PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

"Estudios citoquímicos y de microscopía óptica de proteína de andamiaje, asociadas con el receptor del neurotransmisor acetilcolina nicotínico"

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

Olszevicki, Nicole Melisa | LU.:1073190

TUTOR

Barrantes, Francisco J. | BIOMED UCA-CONICET

CO-TUTOR

Bizzotto, Juan | Universidad Argentina de la Empresa

| 2020

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOMED | UCA - CONICET

FUNDACIÓN UADE
UNA GRAN UNIVERSIDAD

PROYECTO FINAL DE INGENIERIA

"ESTUDIOS CITOQUÍMICOS Y DE MICROSCOPÍA ÓPTICA DE PROTEÍNA DE ANDAMIAJE, ASOCIADAS CON EL RECEPTOR DEL NEUROTRANSMISOR ACETILCOLINA NICOTÍNICO"

Olszevicki, Nicole Melisa | LU.: 1073190

Licenciatura en Biotecnología

TUTOR

Barrantes, Francisco J. | BIOMED UCA-CONICET

CO-TUTOR

Bizzotto, Juan | Universidad Argentina de la Empresa

20 de Enero del 2020

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas

Todas las figuras presentes en este escrito fueron re-diseñadas e ilustradas por la Diseñadora en Comunicación Visual, docente en las carreras de diseño, Mara Clarisa Tornini.

RESUMEN

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurobiología Molecular dirigido por el Prof. Dr. Francisco J. Barrantes, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED, UCA-CONICET).

El objetivo de este proyecto es contribuir a dilucidar las interacciones entre el receptor del neurotransmisor acetilcolina y proteínas de andamiaje, con el propósito de entender la interrelación entre estas proteínas y su efecto sobre la función del receptor.

Para llevarlo a cabo, se utilizaron cultivos celulares de líneas clonales que expresan el receptor de acetilcolina nicotínico en forma estable. Implicó el aprendizaje y la aplicación de técnicas de inmunocitoquímica con sondas fluorescentes que son el *"gold standard"* actual. Mediante dichas técnicas, en combinación con epimicroscopia óptica e fluorescencia, caractericé la expresión en la superficie celular, la topografía y distribución de las proteínas implicadas en la organización en el plasmalema del receptor de acetilcolina, como las proteínas LL5β y LRP4, y la Rapsina, proteína de andamiaje involucrada en el anclaje y estabilización del receptor en dicha membrana.

Desde el punto de vista metodológico los trabajos desarrollados en este Proyecto recurrieron además al uso de técnicas de biología molecular, lo cual involucró la selección, purificación y amplificación de plásmidos bifuncionales (poseyendo el material genético codificante de la proteína en estudio combinado con el gen de una proteína fluorescente), la transfección transiente de tales plásmidos en células de mamíferos que expresaban en receptor de acetilcolina nicotínico en su superficie y, finalmente, la microscopía óptica de fluorescencia como sistema de interrogación.

El desarrollo del proyecto implicó el aprendizaje y ejecución de distintos métodos experimentales enumerados precedentemente, que constituyen uno de los frentes de avanzada de la investigación en Neurociencias. El Proyecto, que involucró mi ejecución de todos los pasos contemplados en el mismo, desde la preparación de cultivos celulares de líneas clonales, la tinción mediante sondas fluorescentes, la ulterior obtención de imágenes de fluorescencia, y finalmente el análisis de las imágenes resultantes y su interpretación me han proporcionado sólidas bases de capacitación intelectual y experimental con la que podré enfrentar otros temas de investigación en el futuro.

Los conocimientos que surjan de este proyecto podrían tener implicancias en entender los mecanismos moleculares subyacentes en sinaptopatías (anomalías de la transmisión nerviosa en la sinapsis) y enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer y el Parkinson en el sistema nervioso central o la miastenia gravis en el sistema nervioso periférico.

ABSTRACT

The project was carried out in the Neurobiology Laboratory Directed by Prof. Dr. Francisco Barrantes, at the Biomedical Research Institute (BIOMED, UCA-CONICET).
The objective is to elucidate the interactions between the neurotransmitter receptor for acetylcholine and scaffolding proteins that interact with the receptor and link it to its surrounding lipid microenvironment (in particular with cholesterol), in order to understand the interactions among these proteins and their effect on the function of the receptor.

To this end, cell culture of clonal cell lines expressing the nicotinic receptor were employed. Immunocytochemical techniques using fluorescent probes were employed to characterize the expression of the receptor at the cell Surface, its topography and distribution of the scaffolding proteins involved in the plasmalemma organization of the receptor, such as LL5β and LRP4, or rapsyn, another scaffolding protein involved in the anchoring and stabilization of the receptor in the membrane.

Methodologically, the work carried out in this Project involved molecular biology techniques, including selection, purification and amplification of bi-functional plasmids (i.e. possessing the genetic information codifying for the protein under study combined with the gene of a fluorescent protein), the transient transfection of such plasmids in mammalian cells expressing the nicotinic receptor, and finally the interrogation of such specimens using fluorescence microscopy.

The knowledge stemming from this project may have implications for understanding the underlying molecular mechanisms in synaptopathies and neurodegenerative diseases such as Alzheimer and Parkinson diseases in the central nervous system or myasthenia gravis in the peripheral nervous system.

RESUMEN 4

ABSTRACT 6

OBJETIVO 10

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES 11

UNIÓN NEUROMUSCULAR 11

1 | LAS NEURONAS MOTORAS 12
2 | FIBRA MUSCULAR O MIOCITO 12
3 | CÉLULA DE SCHWANN 13

EL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO 18

LIGANDOS DEