) derivados en su mayoría de células de aves, que como se mencionó, presentan diferencias en el tamaño de las subunidades catalíticas de AChE respecto al resto de los vertebrados, ignorándose hasta el momento en que medida tales diferencias influyen sobre los eventos post-traduccionales.

ChE presenta un grado considerable de homología con AChE y el polimorfismo estructural paralelo de ambas enzimas sugiere que podrían estar sujetas a eventos regulatorios similares.

embargo, la ChE ha sido menos estudiada, posiblemente por la imposibilidad de adscribirle un papel funcional en algún tipo celular. Contar con un sistema experimental donde se expresen ambas enzimas (AChE y ChE) permitiría además evaluar de qué forma regulan los diferentes destinos, dado sus notable similitudes en estructura molecular.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los interrogantes que se propone resolver el proyecto de investigación cuyos resultados se exponen en esta Tesis son los siguientes:

Es la corteza cerebral de rata durante el desarrollo un sistema adecuado para el estudio simultáneo de la distribución subcelular y asociación a membranas de AchE y ChE?

b- En el caso de hígado de rata, para el cual se ha descrito actividad de colinesterasa, puede dicha actividad atribuirse a AchE y/o ChE, en base a las especificidades de sustrato, sensibilidad a inhibidores y estabilidad térmica descriptos para AchE y ChE de otros orígenes? De ser así, cual es la distribución subcelular de AchE y ChE en hígado de rata?

c- Cuales son las propiedades de solubilidad de AchE y ChE en estos tejidos, de acuerdo a las rutinas metodológicas más comunmente empleadas en la determinación de grado de asociación de proteínas a membranas biológicas? Cuales son los factores operativos más relevantes que condicionan la extractabilidad de estas enzimas?

d- Teniendo en cuenta el polimorfismo estructural de AchE y ChE, es la solubilidad diferencial atribuible a diferencias en el grado de ensamblaje?

e- Considerando que para AChE de otros orígenes se han descrito variantes que difieren en grado de hidrofobicidad (especies anfifílicas y no anfifílicas), cuales son las propiedades de interacción con detergentes no iónicos y fosfolípidos de AChE y ChE en estos tejidos?

La respuesta a estos interrogantes permitirá evaluar si la solubilidad diferencial de AChE y ChE en estos tejidos se correlaciona con su grado de ensamblaje y/o grado de hidrofobicidad.

Asimismo se propone evaluar si alguno de estos tejidos presenta características que permitan abordar estudios simultáneos de AChE y ChE, con vistas a estudiar la síntesis, ensamblaje, señalización molecular y transporte intracelular de estas proteínas.

FIGURA 1

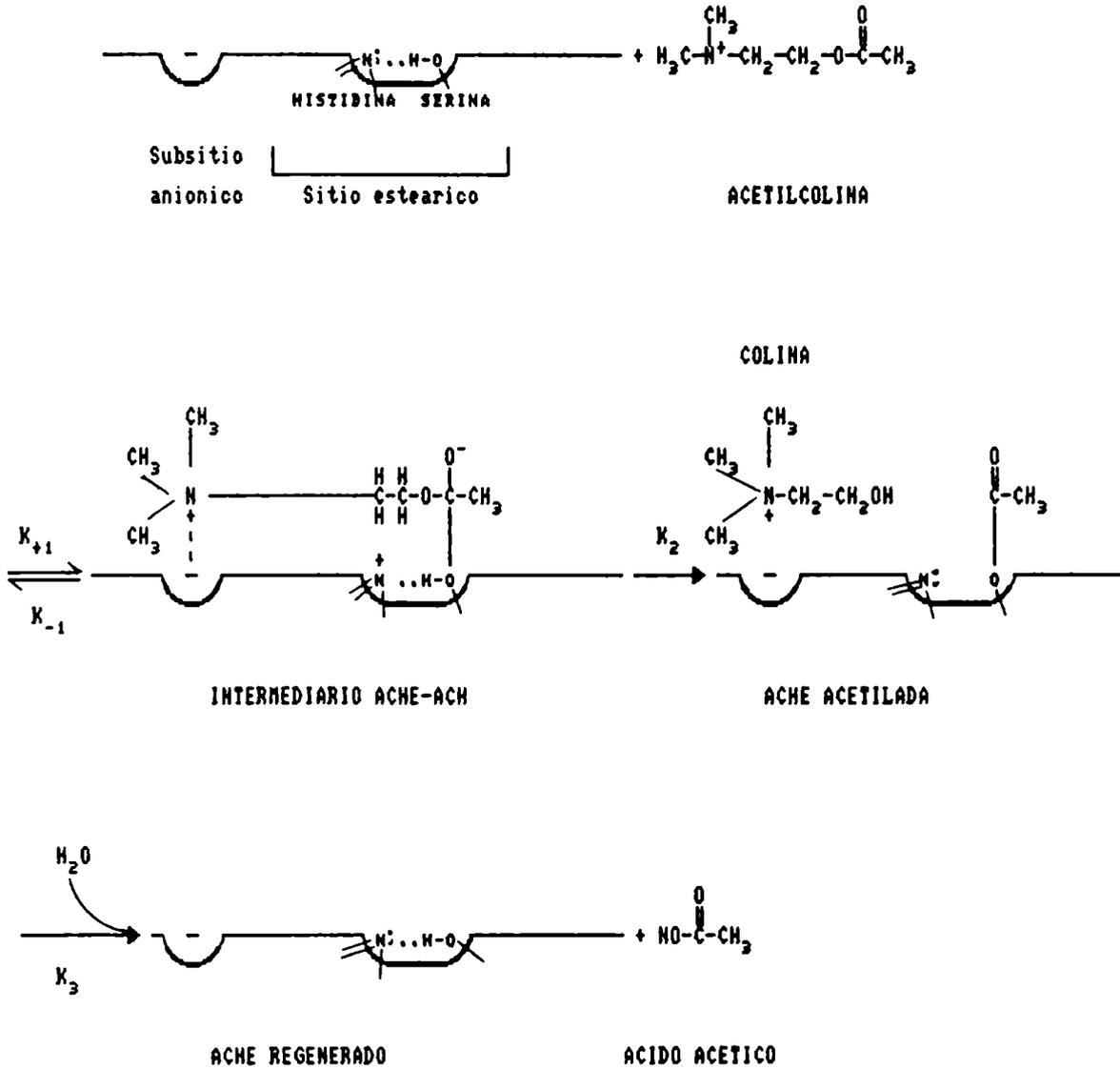


Figura 2

Características Generales de AChE y ChE

	AChE	ChE
Composicion	GLICOPROTEINAS	
Sitio activo (1 sitio por subunidad catalitica)	subsitio anionico mas subsitio esteratico de serina.	
Mecanismo de hidrolisis	ACILACION-DESACILACION	
PM. subunidad catalitica	aproximadamente 80.000 DALTONS	
Asociaciones cuaternarias (ver Figura B)	SI PRESENTAN	
Sustratos preferenciales	ACh	ACh, BuCh y esteres superiores de colina.
Inhibicion por sustrato	> 10 ⁻³ M	no presenta
Inactivacion termica	> 45 °C	> 55 °C
Inmunoreactividad cruzada	no se ha detectado aun reactividad cruzada entre ambas enzimas*	
Inhibidores selectivos	BW 62C47	Ethopropazine
Inhibidores comunes a ambas	Eserina DFP**	

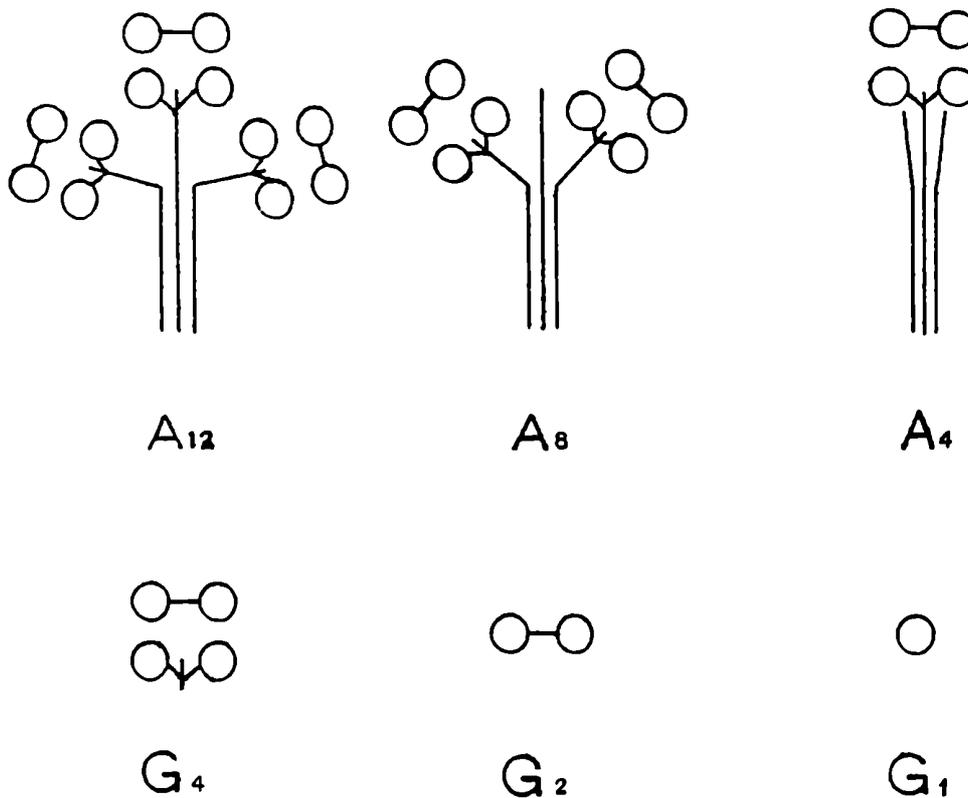
* los antisueros policlonales utilizados fueron de:Torpedo (Toutant y col.,1985); rata(Vigny y col., 1978), ave (Rotundo, 1984b); los anticuerpos monoclonales de:Torpedo (Muset y col., 1987); rata (Rackonczay, 1986), conejo (Mintz y Brimijoin, 1985), ave (Rotundo, 1984b).

** la velocidad de inactivacion de la ChE en presencia de DFP es considerablemente mayor (Lockridge y col., 1987)

Los datos para confeccionar esta tabla se tomaron de las revisiones de Toutant y Massoulie (1988)

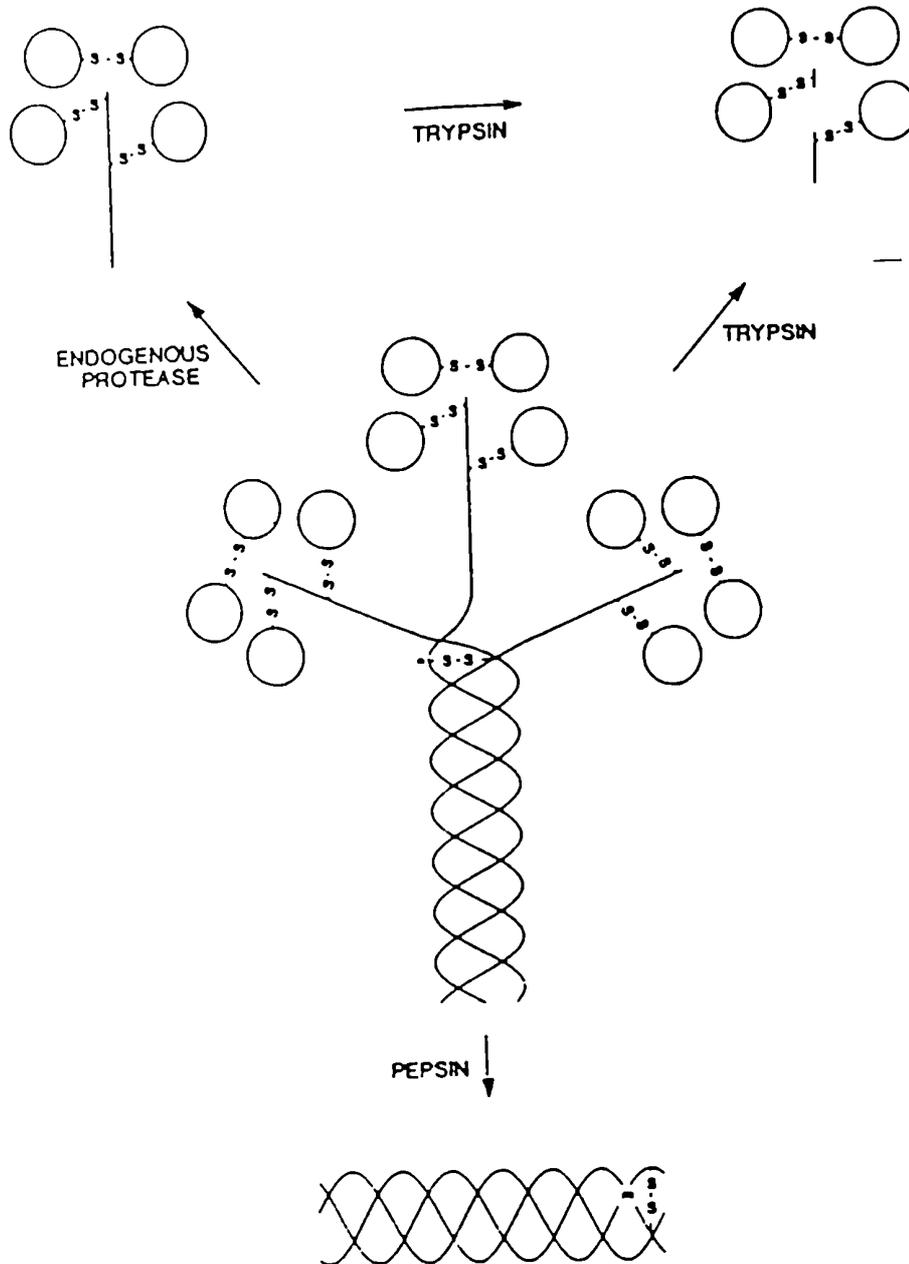
Figura 3

DIAGRAMA DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LAS FORMAS ASIMÉTRICAS Y DE LAS FORMAS GLOBULARES DE LAS COLINESTERASAS



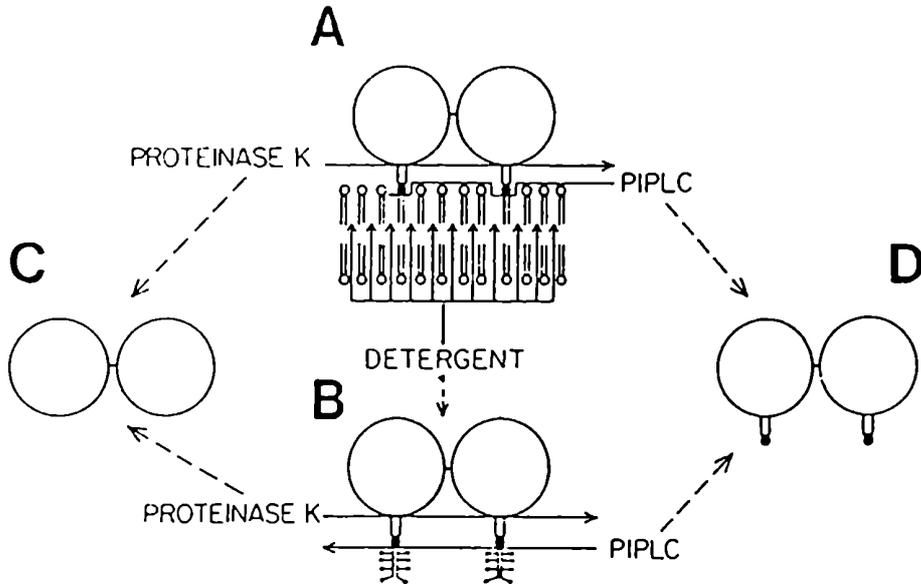
La línea triple representa la estructura no-catalítica tipo colágeno; los círculos representan las subunidades catalíticas. Las barras que unen las subunidades catalíticas entre sí o con la subunidad no-catalítica representan puentes disulfuro. Diagrama sacado de Massoulié Bon (1982).

Figura 4

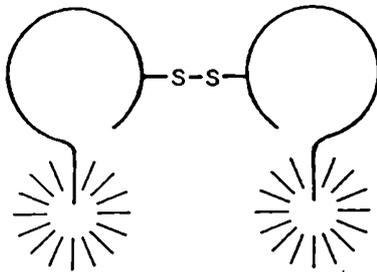


Arreglo de las subunidades catalíticas de la forma A12 de AChE de órgano eléctrico de *Electrophorus* (tomado de Toutant y Massoulie, 1988)

Figura 5



B'



A'

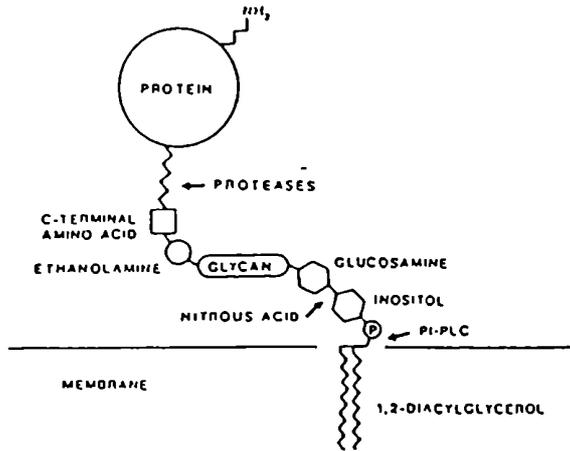


Figura 6

Representación esquemática de la estructura de la forma G₄ de cerebro de buey. (sacado de Massoulié y Toutant, 1988)

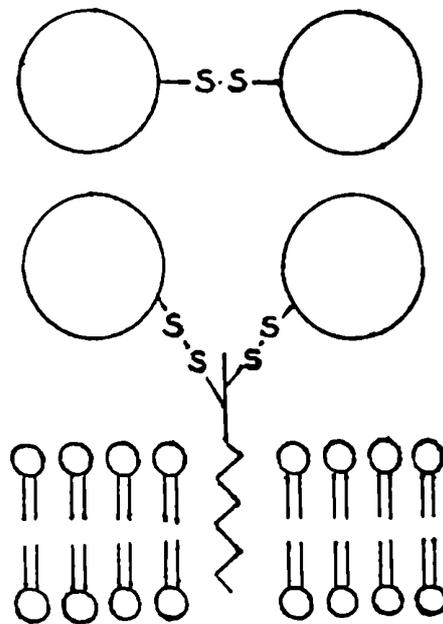


FIGURA 7

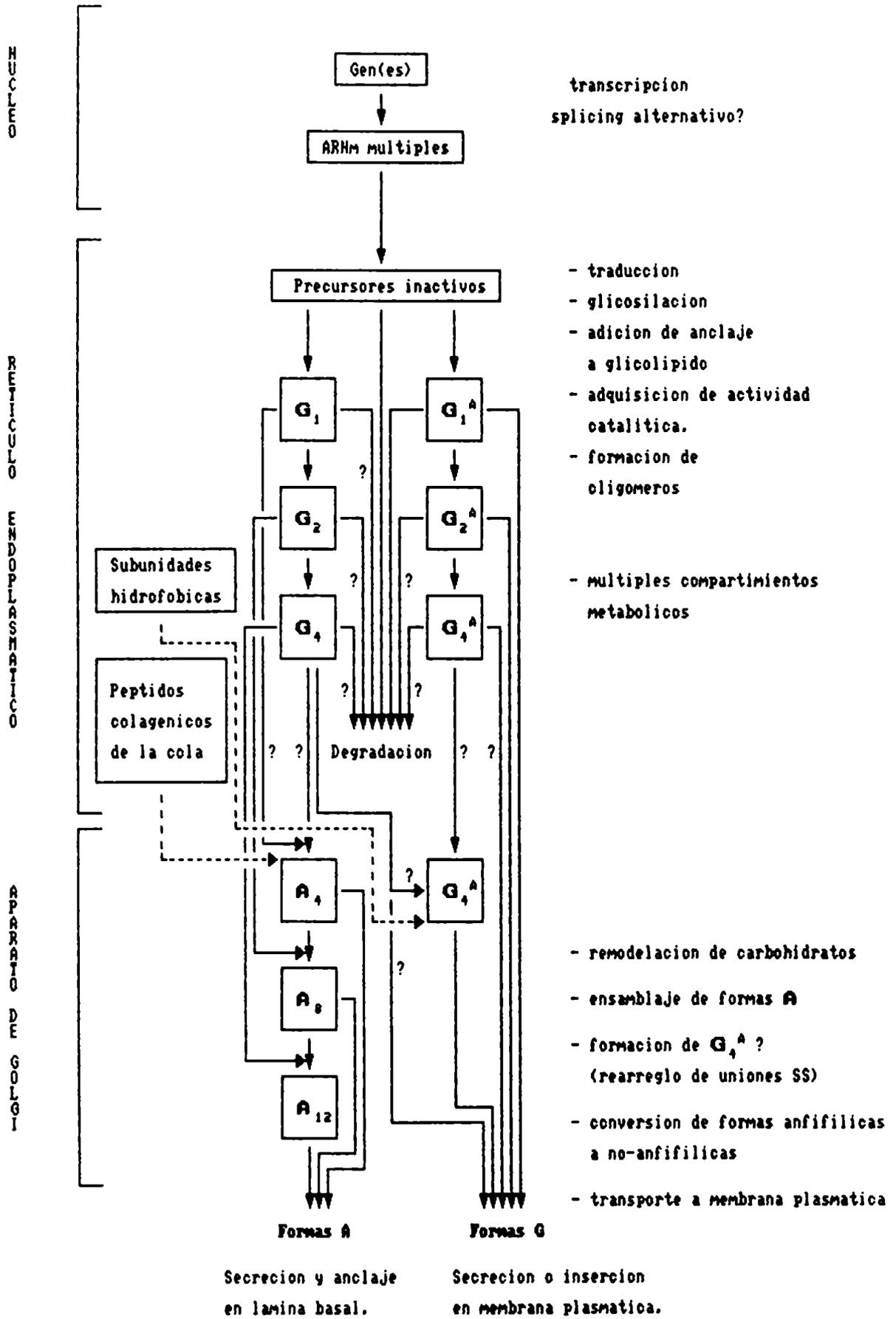


FIGURA 7

Relaciones biosintéticas hipotéticas entre las formas moleculares de AchE (tomado de Toutant y Massoulie 1988)

Este esquema incorpora las evidencias derivadas de los estudios de: Rotundo y Frambrough (1982) y Rotundo (1984a,b) en cultivos primarios de células musculares embrionarias de aves; de Lazar y cols. (1984) en una línea celular neural de ratón y de Brockman y cols. (1986) en cultivos primarios de células musculares en cultivo.

G : formas globulares

A : formas asimétricas

Los subíndices indican el número de subunidades catalíticas. Las formas globulares anfifílicas se indican como Gⁿ.

Para más detalles, véase el texto (Capítulo 1, "Transporte intracelular y secreción de AchE").

CAPITULO 2:

MATERIALES Y METODOS

2.1 ANIMALES Y EXTRACCION DE ORGANOS

Para la obtención de hígado se emplearon ratas de la cepa CHBBThom de 150-250 gr de peso, privadas de alimento durante 12-16 horas antes de su sacrificio. Se decapitaron con guillotina, y el hígado fue rápidamente perfundido *ex vivo* con NaCl 0.85% a través de la vena porta hasta que se blanqueó (aproximadamente 100-150 ml). El hígado fue cortado en trozos pequeños con bisturí a 0° previo a su homogenización.

Para la obtención de corteza cerebral se emplearon ratas de la cepa CHBBThom las cuales fueron sacrificadas con guillotina (adultas) o con tijeras (fetos y neonatas). En todos los casos se removió el cerebro y se lo colocó en solución fisiológica a 0°C. Su disección se realizó sobre hielo.

En el caso de los fetos se consideró día 0 de gestación el día de aparición de tapón mucoso en vagina. El día del nacimiento se consideró día 0 post-natal.

2.2 OBTENCION DE FRACCIONES DERIVADAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA

2.2.a Aislamiento simultáneo de cuerpos celulares de neuronas y sinaptosomas

Se realizó mediante la combinación del método de aislamiento de cuerpos celulares de neuronas descrito por Sellinger y col.(1971) con modificaciones tal como se describe en Berninsone y cols. (1989) con la técnica de Booth y Clark (1978) para la

purificación de sinaptosomas. Esta combinación permite obtener ambas preparaciones a partir del mismo material y se esquematiza en la Figura 8. Las cortezas cerebrales fueron disecadas e inmediatamente sumergidas en solución A" a 0°C (PVP 7.5%; BSA 0.5%; CaCl₂ 5 mM; sacarosa 0.1 M en buffer fosfato 5 mM pH 7). La suspensión fue pasada a presión a través de mallas de acero inoxidable de 330, 110 y 73 µm (3 veces por cada una). La suspensión final (20 mL de solución A" por corteza) fue sembrada sobre un gradiente de sacarosa (1.0 M, 1.25 M, 1.4 M, 1.65 M) el que fue centrifugado a 40000 x g durante 20 minutos en un rotor AH-627. Los pellets que contenían los cuerpos celulares de neuronas, fueron controlados por microscopía de contraste de fases, resuspendidos en una solución de sacarosa 0,25 M y centrifugados a 1000 x g durante 5 minutos. El lavado se repitió, los pellets finales fueron homogenizados en solución fisiológica u otras según se indicará, y conservados a -20°C hasta su ensayo. El material que se encontraba entre las capas de sacarosa 1.25 M/1.4 M y 1.4 M/1.65 M se colectó, suspendió en sacarosa 0.32 M y, previa homogenización, se sedimentó a 17000 x g durante 10 minutos. El sedimento fue sometido a separación isopícnica en gradientes discontinuos de Ficoll-sacarosa (ver Figura 8). El material recuperado en las interfases (Sy y My) fue recogido por aspiración, diluidas en sacarosa 0.25 M o solución fisiológica como se indicará en cada caso y lavadas por centrifugación a 100000 x g durante 1 hora (rotor Ti 865.1).

2.2.b Aislamiento de conos de crecimiento nervioso prenatales

Se realizó según el método descrito por Pfenninger y cols. (1983) modificado según se describe empleando fetos de 16-18 días de gestación, según se esquematiza en la Figura 9.

Se extrajo el cerebro de los fetos y se los homogenizó en 8 volúmenes de sacarosa 0,32 M, $MgCl_2$ 1 mM, HEPES 1 mM pH 7.4 en un homogenizador de teflon-vidrio. El homogenato resultante se centrifugó a 1600 g durante 15 minutos. El sobrenadante se cargó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (0.75 M; 1.0 M; 2.66 M) y se centrifugó a 242000 x g durante 40 minutos en un rotor vertical (TV-865). El material en las interfases A (carga/0.75M), B (0.75M/1M) y C (1M/2.66M) fue recogido, diluido con 10 volúmenes de sacarosa 0.32 M y centrifugada a 100000 x g durante 1 hora. Los pellets fueron resuspendidos en H_2O bidestilada y conservados a $-20^{\circ}C$.

2.3 OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES DE HIGADO DE RATA

2.3.a Fraccionamiento de microsomas

El hígado fue homogenizado (1:10, p/v) en sacarosa 0.25 M; tris-HCl 10 mM pH 7.4; EDTA 1 mM en un homogenizador teflon-vidrio (Potter-Elvehjem) a 500 rpm con 40 pases. Se centrifugó a 20000 x g durante 10 minutos (rotor SS34). El sobrenadante fue centrifugado a 37000 rpm (100000 x g) durante 1 hora (rotor T-865). Los precipitados (fracción microsomal) fueron resuspendidos en la solución de homogenización mediante 5 pases suaves en homogenizador Dounce en el caso de ser utilizados para ensayos de latencia, los cuales se realizaron inmediatamente. En el caso de ser utilizados para ensayos bioquímicos o lavados, fueron

homogenizados en teflon-vidrio en la solución correspondiente y conservados a -20°C .

2.3.b Fraccionamiento de RER y REL

Se realizó por la técnica descrita por Carey y Hirschberg (1980) como se representa esquemáticamente en la Figura 10.

2.3.c Fraccionamiento de aparato de Golgi

Se realizó por la técnica descrita por Leelavathi y col. (1970) según se esquematiza en la Figura 11.

2.3.d Fraccionamiento de membrana plasmática

Se realizó por la técnica de Hubbard y col. (1983) tal como se indica en la Figura 12.

2.4 OBTENCION DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS HUMANOS

Se purificaron membranas de eritrocitos humanos de acuerdo a la técnica descrita por L. Steck y A. Kant (1974) con ligeras modificaciones. Se extrajo sangre humana y se le agregó citrato de sodio 3.8% (1:10 v/v) como anticoagulante. En todos los casos la sangre así obtenida fue guardada a $0-4^{\circ}\text{C}$ y utilizada a las 24 horas de la extracción. Todos los pasos siguientes se realizaron también a $0-4^{\circ}\text{C}$. La sangre se centrifuga a 2300 gav por 10 minutos, se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 5 volúmenes de PBS (NaCl 150 mM, buffer fosfato 5mM, pH 8) y se vuelve a centrifugar a 2300 gav por 10 min. Se repite el lavado 2 veces más. El pellet del último lavado, eritrocitos empaquetados, se resuspende en 40 volúmenes de 5PB (buffer fosfato 5mM, pH 8) y

se mezcla rápidamente para lograr la hemólisis de los eritrocitos empaquetados. Se centrifuga a 22.000 gav durante 10 minutos y se descarta el sobrenadante. Se repite el lavado 3 veces. El pellet final se resuspendió (1:20 v/v) en 5PB y se centrifugó a 100.000 gav durante 1 hora. El pellet final, membranas de eritrocitos, fue sometido distintos procedimientos de extracción.

2.5 LAVADOS DE FRACCIONES

La eliminación de proteínas adsorbidas a las vesículas de fracciones microsomales y de RE se realizó según lo descrito por Autori y col (1975). Las fracciones fueron resuspendidas en tris-HCl 0.1 M pH 8 y centrifugadas a 100000 x g durante 1 hora.

La liberación de proteínas periféricas de membranas y del contenido de vesículas se realizó mediante un tratamiento alcalino (Fujiki y cols. 1982). Los sedimentos correspondientes a las diferentes fracciones se homogenizaron (1:10 p/v) en Na₂CO₃ 0.1 M pH 11.5, se dejó en hielo durante 30 min y se centrifugó a 100000 x g durante 1 hora.

2.6 OBTENCION DE EXTRACTOS

El tejido fue extraído, previa perfusión *ex vivo* como se describió e inmediatamente pesado y transferido a 0°C.

Las soluciones empleadas para la extracción de AChE y ChE (cuya composición se indicará en cada caso) contenían como inhibidores de proteasas: benzamidina 1 mM; EDTA 1 mM; leupeptina 1 µg/mL; aprotinina 2 µg/mL. Todos los pasos del procedimiento se realizaron entre 0 y 4° C.

Las homogeneizaciones se realizaron empleando un homogenizador teflon-vidrio mediante 100 pases a 500 rpm. Las centrifugaciones se realizaron a $100.000 \times g$ durante 1 hora a 4°C en un rotor T-865 Sorvall.

Los sobrenadantes obtenidos en cada paso de extracción fueron separados en alícuotas y conservados a -70°C hasta su análisis.

En el caso de extracciones secuenciales se emplearon las siguientes:

Secuencia de extracción A:

Se realizó según el procedimiento descrito inicialmente por Vigny (1976) con la modificación de que la extracción inicial con alta fuerza iónica fue repetida antes de la extracción en presencia de detergente (ver Figura 13).

Las soluciones usadas fueron:

HS: NaCl 1M en tris-HCl 10 mM pH 7

HST: Tritón X-100 1% en HS.

Secuencia de extracción B:

Se realizó según el esquema empleado para la solubilización secuencial de AchE y ChE de diferentes tejidos de *Torpedo* (Bon y col 1988) y de cabeza de *Drosophila* (Toutant y col 1988), que se muestra en la Figura 14.

Las soluciones usadas fueron;

LS: tris-HCl 10 mM pH 7

LST: LS con Tritón X-100 1%

HST: NaCl 1M , Tritón X-100 1% en LS)

2.7 CARACTERIZACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE AChE y ChE POR CENTRIFUGACION DE VELOCIDAD DE SEDIMENTACION

Centrifugación en gradientes de sacarosa:

Se usaron gradientes lineales de sacarosa de las siguientes características:

- 5-20% p/v
- 10-40% p/v
- 5-20% p/v con agregado de un colchón de sacarosa al 50% p/v para impedir la precipitación de agregados o restos de material particulado cuando se analizaron sobrenadantes de 20000 x g 20 minutos.

En todos los casos los gradientes se prepararon en solución HST, a excepción de algunos que se realizaron en HS según se indicará, con el fin de determinar si la ausencia de detergente inducía la agregación de las enzimas en estudio.

Las centrifugaciones se realizaron a 4°C en una ultracentrífuga Sorvall OB65 en dos condiciones diferentes:

- a- en rotor de cabezal oscilante (AH-627) a 27000 rpm (135.000 gmax) durante 17 horas.
- b- en rotor vertical (TV-865) a 55000 rpm (286.000 gmax) durante 2 horas 30 minutos para gradientes 5-20% con colchon, o 4 horas para gradientes 10-40% y 5-20%.

En cada corrida se incluyeron como marcadores de velocidad de sedimentación: fosfatasa alcalina (6.1 S) y B-galactosidasa (16 S) .

Los gradientes fueron fraccionados desde el fondo hacia la superficie. Las fracciones fueron conservadas a -20°C hasta ser ensayadas, según se describe más adelante.

2.8 ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se realizó según la técnica descrita por Toutant (1986).

Se emplearon geles planos (2 mm de espesor) de poliacrilamida 7.5% T, 2.6% C, que fueron corridos en una unidad de electroforesis horizontal (LKB Multiphor II).

Los geles y el buffer de corrida contenían 5×10^{-2} M tris-glicina pH 8.9 y tal como se indicará en cada caso, o bien ningún detergente o Tritón X100 al 0.5%.

Las muestras fueron preincubadas con el buffer de corrida (20 minutos a 20°C, dilución 1:1) antes de ser aplicadas al gel. Al final de la corrida (3 horas a 40 mA, a 20°C) los geles fueron enjuagados intensamente con buffer acetato 10^{-1} M pH 6.

La actividad de colinesterasas (AChE y ChE) fueron visualizadas por medio de una tinción específica directa (Karnovsky y Roots, 1964). La tiocolina liberada durante la reacción enzimática reduce el ferricianuro a ferrocianuro, combinándose éste con los iones Cu^{++} formando ferrocianuro de cobre insoluble (marrón). Los iones Cu^{++} del medio están complejados con citrato para prevenir la formación del ferricianuro de cobre.

La solución de tinción empleada contenía:

citrato de sodio	5 mM
sulfato de cobre	3 mM
ferricianuro de potasio	0.5 mM
butiriltiocolina	0.01 mM
en buffer acetato 65 mM pH 6	

2.9 SEPARACION DE FASES EN SOLUCIONES DE TRITON X-114.

El detergente no iónico Tritón X-114 se empleó en este caso para estudiar el carácter anfifílico de las colinesterasas en diferentes extractos.

Precondensación de Triton X-114 comercial:

Las soluciones stock empleadas en este trabajo fueron preparadas por precondensación de Triton X-114 comercial con el fin de eliminar las moléculas más hidrofílicas (Bordier, 1981).

Se preparó una solución al 2% p/v de Tritón X-114 en buffer tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM, pH 7.4 a 4°C; agitando hasta obtener una solución límpida. Se incubó a 30°C durante toda la noche, ocurriendo la condensación de las micelas del detergente. La fase superior, más abundante y empobrecida en detergente ("acuosa") se descartó, previa determinación de la concentración de detergente por absorbancia a 275 nm. La fase inferior, de aspecto oleoso, enriquecida en detergente fue redisuelta en igual volumen de buffer a 0° C y sometida a una nueva condensación en iguales condiciones. Este proceso fue repetido hasta que la concentración de detergente en la fase superior "acuosa" fuera inferior a 0.05%, usualmente tres veces.

La concentración de Triton X-114 en la fase inferior enriquecida en detergente resultante fue determinada por absorbancia a 275 nm (En nuestras condiciones resultó de 16.6 % p/v). Esta fase fue conservada y usada como stock de Triton X-114 para los experimentos que aquí se describen.

Separación de proteínas anfifílicas y no anfifílicas de extractos por separación de fases de soluciones de Triton X-114:

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Bordier (1981) con las modificaciones introducidas por Belzunces y col. (1988) para la separación de AChE en extractos totales de SNC de Insectos.

A una alícuota de cada muestra (usualmente entre 300 y 500 μ L) contenida en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL se le agregó un volumen de solución precondensada de Triton X-114 tal que la concentración final fuera del 3%. Las muestras fueron agitadas vigorosamente y mantenidas en hielo durante 10-15 minutos, incubadas a 30°C durante 15 minutos y centrifugadas en una microcentrifuga a 10000 \times g durante 3 minutos a temperatura ambiente. La fase superior acuosa (A) y la fase inferior rica en micelas de detergente (D) obtenida por condensación de cada muestra fueron separadas, y previa medición del volumen resultante y separación de una alícuota para la determinación de actividades enzimáticas, se les agregó solución precondensada o buffer hasta lograr una concentración final de Triton X-114 de 3% y fueron sometidas a una nueva condensación. Las fases A y D obtenidas se conservaron para los ensayos bioquímicos.

2.10 INCORPORACION DE AChE y ChE DE EXTRACTOS DE HIGADO EN VESICULAS FOSFOLIPIDICAS (LIPOSOMAS)

Se realizaron experiencias de reconstitución usando asolectina (fosfolípidos de porotos de soja, Am.Lec.Co., USA) que fue pesada, lavada en acetona o cloroformo y secada bajo N_2 inmediatamente antes de su uso. Los fosfolípidos (PL) así

tratados fueron resuspendidos en las soluciones que se indicarán en cada caso.

Se emplearon dos técnicas diferentes de incorporación y/o formación de vesículas fosfolipídicas:

2.10.a Formación de proteoliposomas por remoción del detergente (diálisis):

En este caso la formación de las vesículas se realiza simultáneamente con la incorporación, por diálisis extensiva de una mezcla de PL y extractos conteniendo la/s proteínas a incorporar, como fuera descrito por Helenius y cols. (1977). El extracto sometido a este procedimiento fue obtenido por solubilización de membranas de hígado en 20 mM octilglucósido (0.6% p/v) en tris-HCl 4 mM pH 7.4 (EOG).

Volúmenes de 1 - 1.2 mL del extracto se transfirieron a tubos conteniendo PL pretratados como se describió previamente, en cantidad tal que la relación PL:proteínas fuera de 5:1 aproximadamente. Las mezclas fueron agitadas a temperatura ambiente y transferidas a bolsas de diálisis.

Como control, una alícuota del extracto EOG fue sometida al mismo tratamiento en ausencia de PL (EOG -PL)

La diálisis se realizó a 4°C en 500 mL de buffer OG (tris-HCl 4 mM pH 7.4) durante 48 horas con cambios cada 12 horas.

2.10.b Formación de proteoliposomas por congelamiento /descongelamiento y sonicación breve de extractos depletados de detergente y liposomas preformados:

Este procedimiento requiere la formación previa de vesículas fosfolipídicas por sonicación, para luego realizar la incorporación de proteínas de los extractos por sonicación breve (Tse y cols. 1985). En este caso, los extractos deben ser pretratados para la remoción del detergente. El extracto sometido a este procedimiento fue obtenido por solubilización de membranas de hígado con Triton X-100 al 1% y pretratado con Bio-Beads SM-2 para remover el Triton X-100 por adsorción (ver más adelante).

Asimismo se sometió a reconstitución en liposomas preformados a una mezcla de enzimas purificadas (AChE de eritrocitos humanos y ChE de suero de caballo, Sigma) - EP-.

Remoción de Triton X-100:

Se empleó Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA), un copolímero poroso neutro de estireno-divinilbenceno, que adsorbe fuertemente Tritón X-100 (Holloway P.W. 1973). Las Bio-Beads SM-2 fueron lavadas dos veces en metanol (aproximadamente 7 mL/ gramo de copolímero) con agitación, sin permitir que se secan fueron lavadas 2 veces en agua bidestilada (15 mL/gramo) y conservadas en agua bidestilada hasta su uso.

gr de Bio-Beads húmedas se agregaron por cada mL de extracto conteniendo 1% de Triton X-100, y se agitó la mezcla a 4°C durante 10-12 horas.

Formación de proteoliposomas:

PL pretratados como se describió fueron suspendidos en buffer OG (24 mg PL/mL) y sonicados hasta que la suspensión se aclaró (30

min a temperatura ambiente) en un sonicador marca Ultrasonics Inc. Modelo W-220F a 40-50% de la salida máxima del aparato.

Los extractos crudos, pretratados para remover el detergente y la mezcla de enzimas puras se agregaron a alícuotas de la preparación de vesículas sonicadas en una relación PL:proteínas de 6:1 en un volumen final de 1,2 - 1,5 mL.

Las mezclas fueron sometidas a dos ciclos de congelamiento rápido en hielo seco/acetona y descongelamiento lento a temperatura ambiente y luego sonicadas durante 20 segundos.

2.10.c Separación de proteoliposomas y proteínas no asociadas por centrifugación en gradientes isopícnicos:

Se realizó una técnica de flotación en gradientes isopícnicos (Kaufman y Silman, 1980). Las muestras de proteoliposomas preparadas por cualquiera de los métodos antes descritos fueron llevadas a una concentración de sacarosa 1,2 M, y 1,8 mL de esta suspensión se sembraron sobre 1,5 mL de sacarosa 2 M. Sobre la muestra se depositaron 9 mL de sacarosa 1 M y sobre ésta 1,7 mL de buffer OG (las soluciones de sacarosa fueron preparadas en buffer OG). Los gradientes discontinuos fueron centrifugados durante 21 horas a 4°C en un rotor AH 627 a 25000 rpm. Luego los gradientes fueron separados en fracciones de 0,5 mL a las que se ensayaron las actividades de AchE y ChE como se describirá más adelante.

2.11 DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

2.11.a DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES DE ACETILCOLINESTERASA Y COLINESTERASA NO ESPECIFICA

Se realizó mediante una modificación del ensayo de Ellman y cols. (1961) que incluye el uso de inhibidores específicos de cada enzima.

Como sustratos se emplearon yoduro de acetiltiocolina (ATC, análogo del sustrato natural de ambas enzimas) y yoduro de butiriltiocolina (BTC, análogo del sustrato de ChE), los cuales por hidrólisis producen acetato (o butirato) y tiocolina.

La tiocolina liberada reacciona con el ion 5,5-ditio-bis-nitrobenzoato (DTNB) produciendo el ion 5-tiobenzoato de color amarillo cuya absorbancia se determina espectrofotométricamente a 412 nm ($\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Condiciones de la reacción

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1,1 mL. Los sustratos ATC y BTC se emplearon en una concentración final de $5.4 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Como inhibidor de AChE se usó BW 284 C51 (dibromuro de 1,5 bis [alildimetil-fenilamonio]pentan-3-ona).

Como inhibidor de ChE se empleó ethopropazine (hidrocloruro de 10-[2-dietilamino]propil fenotiazina).

Las concentraciones óptimas de cada inhibidor se determinaron como se describirá más adelante.

En cada serie de determinaciones se incluyeron los siguientes controles:

a- reactivos en ausencia de muestra

b- para cada muestra se realizó un ensayo en ausencia de sustrato, con el fin de determinar la absorbancia producida por tiosoles endógenos.

Para medir la actividad de AchE se realizó alternativamente alguna de estas opciones:

i- ATC como sustrato, en presencia de ethopropazina como inhibidor de ChE

ii- [ATC como sustrato, en ausencia de inhibidores] - [ATC como sustrato en presencia de BW 284 C51]

Para medir la actividad de ChE se realizó alternativamente alguna de estas opciones:

iii- BTC como sustrato en ausencia de inhibidores

iv - BTC como sustrato en presencia de BW 284 C51 como inhibidor de AchE

v - ATC como sustrato en presencia de BW 284 C51.

Para cada tejido estudiado se analizó la equivalencia entre las diferentes condiciones experimentales, encontrándose que $i = ii$ y $iii = iv$. Esto verifica que las concentraciones de inhibidores seleccionadas empleando enzimas purificadas eran las adecuadas para la determinación de actividades en homogenatos y fracciones subcelulares de cada tejido.

Las diferencias obtenidas para la condición v respecto de iii y iv están basadas en que los diferentes ésteres de colina tienen diferente afinidad por ChE.

Determinación de las concentraciones óptimas de inhibidores específicos de AchE y ChE

Con el fin de determinar las concentraciones de BW 284 C51 (inhibidor de AchE) y ethopropazine (inhibidor de ChE) en las cuales la inhibición específica fuera máxima y la inhibición cruzada fuera mínima, se emplearon AchE y ChE purificadas (AchE de eritrocitos humanos, Sigma y ChE de suero de caballo tipo VII, Sigma). Se determinó la actividad de las mismas en presencia de cada uno de los inhibidores en un rango de concentraciones entre 10^{-8} y 10^{-4} M, respecto a la actividad en ausencia de inhibidores.

Las condiciones óptimas fueron:

BW 284 C51 en concentración final $5 \cdot 10^{-8}$ M : inhibe 97% AchE y 6% ChE

Ethopropazina en concentración final 10^{-8} M : inhibe 99% ChE y 6% AchE.

Si bien se encontró que concentraciones superiores incrementaban la inhibición específica, se registró en esos casos un incremento significativo de la inhibición cruzada, por lo tanto se seleccionaron las concentraciones antes mencionadas, corrigiéndose en cada caso los valores de actividad calculados para cada muestra por la inhibición no específica.

Ensayos

Se realizaron tres tipos de ensayos de AchE y ChE:

1) Ensayos cinéticos: Las determinaciones se realizaron en espectrofotómetro Beckman modelo 25 por registro continuo de la

absorbancia a 412 nm, a partir de la adición del sustrato a la mezcla de reacción previamente termostaticada en cubeta. El registro se realizó contra un blanco conteniendo reactivos al cual se agregó sustrato. La velocidad de aparición del producto se determinó a partir de la pendiente del registro Abs.vs. tiempo.

2) Ensayos incubando la mezcla de reacción a tiempo fijo: Las reacciones se realizaron incubando a 37°C durante 15 y 30 minutos. Se detuvo la reacción por agregado de prostigmin M (inhibidor de ambas colinesterasas) y colocación a 0°C. Las determinaciones de absorbancias se realizaron inmediatamente.

3) Ensayos a tiempos fijos, en el caso de fracciones de gradientes de sacarosa: Los ensayos para colinesterasas se realizaron empleando ATC como sustrato en presencia de ethopropazine (inhibidor de ChE) para AchE y con BTC como sustrato en presencia de BW 284 C51 (inhibidor de AchE) para ChE, en las concentraciones especificadas. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante tiempos que oscilaron entre 30 minutos y 24 horas en el caso de muestras con baja actividad.

La presencia de sacarosa en las fracciones incrementa la absorbancia a 412 nm cuando son sometidas al ensayo de Ellmans, dando apariencia de una actividad mayor que la real, y este fenómeno aumenta de magnitud con el tiempo. Para corregir esto, un gradiente de sacarosa equivalente al empleado para separar formas moleculares (FM) sin muestra fue fraccionado para cada corrida y sometido a la reacción de Ellmans por el mismo tiempo que para las muestras. Las lecturas a 412 nm de estos gradientes "blancos" vs. la fracción del gradiente del que provenían fueron

ajustadas por regresión lineal y descontadas de las lecturas de cada fracción de gradientes con muestra.

Se observó que para periodos de tiempo superiores a los 60 minutos el incremento de absorbancia (indicativo de la velocidad de producción de tiocolina) no resultaba lineal con el tiempo. De esta manera las actividades de las fracciones de gradientes se expresan en unidades arbitrarias de actividad y la cuantificación de los porcentajes de cada FM se realizó por cálculo del área en cada pico respecto del área total.

2.11.b Determinación de actividad de glucosa-6-fosfatasa (E.C.3.1.3.9)

Se realizó mediante la técnica descrita por Aronson y Touster (1974) por la cual se determina la velocidad de liberación de fosfato inorgánico a partir de glucosa 6 fosfato.

A 50 μ l de la muestra se agregó 450 μ l de reactivo (Na-glucosa 6 fosfato 22 mM; histidina 19 mM; EDTA 1 mM; pH 6.5). Se incubó durante 15 y 30 minutos a 37°C con agitación. La reacción se detuvo en hielo agregando 25 μ l de TCA al 50%. Se centrifugó a 2000 x g durante 15 minutos y de los sobrenadantes se tomó una alícuota para determinar P como se describirá más adelante.

Cada muestra se ensayó en triplicado, y para cada una se realizó un blanco en el que se reemplazó el reactivo por un volumen equivalente de H₂O, con el fin de determinar la cantidad de Pi presente en la muestra y el liberado durante la incubación a partir de sustratos endógenos. En cada serie de determinaciones se incluyó asimismo un blanco de reactivos.

2.11.c Determinación de actividad de 5'nucleotidasa (E.C.3.1.1.5)

Se realizó por la técnica de Aronson y Touster (1974) en la cual se determina la velocidad de producción de Pi por hidrólisis de 5'AMP.

A 50 μ l de muestra se le agregaron 450 μ l de reactivo (Na-AMP 5,5 mM; NaOH glicina 0.1M; MgCl₂ 10 mM; pH 9.1). Se incubó a 37°C por 15 y 30 minutos y la reacción se detuvo en hielo por agregado de 25 μ l de TCA 50%. Se centrifugó a 2000 x g durante 15 minutos y del sobrenadante se tomaron alícuotas para la determinación de Pi.

Se realizaron el mismo tipo de controles que para glucosa 6 fosfatasa.

2.11.d Determinación de actividad de ácido N-acetil-neuramínico transferasa (sialil transferasa) (E.C.2.4.99.1)

Se realizó de acuerdo a la técnica de Briles y col (1977) por la cual se determina la velocidad de transferencia de ácido siálico a partir de CMP-[³H]ácido siálico a un aceptor exógeno (asialofetúina, ASF).

Se tomaron 25 y 50 μ l de muestras apropiadamente diluidas tal que contuvieran: entre 200 y 500 μ g de proteínas para RER y SER; entre 50 y 150 μ g para homogenatos y entre 10 y 25 μ g para fracciones de Golgi. Se agregó 150 μ l de reactivo conteniendo: 0.15 μ Ci de CMP-[³H]SA, actividad específica 15 Ci/mmol, 0,5 mg de ASF, NaCl 66 mM, Tritón X-100 0,1% , en buffer fosfato 20 mM pH 7.5.

Se incubó 1 hora a 37°C con agitación y se detuvo la reacción con 1 ml de ácido fosfotungstico al 1% en HCl 0.5N. Después de 15 minutos en hielo, se centrifugó a 2000 x g durante 15 minutos y los precipitados fueron sometidos a dos lavados, resuspendidos en 1 mL de NaOH 1N y transferidos a viales donde se agregó 19 mL de líquido de centelleo (0,025% POPOP, 0,4% PPO, 30% p/v Tritón X-100 en tolueno bidestilado). La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido en condiciones en que el error de medición fue 2%. La eficiencia del conteo se determinó por el método del standard externo, empleando para su calibración una curva de standard de ^3H .

2.11.e Determinación de la integridad de vesículas derivadas del RE (latencia de hidrólisis de manosa-6-fosfato por glucosa 6 fosfatasa)

Se determinó la latencia de hidrólisis de manosa 6-fosfato (sustrato no permeante a través de membranas de RE) por glucosa 6-fosfatasa (enzima de orientación luminal en el RE) según lo descrito por Arion y cols. (1976).

Los sedimentos correspondientes a las fracciones a ensayar se suspendieron en sacarosa 0.25 M; tris HCl 10 mM pH 7.4 mediante 5 pases con un homogenizador Dounce, separándose la suspensión resultante en dos alícuotas. Una de ellas fue llevada a una concentración final de 0,05% de Tritón X-100, mediante el agregado de Triton X-100 al 10%, con el fin de hacer permeables las vesículas al sustrato.

En ambas preparaciones, (con y sin detergente) se determinó la actividad de glucosa-6-fosfatasa empleando como sustrato manosa-

6-fosfato midiendo la liberación de Pi según se describe más adelante.

2.11.f Determinación de la actividad de láctico deshidrogenasa

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Kornberg y col. (1955) en la que se determina espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia a 340 nm por consumo de NADH + H⁺ por reducción de piruvato.

2.11.g Determinación de fosfato

Se realizó de acuerdo a la técnica de Chen y col. (1956) que se basa en el uso de ácido ascórbico como reductor del fosfomolibdato.

Las alícuotas de los sobrenadantes de la reacción enzimática correspondiente se llevaron a 250 µL con H₂O y se agregó 700 µL de reactivo (MbnH₄ 0.42% en H₂SO₄ 1 N : 6 vol a los cuales se agregó 1 vol de ácido ascórbico al 10% preparado inmediatamente antes).

Se incubó a 40°C por 20 minutos y se determinó la absorbancia a 660 nm. La concentración de fosfato se calculó en base a una curva de calibración de fosfato (entre 10 y 200 nmoles) tratada de la misma forma que las muestras.

2.11.h Determinación de proteínas

La masa de proteínas se determinó por el método de Lowry y col (1951) o en el caso de muestras que contenían sustancias que interfieren, se empleó la técnica de Peterson (1977). En ambos casos se usó albúmina de suero bovino fracción V como patrón.

2.11.i Determinación de ADN

Se realizó de acuerdo a la técnica de Burton (1965).

2.11.j Determinación de ARN

Se empleó la técnica de Fleck y Begg (1965) con las modificaciones de Schmidt y Thannhauser (1969).

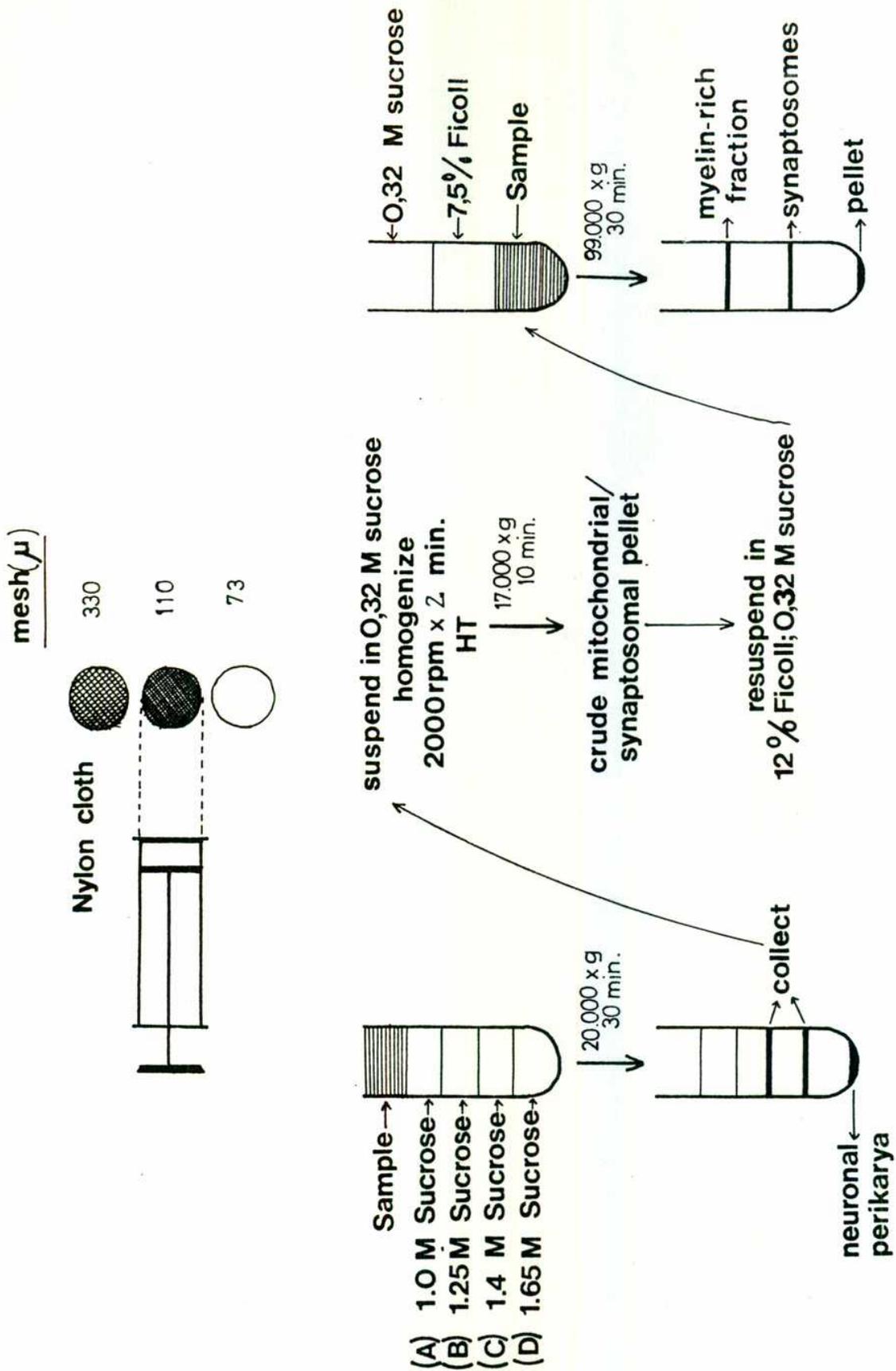
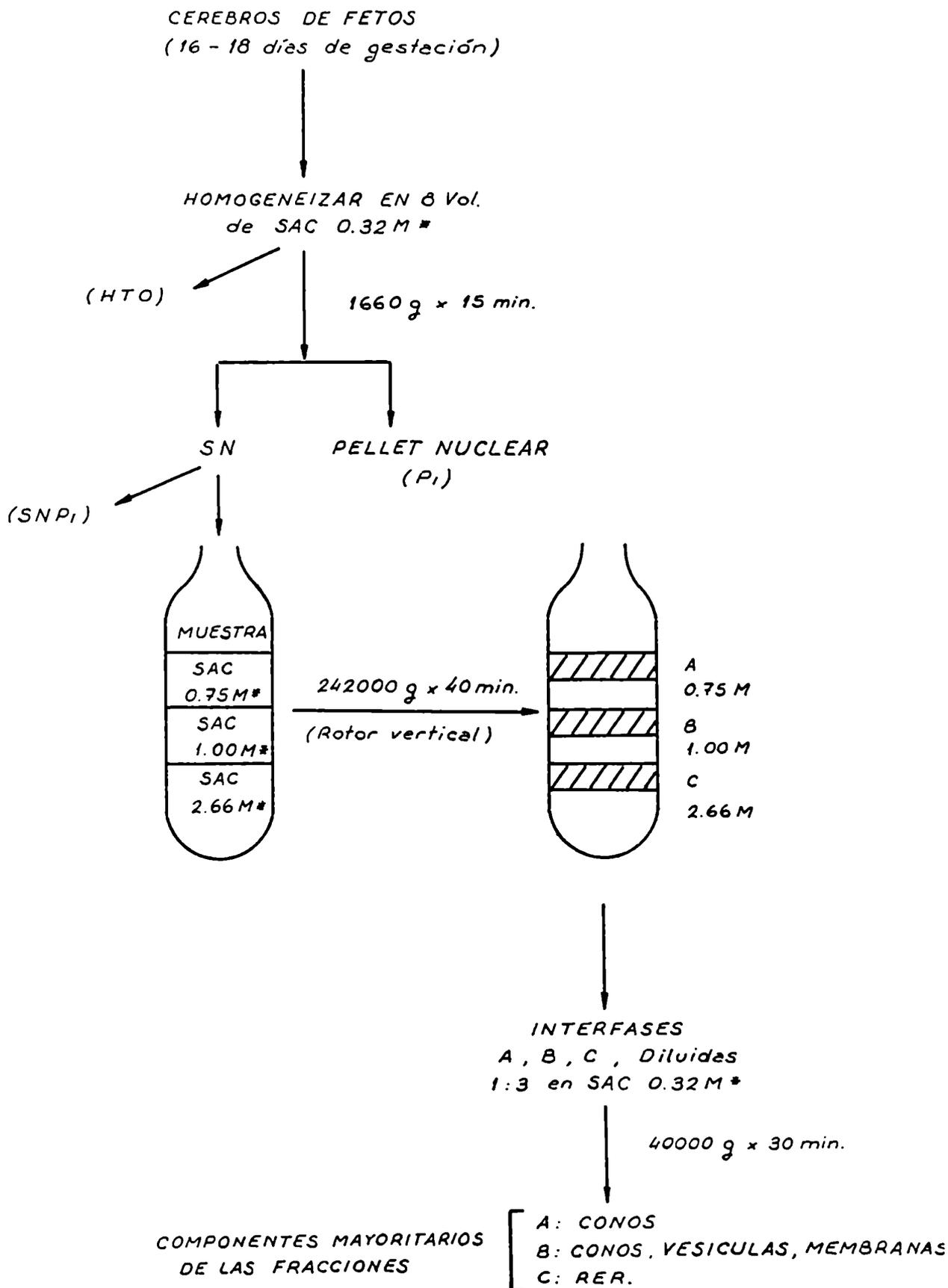


Figura 8

Figura 9



* 1 mM $MgCl_2$, 1 mM HEPES , pH: 7.3

Figura 10

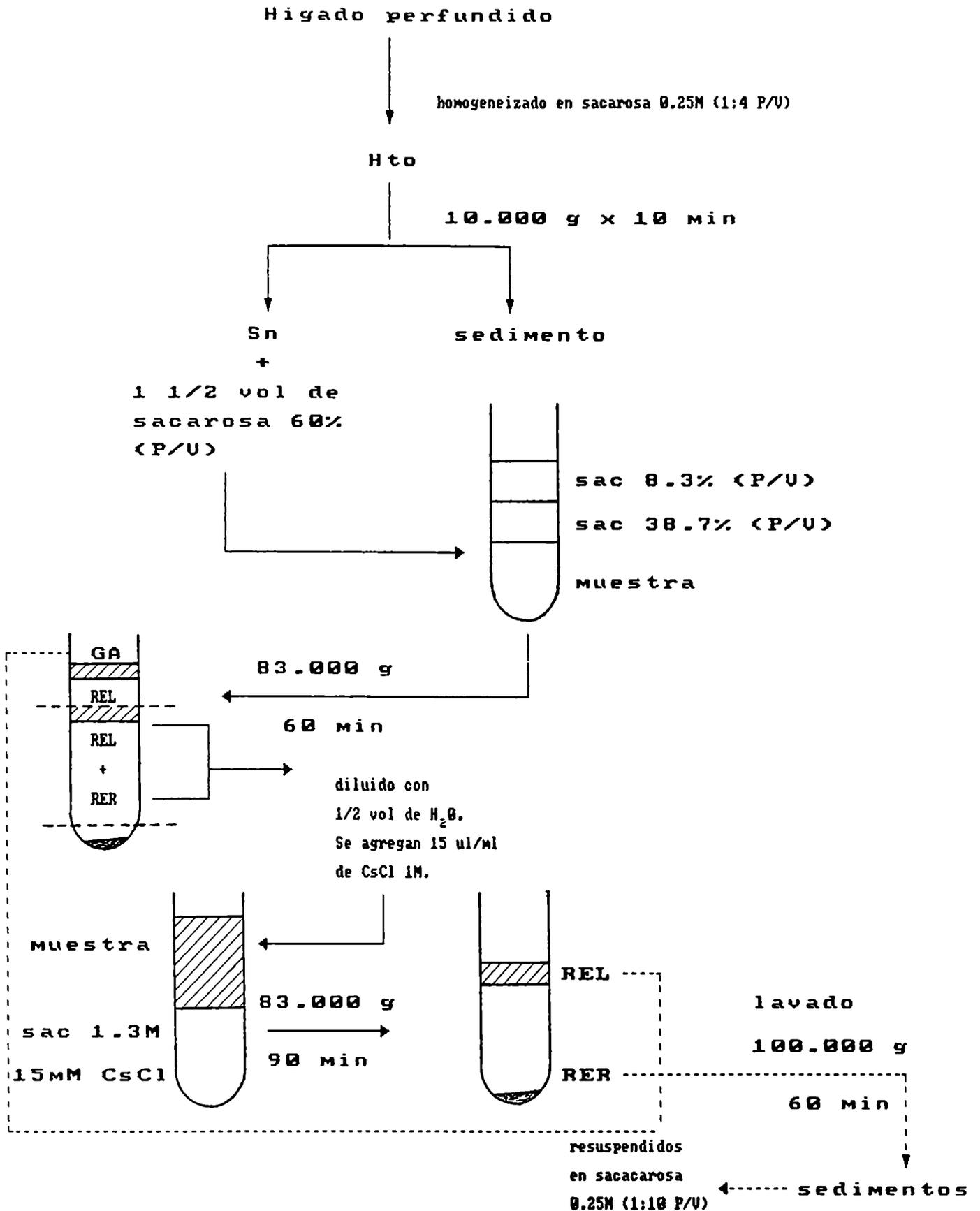
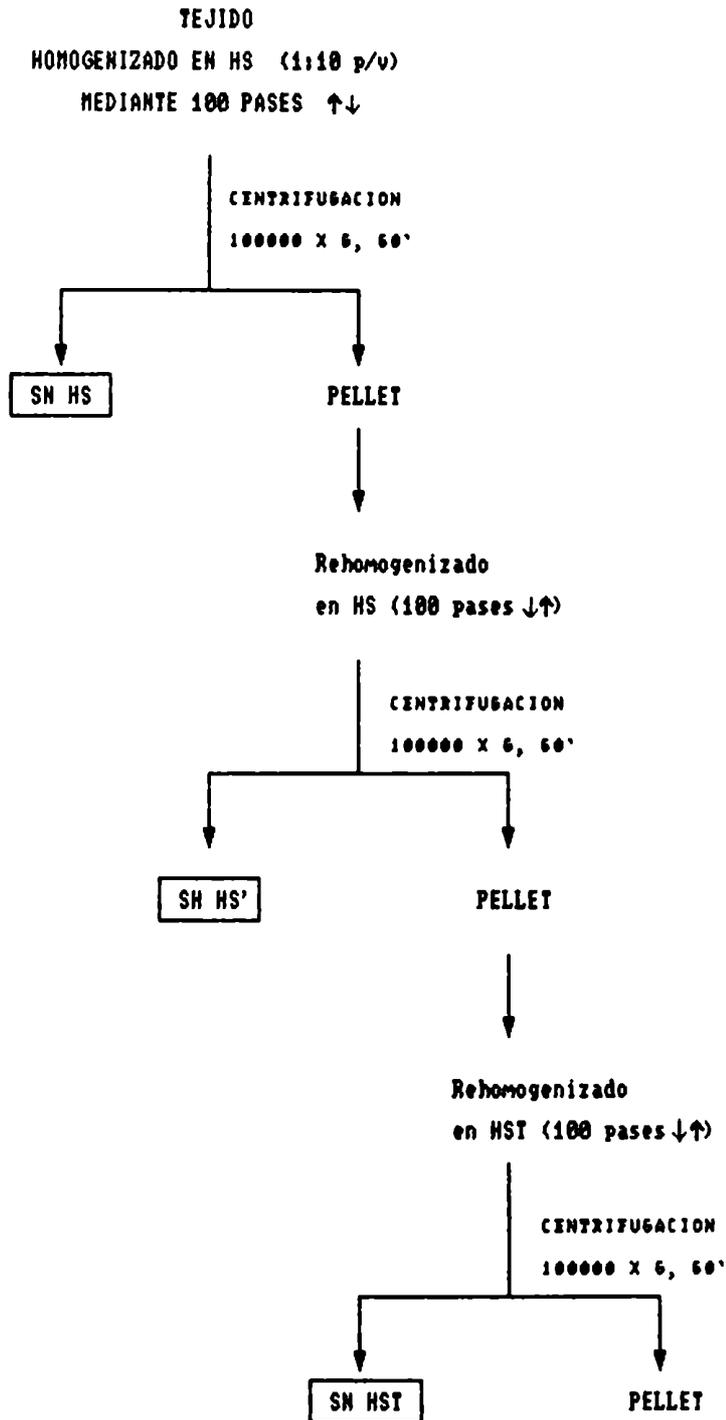


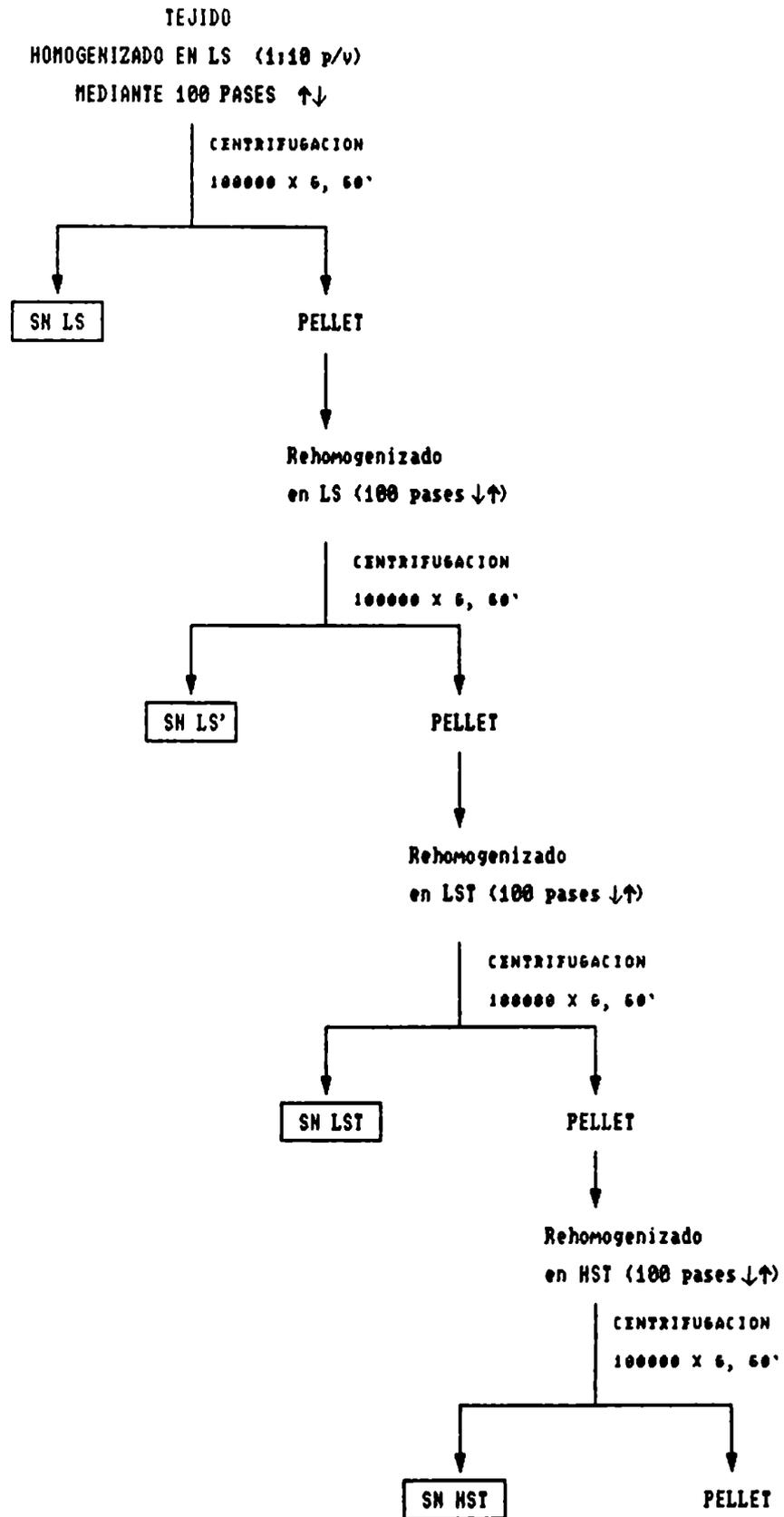
FIGURA 13



HS: NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM, pH=7

HST: NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM, pH=7, Tx-100 1%

FIGURA 14



NS: NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM, pH=7

LST: Tris-HCl 10 mM, pH=7, Tx-100 1%

HST: NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM, pH=7, Tx-100 1%

CAPITULO 3:

Estudios de distribución de AchE y ChE en corteza cerebral de rata durante el desarrollo.

RESULTADOS:

-Distribución de AchE y ChE en distintos tipos celulares de corteza cerebral:

En una primera aproximación, se estudió la distribución de AchE y ChE en los tipos celulares presentes en corteza cerebral. Se encontró que tanto las fracciones de pericarion neuronales como de astrocitos aislados tenían actividades de AchE y ChE (Tabla I)

Las relaciones de las actividades de ambas enzimas en las fracciones evidencian la expresión preferencial de AchE en neuronas y de ChE en las células gliales.

-Actividades de AchE y ChE durante el desarrollo en fracciones de corteza cerebral de rata:

La estrategia de estudiar el desarrollo tiene la ventaja que éste ha sido objeto de estudios morfológicos detallados y que se cuenta con un panorama temporal de los eventos que determinan la generación de la complejidad estructural a nivel sináptico.

Se determinaron las actividades de AchE y ChE de corteza cerebral de rata durante el desarrollo en fracciones derivadas de un tipo celular.

Las edades seleccionadas fueron: 8 días (corteza no diferenciada); 13 días (inmediatamente antes del inicio del incremento de densidades sinápticas); 18 días (sináptogenesis

activa); 32 días (post-sinaptogénesis) y 90 días (adulto); seleccionadas de acuerdo con los datos morfológicos de Aghajanian y Bloom (1967). Para cada una de ellas, se aislaron cuerpos celulares de neuronas y terminales sinápticos, mediante la técnica combinada que se describió en Materiales y Métodos.

El contenido de ARN, proteínas y actividad de colinesterasa total, expresado por μgr de DNA, en cuerpos celulares de neuronas aislados a partir de corteza cerebral de las edades antes mencionadas se muestra en la Figura 15. No se encontraron variaciones significativas en las relaciones RNA/DNA y proteínas/DNA en las fracciones derivadas de distintas edades.

A pesar de la constancia de los parámetros antes mencionados, un incremento significativo de la actividad de colinesterasa total por célula se encontró a los 13 días, que alcanzó el máximo a los 18 días, durante la activa sinaptogénesis. La actividad se reduce significativamente a partir del fin de este evento (32 y 90 días).

Cuando se discriminaron las actividades de AchE y ChE en estas fracciones (Figura 16), se encontró que el incremento de actividad de colinesterasas se debe a un aumento significativo de actividad de AchE. La actividad específica de ChE en cuerpos celulares de neuronas no se modificó significativamente durante el período analizado.

- Solubilidad de AChE y ChE en cuerpos celulares de neuronas aisladas de corteza cerebral de rata durante el desarrollo postnatal:

Considerando que AChE puede presentarse con diferente grado de asociación a membranas, se analizó la solubilidad de AChE y ChE neuronal.

Cuerpos celulares de neuronas aisladas de corteza cerebral de rata de 3, 15-18 y 60 días (estadios críticos de la maduración postnatal) fueron sometidos a extracciones secuenciales. Se realizó una extracción inicial en buffer de alta fuerza iónica en ausencia de detergentes (HS), centrifugado a 100000 x g durante 60 minutos, y el material particulado fue reextraído en buffer de alta fuerza iónica en presencia de 1% Triton X-100 (HST). Para cada edad se realizó el mismo tratamiento a la corteza sin fraccionar. En los sobrenadantes de las extracciones en alta fuerza iónica (HS) y alta fuerza iónica con detergente (DS) se ensayaron las actividades de AChE y ChE como se describió en Materiales y Métodos. La Figura 17 muestra la distribución porcentual de actividades en HS y DS.

La distribución de la actividad de ChE en HS y DS no difirió significativamente entre corteza y neuronas para cada edad. Tanto en la corteza sin fraccionar como en los pericarion neuronales, se encontró un incremento de la proporción de actividad de ChE recuperada en la fracción DS durante el desarrollo (52%, 70% y 75% a los 3, 15 y 60 días respectivamente).

En contraste, la actividad de AChE de corteza y neuronas se distribuyó de manera diferencial en HS y DS.

En la corteza sin fraccionar se encontró un incremento de la actividad de AchE recuperada en DS durante la maduración (50%, 75% y 96% a los 3, 15 y 60 días respectivamente).

En cuerpos celulares de neuronas, se detectó un patrón diferente. Si bien a los 3 y 60 días PN el 60 y 75% de la actividad de AchE se recuperó en la fracción DS; a los 15 días PN el 60% de la actividad de AchE se solubilizó en la fracción HS, esto es, en ausencia de detergente.

Estos resultados indican que el incremento de actividad específica de AchE observado en pericarion neuronales durante la sinaptogénesis (ver Figura 16) está acompañado de un aumento de la actividad de AchE "soluble". Dicha variación no fue detectada en la corteza sin fraccionar.

- Topología de AchE y ChE en sinaptosomas aislados de corteza cerebral de rata adulta:

Con el fin de determinar la orientación de los sitios activos de AchE y ChE en los sinaptosomas, se obtuvo una fracción de sinaptosomas purificados mediante la técnica de Booth y Clark (ver Materiales y Métodos).

La realización de este tipo de mediciones requiere el conocimiento del grado de integridad de las preparaciones a emplear. Con este fin, se determinó en las preparaciones de sinaptosomas la latencia de la enzima citosólica láctico-deshidrogenasa (LDH), midiendo el consumo de $\text{NADH}+\text{H}^+$ en la preparación intacta y en una alícuota preincubada con 0,1% Triton X-100 como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de LDH en la preparación control de sinaptosomas fue de 121,57

nmol/min/mg de proteínas y la de los sinaptosomas permeabilizados con Triton X-100 de 486,95 nmol/min/mg de proteínas, lo que indica que la preparación contenía un 75% de sinaptosomas intactos.

La actividad de AchE de la preparación no se modificó por la preincubación con Triton X-100, sin embargo los sinaptosomas permeabilizados tuvieron una actividad de ChE 1,3 veces superior a la de la preparación control (Tabla II).

Estos resultados son consistentes con la orientación ectocelular de la AchE en las estructuras sinápticas. En contraste, al menos una fracción de la actividad de ChE permanece latente en los sinaptosomas, a juzgar por el incremento de actividad detectado al permeabilizar la preparación. La actividad de ChE que se manifiesta inclusive en la preparación intacta, supera a lo que se esperaría obtener por el 25% de sinaptosomas rotos si la ChE fuera de orientación luminal exclusivamente. Esta fracción de actividad de ChE, aparentemente ectocelular, podría atribuirse a que esta enzima se localice preferentemente en otras estructuras subcelulares para las cuales no se ensayó latencia y que no preserven su integridad en la preparación de sinaptosomas intactos.

Con el fin de determinar el grado de asociación de AchE y ChE a membranas sinaptosomales, las preparaciones de sinaptosomas fueron sometidas a un shock hipoosmótico por agregado de agua, seguido de centrifugación a 100000 x g durante 60 minutos para separar las membranas del contenido de los sinaptosomas.

En la Tabla II se indican los valores de a.e. y recuperaciones de AchE y ChE en estas fracciones. Se encontró que el 91% de la actividad de AchE se recuperó en las membranas, mientras que el 72% de la actividad de ChE se recuperó en el contenido. La asociación diferencial a membranas se evidencia asimismo en los enriquecimientos diferenciales de AchE y ChE en membranas y contenido, respectivamente.

- Actividades de AchE y ChE en fracciones de sinaptosomas y mielina durante el desarrollo postnatal:

Las variaciones en la a.e. de AchE y ChE en la fracción de terminales altamente purificados y en la fracción enriquecida en mielina se muestran en las Figuras 18 y 19.

En sinaptosomas, la a.e. de AchE se incrementa significativamente a lo largo del desarrollo, alcanzando en el adulto un valor 5 veces superior al de 13 días. Este enriquecimiento de AchE en terminales a lo largo de la maduración coincide con observaciones de otros autores (Gonatas y cols.1972) para fracciones derivadas de gradientes similares. En contraste, la a.e. de ChE manifiesta un patrón diferente: después de un incremento significativo entre los 8 y los 13 días, no varía significativamente a los 18 y 32 días, y en el adulto es sólo un 30% más elevada que a los 13 días.

La fracción que consideramos como enriquecida en mielina, que está compuesta de estructuras membranosas y que está progresivamente enriquecida en mielina a partir de los 13 días (Gonatas y cols. 1972) manifestó un incremento de la a.e. de AchE a los 18 días, sin variaciones posteriores significativas. Los

valores constantes y relativamente bajos de a.e. de AchE en la fracción de mielina son indicativos de que una contaminación importante de esta fracción con terminales puede ser descartada. Cuando se analizó la a.e. de ChE en estas fracciones se encontró que ésta aumentó progresivamente a partir de los 8 días alcanzando un máximo a los 32 días, que es 3 veces superior a la de los 13 días. En la fracción de mielina proveniente de corteza cerebral adulta (90 días) la a.e. de ChE fue tan baja como la de 8 días. Estos resultados indican un pico de la a.e. de ChE en la fracción rica en mielina a los 32 días, cuando la etapa de sinaptogénesis ha concluido y la mielinización es aún muy activa ().

- Distribución de AchE y ChE en membranas de cerebro fetal:

Se estudió la distribución de las actividades de AchE y ChE en fracciones derivadas de cerebro de ratas en gestación. Debido a las considerables diferencias en organización estructural de la corteza durante la gestación respecto al adulto, no es posible aplicar el mismo esquema de fraccionamiento.

Se empleó la técnica descrita por Pfenninger y col. (1983) para el fraccionamiento de cerebro de rata de 16-18 días de gestación, mediante la cual se obtienen fracciones enriquecidas en RE y otras, que por sus características, se pueden considerar representativas de los extremos de las prolongaciones que las neuronas extienden previo a la sinaptogénesis (neuritas) y se denominan "conos de crecimiento" (Lockerbie 1987).

Se obtuvieron las fracciones A, B y C a partir de cortezas de fetos de 16-18 días de gestación.

El rendimiento en proteínas de la fracción A (conos), fue de 878 ug/gr de tejido, aproximadamente el 90% de lo reportado por Pfenninger. La fracción A resultó enriquecida -3 veces - respecto al homogenato en GAP-43 (growth associated protein; fosfoproteína de 45kDa asociada a conos de crecimiento) en comparación con otras fosfoproteínas.

Si bien las 3 fracciones (A, B y C) derivadas del gradiente resultaron enriquecidas en actividad de glucosa 6-fosfatasa, (enzima marcadora de RE) respecto al homogenato, se encontró una mayor a.e. en C respecto a B y A. En C se recuperó un 35% de la actividad total de glucosa-6-fosfatasa del sobrenadante post-nuclear, lo que indica que las membranas de C contenían comparativamente una mayor proporción de RE que A y B.

Cuando se ensayó la actividad de 5'nucleotidasa en las fracciones, se encontró esta actividad enriquecida 3,6 veces respecto al homogenato en la fracción A. La 5'nucleotidasa se considera usualmente una enzima marcadora de membrana plasmática, si bien recientemente Schoen y cols.(1988) han informado una elevada actividad de 5'Nu en células nerviosas en migración, mediante técnicas histoquímicas. Aunque no hemos investigado en detalle esta cuestión por exceder los objetivos de esta Tesis, resulta interesante que 5'nucleotidasa se encuentre enriquecida en los conos de crecimiento, representativas de estructuras membranosas en constante expansión y migración hacia las células blanco para el establecimiento de las sinapsis.

La actividad de ChE se encontró enriquecida en las 3 fracciones derivadas del gradiente -A,B y C-, aunque en mayor grado -6x- en C (fracción de RE), donde asimismo se recuperó el 82% del total recuperado en el gradiente.

La actividad de AchE también se encontró enriquecida en la fracción C, donde se encontró el 77% de la actividad recuperada en el gradiente.

TABLA I

RELACIONES AchE/ChE EN DISTINTOS TIPOS CELULARES DE LA
CORTEZA CEREBRAL

Fracción celular	AchE/ChE
Astrocitos (Cultivo celular)(*)	0.66
Fracción de células gliales (aisladas en masa)(#)	0.45
Fracción de cuerpos celulares de neuronas ()	4.10

(*) Los cultivos de astrocitos fueron generosamente provistos por la Dra. Berria.

(#) Aislados de acuerdo a la técnica de Sellinger y Azcurra (1973).

() Aislados como se describió en la Sección 2.2.a.

Los valores representan las relaciones de a.e. de AchE y ChE empleando ATC como sustrato, y son el promedio de tres preparaciones independientes.

Figura 15

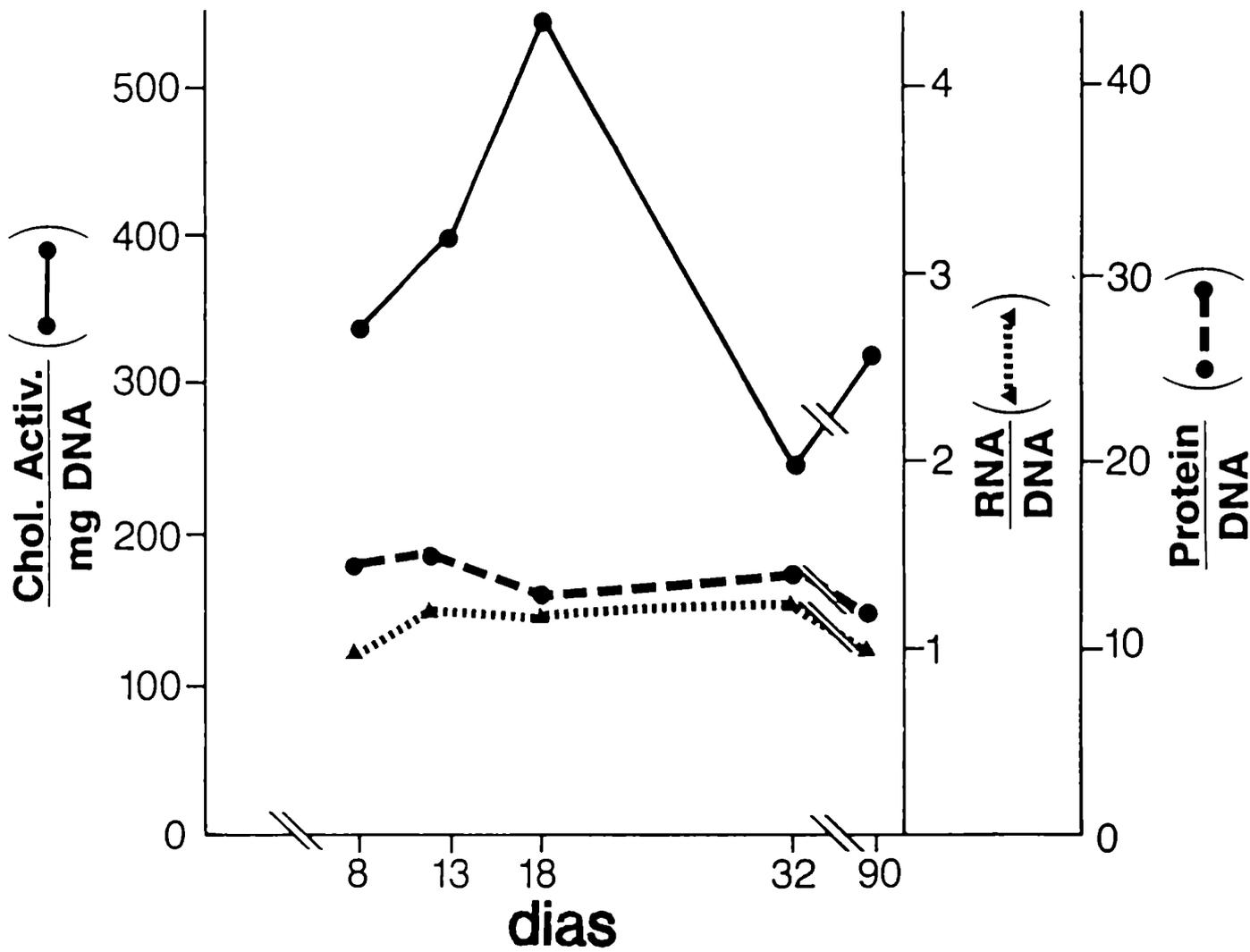


FIGURA 15

Actividad de colinesterasa total/mg de ADN; y relaciones proteína/ADN y ARN/ADN en cuerpos celulares de neuronas durante el desarrollo. La actividad de colinesterasa se expresa en nmol de ATC hidrolizado/min/mg de ADN; ARN y ADN en mg. Los valores son la media de 3 experiencias independientes.

Figura 16

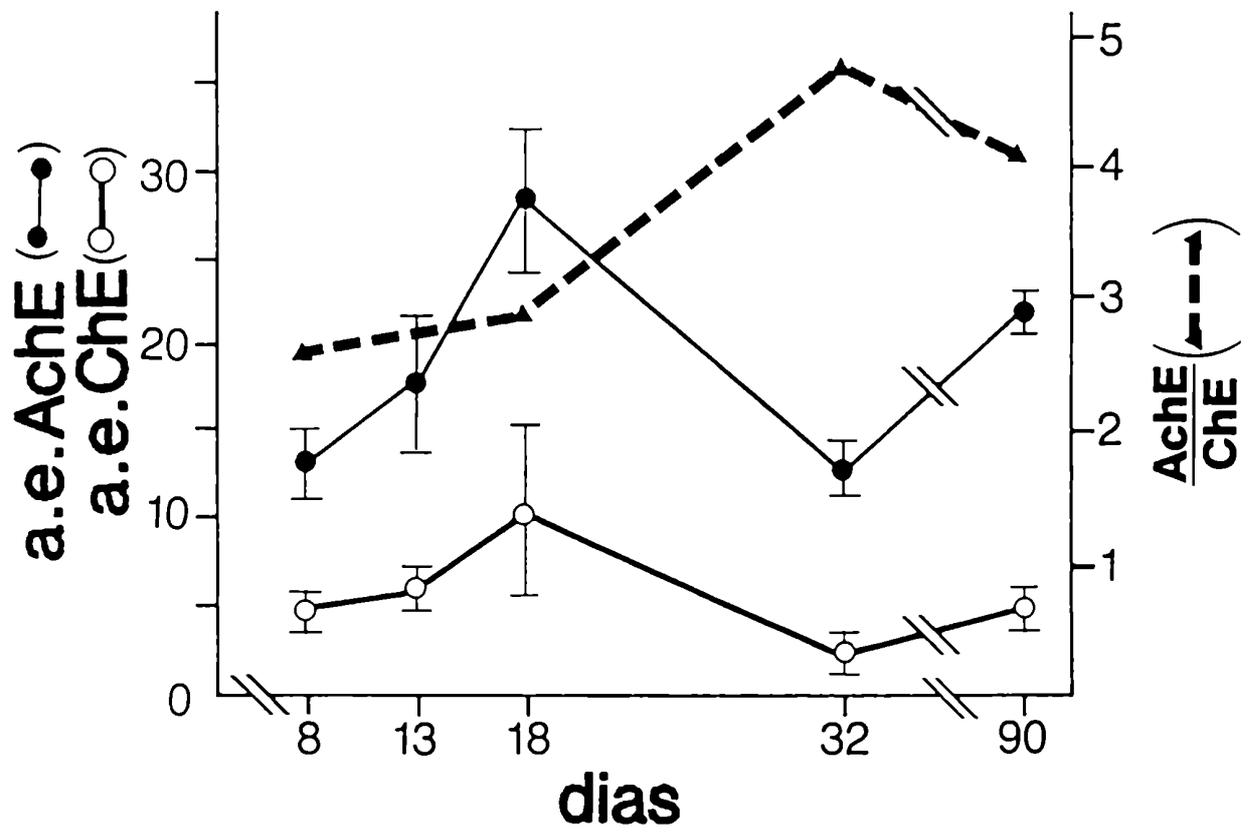


FIGURA 16

Actividades específicas (a.e.) de AchE y ChE en pericarion neuronales durante el desarrollo. a.e. se expresan en nmol ATC hidrolizado/min/mg proteínas. Los valores indican la media de 3 experiencias independientes; las barras representan la DS.

Figura 17
Solubilidad de AchE y ChE en pericarion
neuronales y corteza

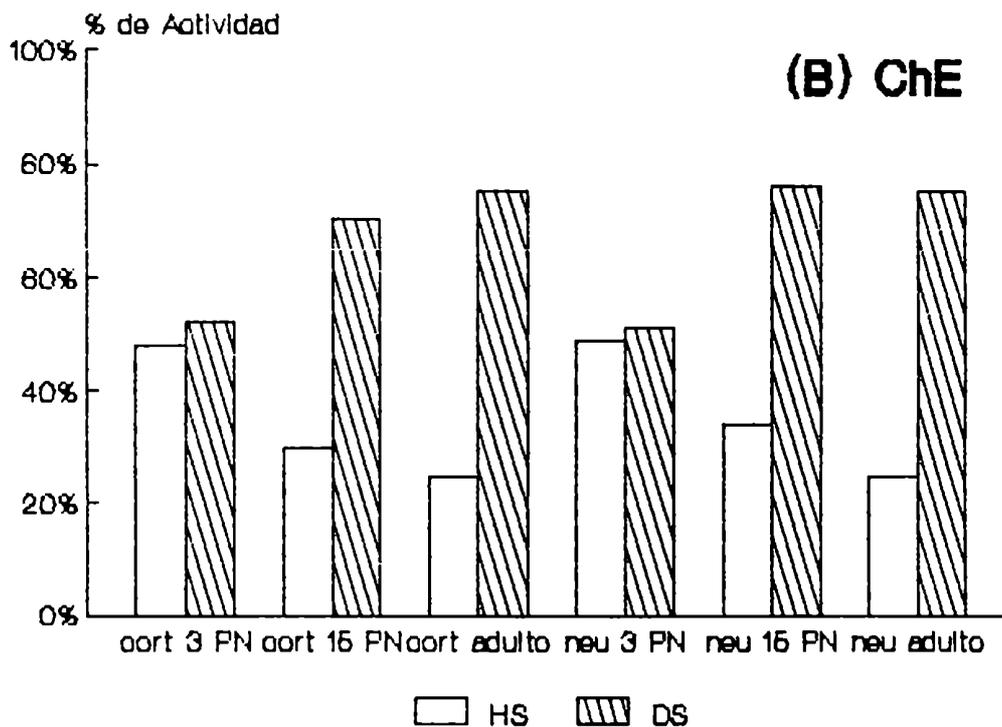
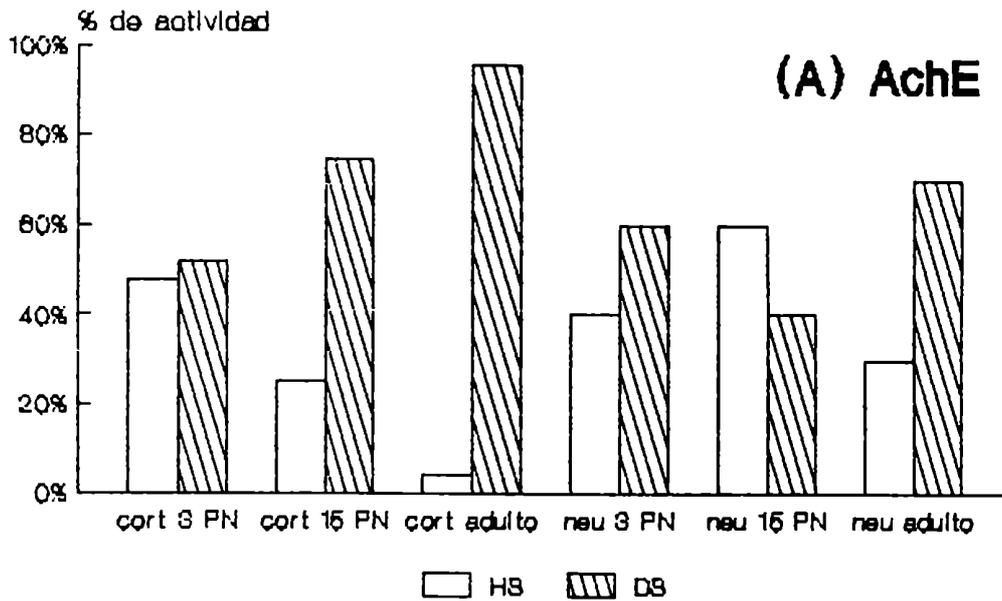


FIGURA 17

Solubilidad de AChE y ChE en corteza cerebral y cuerpos celulares de neuronas aislados durante el desarrollo post-natal

Cuerpos celulares de neuronas (**neu**) aislados según se describió en la Sección 2.2.a. y corteza cerebral sin fraccionar (**cort**) de ratas de 3 días (**3 PN**); 15-18 días (**15 PN**) y más de 60 días (**adulto**) fueron extraídos secuencialmente en soluciones de alta fuerza iónica y alta fuerza iónica en presencia de detergente (ver Secuencia A; Sección 2.6). En los sobrenadantes obtenidos (HS y DS, respectivamente) se ensayaron las actividades de AChE y ChE. Se indican los porcentajes de actividad de AChE (A) y ChE (B) en HS (barras blancas) y DS (barras sombreadas) en cada fracción, calculado sobre el total recuperado mediante ambas extracciones.

TABLA II

TOPOLOGIA EN SINAPTOSOMAS

	AChE		ChE	
	AE	AER	AE	AER
Sinaptosomas intactos*	136.3	1	1.83	1
Sinaptosomas + TX-100	124.7	0.91	2.45	1.34
<u>Shock osmótico</u>				
Membranas	182.2	1.33 (91%)	0.45	0.25
Contenido	52.6	0.38	3.60	1.96 (72%)

*Las preparaciones de sinaptosomas contenían un 75% de sinaptosomas intactos, lo que se evaluó determinando la latencia de la enzima citosólica láctico deshidrogenasa (LDH) como se describió en la Sección 2.11.f.

-AE (actividad específica): se expresan en nmoles de ATC o BTC hidrolizados/min/mg de proteínas.

-AER (actividad específica relativa): expresadas como AE de la fracción/AE de sinaptosomas intactos.

-Los valores entre paréntesis indican porcentaje de la actividad recuperada respecto de la actividad en la preparación inicial.

Los valores mostrados son el promedio de 3 determinaciones independientes.

Figura 18

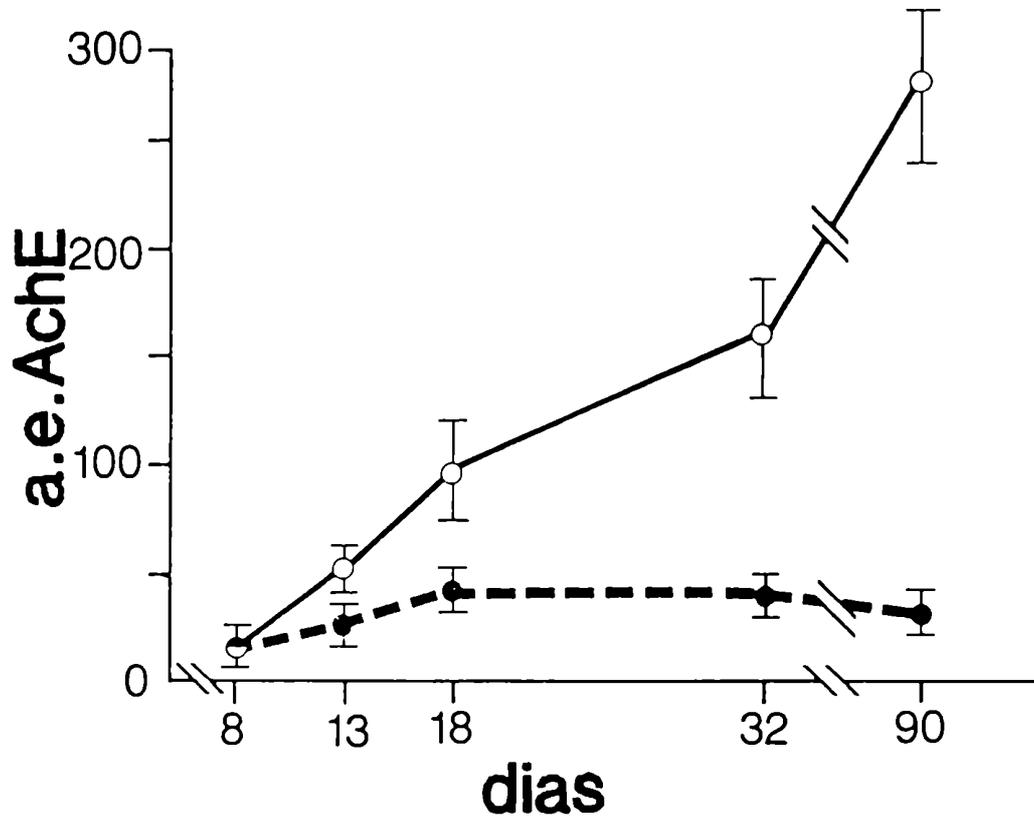


FIGURA 18

Actividades específicas (a.e.) de AchE en las fracciones de sinaptosomas (líneas llenas) y enriquecida en mielina (líneas cortadas) aisladas de corteza cerebral de rata de distintas edades post-natales. a.e. como en Figura 16.

Figura 19

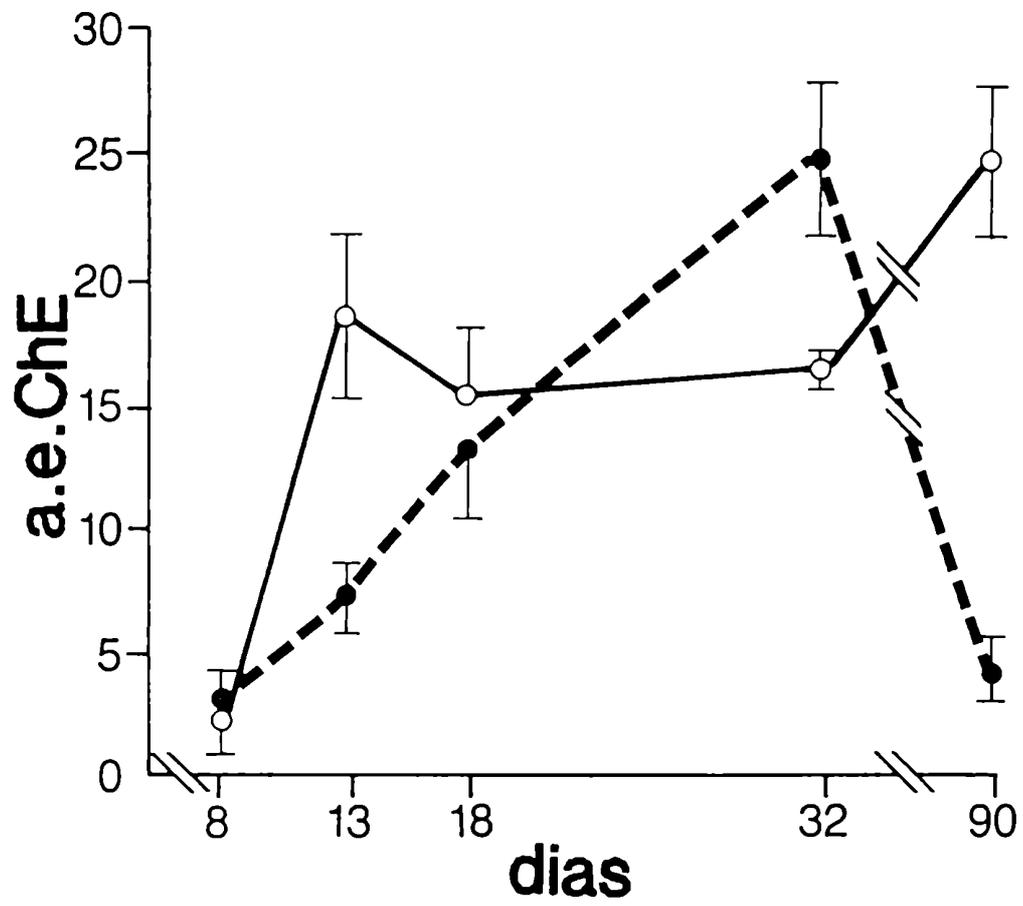


FIGURA 19

Actividades específicas (a.e.) de ChE en las fracciones de sinaptosomas (líneas llenas) y enriquecida en mielina (líneas cortadas) aisladas de corteza cerebral de rata de distintas edades. a.e. como en Figura 16.

TABLA III

**ACTIVIDADES DE AChE, ChE, GLUCOSA-6-FOSFATASA Y
5'NUCLEOTIDASA EN FRACCIONES DERIVADAS DE CEREBRO FETAL**

Fracción	glu-6-Pasa	AChE	ChE	5'Nu
H	0.19	0.34	0.21	0.19
Sn Pi	0.24	0.44	0.61	0.16
A	0.29	0.94	0.45	0.69
B	0.40	0.58	0.58	0.42
C	0.53	0.88	1.35	0.22

Las fracciones corresponden a las indicadas en la Figura 9. Los valores corresponden a actividad específica (a.e.) expresada en nmoles de Pi/min/mg de proteínas (glucosa 6 fosfatasa, glu-6-Pasa y 5'nucleotidasa, 5'Nu); o nmoles de tiocolina liberada/min/mg de proteína (AChE y ChE). Los valores son el promedio de tres preparaciones independientes.

CAPITULO 4:

Caracterización y distribución subcelular de AChE y ChE en hígado de rata

RESULTADOS:

Caracterización de las actividades de AChE y ChE de hígado de rata:

Como se indicó en el Capítulo 1, las características más empleadas para discriminar las actividades de AChE y ChE son: sensibilidad a inhibidores selectivos, especificidad de sustratos y estabilidad térmica.

- Sensibilidad a inhibidores y especificidad de sustratos:

Se determinó en qué medida la hidrólisis de los sustratos ATC (acetiltiocolina) y BTC (butiriltiocolina) en preparaciones de hígado de rata era inhibida selectivamente por BW 284 C 51 y/o Ethopropazina (inhibidores selectivos de AChE y ChE, respectivamente), a fin de corroborar mediante este criterio la presencia de estas actividades enzimáticas en este tejido. Por otra parte, esto también permitió estimar en qué proporción la hidrólisis de estos sustratos se produce por actividad de esterasas no específicas.

Con este propósito, una preparación de microsomas de hígado fue ensayada mediante la técnica colorimétrica de Ellmans para detectar la hidrólisis de ATC y BTC en ausencia de inhibidores y en presencia de BW 284 C 51 (BW), Ethopropazina (Etho) o ambos. Las concentraciones de inhibidores empleadas en este ensayo

fueron las seleccionadas empleando enzimas purificadas como se describió en Materiales y Métodos.

La Figura 20 muestra que la hidrólisis de BTC (sustrato específico de ChE) se inhibió en un 94% cuando la preparación se preincubó con ambos inhibidores, y un 90% por preincubación con Ethopropazine. Esto indica que en este tejido la hidrólisis de BTC es atribuible en un 90% a ChE.

BW inhibió en estas preparaciones un 24% de la hidrólisis de BTC. Considerando que a esta concentración un 12.5% de la actividad de ChE purificada de suero de caballo se ve inhibida por BW (ver Materiales y Métodos) y corrigiendo por esta inhibición cruzada, este resultado corrobora que aproximadamente el 10% de la hidrólisis de BTC es debida a esterasas no específicas. Asimismo se observa que BTC no es hidrolizado en cantidades significativas por AchE de este tejido, en forma similar a lo que se describió para AchE de otros orígenes.

La hidrólisis de ATC se inhibió en esta preparación en un 97% por preincubación con BW y ethopropazine, por lo que la hidrólisis de este sustrato por esterasas inespecíficas representa sólo un 3% del total.

Por otra parte, encontramos que ATC es hidrolizado en hígado por ambas colinesterasas -AchE y ChE-, ya que su hidrólisis no puede ser totalmente inhibida por BW o Ethopropazina por separado.

De estos resultados se evidencia que en hígado de rata existe actividad de colinesterasas, atribuible a AchE y ChE por la sensibilidad a inhibidores y especificidad de sustratos, a saber:

AchE: hidrólisis de ATC, inhibible por BW 284 C 51.

ChE: hidrólisis de BTC y ATC, inhibible por Ethopropazina.

Asimismo, nuestros resultados indican que la hidrólisis de ATC no inhibible por BW 284 C 51 no difiere significativamente de aquella sensible a Ethopropazina, verificándose la aditividad de las actividades de AchE y ChE cuando se determina la hidrólisis de ATC (sustrato hidrolizado por ambas), debida a los bajos niveles de hidrólisis no específica de este sustrato.

Basándose en estas evidencias, es factible discriminar las actividades de AchE y ChE en este tejido empleando sólo un inhibidor (BW 284 C 51, inhibidor de AchE) cuando se emplea ATC como sustrato.

-Estabilidad térmica:

Como se describió en el Capítulo 1, AchE y ChE de diferentes orígenes manifiestan distinta estabilidad frente a altas temperaturas. Asimismo se ha informado que el patrón de inactivación térmica de ChE de GCS se ve modificada por la presencia del ion Mg^{2+} , mientras que la estabilidad de AchE no se ve afectada por este catión.

Se estudiaron los patrones de inactivación térmica de AchE y ChE de hígado de rata, en las condiciones de concentración de inhibidores y sustratos que se especificaron previamente, con el

fin de corroborar mediante este parámetro si estas actividades se ajustaban al patrón descrito.

Extractos HST de hígado de rata obtenidos en presencia y ausencia de Mg^{2+} (ver Materiales y Métodos), fueron incubados durante distintos tiempos a 45° y 55° , determinándose la actividad remanente.

Las Figuras 21 y 22 muestran los patrones de estabilidad térmica de AchE y ChE a $45^{\circ}C$ y $55^{\circ}C$, respectivamente.

A $45^{\circ}C$, la actividad de ChE de los extractos obtenidos en presencia de Mg^{2+} , se incrementa en un 30% a los 5 minutos y no se ve modificada por la exposición a esta temperatura durante un período de 60 minutos. En contraste, la actividad de AchE se reduce a un 60% de la actividad inicial a los 20 minutos (Figura 21 A).

En los extractos obtenidos en ausencia de Mg^{2+} , la actividad de ChE mostró un incremento inicial equivalente (30% a los 5 minutos), aunque se encontró una gradual inactivación a partir de los 15 minutos, llegando a un 40% de la actividad inicial a los 60 minutos. La actividad de AchE en este extracto mostró un patrón de inactivación similar al encontrado en los extractos con Mg^{2+} (Figura 21 B).

Cuando se analizó la estabilidad de las actividades de AchE y ChE de hígado de rata a $55^{\circ}C$, no se encontraron diferencias significativas en los extractos obtenidos en presencia (Figura 22 A) y ausencia de Mg^{2+} (Figura 22 B). Tanto AchE como ChE mostraron una inactivación superior al 80% a los 5 minutos de incubación a esta temperatura.

Estos resultados muestran que las actividades de ChE y AchE de hígado de rata se comportan de manera diferencial frente a incrementos de la temperatura, observándose para ChE el efecto protector del Mg^{2+} a 45°C; aunque el comportamiento de ChE de extractos de hígado difiere del descrito por Pavlic (1988) para ChE purificada de suero de ratón que a 55°C mantiene su actividad.

Distribución subcelular de AchE y ChE en hígado de rata:

Una vez establecida en hígado de rata la presencia de actividades de colinesterasa atribuibles a AchE (E.C.3.1.1.7) y ChE (E.C.3.1.1.7) de acuerdo a sus especificidades de sustratos, sensibilidad a inhibidores e inactivación térmica, nos interesó determinar a qué tipo de organelas subcelulares se asociaban estas actividades, ya que sólo se habían reportado estudios de AchE mediante fraccionamientos primarios (Wheeler y cols. 1972).

Inicialmente, se emprendió el estudio de estas actividades en fracciones obtenidas de hígado de rata mediante centrifugación diferencial como fue descrito por Lahav y cols. (1982). Las fracciones obtenidas (nuclear, mitocondrial cruda y microsomal) presentaron considerable contaminación cruzada a juzgar por los valores de las enzimas diagnósticas de las diferentes organelas, y por esto las actividades de AchE y ChE detectadas en el homogenato no pudieron ser atribuidas a alguna organela en particular (datos no mostrados). Sin embargo, este tipo de fraccionamiento permitió obtener la evidencia de que las

actividades de AchE y ChE no se encuentran presentes, al menos en cantidades significativas, en el citosol, ya que con este tipo de técnicas de separación ésta es la única fracción que se puede esperar obtener con elevado grado de pureza.

Por estas razones, se decidió emplear otras técnicas de fraccionamiento, que permitieran obtener fracciones representativas de las diferentes organelas y membranas con alto grado de pureza (ver Materiales y Métodos).

-Caracterización bioquímica de las fracciones obtenidas:

Para determinar el grado de pureza de las fracciones subcelulares obtenidas, se ensayaron las actividades de las enzimas marcadoras de retículo endoplasmático (glucosa-6-fosfatasa), de membrana plasmática (5' nucleotidasa) y de aparato de Golgi (sialil-transferasa). Las actividades específicas se calcularon respecto a la masa total de prots de cada fracción, excepto en el caso del RER en el cual se descontó 1/3 de las mismas, que corresponden a proteínas ribosomales (Fleischer y Kervina, 1974).

La Figura 23 muestra las actividades específicas de las enzimas marcadoras en las fracciones obtenidas. Estos resultados indican que las fracciones presentan enriquecimientos de las enzimas marcadoras que están en concordancia con lo descrito por otros autores.

- Distribución de AchE y ChE en las diferentes fracciones subcelulares:

Las a.e. de colinesterasa total (medidas empleando ATC como sustrato, en ausencia de inhibidores) de fracciones de RER

(retículo endoplasmático rugoso), REL (retículo endoplasmático liso), MP (membrana plasmática), GA (aparato de Golgi) y M (fracción microsomal) se muestran en la Figura 24. Estas fueron superiores a la de Homogenato total en todas las fracciones ensayadas.

Cuando se discriminó la actividad de AchE y ChE se encontró que AchE estaba enriquecida 6 veces en PM y GA, mientras que la actividad de ChE lo estaba 13 veces en RER y 9.6 veces en REL.

La fracción microsomal, que como se muestra en la Figura 23, está constituida por una población heterogénea de membranas y vesículas, estuvieron enriquecidas 2.5 y 2.8 veces en AchE y ChE, respectivamente.

Como se detectó cierta actividad de AchE en RER y REL, y de ChE en PM y GA, se evaluó la contaminación de cada fracción con otras membranas, tomando como criterio la a.e. de las enzimas marcadoras en las fracciones purificadas. Utilizando este criterio, el tipo de error que se espera cometer es el de sobreestimar la contaminación, por subestimación de la a.e. en las fracciones puras.

Se encontró que la actividad relativamente baja de ChE detectada en GA y PM podría explicarse por la presencia de vesículas de RE presentes en estas fracciones. Asimismo la contaminación de GA y PM en las fracciones de RER y REL podría considerarse la causa de la baja actividad de AchE detectadas en fracciones de RE. Sin embargo estas consideraciones no excluyen la posibilidad de que sean en realidad componentes genuinos de baja a.e. en estas fracciones, enmascarados por bajos niveles de contaminación de

membranas de alta a.e.. La elucidación de este punto requeriría otra aproximación metodológica.

La actividad de ChE está latente en vesículas del RE:

La orientación de las actividades de AchE y ChE en vesículas derivadas de hígado de rata, se evaluó mediante la comparación de la actividad de una preparación de vesículas intactas con la actividad determinada al permeabilizar las mismas. Este tipo de ensayos requiere conocer el grado de integridad de la preparación a emplear.

Fracciones microsomales fueron resuspendidas en condiciones extremadamente suaves empleando un homogenizador Dounce (émbolo B) en solución de sacarosa 0,25 M, y se ensayó la latencia de hidrólisis de manosa 6 fosfato (sustrato no permeante) por glucosa 6 fosfatasa (enzima de RE de orientación luminal). El porcentaje de vesículas de RE intactas en las preparaciones empleadas fue de $89.1 \pm 5.4 \%$ (n=4).

Como se muestra en la Tabla IV, cuando se realizaron los ensayos de actividades de AchE y ChE en las preparaciones intactas y permeabilizadas (ya sea por tratamiento con Triton X-100 al 0.05% o por sonicación), se encontró que la permeabilización de las vesículas inducía un incremento significativo de la actividad de ChE (2,7 veces). En contraste, la actividad de AchE no varió significativamente por los tratamientos.

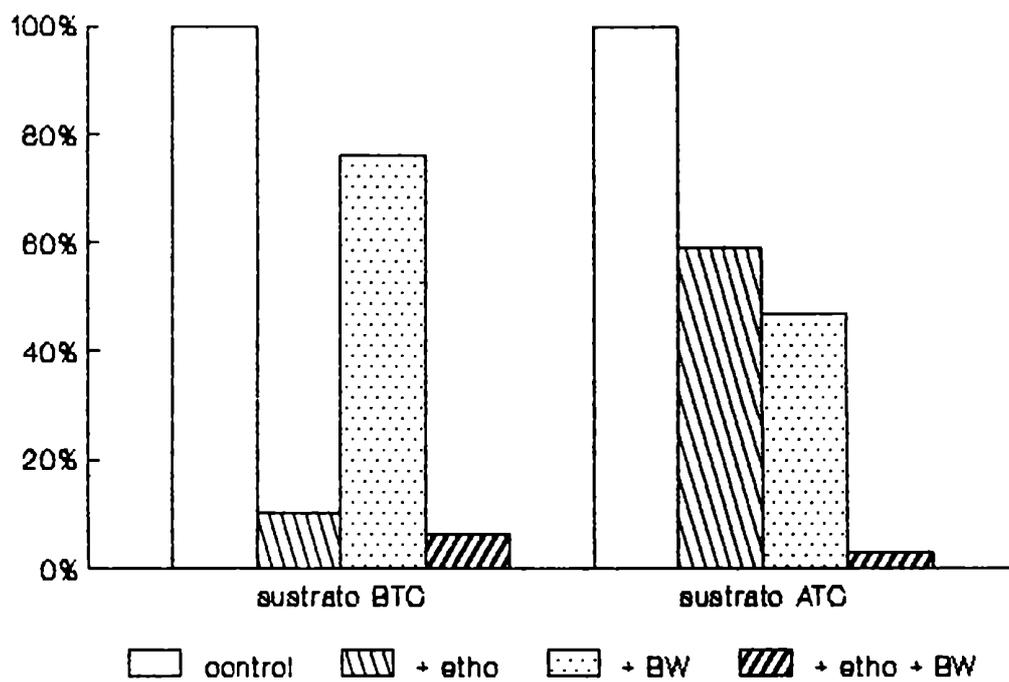
Extracción de activ. de AchE y ChE de fracciones subcelulares por tratamiento alcalino:

Con el fin de determinar si AchE y ChE de hígado de rata correspondían a proteínas integrales de membrana o por el contrario, se asociaban a las mismas por otros tipos de interacciones, se realizó un lavado alcalino de la fracción microsomal como se describió en Materiales y Métodos. La Tabla IV muestra que el 78% de la actividad de AchE se mantuvo asociada a las membranas de microsomas después del tratamiento, mientras que la actividad de ChE fue extraída en su totalidad. La recuperación de ambas enzimas fue del 83% respecto de la fracción microsomal total.

El mismo tratamiento se efectuó a fracciones enriquecidas en cada una de las enzimas (e.g. RER para ChE y GA para AchE). La Tabla IV muestra que el 96% de la actividad de ChE de RER fue extraída por el tratamiento alcalino, mientras que el 92% de la actividad de AchE permaneció asociada a las membranas de GA.

Fracciones de RER y GA homogenizadas en sacarosa 0,25 M, tris HCl 10 mM pH 7.4 y centrifugadas en las mismas condiciones que para el lavado alcalino, no mostraron diferencias significativas con fracciones no tratadas, indicando que la disrupción mecánica per se no contribuyó a la extracción de actividades (datos no mostrados).

Figura 20



Hidrolisis de ATC y BTC en hígado de
rata: sensibilidad a inhibidores

FIGURA 20

Hidrólisis de ATC y BTC en hígado de ratas: sensibilidad a inhibidores

Se determinó la hidrólisis de ATC (acetiltiocolina) y BTC (butiriltiocolina) en preparaciones de microsomas de hígado de rata, en ausencia de inhibidores (**control**) y en presencia de Ethopropazine (**Etho**) o BW 284 C 51 (**BW**) o ambos (**Etho + BW**) como se describió en la Sección 2.11.a.

Los valores mostrados indican el porcentaje de actividad respecto a la actividad del control y son el promedio de 3 experimentos independientes.

Figura 21

Estabilidad Termica a 45 oC

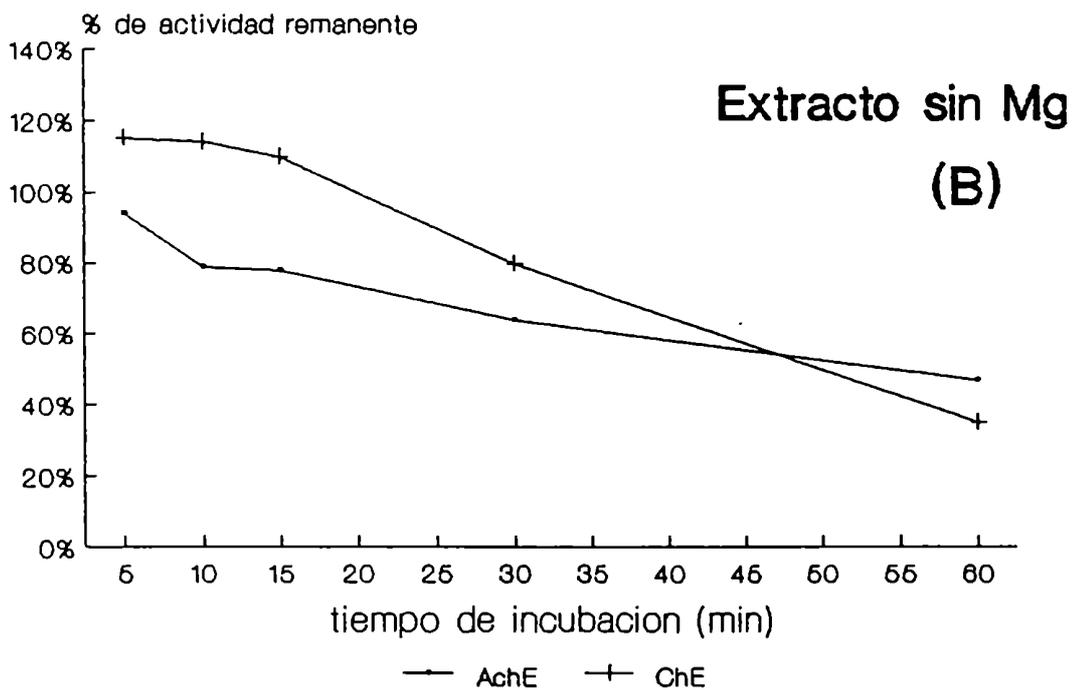
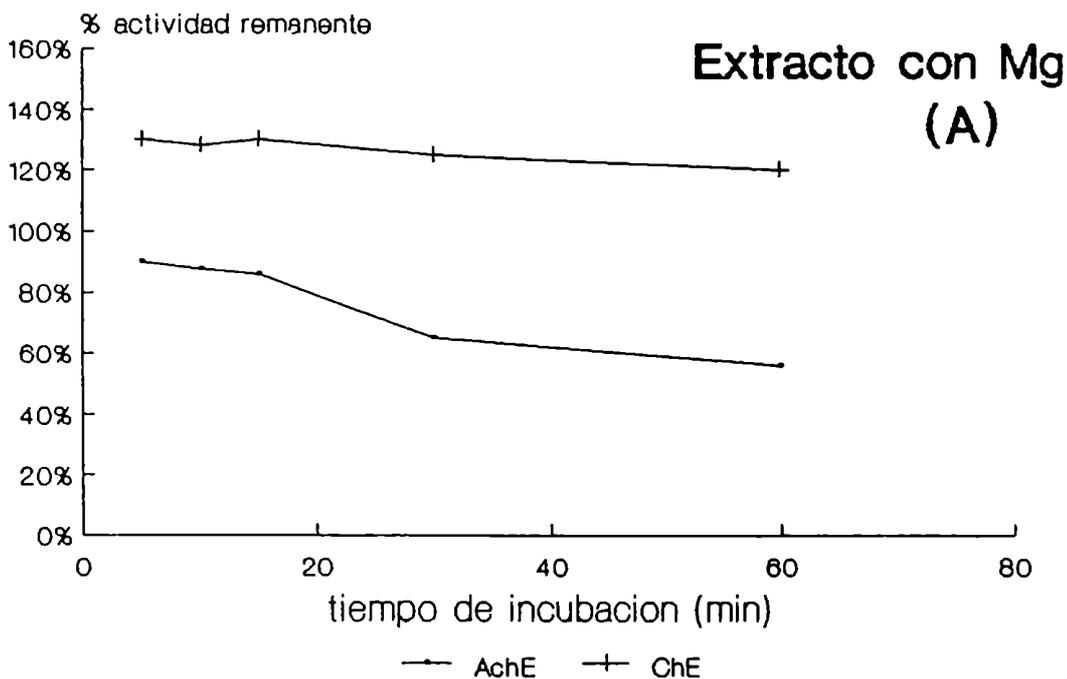


FIGURA 21

Estabilidad de AchE y ChE hepáticas a 45°C.

Extractos HST de hígado de rata obtenidos en presencia (A) y ausencia (B) de Mg^{2+} fueron incubados a 45°C durante 5, 10, 15, 20 y 60 minutos; y se determinaron las actividades de AchE y ChE remanentes. Los valores son el promedio de dos experiencias independientes.

Figura 22

Estabilidad Termica a 55 oC

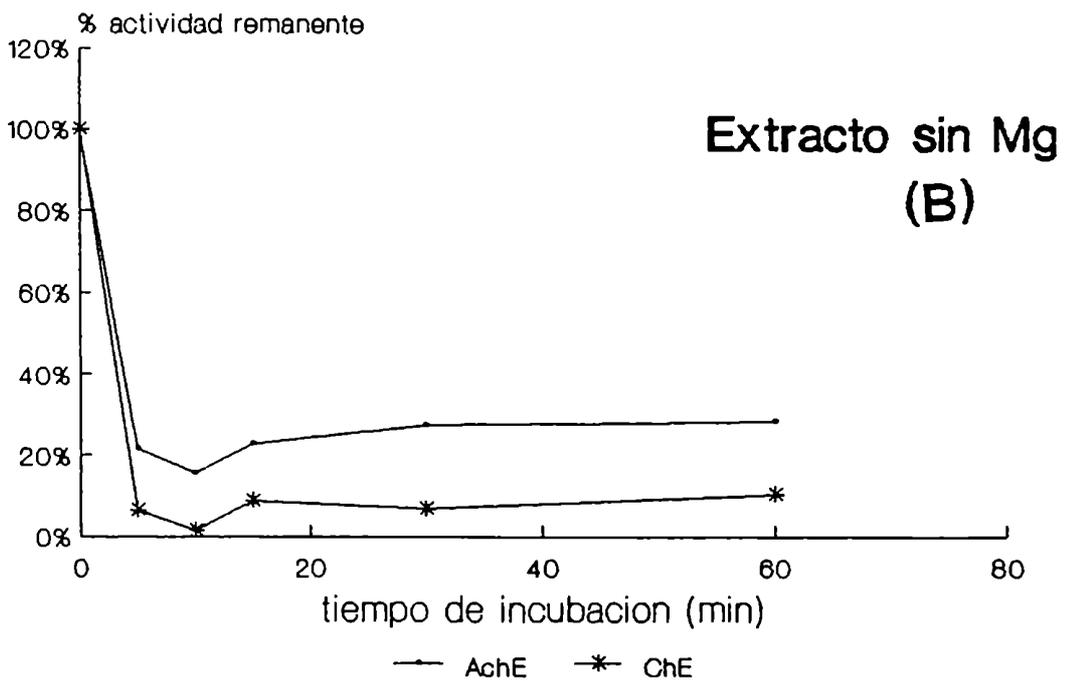
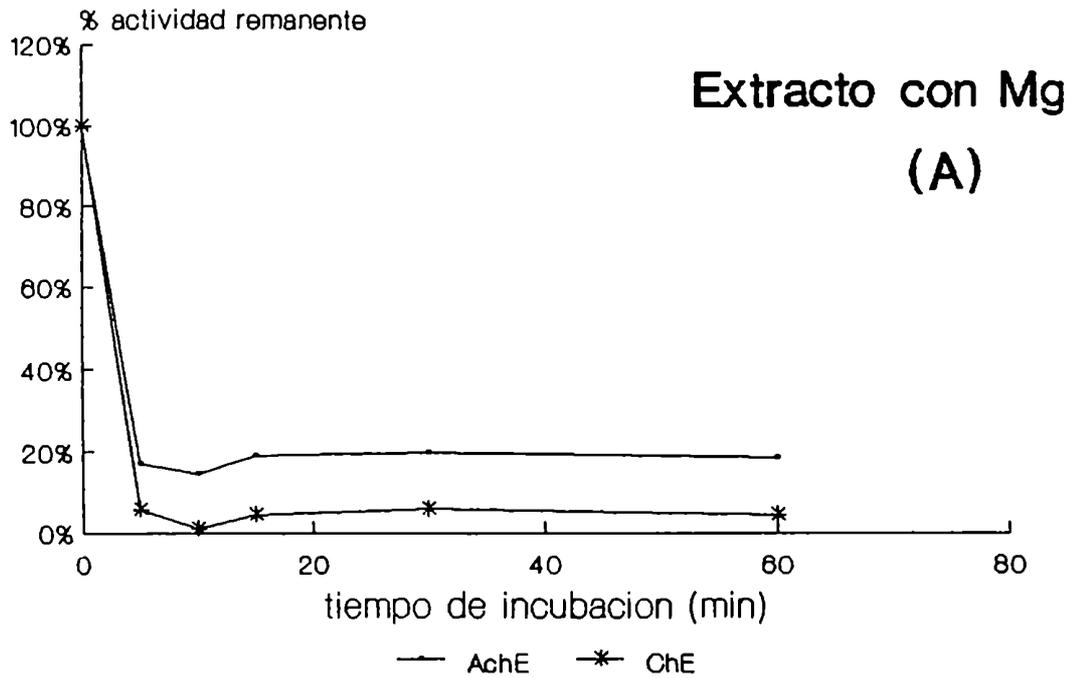
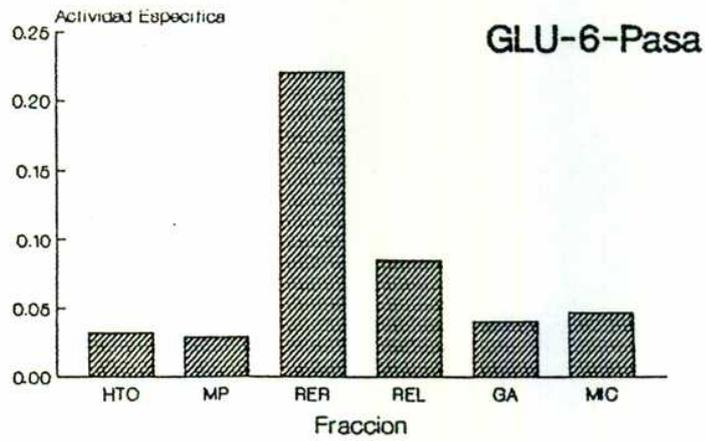


FIGURA 22

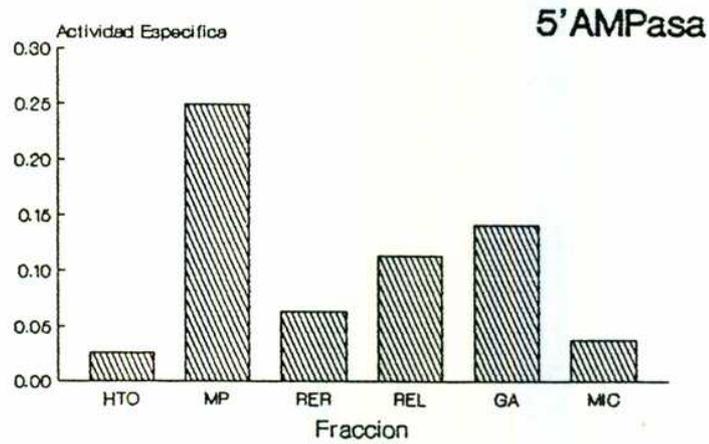
Estabilidad de AChE y ChE hepáticas a 55°C.

Se procedió como se describe para la Figura 21, excepto que las incubaciones se realizaron a 55°C.

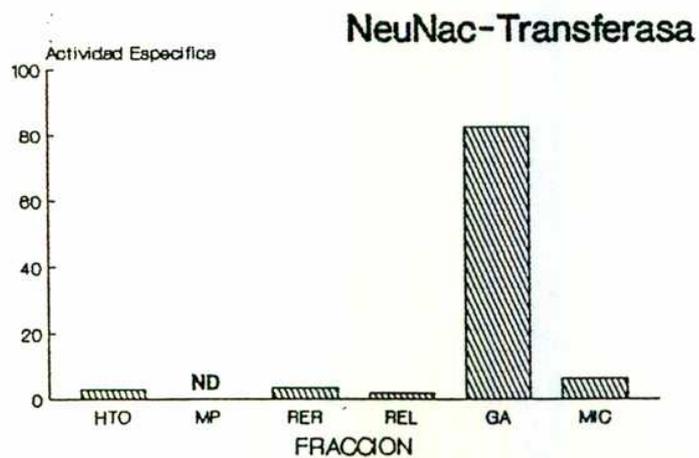
Figura 23



AE: $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg prot.}$



AE: $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg prot.}$



AE: $\text{nmol}/\text{hora}/\text{mg prot.}$

FIGURA 23

Actividades de enzimas diagnósticas en fracciones subcelulares de hígado de rata

Las fracciones subcelulares se obtuvieron como se describe en la Sección 2.3.

(A) glucosa-6-fosfatasa

(B) 5'nucleotidasa

(C) ácido N-acetil-neuramínico-transferasa

Las a.e. se expresan como μ moles de producto/min/mg de proteínas; excepto para ácido N-acetil-neuramínico transferasa (sialil-transferasa) que se expresa como nmoles de ácido siálico transferido/hora/mg de proteínas.

Los resultados presentados son el promedio de al menos 3 preparaciones independientes, DS < 15% que la media.

H: homogenato; RER: retículo endoplasmático rugoso; REL: retículo endoplasmático liso; MP: membrana plasmática; GA: aparato de Golgi; M: microsomas.

Figura 24

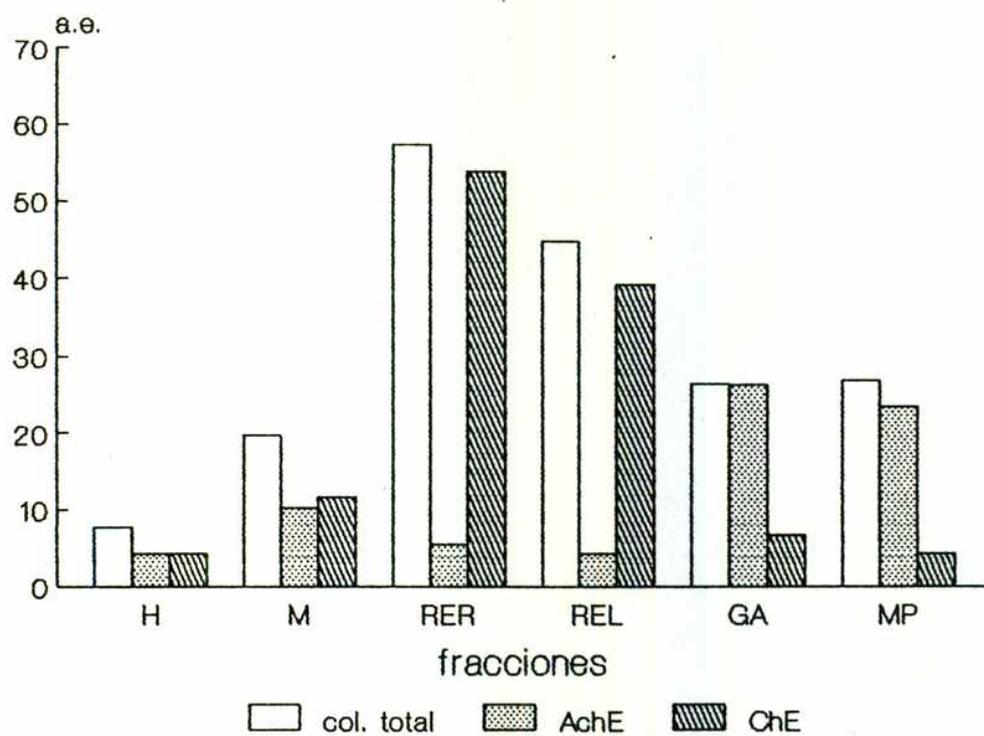


FIGURA 24

Actividades de AchE y ChE en fracciones subcelulares de hígado de rata

Las a.e. se expresan como nmoles de sustrato hidrolizados/min/mg de proteínas.

Los valores mostrados son el promedio de al menos 3 preparaciones independientes, DS menor que 12% de la media.

Las fracciones se indican como en la Figura 23.

TABLA IV

**ACTIVIDADES DE AchE Y ChE EN FRACCIONES DE HIGADO DE RATA
SOMETIDAS A PERMEABILIZACION, DISRUPCION MECANICA Y
TRATAMIENTO ALCALINO**

<u>Tratamiento</u>	<u>AchE</u>	<u>ChE</u>
Sonicación (M)	0.92	2.76
Triton X-100 0.05% (M)	1.20	2.71
Na ₂ CO ₃ 0.1 M; pH 11.5 (M)	1.30 (78%)	0.20 (2%)
(RER)	-	0.04 (4%)
(GA)	0.92 (92%)	-

Las fracciones fueron obtenidas como se describió en la Sección 2.3. El tratamiento alcalino se realizó según se detalla en la Sección 2.5.

Los valores indican las a.e. de las preparaciones tratadas respecto a las a.e. de las preparaciones no tratadas.

Los números entre paréntesis indican el porcentaje de recuperación respecto de la actividad total de la fracción previo al tratamiento.

CAPITULO 5:

Propiedades de extracción y propiedades de interacción con detergentes no iónicos y fosfolípidos de AchE y ChE de hígado y corteza cerebral de rata

RESULTADOS:

Propiedades de solubilidad:

Se aplicaron a tejido hepático y corteza cerebral de rata dos secuencias de extracción utilizadas para el estudio de la distribución de colinesterasas en otros tejidos:

La secuencia A consiste de una homogenización y extracción inicial en alta fuerza iónica seguida de una extracción del material particulado remanente en presencia de Triton X-100. La secuencia B consiste de una extracción inicial en baja fuerza iónica, seguida de dos reextracciones sucesivas en presencia de detergente: la primera en baja fuerza iónica y la última en alta fuerza iónica.

Los resultados obtenidos en hígado de rata se muestran en la Figura 25. Aplicando la secuencia A se encontró que en HS sólo fue posible solubilizar un 33% y 24% de las actividades totales de AchE y ChE respectivamente, siendo el 64% de la actividad de AchE y el 73% de la actividad de ChE extraíbles en presencia de Triton X-100. La reextracción con HS (fracción HS') previo a la extracción con Triton X-100 solubilizó sólo cantidades relativamente bajas del total (3% y 2% de AchE y ChE) confirmando que la solubilización de la mayor parte de las actividades de AchE y ChE requiere tratamientos más drásticos.

Cuando el hígado fue extraído de acuerdo a la secuencia B, se encontró que sólo un 1% y un 17% de las actividades de AChE y ChE son solubilizables en LS. Este tipo de tratamiento a baja fuerza iónica sólo es capaz de solubilizar aquellas proteínas que siendo solubles, se encuentran adsorbidas a las membranas (Autori y cols. 1975), por lo que se podría considerar que la fracción de actividad extraída en estas condiciones corresponde a una población auténticamente soluble. Como en la secuencia A, una reextracción del material particulado en el mismo medio (en este caso LS) no produjo una mayor solubilización, por lo que consideramos que una baja relación solvente:membranas no fue un factor limitante que determinara una solubilización inicial ineficiente. LST extrajo un 43% de AChE y 63% de ChE. Una posterior extracción en HST extrajo un 49% AChE y 17% ChE.

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos cuando estas secuencias de extracción se aplicaron a corteza cerebral de rata adulta. En contraste con lo encontrado para hígado de rata, este tejido no mostró diferencias significativas de las actividades de AChE y ChE extraídas mediante homogenización y extracción inicial en HS y LS. HS solubilizó 14% y 32% de AChE y ChE, respectivamente; mientras que LS solubilizó 17% y 36% de la actividad total de cada una de ellas. La reextracción del material particulado previo al tratamiento con detergente, no produjo mayor solubilización. A diferencia del hígado, las actividades de AChE y ChE que permanecían asociadas a las membranas de corteza cerebral después de la extracción en LS,

fueron solubilizadas totalmente en LST, no detectándose actividad de estas enzimas en un posterior extracto HST.

A modo de control, nos interesó corroborar si la fracción de actividad extraíble en condiciones que no afectan la integridad de la bicapa lipídica (es decir, en ausencia de detergente), podía considerarse en realidad una población de moléculas no asociadas estrechamente a membranas. Se empleó como marcadora la actividad de 5' nucleotidasa, ya que en hígado de rata se ha descrito que permanece firmemente asociada a las mismas cuando se solubiliza en soluciones acuosas libres de detergentes. No se detectó actividad de 5' nucleotidasa en los extractos LS y LS' y menos del 10% de la actividad total de esta enzima en el homogenato se solubilizó en HS; lo que indica que en las condiciones de trabajo aquí empleadas, las actividades extraíbles en ausencia de detergente no constituyen un "artificio" producido por otros factores (e.g. degradación proteolítica o disrupción mecánica).

Con el fin de determinar si el requerimiento de detergente para solubilizar un porcentaje significativo de la actividad de estas enzimas se debía a que esta actividad se encontraba "latente" en vesículas cuya integridad no se había visto afectada en las homogeneizaciones iniciales en HS y LS, se midió la latencia de hidrólisis de un sustrato no permeante (manosa 6 fosfato) por una enzima de orientación luminal en el RE (glucosa 6-fosfatasa) en las fracciones particuladas obtenidas por centrifugación después de las extracciones.

Como se observa en la Tabla V, se encontró que la homogenización y extracción de hígado en HS afectaba la integridad de al menos un 85% de las vesículas del RE. En contraste, cuando el tejido era homogenizado inicialmente en LS, un 85% de las vesículas del RE permanecían intactas. Esto indica que en las condiciones de homogenización inicial de la secuencia B, no es esperable extraer la actividad enzimática que estuviera en el contenido de las vesículas del RE, aún cuando esta fuera "soluble" o no asociada a membranas. Un elevado porcentaje de vesículas del RE (más del 70%) se encontraron intactas aún luego de una segunda extracción en LS.

En el caso de la corteza cerebral, la homogenización y extracción en ambos medios (LS y HS) indujo la disrupción de más del 85% de las vesículas del RE.

De esta manera, las diferencias obtenidas en actividad de AChE y ChE solubilizadas en HS y LS para el hígado podrían atribuirse, al menos en parte, a la "latencia" de estas enzimas en las vesículas microsomales.

Por otra parte, no es factible atribuir a la latencia como factor único las diferencias entre HS y LS, sin antes descartar la contribución de la desestabilización de las interacciones iónicas inducidas por HS u otros factores.

De hecho, una baja fuerza iónica en presencia de detergente (LST) no fue capaz de solubilizar la totalidad de las actividades en la secuencia B, y una posterior extracción en alta fuerza iónica +

detergente solubilizó cantidades significativas de AChE y ChE (49% y 17%, respectivamente).

A priori, esto sugiere la presencia de formas A (asimétricas) en este tejido. Estas se caracterizan por interactuar con las membranas por interacciones de tipo iónico, lo que determina el estricto requerimiento de alta fuerza iónica para su solubilización y su resistencia a la solubilización por detergentes no iónicos en baja fuerza iónica, como se mencionó en el Capítulo 1. Sin embargo, como se verá más adelante, no se han detectado formas A en extractos de este tejido mediante centrifugación en gradientes de densidad.

Efecto de la fuerza iónica en la extracción secuencial de las actividades de AChE y ChE de hígado de rata:

Se estudiaron los efectos de la fuerza iónica en la eficiencia de las extracciones secuenciales de AChE y ChE de hígado de rata con el fin de responder a los siguientes interrogantes:

a- De qué forma influye la fuerza iónica de las soluciones en que se realiza la homogeneización y extracción inicial del tejido en la solubilización posterior de AChE y ChE por detergentes no iónicos ?

b- De qué forma es afectada la solubilización por detergentes de las actividades de colinesterasas por la fuerza iónica en que se realiza la extracción?

Con el fin de responder a la pregunta a, el tejido fue extraído en las siguientes condiciones:

-Serie A: dos extracciones sucesivas en LS.

-Serie B: dos extracciones sucesivas en HS.

A los fines de interpretar los resultados y basándose en los resultados previamente obtenidos, se consideró que las fracciones particuladas obtenidas (previa centrifugación a 100000 g durante 1 hora) contenían vesículas de RE intactas (ver Tabla V) sin proteínas adsorbidas (serie A) y membranas carentes de proteínas solubilizables por alta fuerza iónica (serie B).

Para responder al interrogante planteado en b, las fracciones particuladas obtenidas de las series A y B fueron sometidas a extracciones secuenciales en presencia de Triton X-100 al 1% en diferentes condiciones de fuerza iónica, a saber:

-Secuencia I: extracción en HST; reextracción en HST.

-Secuencia II: extracción en LST; reextracción en LST.

-Secuencia III: extracción en LST; reextracción en HST.

A las fracciones solubles obtenidas al centrifugar 100000 x g durante 1 hora se ensayó actividad de AchE y ChE. Los resultados se muestran en la Figura 27.

Se encontró que para la extracción de colinesterasas con Triton X-100 en alta fuerza iónica (sec. I), resulta indistinto el pretratamiento al que fueron sometidas las membranas; ya que las actividades de AchE y ChE extraídas no difieren entre preparaciones que aún conservan proteínas periféricas (serie A) y aquellas en que éstas fueron previamente extraídas (serie B).

Una reextracción del material particulado en las mismas condiciones (HST') no condujo a la solubilización de más actividad, por lo que las actividades solubilizadas por HST se

consideró el 100% para comparar la eficiencia de otras secuencias de extracción.

Cuando membranas fueron extraídas por Triton X-100 en baja fuerza iónica (LST; 1ª extracción de las secuencias II y III), se evidenció una diferencia en las actividades solubilizadas entre las Series A y B, que es más pronunciada para ChE.

LST solubiliza 76% y 87.5% de las actividades totales de AchE y ChE, respectivamente, cuando se aplica a membranas preextraídas con HS (serie B) y sólo 64% y 56% de AchE y ChE cuando se aplica a membranas preextraídas con LS (serie A). En este último caso (serie A) se observó que la actividad que permanecía asociada a la fracción particulada después de la extracción con LST, no era extraíble por una 2ª extracción por LST (sec.II) y si por HST (sec.III).

Estos resultados indican que la pre-extracción de las membranas con HS hace que la extracción posterior en presencia de detergentes sea prácticamente independiente de la fuerza iónica en que se realiza. En contraste, cuando el tejido es pre-extraído en LS, se requiere **alta fuerza iónica** en la extracción con detergente para solubilizar el 100 % de la actividad remanente, ya que LST en estas condiciones sólo solubiliza una fracción de la actividad. Como en ambos casos la extracción se realiza en presencia de Triton X-100, que afecta la integridad de las vesículas, esta diferencia no podría atribuirse a especies solubles latentes en el interior de vesículas. Además, la actividad que permanece asociada a la fracción particulada

después de la extracción con LST no es solubilizable por reextracción en el mismo medio y sí por HST. Estos resultados indican que el desplazamiento de interacciones electrostáticas por medio de alta fuerza iónica resulta imprescindible a los fines de solubilizar cuantitativamente la actividad de colinesterasas de hígado.

Cuando se analizó la extractabilidad de AchE de eritrocitos humanos en diferentes condiciones (Tabla VI), se encontró que la aplicación de extracciones secuenciales HS-CO₃ y CO₃-HS inducía una solubilización mayor que la esperada basándose en cada tratamiento realizado individualmente. Estos resultados indican que la desestabilización de interacciones iónicas y/o modificación de plegamiento de las proteínas por variaciones en sus cargas afectan la posterior extractabilidad de AchE.

Grado de ensamblaje de las especies de AchE y ChE solubilizadas por HS y HST:

Las formas moleculares de AchE y ChE presentes en extractos HS y HST de hígado de rata se determinaron mediante centrifugación de alícuotas de estos extractos en gradientes de sacarosa conteniendo 1% Triton X-100 tal como se describió en la Sección 2.6. La Figura 28 muestra las actividades de AchE y ChE registradas en las fracciones de los gradientes.

Los perfiles de sedimentación obtenidos indican que en hígado de rata existen sólo formas globulares (G) de AchE y ChE, no habiéndose detectado actividad correspondiente a formas asimétricas (A).

La actividad de ChE de ambos extractos sedimentó como un pico único, que por comparación con patrones de sedimentación tenía 6.0 S, por lo que la actividad de ChE se podría atribuir a dímeros + monómeros (G2 + G1). En contraste, la actividad de AchE sedimentaba como dos poblaciones de 9.5 S y 6.0-5.5 S, correspondientes a tetrámeros (G4) y dímeros + monómeros (G2 + G1). Al comparar las características de sedimentación de AchE en ambos extractos no se encontraron diferencias cualitativas. La contribución porcentual de cada especie de AchE a la actividad total en el extracto HST fue: 40% correspondiente a la forma G4 y el 60% restante a formas G2 + G1.

Estos resultados indican que las poblaciones de colinesterasas que manifiestan solubilidad diferencial en hígado de rata no corresponden a poblaciones con diferente grado de ensamblaje, y por lo tanto este factor no es el determinante de las diferencias en extractabilidad .

Propiedades de interacción con detergentes no-iónicos y propiedades hidrodinámicas en presencia y ausencia de detergente:

En la Sección precedente se mostró la asociación de cantidades significativas de AchE y ChE a las membranas extraídas en diferentes condiciones iónicas en ausencia de detergente.

En estas condiciones, el requerimiento de detergentes no iónicos para la extracción de una proteína sugiere que las interacciones hidrofóbicas podrían jugar un rol importante en la unión de esta a las membranas.

Propiedades hidrodinámicas en ausencia y presencia de detergentes no-iónicos:

El carácter anfifílico de una proteína se define por su interacción con detergentes no-iónicos, con los cuales forman complejos.

Operativamente, éste carácter puede valorarse por los cambios en las propiedades hidrodinámicas de las moléculas que acompañan la unión del detergente. Entre estos se suele determinar la disminución del coeficiente de sedimentación y aumento del radio de Stokes, causados por el elevado volumen parcial específico de los complejos debido al Triton unido ($V_{\text{TritonX-100}}=0.908$), aunque también se cree que podrían contribuir la asimetría y la anormal solvatación de los complejos.

Con el fin de estudiar si las actividades de AchE y ChE de hígado de rata manifestaban carácter anfifílico, se determinaron los patrones de sedimentación de AchE y ChE en extractos HST por centrifugación en gradientes de sacarosa (5-20%) conteniendo 1% Triton X-100 y se compararon con los obtenidos en gradientes libres de detergente.

La Figura 29 (A) muestra que la actividad de AchE en este extracto sedimenta en presencia de Triton X-100 como dos picos de 9.5S y 6.0 S, que corresponderían a G4 (tetrámeros) y G2+G1 (dímeros + monómeros) según el esquema de Bon (1979). La Figura 30 (A) muestra el perfil de sedimentación de la actividad de ChE

en presencia del detergente , la cual sedimenta como un pico único de 6.5 S, correspondiente a G2+G1.

Cuando alícuotas de los mismos extractos fueron separadas en gradientes de sacarosa (5-20%) en ausencia de detergente, se observó que la actividad total de AchE recuperada en el gradiente se vio considerablemente reducida respecto a una muestra equivalente separada en presencia de detergente (Figura 29 (B)). El área total del perfil de sedimentación de AchE en ausencia de detergente fue del 66% del área equivalente en presencia de Triton X-100.

Asimismo se vio afectado el patrón de sedimentación: se encontró una considerable proporción de la actividad polidispersa en fracciones correspondientes a altos coeficientes de sedimentación (>12S); mientras que las áreas correspondientes a los picos de G4 y G2+G1 obtenidos en presencia de detergente se reducían considerablemente.

Con el fin de determinar si la pérdida de una sustancial porción de la actividad catalítica de AchE de HST en ausencia de detergente podía restaurarse por la adición de Triton X-100, alícuotas de las formas de AchE aisladas de gradientes libres de detergentes fueron incubadas 10 minutos a temperatura ambiente con una cantidad de Triton X-100 suficiente para dar una concentración final de 1%. Se ensayó la actividad de AchE y se comparó con la actividad de alícuotas sometidas a la incubación sin detergente.

La Tabla VII muestra que la actividad de AchE de las fracciones 19 y 26 (correspondientes a G4 y G2+G1, respectivamente) aisladas del gradiente sin detergente no se incrementó por preincubación con Triton X-100 al 1%, lo cual descarta que las actividades significativamente menores encontradas respecto al gradiente en presencia de Triton X-100 se debieran a inhibición por ausencia del detergente.

En contraste, las fracciones 5 y 9 (correspondientes a agregados) del gradiente libre de detergente evidenciaron un incremento promedio del 32% en la actividad de AchE cuando fueron preincubadas con Triton X-100 al 1%, lo que indica que la agregación de AchE en ausencia de detergente está acompañada de una considerable reducción en actividad, reversible por el agregado de un anfifilo.

La agregación en gradientes libres de detergentes es indicativa de que la forma G4 y una alta proporción de la forma G2+G1 de la AchE de hígado de rata se comportan como anfifílicas. Esta agregación de las formas anfifílicas permite detectar un componente menor correspondiente a G2+G1 hidrofílico, que podría atribuirse a derivados líticos hidrofílicos de las formas anfifílicas o a la existencia de formas no-anfifílicas de AchE en este tipo de extractos.

Con respecto a la actividad de ChE en gradientes libres de detergente (Figura 30 B), se encontró que la actividad sedimentaba como un pico no simétrico de 6.0 S con un hombro a

6.5 S, sin que fuera evidente la formación de agregados de mayor coeficiente de sedimentación.

En contraste con lo observado para AchE del mismo extracto, el área total del perfil de sedimentación de ChE en presencia de Triton X-100 fue considerablemente menor (34%) que la obtenida en gradientes libres de detergente. Con el fin de determinar si el Triton X-100 inhibe la actividad de ChE, alícuotas de la fracción 26 del gradiente sin detergente fueron incubadas 10 minutos a temperatura ambiente en ausencia y en presencia de Triton al 1%. Como se observa en la Tabla VII, el Triton al 1% inhibe un 54 % de la actividad de ChE.

La ausencia de agregados de ChE en gradientes libres de detergentes no nos permite excluir el posible carácter anfifílico de la enzima en este extracto, habida cuenta del incremento del coeficiente de sedimentación observado.

Polimorfismo de ChE detectado por electroforesis no desnaturizante.

Como técnica complementaria a la sedimentación en gradientes de sacarosa, se empleó la electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida. Un extracto LST de hígado de rata fue sometido a electroforesis no-desnaturizante en geles de poliacrilamida en presencia de Triton X-100 al 0,5%, y el patrón de especies con actividad de ChE fue determinado mediante una tinción histoquímica específica según lo descrito en la Sección 2.8.

Como se observa en la Figura 31 (A), en presencia de Triton X-100 la actividad de ChE del extracto LST se separa en 3 bandas principales: la más abundante de menor movilidad electroforética (banda 1) y dos bandas menos abundantes de mayor movilidad (bandas 2 y 3). La resolución de la actividad de ChE del extracto en más de una especie confirma que las poblaciones homogéneas de acuerdo a su S manifiestan heterogeneidad al ser sometidas a otros procedimientos analíticos.

El patrón obtenido al realizar la electroforesis en idénticas condiciones en ausencia de detergente se muestra en la Figura 31 (B).

En ausencia de detergente en el gel y buffer, la movilidad de la banda 1 no se modificó (aunque se evidencia una leve reducción de su actividad). Las bandas 2 y 3 no aparecen. Asimismo, en ausencia de detergente, aparece una especie de alta movilidad y baja actividad (banda 4) que no se observa en presencia de detergentes. La elevada movilidad electroforética de esta especie sugiere que podría corresponder a la forma G1 (monómero). Aunque no se ha investigado en detalle su comportamiento electroforético y propiedades de interacción con detergentes no iónicos, su ausencia cuando los extractos son sometidos a electroforesis en presencia de detergente, podría deberse a dimerización de estas formas G1 en estas condiciones. Tal comportamiento se ha descrito para la ChE G1 de corazón de *Torpedo*, para la cual se ha verificado además su carácter anfifílico (Bon 88).

Interacción de ChE hepática con detergentes no-iónicos:

Con el fin de estudiar el comportamiento hidrofóbico de la ChE hepática, se empleó como criterio de distinción entre especies anfifílica y no-anfifílicas la interacción con Tritón X-114, que tiene como ventaja que define el carácter anfifílico de una proteína independientemente de sus propiedades de agregación.

El detergente de la serie del Triton más comúnmente usado, Triton X-100, forma a temperatura ambiente soluciones micelares claras. Al aumentar la temperatura el peso molecular micelar aumenta, y la solución se vuelve subitamente turbia a los 64°C. A esta temperatura, llamada el cloud point (c.p.), ocurre una separación macroscópica de fases en la solución, que podría deberse a una asociación secundaria de micelas pequeñas en grandes agregados micelares. A temperaturas mayores, la separación de fases prosigue hasta que se forman 2 fases claramente definidas, una superior y otra inferior, depletada y enriquecida en detergente, respectivamente.

Dentro de la serie del Triton, la temperatura del cloud point depende fuertemente del número de unidades oxietileno (hidrofílicas) unidas al residuo octifenil (hidrofóbico).

La solubilidad en agua del residuo más hidrofóbico de la serie del Triton, (n<6) apenas excede la concentración micelar crítica, y el detergente se encuentra en una fase separada, aún a 0°C. El Triton X-114 (n=7-8) exhibe en soluciones diluidas una temperatura de c.p. de 20°C, que resulta conveniente para la condensación y separación reversible del detergente en condiciones compatibles con el aislamiento de proteínas nativas.

Considerando que sólo proteínas con algún componente hidrofóbico pueden formar micelas mixtas con detergentes no iónicos, se emplea la separación de fases de soluciones diluidas de Triton X-114 a 20-30°C como forma de separarlas de las proteínas hidrofílicas que se recuperan en la fase superior depletada en detergente.

Cuando un extracto HST de hígado de rata fue sometido a separación de fases a 30°C como se describió en la Sección 2.9, la fase inferior enriquecida en detergente contenía después de dos recondensaciones un 65% de la actividad de ChE recuperada (que osciló entre el 70 y el 90% de la actividad inicial sometida a partición).

La actividad de AchE de los extractos de hígado de rata se inhibió considerablemente por adición de Triton X-114, lo que no permitió realizar estimaciones de su partición en las dos fases. En el caso de la corteza cerebral de rata, la actividad de AchE se inhibió en un 50% por agregado de este detergente; sin embargo el carácter anfifílico de AchE de corteza cerebral se puso en evidencia ya que el 80% de la actividad recuperada particionó en la fase de detergente. La baja actividad de ChE de corteza cerebral no hizo posible las mediciones de partición de esta enzima con el método colorimétrico utilizado en este trabajo.

La interacción de la actividad de ChE de hígado de rata con micelas de detergente no iónico indica que según este criterio al menos una fracción de esta actividad manifiesta carácter anfifílico.

Incorporación de AchE y ChE de hígado de rata a vesículas fosfolipídicas:

Se estudió la interacción de AchE y ChE -extraídas de hígado de rata con detergentes - con fosfolípidos, como criterio adicional de carácter anfifílico, tal como fuera empleado por Ott y Brodbeck para AchE de GR (1984).

La interacción de proteínas con fosfolípidos o vesículas fosfolipídicas preformadas puede lograrse si se remueve el detergente de los extractos, procedimiento que principalmente depende de la naturaleza del detergente.

Así, la formación de proteoliposomas por remoción del detergente se puede lograr por diálisis, en el caso de que el detergente empleado para la solubilización tenga una CMC elevada (e.g. octil glucosido, CMC 24 mM). En el caso del Triton X-100, que tiene una CMC baja (0,25 mM), se puede recurrir a su remoción de los extractos mediante adsorción o filtración en geles, y posteriormente proceder a la reconstitución por sonicación breve y/o congelamiento /descongelamiento de una mezcla del extracto depletado de detergente y liposomas preformados.

Con el fin de analizar si las actividades de AchE y ChE presentes en los extractos eran capaces de interactuar con vesículas fosfolipídicas era imprescindible contar con una técnica que permitiera separar las vesículas de aquellas proteínas que no se asociaron a las mismas. Con tal fin se empleó una técnica basada en las diferencias de densidades de proteoliposomas y proteínas no asociadas a lípidos.

Incorporación de AChE y ChE de extractos de hígado a proteoliposomas obtenidos por diálisis y por sonicación:

Un extracto de hígado obtenido solubilizando membranas pretratadas con HS en presencia de 0,6% octilglucósido, fue sometido a diálisis en presencia y ausencia de fosfolípidos y los proteoliposomas obtenidos fueron separados de las proteínas no incorporadas por flotación en gradientes isopícnicos de sacarosa como se describió en las Secciones 2.10.a y 2.10.c.

Las Figuras 31 A y B muestran las actividades de AChE y ChE en las fracciones de los gradientes. Se encontró que en los extractos no reconstituidos (es decir dializados en ausencia de PL) las actividades de AChE y ChE tenían un pico de actividad comprendido en las 5 fracciones más densas del gradiente. Esta posición se considera entonces la correspondiente a la densidad de AChE y ChE no asociada a PL.

En contraste, para los extractos reconstituidos (dializados en presencia de PL), se encontró que una fracción significativa de las actividades de AChE y ChE se detectaba en las fracciones 21- correspondientes a la interfase sacarosa 1M/buffer. Estas fracciones tenían asimismo una considerable turbidez, lo que indicaba claramente que contenían lípidos.

Se realizaron incorporaciones de AChE y ChE de extractos de hígado a vesículas fosfolipídicas preformadas por sonicación, previo tratamiento de los extractos conteniendo Triton X-100 con Bio-Beads SM-2; y posteriormente se separaron los proteoliposomas de las proteínas libres por flotación, tal como se describió en

las Secciones 2.10.b y 2.10.c. En este caso, se sometió al mismo tratamiento a AchE purificada de eritrocitos humanos y ChE purificada de suero de caballo (Sigma Chem. Co.).

Los Resultados obtenidos al ensayar las actividades de AchE y ChE (Figuras 33 A y B) en las fracciones de los gradientes, indican que AchE pura interactúa con vesículas fosfolipídicas, consistentemente con su carácter de dímero anfifílico y ChE de suero (que es un tetrámero hidrofílico) no lo hace. La AchE y ChE de hígado interactúan con vesículas fosfolipídicas de manera similar a lo descrito para proteoliposomas preparados por diálisis.

La cuantificación de estos resultados en términos de proporción de actividad total incorporada, no es posible mediante cálculo de áreas, debido a que como se mostró previamente la presencia de sacarosa interfiere en los ensayos de actividad de colinesterasas por la técnica de Ellman.

Con el fin de realizar una aproximación cuantitativa se trabajó sobre tres puntos del gradiente: fracciones 2+3 (fondo); 9+10 y 22+23 (tope) . Se realizaron determinaciones de AchE y ChE en las condiciones de ensayo optimas para cada enzima las que fueron registradas en espectrofotómetro doble haz tal como se describió en la Sección 2.11.a. Para descartar otros factores de las muestras que podrían interferir (sacarosa, turbidez producida por PL, etc.) la actividad se registró usando como blanco para la reacción una alícuota de la misma muestra conteniendo inhibidores de ambas enzimas y el sustrato y reactivo color empleados en el ensayo. De esta manera, la variación en absorbancia a 412 nm

registrada en el tiempo es indicativa de actividad enzimática. La Tabla VIII muestra los porcentajes de actividad en las fracciones (fondo) y 22+23 (tope) de los gradientes determinados de esta forma.

Se encontró que una fracción -entre el 11% y el 19%- de la actividad de ChE de extractos de hígado se incorporó a vesículas fosfolipídicas. Cuando un extracto equivalente fue sometido a diálisis en ausencia de fosfolípidos, el 100% de la actividad de ChE se encontró en la porción del gradiente correspondiente a proteínas no asociadas; encontrándose un resultado similar (98%) para ChE pura sometida a incorporación por sonicación.

Alrededor del 50 % de la actividad de la AChE purificada de eritrocitos humanos como de la enzima de extractos de hígado se encontró en la fracción del gradiente correspondiente a proteoliposomas. En contraste, en los extractos dializados en ausencia de PL, el 100% de la actividad se encontró en la fracción del gradiente correspondiente a proteínas no asociadas.

Figura 25
Extracción secuencial de AchE y ChE
de hígado de rata

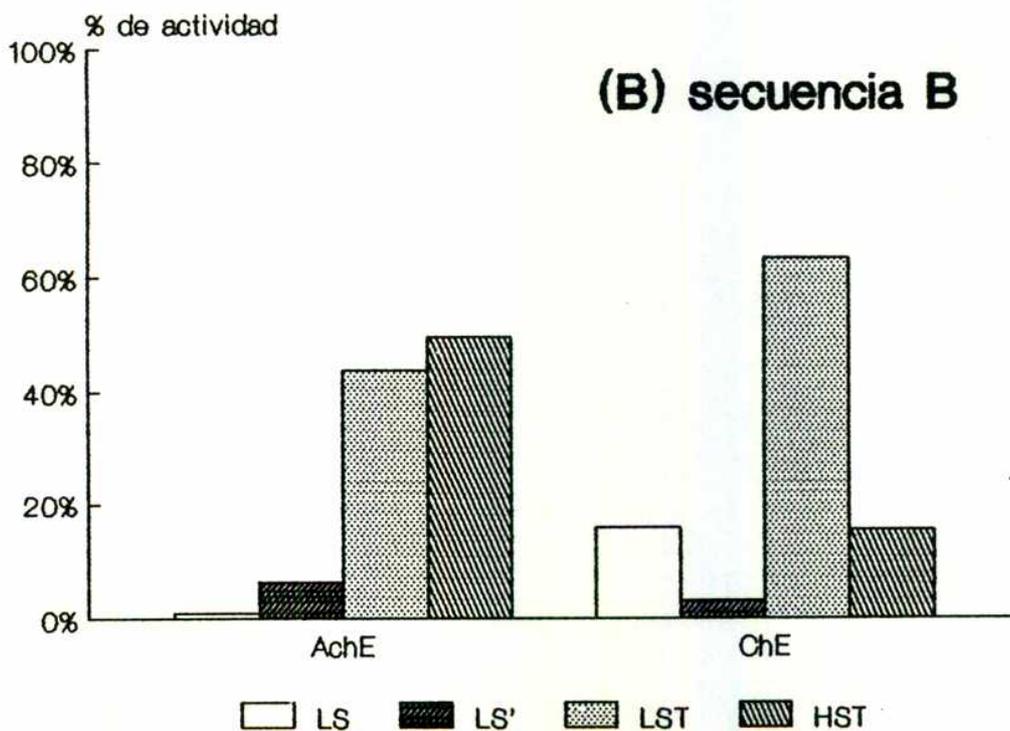
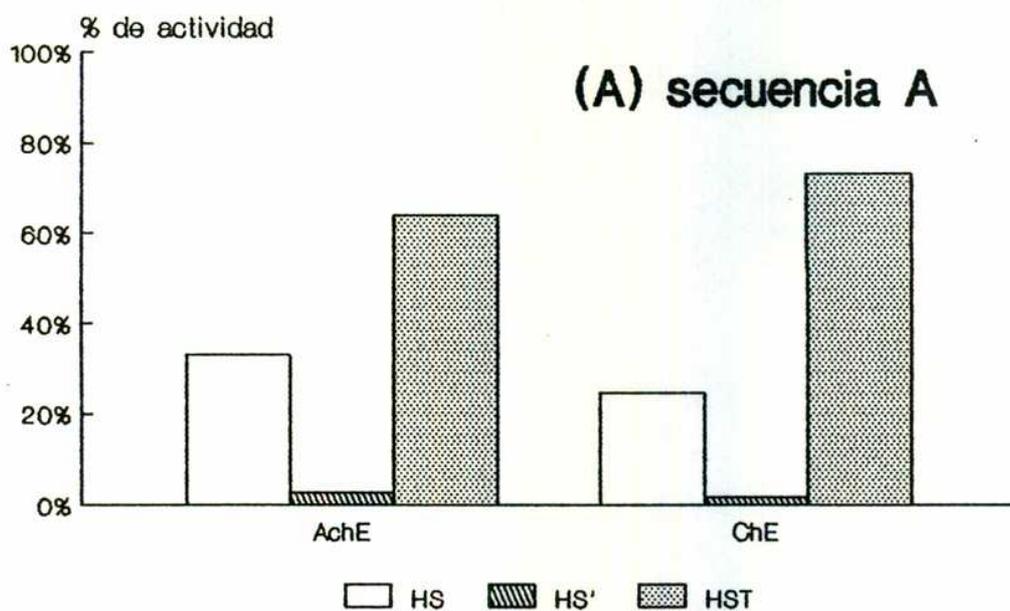


FIGURA 25

Extracción secuencial de AchE y ChE de hígado de rata

Se determinaron las actividades de AchE y ChE en extractos obtenidos por extracciones sucesivas en:

HS, HS', HST (secuencia A) o

LS, LS', LST, HST (secuencia B)

según se describe en la Sección 2.6.

Figura 26
Extracción secuencial de AchE y ChE
de corteza cerebral de rata

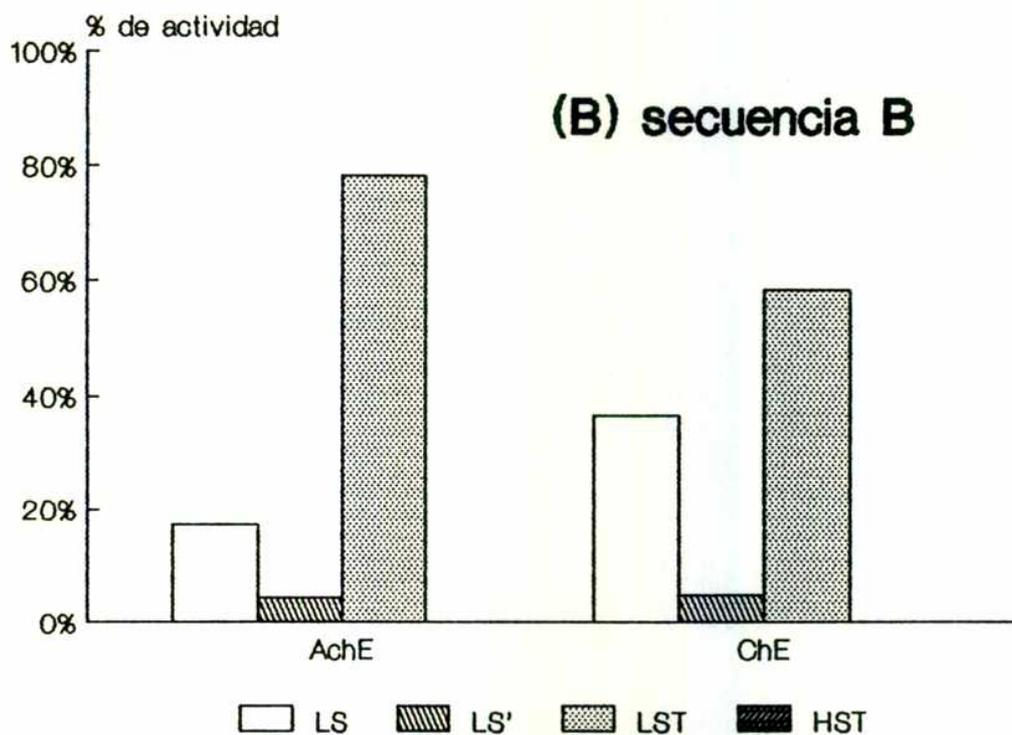
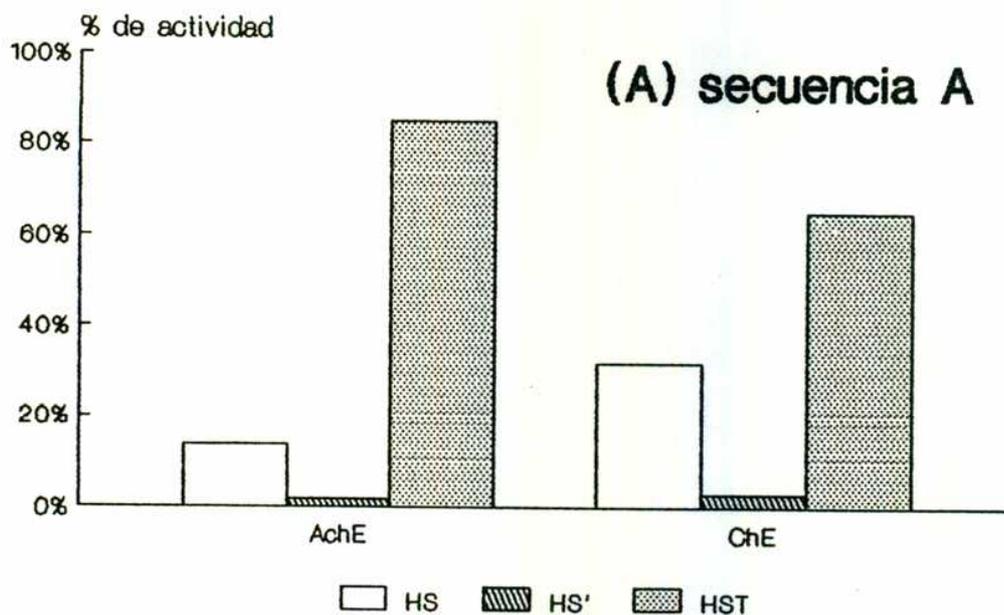


FIGURA 26

Extracción secuencial de AChE y ChE de corteza cerebral de rata

Idem Figura 25.

TABLA V

INTEGRIDAD DE VESICULAS DEL RETICULO ENDOPLASMATICO EN LAS
FRACCIONES PARTICULADAS OBTENIDAS DE HIGADO DE RATA POR
EXTRACCION EN SOLUCIONES DE BAJA Y ALTA FUERZA IONICA

Extracción	% de vesículas intactas
LS (1*)	85
LS (2*)	72
HS (1*)	15
HS (2*)	7

LS=tejido extraído en 10 mM tris-HCl pH 7.4

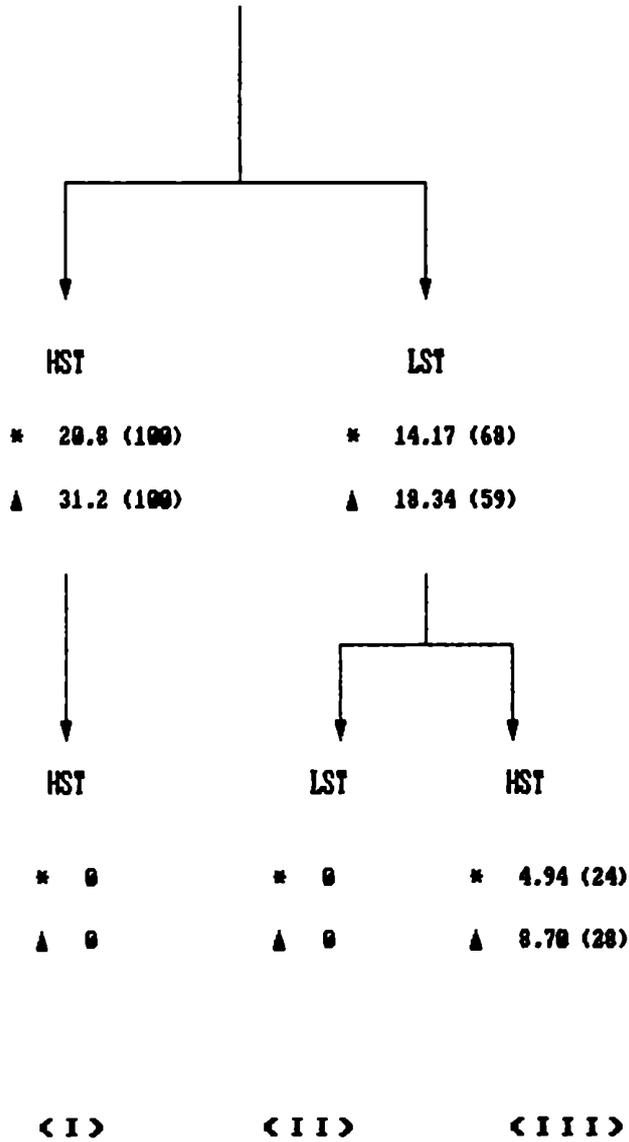
HS= " " " 1 M NaCl en LS.

El porcentaje de vesículas intactas se determinó mediante la latencia de hidrólisis de manosa-6-fosfato por glucosa-6-fosfatasa como se describió en la Sección 2.11.e, en las fracciones particuladas (obtenidas por centrifugación a 100000 x g durante 1 hora) luego de la extracción. Los valores son el promedio de dos preparaciones independientes.

FIGURA 27

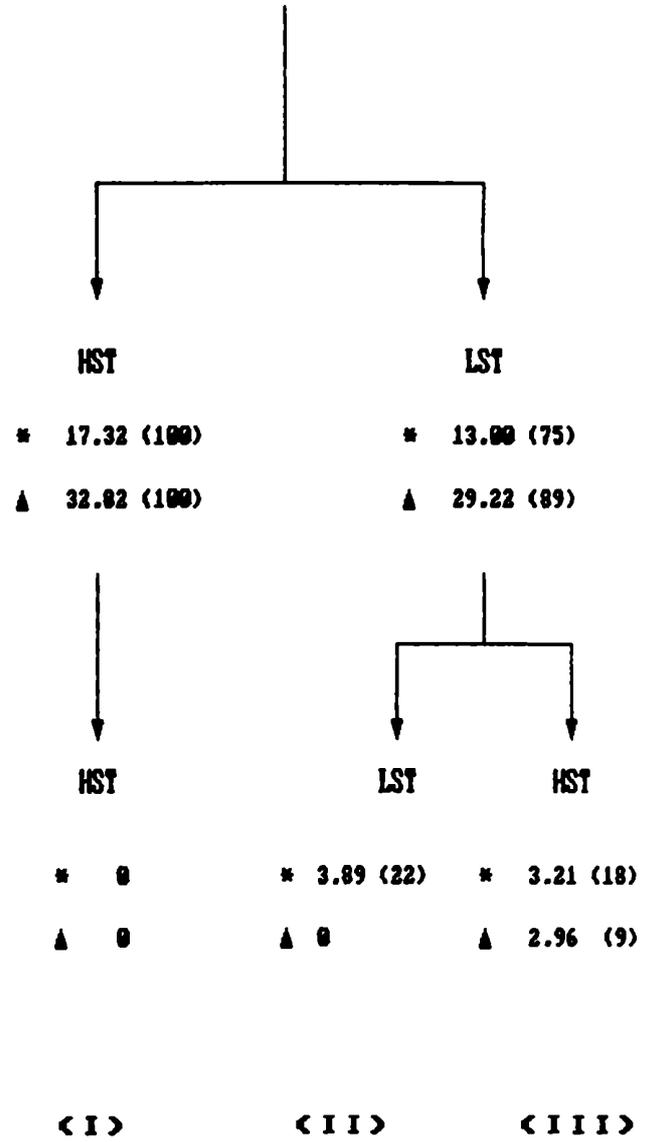
SERIE A

Membrana preextraídas
en LS; LS'



SERIE B

Membranas preextraídas
en HS; HS'



* AChE ▲ ChE

FIGURA 27

Solubilización secuencial por Triton X-100 1% en alta y baja fuerza iónica de AchE y ChE a partir de tejido preextraído en diferentes condiciones iónicas.

Se determinaron las actividades de AchE y ChE solubilizables por detergente (Triton X-100) en alta y baja fuerza iónica (HST y LST, respectivamente) en diferentes secuencias.

Cada extracción consistió en homogenización y centrifugación a 100000 x g durante 60 minutos como se describe en el texto.

Los valores indican actividad recuperada en el sobrenadante. Los números entre paréntesis indican porcentaje de actividad recuperada en cada extracto respecto a la actividad total de la preparación inicial.

TABLA IV

EFFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE AChE
DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS HUMANOS

Tratamiento	% actividad remanente
Na ₂ CO ₃	98.6
HS	89.0
Na ₂ CO ₃ -HS	73.0 (88.6)
HS-Na ₂ CO ₃	70.0 (88.6)

Los valores indican el porcentaje de actividad de AChE asociada a las membranas después de lavado alcalino (CO₃) (ver Sección 2.6), extracción en solución de alta fuerza iónica (HS), o ambas aplicadas secuencialmente como se indica. Se indican los promedios de tres preparaciones independientes; los valores entre paréntesis indican la recuperación esperada si los tratamientos fueran aditivos. Las membranas fueron obtenidas como se describe en la Sección 2.4.

Figura 28

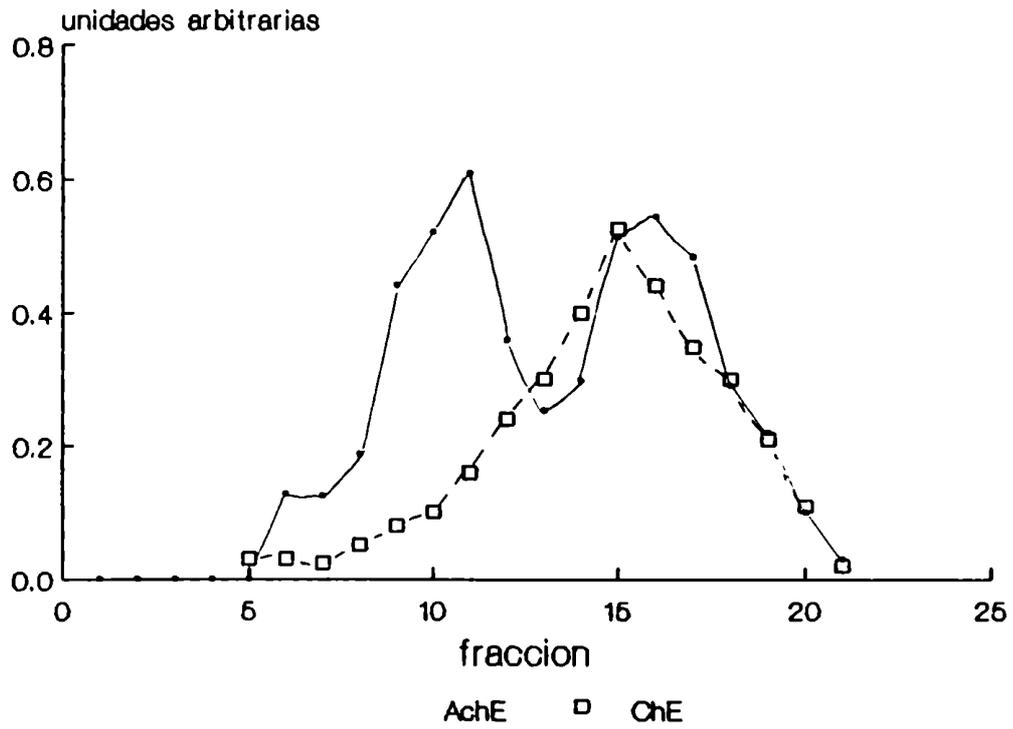
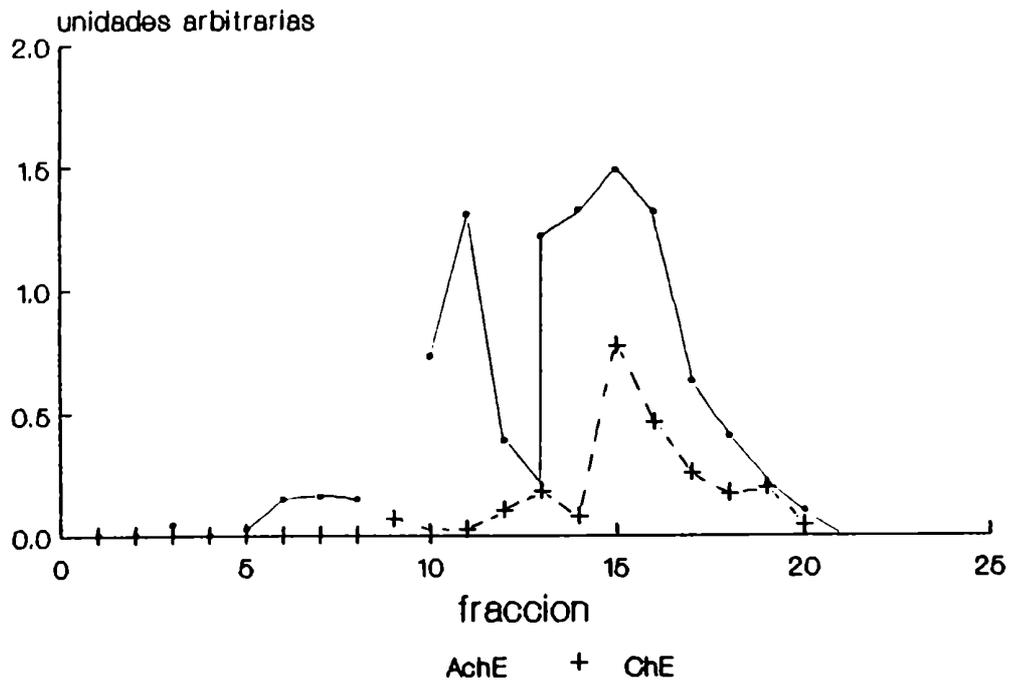


FIGURA 28

Perfiles de sedimentación de las actividades de AchE y ChE de extractos HS y HST de hígado de rata

Extractos HS (A) y HST (B) de hígado de rata fueron fraccionados por centrifugación en gradientes de sacarosa en HST como se describe en la Sección 2.7. Se determinaron las actividades de AchE y ChE en las fracciones, como se describe en la Sección 2.11.a.

Figura 29

AchE

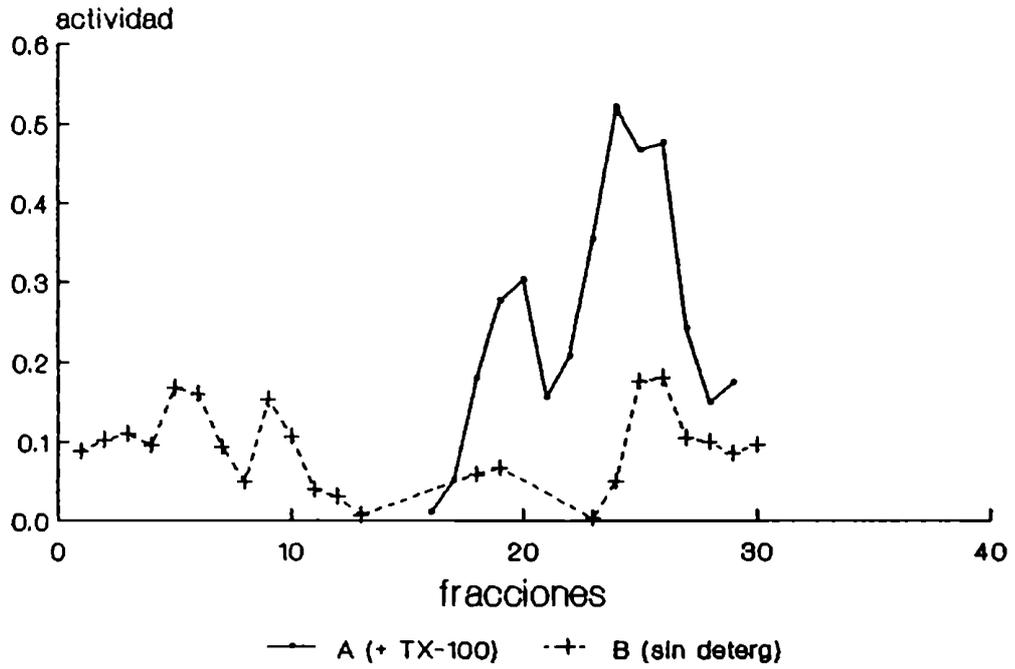


FIGURA 29

Perfil de sedimentación de AchE de extractos HST de hígado de rata en gradientes de sacarosa preparados en presencia de Triton X-100 1% (A) o ausencia de detergentes (B) como se describe en la Sección 2.7.

Figura 30

ChE

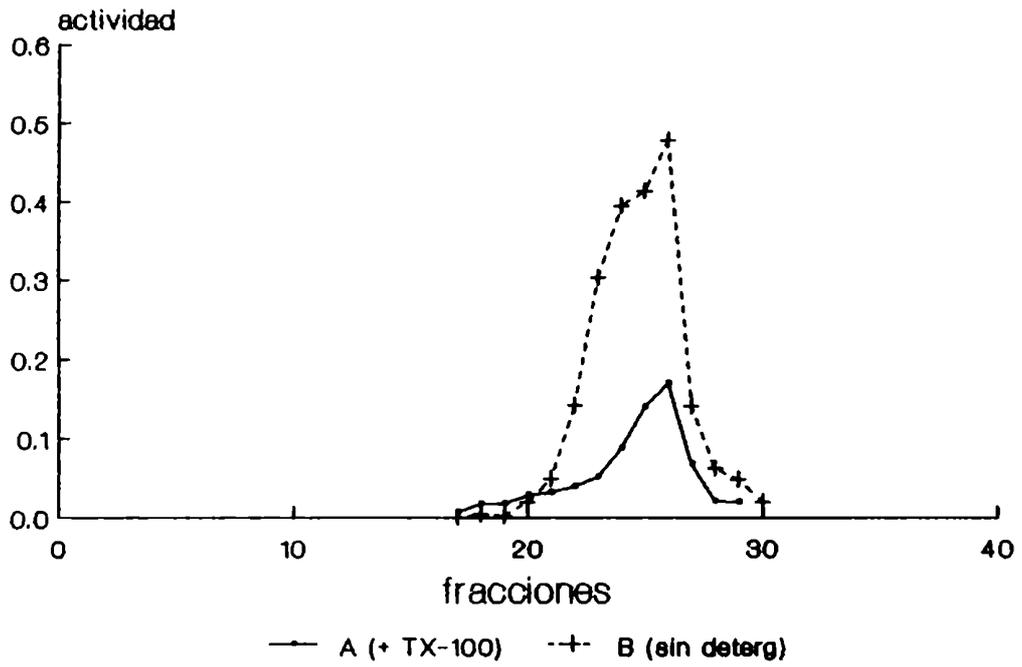


FIGURA 30

Perfil de sedimentación de ChE de extractos HST de hígado de rata en gradientes de sacarosa preparados en presencia de Triton X-100 1% (A) o ausencia de detergente (B) como se describe en la Sección 2.7.

TABLA VII

**EFECTO DEL TRITON X-100 SOBRE LA ACTIVIDAD DE FORMAS DE AchE
Y ChE DE HIGADO DE RATA AISLADAS DE GRADIENTES LIBRES DE
DETERGENTES**

<u>Forma</u>	<u>Triton x-100</u>	<u>Actividad relativa</u>
AchE 6.0 S	-	100
(fracción 26)	+	63
AchE 9.5 S	-	100
(fracción 19)	+	70
agregados AchE	-	100
(fracciones 5 y 9)	+	132
ChE 6.5 S	-	100
	+	54

Extractos HST de hígado de rata fueron fraccionados en gradientes de sacarosa (5%-20%) en HS (libres de detergente), como se describió en la Sección 2.7.

En las fracciones indicadas, se determinaron las actividades de AchE o ChE en ausencia de detergente (-) y en alícuotas de cada fracción preincubadas 10 minutos a temperatura ambiente en presencia de Triton X-100 al 1% (+). Los valores indican la actividad de las fracciones respecto a la actividad en ausencia de detergente.

Figura 31



Figura 32

Incorporación por dialisis de AchE y ChE a vesículas fosfolipídicas

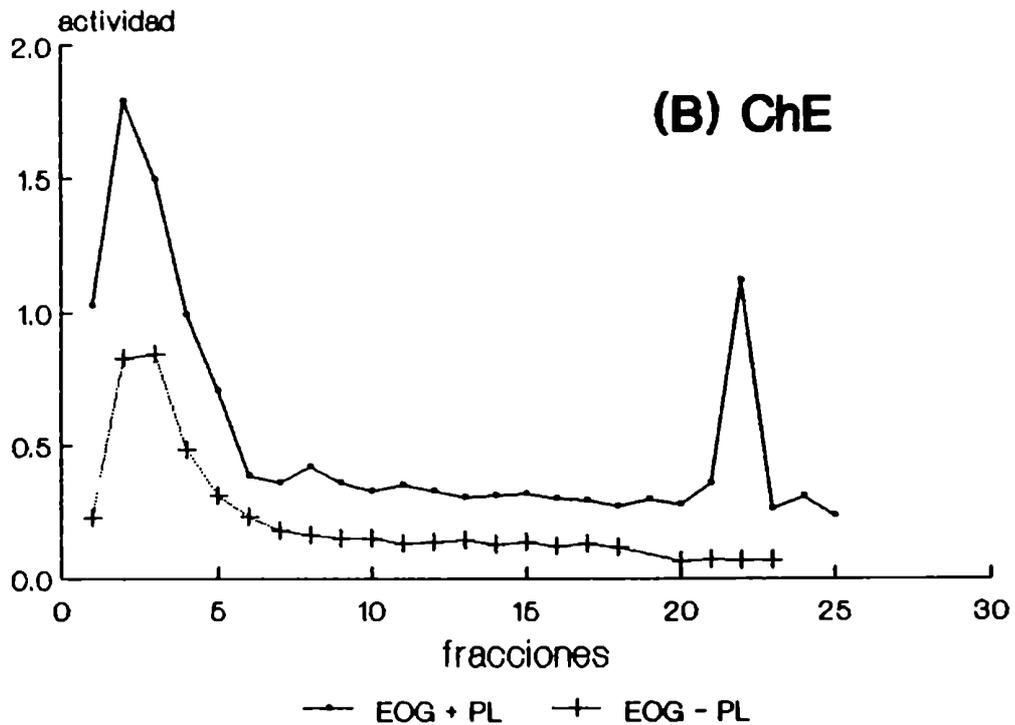
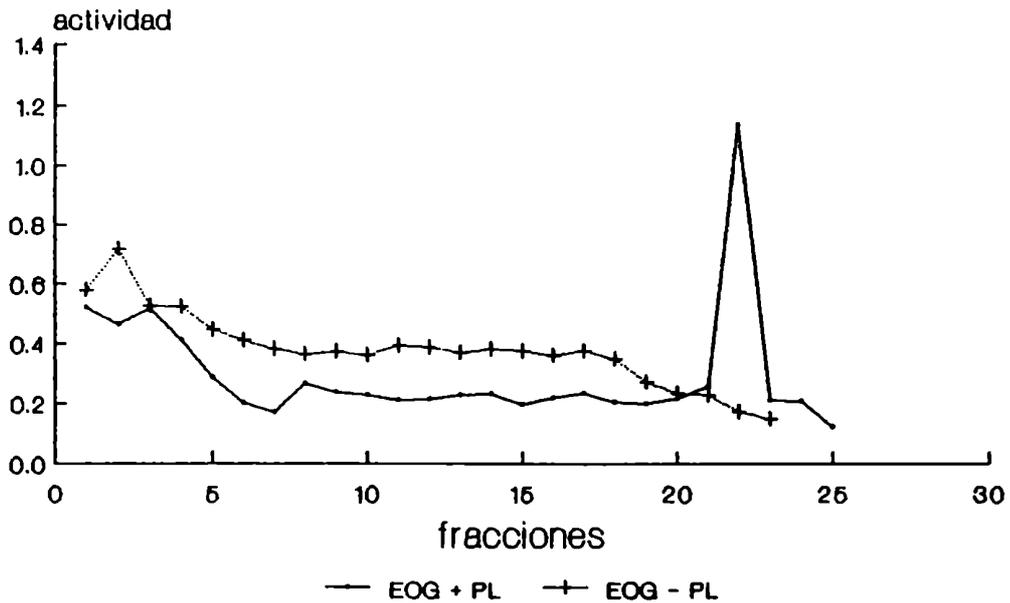


FIGURA 32

Incorporación de AChE y ChE de extractos de hígado de rata a vesículas fosfolipídicas mediante diálisis

EOG + PL : extracto obtenido por solubilización con octilglucósido 0.6% reconstituido en presencia de fosfolípidos.

EOG - PL : idem anterior sometido a los mismos procedimientos en ausencia de fosfolípidos.

La incorporación se realizó como se describe en la Sección 2.10.a.

La separación de proteoliposomas y proteínas no incorporadas se llevó a cabo mediante centrifugación en gradientes isopícnicos (ver Sección 2.10.c). Los gradientes fueron fraccionados desde el fondo hacia la superficie.

Figura 33
Incorporación por sonicación de AchE y ChE a vesículas fosfolipídicas

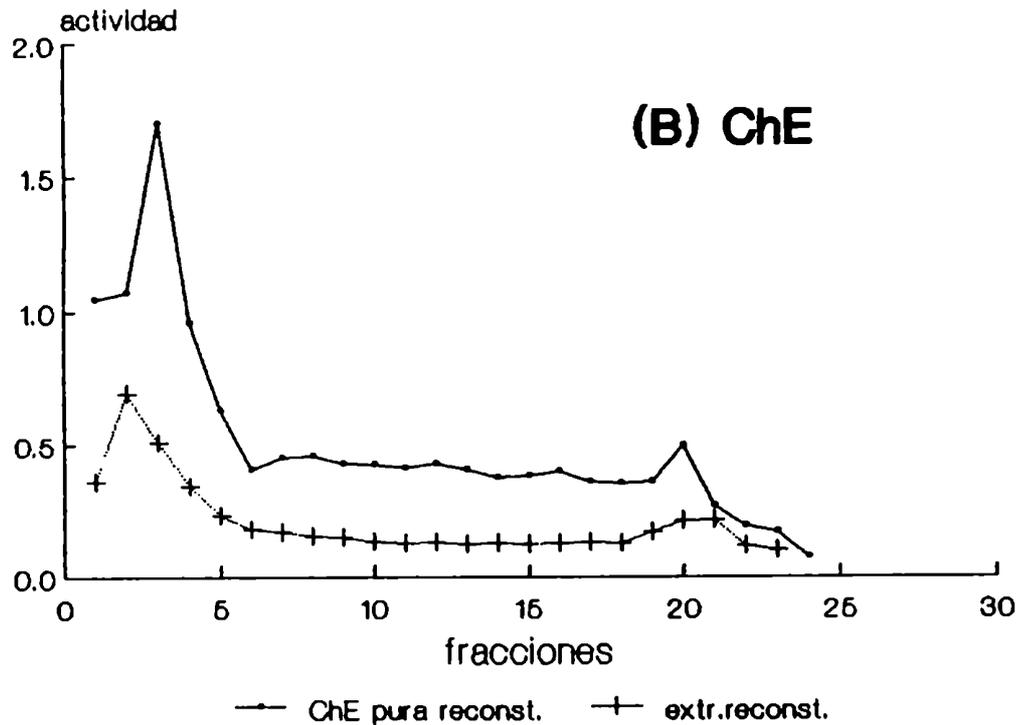
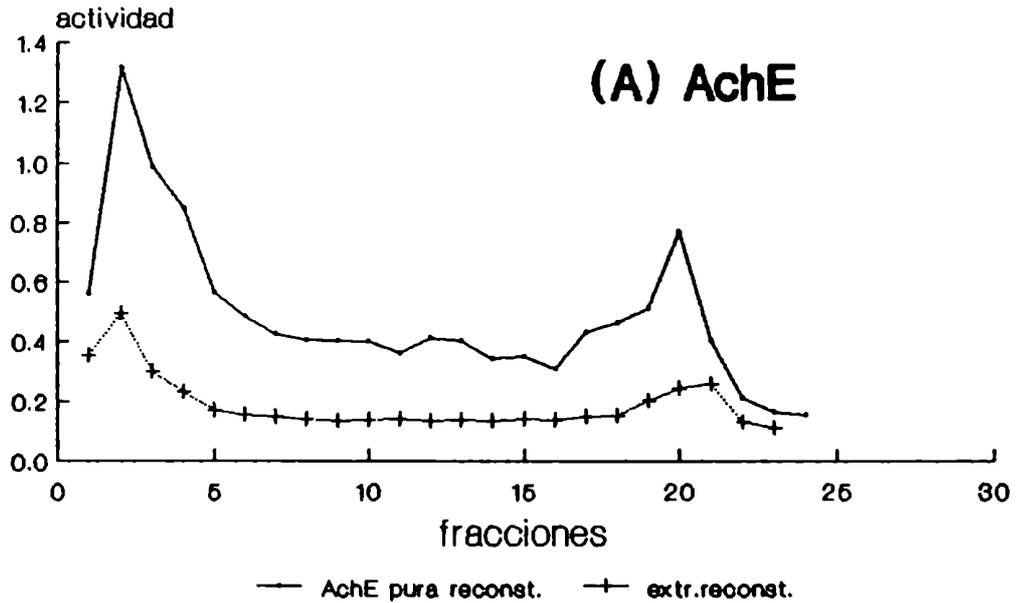


FIGURA 33

Incorporación de AchE y ChE de extractos de hígado de rata a vesículas fosfolipídicas obtenidas por sonicación

Para la formación de proteoliposomas se procedió como se describe en la Sección 2.10.b.

Demás procedimientos como se detalla para la Figura 32.

TABLA VIII

DISTRIBUCION DE LAS ACTIVIDADES DE AChE Y ChE: ACTIVIDADES INCORPORADAS Y NO INCORPORADAS A PROTEOLIPOSOMAS

<u>Muestra</u>	<u>ChE</u>		<u>AChE</u>	
	No I	I	No I	I
EOG + PL (D)	81	19	-	-
EOG - PL (D)	100	0	100	0
Extracto reconst. (S)	88	12	53	47
Enzimas puras reconstituidas (S)	98	2	54	46

Los valores indican el porcentaje de actividad no incorporada (No I) e incorporada (I) a proteoliposomas mediante diálisis (D) o sonicación (S), determinado como se describe en Resultados.

CAPITULO 6:DISCUSION:Distribución en corteza cerebral durante el desarrollo:

La actividad de ChE en corteza cerebral de rata madura permaneció durante mucho tiempo ignorada, ya que debido a baja actividad no era detectada mediante técnicas histoquímicas. Posteriormente se corroboró su presencia aunque durante mucho tiempo se la consideró una actividad exclusiva de elementos no neuronales (Giacobini E. 1959), en contraste con la AchE para la cual se postulaba una asociación exclusiva con componentes neuronales.

En este trabajo se corrobora que tanto AchE como ChE se expresan en neuronas como en astrocitos de corteza cerebral de rata, aunque existe una distribución preferencial de AchE en neuronas y de ChE en las células gliales (Tabla I). Hemminki y cols. (1973) encontraron niveles de ChE similares a los de AchE en pericarion neuronales aislados, aunque una relación de actividades de AchE/ChE mayor que 2 se informó para cuerpos celulares de neuronas de conejo (Azcurrea y cols. 1969) y rata adultos (Ochoa y cols. 1982).

La aparición de ambas enzimas en tipos celulares que presentan diferentes especializaciones funcionales, señala la necesidad de partir de una población celular homogénea si se pretende el estudio de metabolismo de estas enzimas.

La AchE tiene un rol funcional bien establecido en la transmisión colinérgica y su asociación a la membrana sináptica en la corteza ha sido objeto de numerosos estudios (Gómez y cols. 1970).

En este trabajo se corrobora que en la corteza cerebral madura la AChE manifiesta propiedades de solubilidad consistentes con esta distribución. La proporción de actividad de AChE unida a membranas en la corteza total aumenta durante la maduración (Figura 17); lo que podría explicarse considerando que los terminales sinápticos constituyen una fracción significativa (30%) de la masa de la corteza cerebral (Naftad y Blackstad 1966) y la localización preferentemente sináptica de esta enzima (Lomo 1983).

Para ChE, enzima cuya función en este tejido hasta hoy no se ha esclarecido, se encontró una mayor proporción de actividad "unida a membranas" que de actividad "soluble" a lo largo de la maduración post-natal (Figura 17).

Con el fin de estudiar estas enzimas durante el desarrollo en fracciones derivadas de un tipo celular, las neuronas, se seleccionaron técnicas que permiten la preparación de pericarion neuronales y sinaptosomas aislados, sobre la base de la elevada pureza y preservación metabólica de las preparaciones obtenidas (Sellinger y Azcurra, 1973 ; Booth y Clark, 1978). Ambas técnicas fueron combinadas para obtener ambas fracciones del mismo material de partida.

Dado que la inervación colinérgica de la corteza cerebral se origina principalmente de estructuras subcorticales (Wenk y cols. 1980), las variaciones observadas de parámetros relacionados con la transmisión colinérgica responden a la generación y mantenimiento de estructuras post-sinápticas.

La actividad de AchE durante el desarrollo postnatal en cuerpos celulares de neuronas reveló un pico de actividad de colinesterasa total durante el período de activa maduración sináptica (entre los 15 y los 25 días), como fuera observado por Nagata y cols. (1974) en fracciones de cuerpos celulares de neuronas obtenidos por otra técnica. Un patrón similar fue encontrado para la tirosina hidroxilasa -enzima presináptica- durante la inervación del cuerpo estriado por la sustancia nigra (Baker y cols. 1982). De esta forma, la síntesis preferencial de componentes sinápticos específicos cuando el nivel de demanda es elevado, se reflejaría como un incremento de su actividad en el sitio de síntesis.

Los datos aquí presentados indican que este pico es atribuible a un incremento significativo de la actividad de AchE en la fracción (Figura 16), que coincide con un aumento de la actividad "soluble" a los 15-18 días (Figura 17). Nosotros consideramos que la diferencia de solubilidad de AchE entre la corteza sin fraccionar y cuerpos celulares de neuronas señala que la variación de solubilidad es específica de los cuerpos celulares de neuronas; no detectándose en la corteza sin fraccionar debido a la menor a.e. y menor contribución de los cuerpos celulares de neuronas respecto a los terminales sinápticos en la masa total de la corteza (Giacobini E. 1967; Naftad y Blackstad, 1966).

La coincidencia temporal de este incremento en actividad de AchE soluble con el período de activa sinaptogénesis, en el cual se detectó la máxima actividad específica de AchE en esta fracción celular, sugiere que el incremento de actividad total se debe a incremento de la síntesis de esta enzima en el pericarion

neuronal como precursor no asociado a membranas, a partir del cual se cubrirían las demandas requeridas para la consolidación sináptica.

En los terminales sinápticos (fracción de Sinaptosomas), se encontró un incremento significativo de AchE durante el desarrollo (Figura 18), aún después del periodo de la consolidación de las sinapsis en corteza, determinado por conteo de densidades postsinápticas entre los 15 y 25 días FN (Aghajanian y Bloom 1967). Una posible explicación a este fenómeno sería el retiro de terminales no colinérgicos posterior a la etapa de consolidación (Cotman y Nieto-Santopietro, 1984), aunque se ha demostrado que la concentración de AchE en las membranas post-sinápticas es un evento relativamente tardío de la maduración sináptica (Lomo 1983). En la fracción de mielina, los niveles de actividad de AchE reducidos y constantes indican la baja contaminación con terminales (Figura 18).

Con respecto a la actividad de ChE, no se han detectado variaciones en su actividad en pericarion de neuronas aisladas durante el periodo del desarrollo estudiado (Figura 16).

En la fracción de sinaptosomas, la actividad de ChE aumenta significativamente entre los 8 y los 13 días, y permanece elevada en esta fracción que a partir de los 18 días contiene terminales maduros (Gonatas y cols. 1972). Un incremento de la actividad de ChE en la fracción de mielina también es evidente con un máximo a los 32 días, aunque la actividad de ChE en mielina de corteza cerebral madura decrece significativamente (Figura 19). El patrón temporal de ChE en fracción enriquecida en mielina coincide con

determinaciones histoquímicas que encuentran la máxima actividad de ChE en oligodendrocitos durante la gliosis de mielinización, siendo prácticamente indetectable en el adulto (Wender y Kozic, 1969).

La persistencia de la actividad de ChE en membranas de terminales podría explicarse en función de la dinámica de estas estructuras, donde están demostrados fenómenos plásticos activos que incluyen turnover sináptico (Cotman y Nieto-Santopietro, 1984). En contraste, las membranas de mielina tienen un turnover lento de sus componentes y no son reemplazables en el cerebro adulto.

Los niveles incrementados de la actividad de ChE en fracciones conteniendo membranas en expansión o de elevada capacidad plástica, plantea la cuestión de si esta enzima está específicamente relacionada con fenómenos plásticos asociados a la diferenciación, tal como fue postulado para los eventos de la morfogénesis por Layer (1983, 1985, 1987, 1988a,b) o simplemente acompaña de manera no específica las mayores demandas metabólicas asociadas a estos procesos. En vista de los niveles prácticamente constantes detectados en el sitio de síntesis, el pericarion neuronal, nos inclinamos por la segunda posibilidad. El enriquecimiento relativo de ChE en fracciones derivadas de cerebro fetal (Tabla III) sugiere una asociación con vesículas del RE más que con las membranas específicamente involucradas en la expansión (conos de crecimiento). La elevada actividad de ChE detectada en pericarion neuronales de cerebro de rata de 1-2 días postnatal (Ochoa y cols., 1982), cuando la expansión del RE es un hecho característico de la transición de células indiferenciadas a neuroblastos (Caly y Maxwell, 1971) sustenta esta posición.

Caracterización y distribución subcelular en hígado de rata:

Wheeler y cols (1972) propusieron la asociación de AchE a las membranas de la superficie celular de los hepatocitos.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que en hígado de rata la AchE se localiza preferencialmente en fracciones de Aparato de Golgi y de membrana plasmática. En contraste, la ChE se encuentra enriquecida en el retículo endoplásmico, y orientada hacia el lumen de las vesículas (Figura 24 y Tabla IV).

La orientación luminal de AchE en aparato de Golgi también parece probable, en vista de la necesidad de permeabilización de vesículas de esta organela por filipin para permitir la solubilización de AchE por PI-PLC (Perelman y cols, 1989)

La baja actividad de AchE detectada en fracciones de RE (Figura 24) podría reflejar una situación similar a la encontrada en células musculares en cultivo, en las que la población intracelular de AchE es de alto recambio y representa sólo un 40% del total celular, siendo su permanencia en RER mucho más corta que en GA, a juzgar por el tiempo que media entre la adición de residuos de manosa, N-acetilglucosamina y galactosa y su aparición en el medio de cultivo (Rotundo 1984, 1989).

Por otra parte, la ausencia de actividades significativas de ChE en PM, reflejaría el hecho de que, siendo el hígado el sitio de síntesis de la ChE del suero, una gran parte de la actividad de ChE sea secretada.

Resulta llamativo que no se haya detectado actividad significativa de ChE en GA, dado que para ChE de plasma, hígado y

cerebro fetal humano, se ha descrito la presencia de oligosacáridos complejos cuyo procesamiento implica un tránsito por el GA (Lockridge 1982, Prody y cols., 1987)

Si se considera que los carbohidratos están involucrados en diferentes funciones biológicas incluyendo la determinación de las rutas y destinos finales de las proteínas en las células (Feizi, 1981) es factible que una misma proteína presente diferencias en sus carbohidratos en distintos tipos celulares, e inclusive en distintos sitios subcelulares dentro de la misma célula.

De hecho, se ha descrito para AChE de eritrocitos y linfocitos que una misma forma molecular presenta una composición heterogénea de carbohidratos. Asimismo se han observado diferencias en el patrón de glicosilación de G4 y G2+G1 del mismo tejido, no teniendo los dímeros y monómeros activos sus azúcares totalmente procesados (Meflah y cols., 1984); aunque no se ha establecido aún la relevancia biológica de tal heterogeneidad.

En células musculares de aves y una línea celular neuronal de ratón en cultivo, se ha encontrado que el 80% de los monómeros de AChE sintetizados son degradados intracelularmente (Rotundo y Frambrough, 1982; Lazar y cols. 1984; Brockman y cols., 1986; Rotundo y cols., 1984, 1989) y que no transitan por GA (Rotundo 1989).

Si bien no existen referencias a estudios de biosíntesis y transporte intracelular de ChE, el considerable grado de homología y el polimorfismo estructural paralelo con AChE plantea la posibilidad de que estén sujetas a eventos regulatorios similares. En tal sentido, nuestros datos podrían resultar del

hecho de que la actividad de ChE presente en el RE hepático (G1 + G2), sea en su mayor parte degradada y que sólo se secrete la baja actividad detectada en GA. Alternativamente, la ChE de hígado de rata podría no tener azúcares complejos, siendo exportada por vesículas exocíticas desde el RE sin transitar GA.

Los datos presentados en esta Tesis sugieren también que el hígado no sería la fuente de la ChE G4 del suero. Las formas moleculares de ChE detectadas en hígado de rata, como se muestra en las figuras 28 y 30, son dímeros y monómeros, mientras que se ha descrito que el suero de rata contiene exclusivamente ChE G4 (Massoulie y Bon, 1982). Asimismo, la heterogeneidad de ChE hepática en cuanto a su carácter anfifílico, como se muestra en el Capítulo 5, en contraste con la ChE sérica, considerada una proteína hidrofílica, es consistente con esta hipótesis.

Estudios de asociación de AChE y ChE a membranas basados en propiedades de solubilización

En este trabajo se muestra que la preservación de integridad de vesículas membranosas es uno de los factores que afectan la extractabilidad de AChE y ChE en hígado de rata, siendo determinado básicamente por la fuerza iónica del medio de homogenización y extracción inicial. La disrupción de vesículas membranosas derivadas del RE es prácticamente total cuando el tejido es extraído en HS, mientras que la extracción inicial de hígado en medios de baja fuerza iónica preserva la integridad de vesículas derivadas del RE en un porcentaje elevado. La actividad de AChE y ChE extraída de hígado de rata en ambas condiciones fue

significativamente diferente. Estas diferencias no se encontraron cuando se analizó corteza cerebral de rata, ya que ambos procedimientos afectaron la integridad de estas vesículas y solubilizaron actividades similares de AchE y ChE. Bon y cols. (1988) han reportado una elevada actividad de colinesterasas hidrofílicas en un extracto obtenido en presencia de detergente a partir de o.e. de Torpedo homogeneizado inicialmente en baja fuerza iónica, que tentativamente atribuyeron a la preservación de vesículas intactas.

En este trabajo se propone el ensayo de la latencia de las vesículas del RE como forma de valorar este factor; y se muestra que la preservación de la integridad de estas vesículas afecta la extractabilidad de las colinesterasas, dependiendo de la naturaleza del tejido.

Estos resultados invalidan para el hígado de rata el empleo de una secuencia de extracción que se inicie con homogenización en soluciones de baja fuerza iónica ya que esta condiciona la composición de los extractos que se obtengan a posteriori. Este tipo de control de integridad es de suma importancia si se pretende aplicar las propiedades de extracción como criterios para definir el tipo de asociación de proteínas a las membranas.

La interpretación de los resultados de solubilización de membranas biológicas por detergentes resulta compleja, ya que si bien la literatura es vasta, su uso ha sido en gran medida empírico. Existe un extenso cuerpo de conocimiento acerca de las propiedades de los detergentes en soluciones acuosas y se ha hecho uso de modelos experimentales tales como bicapas lipídicas

y liposomas para el estudio de las interacciones detergente-lípidos, así como estudios de interacción detergente-proteínas empleando proteínas purificadas (e.g. Helenius y Simons, 1975). Resulta evidente que comparadas con estos sistemas simples de 2 o componentes, las membranas biológicas constituyen sistemas extremadamente complejos de lípidos, proteínas, iones, etc. Esto determina que si bien los principios generales de los efectos de los detergentes revelados por estudios sobre sistemas simples se aplican a las membranas biológicas; existen otros factores que pueden afectar la penetración y efecto de los detergentes en las membranas biológicas debido a su compleja arquitectura (e.g. asimetría de lípidos, diferencias de composición, cambios en las propiedades de la bicapa lipídica por: complejamiento de cationes divalentes, interacciones lípido-proteínas, presencia de proteínas altamente cargadas o glicoproteínas, etc.)

Teniendo en cuenta estos factores, cabe la posibilidad de que las diferencias en eficiencia de solubilización de las colinesterasas por Triton X-100 detectadas en diferentes condiciones iónicas se debieran a variaciones de alguna característica del detergente (e.g. número de agregación y por ende tamaño de las micelas) inducida por la fuerza iónica del medio, tal como se ha reportado para otros detergentes (Helenius y Simons, 1975).

Alternativamente, y considerando que la eficiencia de los detergentes para la solubilización de proteínas de membrana depende de la relación en masa detergente/membranas, es factible que dependa del pretratamiento al que han sido sometidas las membranas. Así, en una preparación de tejido extraído con LS, (que

aún conserva proteínas periféricas asociadas a las membranas y como demostramos, vesículas intactas), esta relación podría ser críticamente baja y se requiriese una reextracción en presencia de detergente, independientemente de la fuerza iónica de esta última. Los resultados aquí presentados (Figura 27) indican que éste no es el caso para las colinesterasas de hígado de rata, ya que se demostró que existe un requerimiento de alta fuerza iónica para su extracción en forma cuantitativa.

Mediante el análisis de las formas moleculares de AchE y ChE en este tejido no fue posible detectar formas asimétricas (A) (Figura 28), que son las únicas para las cuales se ha descrito una participación relevante de las interacciones iónicas en la unión a membranas (Toutant 1989). Por lo tanto, consideramos factible que el requerimiento de alta fuerza iónica para la solubilización de las colinesterasas hepáticas (que sólo se encuentran como formas G) se deba a la necesidad de desequilibrar interacciones proteína-proteína. Este tipo de interacciones, son de suma importancia en la arquitectura de las membranas biológicas y de hecho varían entre membranas celulares de diferente origen. En particular se ha demostrado que la asociación no covalente de proteínas integrales a proteínas periféricas (e.g. proteínas del citoesqueleto, espectrina en membranas de eritrocito) modifica el comportamiento de las primeras frente a determinadas condiciones de extracción (Helenius y Simons, 1975).

Los datos de extractabilidad de AchE de membranas de eritrocitos corroboran que la desestabilización de interacciones iónicas y/o variaciones en las cargas de las proteínas de membranas influyen

en su solubilización posterior. Es de hacer notar que la AchE de la membrana del eritrocito es una variedad anclada a la porción hidrofóbica de la membrana. En este sentido, existen evidencias de que las interacciones electrostáticas jugarían un papel en las interacciones entre los componentes de las membranas más relevante que el considerado en el modelo de Singer y Nicholson (Lee 1975).

Estudios de las propiedades de interacción de AchE y ChE

Cuando membranas microsomales o fracciones subcelulares purificadas de hígado de rata fueron sometidas a un tratamiento alcalino, se encontró que AchE y ChE se comportaban de manera diferente: mientras que más del 90% de la actividad de ChE se extraía en estas condiciones, la actividad de AchE permanecía asociada a las membranas (Tabla IV). De esta forma, y según este criterio, AchE podría considerarse una proteína integral de membranas y ChE una proteína periférica o soluble.

La AchE de hígado de rata manifiesta características típicas de una proteína anfifílica, similares a las descritas para AchE de cerebro bovino (Rotundo 1984), a saber: forma agregados polidispersos ($>12S$) cuando se somete a centrifugación por velocidad de sedimentación en gradientes libres de detergente (Figura 29), y en estas condiciones se inhibe un alto porcentaje de la actividad en los agregados, reversible por el agregado de Triton X-100 (Tabla VII). Brandan y cols. (1989) mostraron que la AchE G2 de aparato de Golgi hepático es sensible a la solubilización por PI-PLC, lo que indica que esta forma podría

estar unida a membranas mediante un anclaje glicolipídico, que es una de las formas por las cuales las proteínas anfitróficas interactúan con las membranas celulares (Burn P. 1988).

La ChE hepática presenta características particulares, ya que si bien fue extraíble mediante un tratamiento alcalino, sólo una fracción se solubiliza por alta fuerza iónica (Tabla IV y Figura 25). No forma agregados ni por sedimentación en gradientes de sacarosa (Figura 30) ni por electroforesis no desnaturizante en PAA en ausencia de detergente (Figura 31), pero se evidenció un incremento pequeño pero significativo en el coeficiente de sedimentación (0,5 S) (Figura 30 B). Esta modificación del S es indicativa de interacción con las moléculas del detergente. El patrón de sedimentación se modificó por la aparición de un "hombro" y se encontró una sustancial activación de la actividad de ChE en ausencia de detergente.

El carácter anfifílico de al menos una fracción de la actividad de ChE hepática se puso en evidencia ya que un 65% particionó en la fase de detergente cuando se sometió a separación de fases de soluciones diluidas de Triton X-114. Una fracción de aproximadamente el 20% de la actividad de Che hepática interactúa con vesículas fosfolipídicas.

La ChE manifiesta propiedades de solubilidad y de interacción con detergentes no iónicos similares a las encontrados para la GAP-43 (growth associated protein de los conos de crecimiento nervioso) (Perrone-Bizzizero y cols. (1988) y PateSkene y cols. (1989)). GAP-43 es acilada in vitro por lo que se propone que la fracción que manifiesta carácter anfifílico podría considerarse originada

por interacción post-traducciona l con lípidos, lo que explicaría su asociación a membranas.

El estudio de las denominadas propiedades de interacción de las proteínas constituyen una aproximación desde otro ángulo a la elucidación del tipo de interacciones de las proteínas con las membranas, en particular permiten proponer las posibles formas de asociación en base a propiedades físico-químicas de las proteínas.

En particular se basan en establecer el carácter anfifílico o no anfifílico de una proteína, analizando su capacidad de unir moléculas anfifílicas (e.g. Triton X-100) lo que se determina usualmente por la variación de las propiedades hidrodinámicas en presencia y ausencia del mismo. Sin embargo, estas propiedades de interacción con detergentes no iónicos también están sujetas a variaciones dependiendo de la presencia de otras proteínas en la muestra (Bon y cols. 1988), y se ha sugerido que las interacciones proteína-proteína - en particular con proteínas periféricas - afectan el comportamiento de algunas proteínas frente a algunos procedimientos empleados para estudiar estas propiedades (Pryde 1986). En el caso de las glicoproteínas asociadas a membranas del gránulo cromafín, se ha encontrado que si bien requieren detergente para su solubilización y forman complejos proteína-detergente en solución, algunas son excluidas de las micelas de detergente cuando son sometidas a partición en soluciones de Triton X-114, en contraste con otras que forman micelas mixtas, lo que se atribuye tentativamente a un elevado

contenido de carbohidratos que les conferiría una porción hidrofílica mayor (Fryde 1986).

La corteza cerebral en desarrollo y el hígado de rata como sistemas para el estudio de las colinesterasas:

la corteza cerebral como modelo para el estudio simultáneo de AchE y ChE presentaba a priori la ventaja que AchE tiene una localización preferentemente sináptica y su papel funcional se encuentra bien establecido. Sin embargo, la baja actividad de ChE detectada en el adulto constituye una desventaja que hace que la corteza cerebral madura no pueda emplearse con estos fines. Considerando que diversos estudios han recalcado las variaciones de actividad de estas enzimas durante el desarrollo, habiéndose llegado a proponer inclusive un rol morfogenético para ellas basándose en su elevada actividad en periodos críticos del desarrollo en aves (Layer 1983, 1985, 1986) se decidió explorar la posibilidad de emplear la corteza cerebral durante el desarrollo como modelo para este tipo de estudios.

La corteza cerebral presenta una considerable heterogeneidad celular y una compleja arquitectura tisular, lo que dificulta la obtención de fracciones representativas de estructuras subcelulares que preserven su integridad topológica y con niveles de contaminación aceptables. No se cuenta con técnicas que permitan disponer de fracciones relativamente homogéneas de organelas subcelulares, principalmente en lo referido al tipo celular del que provienen.

La obtención de fracciones subcelulares requiere en este tejido de un paso previo de aislamiento de una población celular

homogénea. En nuestro laboratorio se han intentado fraccionamientos subcelulares a partir de pericarion neuronales aislados de corteza cerebral de rata, no obteniéndose resultados satisfactorios en cuanto al grado de pureza requerido de las fracciones para estudios de distribución subcelular; ni de integridad en el caso del RE (resultados no presentados).

Recientemente se ha informado de la obtención de fracciones enriquecidas en aparato de Golgi de neuronas de cerebro de rata (Gonatas 1990 ASN). Es de esperar que en un futuro próximo se disponga de métodos de fraccionamiento subcelular que permitan abordar este tipo de estudios.

embargo es posible obtener de corteza cerebral de rata fracciones representativas de estructuras especializadas (e.g. terminales sinápticos, mielina).

En este trabajo se diseñó una combinación metodológica que permite obtener a partir de la misma muestra de tejido, una fracción de cuerpos celulares de neuronas y una fracción de sinaptosomas purificados. Los pericarion neuronales así aislados de corteza cerebral mostraron un incremento de actividad de AchE en el período de sinaptogénesis activa, correlacionado con un incremento de actividad "soluble". Se ha informado que las formas de AchE asociadas a membranas en otros sistemas experimentales células musculares y nerviosas en cultivo- son sintetizadas a partir de un pool de precursores solubles catalíticamente activos (Massoulie y Toutant 1988) .En este sentido, los pericarion neuronales se comportarían como "sitios de síntesis". Sin embargo la dificultad actual ya señalada para su posterior

fraccionamiento subcelular representa una desventaja operativa crucial para su empleo.

En este trabajo se encontró que las preparaciones de sinaptosomas obtenidas mediante las técnicas aquí empleadas mantienen un grado de integridad compatible con estudios de topología. Esta preparación constituiría un buen sistema representativo del destino final de AchE, ya que pueden aislarse con elevado grado de pureza y conservando su integridad. La AchE en estas preparaciones manifiesta su orientación ectocelular consistente con su papel fisiológico. Sin embargo, no es factible atribuir un "destino" a la actividad de ChE detectada en la corteza cerebral de rata durante el desarrollo.

El hígado de rata contiene niveles de actividad de AchE y ChE comparables, siendo el sitio de síntesis propuesto de la ChE sérica. A pesar de que el rol funcional de la AchE hepática aún no está establecido, los resultados aquí presentados señalan al hígado como un tejido ventajoso para el estudio de la asociación de ambas proteínas a membranas y compartimientos subcelulares. La homogeneidad celular de este tejido, así como la existencia de técnicas que permiten obtener fracciones subcelulares con alto grado de pureza y rendimiento constituyen ventajas sobre la corteza cerebral en desarrollo. Debemos agregar que existen numerosas técnicas adicionales factibles de aplicarse a este tipo de estudios, que incluyen, entre otras, sistemas in vitro de cortes de tejido, cultivos de células hepáticas normales, líneas celulares transformadas de hígado, preparaciones de órgano aislado, regeneración in vivo de tejido hepático normal, etc.

Por otra parte, los resultados aquí presentados indican que AChE y ChE de hígado de rata se asocian de formas diferentes a membranas de distinto origen subcelular. Ambas enzimas constituidas por poblaciones heterogéneas en cuanto a sus grados de ensamblaje y/o propiedades de interacción.

Estas características muestran al hígado de rata como un sistema experimental atractivo para el estudio de los eventos que conducen a tal heterogeneidad para ambas enzimas. Asimismo, constituiría un modelo apto para el estudio de la función que los distintos tipos de señalizaciones moleculares -originadas en la diversidad genética o en eventos post-traduccionales- tienen en la distribución subcelular y destino final de estas enzimas.

Finalmente, este estudio aporta elementos para considerar que la aplicación de los criterios operativos basados en las propiedades de extracción de las proteínas para inferir su tipo de asociación a las membranas, no resulta de aplicación generalizada. Por una parte, la solubilidad de los componentes está determinada por una compleja variedad de factores, debidos a la complejidad de las interacciones intramoleculares en las membranas biológicas, que aún no están totalmente comprendidas. Por otro lado, las proteínas anfitróficas presentan características de solubilidad que hacen necesaria una revisión del modelo actualmente vigente.

LITERATURA CITADA

Aghajanian G.K. y Bloom F.E., (1967) The formation synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative study by electron microscopy. *Brain Res.* 6: 716-727.

Allemand P, Bon S, Massoulie J, Vigny M (1981) The quaternary structure of chicken acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase: effect of collagenase and trypsin. *J Neurochem* 36:860-867.

Anglister L. y Silman I. (1978) Molecular structure of elongated forms of Electric Eel acetylcholinesterase. *J. Mol. Biol.* 125: 293-311.

Arion W., Ballas L., Lange A. y Wallin B. (1976) Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose 6 phosphatase system. *J.Biol.Chem.* 251: 1901-1907.

Aronson N. y Touster O.(1974) Isolation of plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Meth.Enzymol.* 31: 90-102.

Apragaus M. y Toutant J.P. (1985) Polymorphism of acetylcholinesterase in adult *Pieris brassicae* heads. Evidence for detergent-insensitive and Triton X-100-interacting forms. *Neurochem. Int.* 7: 793-804.

Atack J.R., Perry E.K., Bonham J.R., Candy J.M y Perry R.H. (1986) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J.Neurochem.* 47: 263-277.

Atack J.R., Perry E.K., Bonham J.R., Candy J.M. y Perry R.H. (1987) Molecular forms of butyrylcholinesterase in the human neocortex during development and degeneration of the cortical cholinergic system. *J.Neurochem.* 48: 1687-1692.

Atack J.R., Perry E.K., Bonham J.R. y Perry R.H. (1987) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. *J.Neurochem.* 48: 1845-1850.

Augustinsson K.B. (1963) Classification and comparative enzymology of the cholinesterases and methods for their determination. In: *Cholinesterases and Anti-cholinesterase agents*, pp. 89-128. Ed.G.B.Koelle. Springer Berlin.

Autori F. y col. (1975) Biogenesis of microsomal membrane glycoproteins in rat liver. I. Presence of glycoproteins in microsomes and cytosol. *J.Cell Biol.* 67: 687-714.

Azcurra J.M., Lodin Z. y Zellinger O. (1969) Enzymes in glial cells and neurones. *Proc. 2nd. Int. Meet. of the Int. Soc. for Neurochem., Milan, Italia.*

- Baker H., Joh T.H. y Reis D.J. (1982) Time of appearance during development of differences in nigro-striatal tyrosine hydroxylase activity in two inbred mouse strains. *Develop. Brain Res.* 4: 157-165.
- Baltz T, Duvillier G, Giroud C, Richet C, Baltz D, Degaud P (1983) The variant surface glycoprotein of *Trypanosoma equiperdum*: identification of a phosphorylated glycopeptide as the cross-reacting antigenic determinant. *FEBS Lett* 158:174-178.
- Belzunces L.F., Toutant J.P. y Bounias M. (1988) Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* heads. *Biochem.J.* 255: 463-470.
- Berninsone P.M., Brusés J.L. y Azcurra J.M. (1989a) Detection of drugs effects on neurons: protein synthesis inhibition by low doses of amphetamine. *Meth.Find.Exptl.Clin.Pharmacol.* 11: 249-254.
- Berninsone P.M., Katz E., Napp M.I. y Azcurra J.M. (1989b) Acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase activities in rat liver: subcellular localization, molecular forms and some extraction properties. *Biochem.Cell Biol.* 67: 817-822.
- Birman S (1985) Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. *Biochem J* 225:825-828.
- Bon S. (1982) Molecular forms of acetylcholinesterase in developing *Torpedo* embryos. *Neurochem.Int.* 4: 577-585.
- Bon S, Massoulie J (1976) Molecular forms of *Electrophorus* acetylcholinesterase; the catalytic subunits: fragmentation, intra- and inter-subunit disulfide bonds. *FEBS Lett* 71:273-278.
- Bon S. y Massoulie J. (1978) Collagenase sensitivity and aggregation properties of *Electrophorus* acetylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.* 89: 89-94.
- Bon S., Vigny M., Massoulie J. (1979) Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:2546-2550.
- Bon S, Massoulie J (1980) Collagen-tailed and hydrophobic component of acetylcholinesterase in *Torpedo marmorata* electric organ. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4464-4468.
- Bon S, Chang JY, Strosberg AD (1986) Identical N-terminal peptide sequences of asymmetric forms and of amphiphilic low-salt-soluble and detergent-soluble dimers of *Torpedo* acetylcholinesterase: comparison with bovine acetylcholinesterase. *FEBS Lett* 209:206-212.

Bon S., Toutant J.P., Méflah K. y Massoulie J. (1988a) Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: I. Solubility and aggregation properties. *J. Neurochem.* 51: 776-785.

Bon S., Toutant J.P., Meflah K. y Massoulie J. (1988b) Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: II. Electrophoretic variants and phosphatidylinositol phospholipase C-sensitive and -insensitive forms. *J. Neurochem.* 51: 786-794.

Booth R.F.G. y Clark J.B. (1978) A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.* 176: 365-370.

Bordier C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256 : 1604-1607.

Brandan E. e Inestrosa N.C. (1984) Binding of asymmetric forms of acetylcholinesterase to heparin. *Biochem. J.* 221: 415-422.

Brandan E. e Inestrosa N.C. (1986) The synaptic form of acetylcholinesterase binds to cell surfaces heparan sulphate proteoglycans. *J. Neurosci. Res.* 15: 185-196.

Brandan E. e Inestrosa N.C. (1987) Co-solubilization of asymmetric acetylcholinesterase and dermatan sulphate proteoglycan from the extracellular matrix of the rat skeletal muscle. *Febs Lett.* 213: 159-163.

Briles E., Li E. Kornfeld S. (1977) Isolation of wheat germen agglutinin-resistant clones of Chinese hamster ovary cells deficient in membrane sialic acid and galactose. *J Biol Chem* 252:1107-1116.

Brimijoin S., Mintz K.P. y Alley M.C. (1983) Production and characterization of separate monoclonal antibodies to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* 24: 513-520.

Brockman SK, Przybylski RJ, Younkin SG (1982) Cellular localization of the molecular forms of acetylcholinesterase in cultured embryonic rat myotubes. *J Neurosci* 2:1775-1785.

Brockman S.K., Younkin L.H., Younkin S.G. (1984) The effect of spontaneous electromechanical activity on the metabolism of acetylcholinesterase in cultured embryonic rat myotubes. *J Neurosci* 4:131-140.

Brockman SK, Usiak MF, Younkin SG (1986) Assembly of monomeric acetylcholinesterase into tetrameric and asymmetric forms. *J Biol Chem* 261:1201-1207.

Burn P., Burger M.M. (1987) The cytoskeletal protein vinculin contains transformation-sensitive covalently bound lipid. *Science* 235:62-64.

- Burn P. (1988) Amphitrophic proteins: a new class of membrane proteins. *TIBS* 13: 79-83.
- Burton K. (1965) Determination of DNA concentration with diphenylamine. *M. Enzymol.* XII: 163-166.
- Buss J.E., Kamps M.P., Septon B.M. (1984) Myristic acid is attached to the transforming protein of Rous sarcoma virus during or immediately after its synthesis and is present in both soluble and membrane bound forms of the protein. *Mol Cell Biol* 4:2697-2704.
- Caley D.W. y Maxwell D.S. (1971) An electron microscopic study of neurons during postnatal development of the rat cerebral cortex. *J. Comp. Neur.* 133: 17-44.
- Campbell DG, Gagnon J, Reid KBM, Williams AF (1981) Rat brain Thy-1 glycoprotein: the amino acid sequence, disulphide bonds and unusual hydrophobic region. *Biochem J* 195:15-30.
- Capdeville Y, Baltz T, Deregnacourt C, Keller A-M (1986) Immunological evidence of a common structure between *Paramecium* surface antigens and *Trypanosoma* variant surface glycoproteins. *Exp Cell Res* 167:75-86.
- Carey D. y Hirschberg C.B. (1980) Kinetics of glycosilation and intracellular transport of sialoglycoproteins in mouse liver. *J.Biol.Chem.* 255: 4348-4354.
- Carter JL, Brimijoin S (1981) Effects of acute and chronic denervation on release of acetylcholinesterase and its molecular forms in rat diaphragms. *J Neurochem* 36:1018-1025.
- Chatonnet A, Bacou F (1983) Acetylcholinesterase molecular forms in the fast or slow muscles of the chicken and the pigeon. *FEBS Lett* 161:122-126.
- Chatonnet A., Masson P. (1984) Le site peptidasique de la butyrylcholinesterase est distinct du site esterasique. *C R Seances Acad Sci [III C]* 229:529-534.
- Chatonnet A., Masson P. (1986) Is the peptidase activity of highly purified human plasma cholinesterase due to a specific cholinesterase isoenzyme or a contaminating dipeptylaminopeptidase? *Biochimie* 68:657-667.
- Chen P.S., Toribara T.Y. y Warner H. (1956) Microdetermination of phosphorus. *Analyt.Chem.* 28: 1756-1758.
- Chubb I.W., Hodgson A.J., White G.H. (1980) Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. *Neuroscience* 5:2065-2072.
- Chubb I.W. (1984) Acetylcholinesterase: multiple functions? In: Brzin M, Barnard E.A., Sket D. (eds) *Cholinesterases: fundamental and applied aspects.* de Gruyter, Berlin, pp 345-359.

- Chubb I.W., Borstein J.C. (1985) Dopamine and acetylcholinesterase released in the substantia nigra: cooperative or coincidental? *Neurochem Int* 7:905-912.
- Cohen A.M., Lin S., Derick L.H., Palek J. (1986) *Blood* 68:920-926.
- Collins PL, Younkin SG (1982) Effect of denervation on the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. *J Biol Chem* 257:13638-13644.
- Cotman C.W., Nieto-Santopietro M. (1984) Cell biology of synaptic plasticity. *Science* 225:1287-1294.
- Davis R. y Koelle G.B. (1981) Electron microscope localization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the superior cervical ganglia of the cat. II. Preganglionically denervated ganglion. *J. Cell Biol.* 88: 581-590.
- Davitz MA, Low MG, Nussenzweig V (1986) Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). *J Exp Med* 163:1150-1161.
- Dallner G. (1974) Isolation of Rough and Smooth Microsomes. *Meth. in Enzymol.* 31: 191-200.
- Di Francesco C, Brodbeck U (1981) Interaction of human red cell membrane acetylcholinesterase with phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 640:359-364.
- Drews U. (1975) Cholinesterase in embryonic development. *Prog Histochem Cytochem* 7:3
- Edwards J.A. y Brimijoin S. (1982) Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat. *J. Neurochem.* 38: 1393-1403.
- Edwards J.A. y Brimijoin S. (1983) Thermal inactivation of the molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 742: 509-516.
- Ellman G.L., Courtney D., Andres V. y Featherstone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- Etges R., Bouvier J., Bordier C. (1986) The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is anchored in the membrane by myristic acid-labeled phospholipid. *EMBO J* 5:597-601.
- Falugi C., Raineri M. (1985) Acetylcholinesterase (AChE) and pseudocholinesterase (BuChE) activity distribution pattern in early developing chick limbs. *J Embryol Exp Morphol* 86:89-108.
- Feizi T. (1981) Carbohydrate determination antigens. *Trends in Biochem Sci* 6:333-335.

Ferguson MAJ, Haldar K, Cross GAM (1985) *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein has a sn-1,2-dimyristyl glycerol membrane anchor at its COOH terminus. *J Biol Chem* 260:4963-4968.

Fernandez HL, Duell AJ, Festoff BW (1979) Cellular distribution of 16 S acetylcholinesterases. *J Neurochem* 32:581-585.

Fleck A. y Begg D. (1965) The estimation of ribonucleic acid using ultraviolet absorption measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 108: 333-339.

Fleischer S. y Kervina M. (1974) Subcellular fractionation of rat liver. *Meth.Enzymol.* 31: 6-41.

Fournier D., Bergé J.B., Cardoso de Almeida M.L. y Bordier C. (1988) Acetylcholinesterases from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycopospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase. *J.Neurochem.* 50: 1158-1163.

Fujiki Y. y col. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* 93: 97-102.

Futerman A.H., Low M.G., Silman I. (1983) A hydrophobic dimer of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* electric organ is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Neurosci Lett* 40:85-89.

Futerman A.H., Fiorini R.M., Roth E., Michaelson D.M., Low M.G., Silman I. (1984) Solubilization of membrane bound acetylcholinesterase by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C: enzymatic and physicochemical studies. In: Brzin M., Barnard E.A., Sket D. (eds) *Cholinesterases: fundamental and applied aspects.* de Gruyter, Berlin. p 99.

Futerman A.H., Fiorini R.M., Roth E., Low M.G. y Silman I. (1985) Physicochemical behaviour and structural characteristics of membrane-bound acetylcholinesterase from *Torpedo* electric organ. *Biochem.J.* 226: 369-377.

Futerman A.H., Low M.G., Michaelson D.M. y Silman I. (1985) Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J.Neurochem.* 45: 1487-1494.

Gennari K, Brodbeck U (1985) Molecular forms of acetylcholinesterase from human caudate nucleus: comparison of salt soluble and detergent soluble tetrameric enzyme species. *J Neurochem* 44:697-704.

George S.T., Balasubramanian A.S. (1980) The identity of serotonin-sensitive arylacylamidase with acetyl-cholinesterase from human erythrocytes, sheep basal ganglia and electric eel. *Eur J Biochem* 111:511-524.

- George S.T., Balasubramanian A.S. (1981) The aryl-acylamidases and their relationship with cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. *Eur J Biochem* 121:177-186.
- Giacobini E. (1959) The distribution and localization of cholinesterase in nerve cells. *Acta Physiol. Scand.* 45 (suppl. 156).
- Giacobini E. (1967) Chemical studies on individual neurons. Part I. Vertebrate Nerves. *Neurosci Res* 1:1.
- Gisiger V., Vigny M., Gautron J. y Rieger F. (1978) Acetylcholinesterase of rat sympathetic ganglion: molecular forms, localization and effects of denervation. *J. Neurochem.* 30: 501-516.
- Gomez C.J., Pasquini J.M., Soto E.F. y De Robertis E. (1970) Binding of D-(dimethyl-¹⁴C)-tubocurarine, acetyl-cholinesterase and proteolipids in subcellular membranes of cerebral cortex of the developing rat. *J. Neurochem.* 17: 1485-1492.
- Gonatas N.K., Autilio-Gambetti P. y Shafer B. (1971) Morphological and biochemical changes in rat synaptosome fractions during neonatal development. *J. Cell Biol.* 51: 484-498.
- Gonatas N.K. (1990) Studies on the neuronal Golgi apparatus. 21st Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry.
- Grassi J., Vigny M. y Massoulie J. (1982) Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character. *J. Neurochem.* 38: 457-469.
- Graybiel A.M. y Ragsdale C.W. (1982) Pseudocholinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey. *Nature* 299: 439-441.
- Greenfield S.A., Stein J.F., Hodgson A.J., Chubb I.W. (1981) Depression of nigral pars compacta cell discharge by exogenous acetylcholinesterase. *Neuroscience* 6:2287-2295.
- Greenfield SA, Cheramy A, Glowinski J (1983) Evoked release of proteins from central neurons *in vivo*. *J Neurochem* 40:1048-1057.
- Greenfield S.A. (1984) Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. *Trends Neurosci* 7:364-368.
- Greenfield S.A. (1985) The significance of dendritic release of transmitter and protein in the substantia nigra. *Neurochem Int* 7:887-901.
- Haas R., Rosenberry T.L. (1985) Quantitative identification of N-terminal aminoacids in proteins by radiolabelled reductive methylation and aminoacid analysis: application to human erythrocyte acetylcholinesterase. *Anal. Biochem.* 148: 154-162.

- Haas R., Brandt P., Knight J., Rosenberry T.L. (1986) Identification of non aminoacid components in the hydrophobic membrane-binding domain at the C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochemistry* 25: 3098-3105.
- Hall L.M.C., Spierer P. (1986) Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.* 5: 2949-2954.
- He H.T., Barbet J., Chaix J.C., Goridis C. (1986) Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of N-CAM 120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *EMBO J* 5:2489-2494.
- Helenius A., Simons K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 415:29-79.
- Helenius A. y Simons K. (1977) Charge shift electrophoresis: Simple methos for distinguishing between amphiphilic and hydrophylic proteins in detergent solutions. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 74: 529-532.
- Hemminki K., Hemminki E. y Giacobini E. (1973) Activity of enzymes related to neurotransmission in neuronal and glial fractions. *Int. J. Neurosci.* 5: 87-90.
- Henderson Z., Greenfield S.A. (1984) Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in substantia nigra: a comparison between rat and guinea-pig. *J Comp Neurol* 230:278-286.
- Hodgson A.J., Chubb I.W. (1983) Isolation of the secretory form of soluble acetylcholinesterase by using affinity cromatography on edrophonium-sepharose. *J.Neurochem.* 41: 654-662.
- Holder A.A. (1983) Carbohydrate is linked through ethanolamine to the C-terminal aminoacid of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochem. J.* 209: 261-262.
- Holloway P.W. (1973) A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Analyt.Biochem.* 53: 304-308.
- Hubbard A. y col. (1983) Isolation of hepatocyte plasma membrane. I. Presence of three major domains. *J.Cell Biol.* 96: 217-229.
- Inestrosa N.C., Ramirez B.U., Fernandez H.L. (1977) Effect of denervation and of axoplasmic transport blockage on the *in vitro* release of muscle endplate acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 28: 941-945.
- Inestrosa N.C., Silverstein L., Hall Z.W. (1982) Association of the synaptic form of acetylcholinesterase with the extracellular matrix in cultured mouse muscle cells. *Cell* 29: 71-79.

Inestrosa N.C., Matthew W.D., Reiness C.G., Hall Z.W., Reichardt L.F. (1985) A typical distribution of asymmetric acetylcholinesterase in mutant PC 12 pheochromocytoma cells lacking a cell surface heparan sulphate-proteoglycan. *J. Neurochem.* 45: 86-94.

Inestrosa N.C., Roberts W.L., Marshall T.L. y Rosenberry T.L. (1987) Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues. *J. Biol. Chem.* 262: 4441-4444.

Kaprelyants A.S. (1988) Dynamic spatial distribution of proteins in the cell. *TIBS* 13: 43-46.

Karnovsky M.J. y Roots L. (1964) A direct-coloring thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 219-222.

Kasa P., Rakonczay Z. (1982a) Biochemical and histochemical evidence of 16S acetylcholinesterase in salivary glands. *J. Neurochem.* 38:278-280.

Kasa P., Rakonczay Z. (1982b) Histochemical and biochemical demonstration of the molecular forms of acetylcholinesterase in peripheral nerve of rat. *Acta Histochem. (Jena)* 70: 244-257.

Kaufmann K., Silman I. (1980) Interaction of electric eel acetylcholinesterase with natural and synthetic lipids. *Neurobiochem Int* 2:205-207.

Kim B.H., Rosenberry T.L. (1985) A small hydrophobic domain that localizes human erythrocyte acetylcholinesterase in liposomal membranes is cleaved by papain digestion. *Biochemistry* 24: 3586-3592.

Kimura H., McGeer P.L., Peng J.H., McGeer E.G. (1981) The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. Comp. Neurol.* 200:151-201.

Koelle G.B. (1957) Histochemical demonstration of reversible anticholinesterase action at selective cellular sites *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 120:488-503.

Koelle W.A., Koelle G.B. (1959) The localization of external of functional acetylcholinesterase at the synapses of autonomic ganglia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 126:1-8.

Koelle G.B., Koelle W.A. y Smyrl E.G. (1977) Effects of inactivation of butyrylcholinesterase on steady state and regenerating levels of ganglionic acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 28: 313-319.

Kornberg y col. (1955) *Meth. in Enzymol.* Vol I:441.

Kuliy K.M., Redheeran R., Murphy D. (1977) Serum cholinesterase function in lipoprotein metabolism. *Experientia* 43:420-422.

Kutty K.M. (1980) Biological function of cholinesterase. Clin Biochem 13:239-243.

Lahav M. y col. (1982) A method for obtaining high recovery of purified subcellular fractions of rat liver homogenates. Anal.Biochem. 121: 114-122.

Landauer P., Ruess K.P., Lieflander M. (1984) Bovine nucleus caudatus acetylcholinesterase: active site determination and investigation of a dimeric form obtained by selective proteolysis. J. Neurochem. 43: 799-805.

Layer P.G. (1983) Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chicken brain. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80: 6413-6417.

Layer P.G., Girgert R., Rommel S., Sporns O. (1985) Development of embryonic cholinesterases and cell proliferation in chick brain and retina. J Neurochem 44:S129.

Layer P.G., Alber R. y Rathjen F.G. (1988) Sequential activation of butyrylcholinesterase in rostral half somites and acetylcholinesterase in motoneurons and myotomes preceding growth of motor axons. Development 102: 387-396.

Layer P.G., Alber R. y Sporns O. (1987) Quantitative development and molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase during morphogenesis and synaptogenesis of chick brain and retina. J.Neurochem. 49: 175-182.

Layer P.G., Rommel S., Bulthoff H. y Hengstenberg R. (1988) Independent spatial waves of biochemical differentiation along the surface of chicken brain as revealed by the sequential expression of acetylcholinesterase. Cell Tissue Res. 251: 587-595.

Lazar M. y Vigny M. (1980) Modulation of the distribution of acetylcholinesterase molecular forms in a murine neuroblastoma x sympathetic ganglion cell hybrid cell line. J.Neurochem. 35: 1067-1069.

Lee S.L. y Taylor P. (1982) Structural characterization of the assymetric (17 + 13) S species of acetylcholinesterase from Torpedo. J. Biol. Chem. 257: 12292-12301.

Leelavathi D. y col. (1970) Isolation of a Golgi-rich fraction from rat liver. Biochim.Biophys.Acta 211: 124-138.

Lenoir-Rousseaux J.J., Arpagaus M. y Toutant J.P. (1988) Separation and characterization of hydrophilic and detergent-interacting components of brain acetylcholinesterase from *Tenebrio molitor* L. (Insecta, Coleoptera). Comp.Biochem.Physiol. 90B: 29-35.

- Lockerbie R.O. (1987) The neuronal growth cone: a review of its locomotory navigational and target recognition capabilities. *Neurosci* 20:719-729.
- Lockridge O., Eckerson H.W., La Du B.N. (1979) Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 254: 8324-8330.
- Lockridge O. (1982) Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. *J. Neurochem.* 39: 106-110.
- Lockridge O. (1984) Amino acid composition and sequence of human serum cholinesterase: a progress report. In: Brzin M., Barnard E.A., Sket D. (Eds.) *Cholinesterases: Fundamental and applied aspects.* de Gruyter, Berlin, p5.
- Lockridge O., La Du B. (1986) Amino acid sequence of the active site of human serum cholinesterase from usual, atypical and atypical-silent genotypes. *Biochem. Genet.* 24: 485-498.
- Lockridge O., Bartels C., Vaughan T., Wong C.K., Norton S.E. y Johnson L.L. (1987) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 262: 549-557.
- Lomo T. (1983) Trophic factors and postsynaptic activity in synapse formation. *Nature* 305: 576.
- Low M.G., Finean J.B. (1977) Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.* 167: 281-284.
- Low M.G., Kincade P.W. (1985) Phosphatidylinositol is the membrane domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature* 318:62-64.
- Low M.G., Ferguson M.A., Futerman A. H., Silman I. (1986) Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 11:212-215.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lucas C.A., Kreutzberg G.W. (1985) Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures. I. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin. *Neuroscience* 14:349-360.
- Lyles J. M., Silman I., di Giambardino L., Couraud J.Y., Barnard E.A. (1982) Comparison of the molecular forms of the cholinesterases in tissues of normal and dystrophic chickens. *J. Neurochem.* 38: 1007-1021.
- MacPhee-Quigley K., Taylor P., Taylor S. (1985) Primary structures of the catalytic subunits from two molecular forms of acetylcholinesterase: a comparison of NH₂-terminal and active center sequences. *J. Biol. Chem.* 260: 12185-12189.

MacPhee-Quigley K., Vedvick T.S., Taylor P. y Taylor S. (1986) Profile of disulfide bonds in acetylcholinesterase. *J.Biol.Chem.* 261: 13565-13570.

Masson P. (1979) Formes moleculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. I. Parametres moleculaires apparents et ebauche de la structure quaternaire. *Biochim. Biophys. Acta* 578: 493-504.

Massoulie J. y Bon S. (1982) The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann.Rev.Neurosci.* 5: 57-106.

Massoulie J., Bon S., Lazar M., Grassi J. Marsh D., Meflah K., Toutant J.P., Vallette F. Vigny M (1984) The polymorphism of cholinesterases: classification of molecular forms; interactions and solubilization characteristics; metabolic relationships and regulations. In: Brzin M. Barnard E.A., Sket D. (eds) *Cholinesterases: fundamental and applied aspects.* de Gruyter, Berlin, p 73.

Massoulie J. y Toutant J.P. (1988a) Vertebrate Cholinesterases: Structure and types of interaction. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 86, Cap 8a, V.P. Whittaker Eds., Springer-Berlin.

Massoulie J., Vigny M. y Lazar M. (1985) Expression of acetylcholinesterase in murine neural cells in vivo and in vitro. *Molecular Basis of Nerve Activity*, Changeux, Hucho, Maelicke y Neumann Eds., Walter de Gruyter & Co. Berlin.New York.

Massoulie J., Toutant J.P. (1988) Vertebrate cholinesterases: structure and types of interaction. *Handbook of Experimental Pharmacology* 86: 167-224.

McTiernan C., Adkins S., Chatonnet A., Vaughan T.A., Bartels C.F., Kott M., Rosenberry T.L., LaDu B.N. y Lockridge O. (1987) Brain cDNA clone for human cholinesterase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 84: 6682-6686.

Medof M.E., Walter E.I., Roberts W.L., Haas R., Rosenberry T.L. (1986) Decay accelerating factor of complement is anchored to cells by a C-terminal glycolipid. *Biochemistry* 25: 6740-6747.

Meedle T.H., Whittaker J.R. (1983) Development of translationally active mRNA from larval muscle acetylcholinesterase during ascidian embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4761-4765.

Meflah K., Bernard S. y Massoulie J. (1984) Interactions with lectins indicate differences in the carbohydrate composition of the membrane-bound enzymes acetylcholinesterase and 5'-nucleotidase in different cell types. *Biochimie* 66: 59-69.

- Mendez B., Garrido J., Maldonado M., Jaksic F.M., Inestrosa N.C. (1984) The electric organ of *Discopyge tschudii*: its innervated face and the biology of acetylcholinesterase. *Cell Mol. Neurobiol.* 4: 125-142.
- Millar D.B., Christopher J.P., Bishop W.H. (1979) Inhibition of acetylcholinesterase by TX-100. *Biophys. Chem.* 10: 147-151.
- Mintz K.F. y Brimijoin S. (1985) Monoclonal antibodies to rabbit brain acetylcholinesterase: selective enzyme inhibition, differential affinity for enzyme forms, and cross-reactivity with other mammalian cholinesterases. *J. Neurochem.* 45: 284-292.
- Mizukawa K., McGeer P.L., Tago H., Peng J.H., McGeer E.G., Kimura H. (1986) The cholinergic system of the human hindbrain studied by choline acetyltransferase immunochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Brain Res* 379:39-55.
- Moore D.E., Hess G.P. (1975) Acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of an amide. *Biochemistry* 14:2386-2389.
- Musset F., Frobert Y., Grassi J., Vigny M., Boulla G., Bon S., Massoulie J. (1987) Monoclonal antibodies against acetylcholinesterase from electric organs of *Electrophorus* and *Tarpedo*. *Biochimie* 69: 147-156.
- Naftad P.H.J., Blackstad W. (1966) *Zellforsch Mikroskop Anat* 73:234.
- Nagata Y., Mikoshiba K. y Tsukada Y. (1974) Neuronal cell body enriched and glial cell enriched fractions from young and adult rat brains: preparation and morphological and biochemical properties. *J. Neurochem.* 22: 493-503.
- Niday E., Wang C.S., Alaupovic P. (1967) Studies on the characterization of human erythrocyte acetylcholinesterase and its interaction with antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 459: 180-193.
- Nishizuka Y. (1986) *Science* 233:305-312.
- Ochoa E.L.M., Brusco A., Idoyaga-Vargas V. y Carminatti H. (1982) Postnatal changes in the activity ratio of specific and nonspecific cholinesterases from neuronal perikarya. *J. Neurochem.* 38: 1236-1240.
- Ott F. y Brodbeck U. (1984) Amphiphile dependency of the monomeric and dimeric forms of acetylcholinesterase from human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 775: 71-76.
- Pate Skene J.H. y Virág I. (1989) Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein. *J. Cell Biol.* 108: 613-624.
- Favlic M. (1988) Thermal inactivation of cholinesterases. *Periodicum Biologorum* 90 (2): 115-118.

- Perelman A., Abeijon C., Hirschberg C., Inestrosa N., Brandan E. (1989) Differential association and distribution of Acetyl and Butyrylcholinesterases with different rat liver subcellular organelles. *J Biol Chem.*
- Perrone-Bizzozero N.I., Weiner D., Hauser G., Benowitz L.I. (1988) Extraction of major acidic Ca^{++} dependent phosphoproteins from synaptic membranes. *J.Neurosci.Res.* 20: 346-350.
- Peterson G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.
- Pfenninger K.H., Ellis L., Johnson M.P., Friedman L.B. y Somlo S. (1983) Nerve growth cones isolated from fetal rat brain: subcellular fractionation and characterization. *Cell* 35: 573-584.
- Prody C.A., Zevin-Sonkin D., Gnatt A., Goldberg O. y Soreq H. (1987) Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 3555-3559.
- Pryde J.G. (1986) Triton X-114: a detergent that has come in from the cold. *TIBS* 11: 160-163.
- Rakonczay Z., Brimijoin S. (1985) Immunochemical differences among molecular forms of acetylcholinesterase in brain and blood. *Biochim. Biophys. Acta* 832: 127-134.
- Rakonczay Z., Brimijoin S. (1986) Monoclonal antibodies to rat brain acetylcholinesterase: comparative affinity for soluble and membrane-associated enzyme and for enzyme from different vertebrate species. *J. Neurochem.* 46: 280-287.
- Ralston J.S., Rush R.S., Doctor B.P., Wolfe A.D. (1985) Acetylcholinesterase from fetal bovine serum. Purification and characterization of soluble G_4 enzyme. *J. Biol. Chem.* 260: 4312-4318.
- Ramirez G., Gomez Barriocanal J., Barat A., Rodriguez Borrajo C. (1984) Two classes of collagen-tailed molecular forms of acetylcholinesterase. In BrzinM., Barnard E.A., Sket D. (eds) *Cholinesterases: fundamental and applied aspects.* de Gruyter, Berlin p 115.
- Reich A., Drews U. (1983) Choline acetyltransferase in the chick limb bud. *Histochemistry* 78:383-389.
- Rieger F. y Vigny M. (1976) Solubilization and physicochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: development and maturation of its molecular forms. *J.Neurochem.* 27: 121-129.
- Roberts W.L., Rosenberry T.L. (1986) Selective radiolabelling and isolation of the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochemistry* 25: 3091-3098.

- Robertson R.T. y Mostamand F. (1988) Development of "non-specific" cholinesterase-containing neurons in the dorsal thalamus of the rat. *Dev.Brain Res.* 41: 43-60.
- Romer-Luthi C.R., Ott P. y Brodbeck U. (1980) Reconstitution of human erythrocyte membrane acetylcholinesterase in phospholipid vesicles. *Biochim.Biophys.Acta* 601: 123-133.
- Rosenberry T.L. y Richardson J.M. (1977) Structure of 18 S and 14 S acetylcholinesterase: identification of collagen-like subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits. *Biochemistry* 16: 3550-3558.
- Rosenberry T.L. y Scoggin D.M. (1984) Structure of human erythrocyte acetylcholinesterase: characterization of inter-subunit disulfide bonding and detergent interaction. *J. Biol. Chem.* 259: 5643-5652.
- Rosenberry T.L., Haas R., Roberts W.L., Kim B.H. (1985) The hydrophilic domain of human acetylcholinesterase contains non-aminoacid components. In: Changeux J.P., Hucho F., Maelicke A., Neumann E. (eds.) *Molecular basis of nerve activity.* de Gruyter, Berlin, p651.
- Rotundo R.L., Fambrough D.M.(1980a) Synthesis, transport and fate of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle cells. *Cell* 22:583-594.
- Rotundo R.L., Fambrough D.M. (1980b) Secretion of acetylcholinesterase: relation to acetylcholine receptor metabolism. *Cell* 22:595-602.
- Rotundo R.L., Fambrough D.M. (1982) Synthesis, transport and fate of acetylcholinesterase and acetylcholine receptors in cultured muscle. In: *Membranes in growth and development.* Liss, New York, p 259.
- Rotundo R.L. (1984a) Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 81: 479-483.
- Rotundo R.L. (1984b) Purification and properties of the membrane bound form of acetylcholinesterase from chicken brain. *J.Biol.Chem.* 259: 13186-13194.
- Rotundo R.L. (1988) Biogenesis of acetylcholinesterase molecular forms in muscle. Evidence for a rapidly turning-over, catalytically inactive precursor pool. *J.Biol.Chem.* 263: 19398-19406.
- Rotundo R.L. y Carbonetto S.T. (1987) Neurons segregate clusters of membrane-bound acetylcholinesterase along their neurites. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 2063-2067.

- Rotundo R.L., Gomez A.M., Fernandez-Valle C. y Randall W.R. (1988) Allelic variants of acetylcholinesterase: Genetic evidence that all acetylcholinesterase forms in avian nerves and muscles are encoded by a single gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85: 7805-7809.
- Rotundo R.L., Thomas K., Porter-Jordan K., Benson R.J.J., Fernandez-Valle C. y Fine R.E. (1989) Intracellular transport, sorting, and turnover of acetylcholinesterase. *J.Biol.Chem.* 264: 3146-3152.
- Rubin L.L., Chalfin N.A., Adamo A., Klymkowsky M. (1985) Cellular and secreted forms of acetylcholinesterase in mouse muscle cultures. *J. Neurochem.* 45: 1932-1940.
- Schmidt H. (1981) Muscarinic acetylcholine receptor in chick limb bud during morphogenesis. *Histochemistry* 71:89-98.
- Schoen S.W., Graeber M.B., Toth L. y Kreutzberger G.W. (1988) 5'Nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating nerve cells? *Develop. Brain Res.* 39: 125-136.
- Schroder C. (1980) Characterization of embryonic cholinesterase in chick limb bud by colorimetry and disk electrophoresis. *Histochemistry* 69:243-253.
- Schumacher M., Camp S., Maulet Y., Newton M., MacPhee-Quigley K., Taylor S.S., Friedman T., Taylor P. (1986) Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from c-DNA sequence. *Nature* 319: 407-409.
- Schumacher M., Maulet Y., Camp S. y Taylor P. (1988) Multiple messenger RNA species give rise to the structural diversity in acetylcholinesterase. *J.Biol.Chem.* 263: 18979-18987.
- Sellinger O., Azcurra J.M., Johnson D.E, Ohlsson W.G., Lodin Z. (1971) *Nature New Biology* 230:253-256.
- Sellinger O.Z. y Azcurra J.M. (1973) Bulk separation of neuronal cell bodies and glial cells in the absence of added digestive enzymes in *Research Methods for Neurochemistry*, Ch. I.
- Sikorav J.L., Grassi J., Bon S.. (1984) Synthesis *in vitro* of precursors of the catalytic subunits of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* and *Electrophorus electricus*. *Eur J Biochem* 145:519-524.
- Sikorav J.L., Vallette F., Grassi J., Massoulie J. (1985) Isolation of a cDNA clone for a catalytic subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *FEBS Lett* 193:159-163.
- Sikorav J.L., Duval N., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Osterlund M., Reimund B. y Massoulie J. (1988) Complex alternative splicing of acetylcholinesterase transcripts in *Torpedo electric* organ; primary structure of the precursor of the glycolipid-anchored dimeric form. *EMBO J.* 7: 2983-2993.

- Sikorav J.L., Krejci E. y Massoulie J. (1987) cDNA sequences of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase: primary structure of the precursor of a catalytic subunit; existence of multiple 5'-untranslated regions. *EMBO J.* 6: 1865-1873.
- Silman I., Di Giamberardino L., Lyles J., Couraud J.Y. y Barnard E.A. (1979) Parallel regulation of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase in normal, denervated and dystrophic chicken skeletal muscle. *Nature* 280: 160-162.
- Silver A. (1971) The significance of cholinesterase in the developing nervous system. *Prog Brain Res* 34:345-355.
- Silver A. (1974) The biology of cholinesterases. North-Holland, Amsterdam.
- Singer S.J. y Nicholson G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Sket D., Pavlin R. (1985) Cholinesterases in single nerve cells isolated from locus ceruleus and from nucleus of the facial nerve of the rat: a microgasometric study. *J Neurochem* 45:319-323.
- Sorensen K., Brodbeck U., Rasmussen A.G., Norgaard-Pedersen B. (1986) Normal human serum contains two forms of acetylcholinesterase. *Clin Chim Acta* 158:1-6.
- Soreq H., Parvari R., Silman I. (1982) Biosynthesis and secretion of catalytically active acetylcholinesterase in *Xenopus* oocytes microinjected with mRNA from rat brain and from *Torpedo* electric organ. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:830-834.
- Soreq H., Parvari R., Silman I. (1983) Biosynthesis of acetylcholinesterase in rat brain and *Torpedo* electric organ is directed by scarce mRNA species. *Prog Brain Res* 58:107-115.
- Soreq H., Zevin-Sonkin D., Razon N. (1984) Expression of cholinesterase gene(s) in human brain tissues: translational evidence for multiple mRNA species. *EMBO J* 3:1371-1375.
- Stadler J., Gerisch G., Bauer G., Deppert W. (1985) *EMBO J* 4:1153-1156.
- Staufenbiel M., Lazarides E. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:318-322.
- Steck L., Kant A. (1974) Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membrane. *Meth in Enzymol Vol XXXI*:172-173.
- Stieger S., Brodbeck U., Reber B., Brunner J (1984) Hydrophobic labeling of the membrane binding domain of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata*. *FEBS Lett* 168:231-234.

Stieger S., Brodbeck U. (1985) Amphiphilic detergent-soluble acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata*: characterization and conversion by proteolysis to a hydrophilic form. *J Neurochem* 44:48-56.

Taylor P., Schumacher M., MacPhee-Quigley K., Friedmann T. y Taylor S. (1987) The structure of acetylcholinesterase: relationship to its function and cellular disposition. *Trends in Neurosci.* 10: 93-95.

Torres J.C e Inestrosa N.C. (1983) Heparin solubilized asymmetric acetylcholinesterase from rat neuromuscular junction. *Febs Lett.* 154: 265-268.

Toutant J.P., Massoulie J., Bon S. (1985) Polymorphism of pseudocholinesterase in *Torpedo marmorata* tissues: comparative study of the catalytic and molecular properties of this enzyme with acetylcholinesterase. *J Neurochem* 44:580-592.

Toutant J.P. (1986) An evaluation of the hydrophobic interactions of chick muscle acetylcholinesterase by charge shift electrophoresis and gradient centrifugation. *Neurochem.Int.* 9: 111-119.

Toutant J.P. (1989) Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Progress in Neurobiology* 32: 423-446.

Toutant J.P., Arpagaus M. y Fournier D. (1988) Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*: quaternary structure and hydrophobic character. *J.Neurochem.* 50: 209-218.

Toutant J.P. y Massoulie J. (1987) Acetylcholinesterase. En *Mammalian Ectoenzymes*, Cap.11, p. 289-328, Kenny and Turner Eds. Elsevier Science Publishers B.V.

Toutant J.P., Massoulie J. (1988) Cholinesterases: Tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 86, Cap. 8b, V.P.Whittaker Eds., Springer-Berlin.

Tower D.B. y Young O.M. (1973) The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J. Neurochem.* 20: 269-278.

Tse A.G.D., Barclay A.N., Watts A., Williams A.F. (1985) A glycopospholipid tail at the carboxyl terminus of the Thy-1 glycoprotein of neurons and thymocytes. *Science* 230:1003-1008.

Tse C.M., Belt J.A., Jarvis S.M., Paterson A.R.P., Wu J.S. y Young J.D. (1985) Reconstitution studies of the human erythrocyte nucleoside transporter. *J.Biol.Chem.* 260: 3506-3511.

Vallette F.M., Fauquet M. y Teillet M.A. (1987) Difference in the expression of asymmetric acetylcholinesterase molecular forms during myogenesis in early avian dermomyotomes and limb buds in ovo and in vitro. *Dev.Biol.* 120: 77-84.

Vigny M., Gisiger V. y Massoulie J. (1978) "Nonspecific" cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties, and significance of the two enzyme systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 75: 2588-2592.

Vigny M., di Giamberardino L., Couraud J.Y., Rieger F., Koenig J. (1976) Molecular forms of chicken acetylcholinesterase: effect of denervation. *FEBS Lett* 69:277-280.

Vigny M., Bon S., Massoulie J., Gisiger V. (1979) The subunit structure of mammalian acetylcholinesterase: catalytic subunits, dissociating effect of proteolysis and disulfide reduction of the polymeric forms. *J Neurochem* 33:559-565.

Weitz M., Bjerrum O.J., Brodbeck U. (1984) Characterization of an active hydrophilic erythrocyte membrane acetylcholinesterase obtained by limited proteolysis of the purified enzyme. *Biochim Biophys Acta* 776:65-74.

Wender M. y Kozic M. (1969) Histochemistry of enzymes in developing neuroglia. *Folia Morphologica* XXVIII: 7-16.

Wenk. H., Bigl V. y Meyer U. (1980) Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats. *Brain Res. Rev.* 2: 295-316.

Wheeler G., Coleman R. y Finean J. (1972) Cholinesterase activity in subcellular fractions of rat liver. Association of AchE with the surface membrane and other properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 255: 917-931.

Whittaker V.P. (1963) Identification of acetylcholine and related esters of biological origin. In: Koelle G.B. (ed) *Cholinesterase and anticholinesterase agents.* Springer, Berlin Gottingen Heidelberg, pp 1-39 (Handbuch der experimentellen Pharmakologie, vol 15 [Suppl]).

Wiedmer T., di Francesco C., Brodbeck U. (1979) Effects of amphiphiles on structure and activity of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Eur J Biochem* 102:59-64.

Zakut H., Even L., Birkenfeld S., Malinger G., Zisling R. y Soreq H. (1988) Modified properties of serum cholinesterases in primary carcinomas. *Cancer* 61: 727-737.

Zakut H., Matzkel A., Schejter E., Avni A. y Soreq H. (1985) Polymorphism of acetylcholinesterase in discrete regions of the developing human fetal brain. *J.Neurochem.* 45: 382-389.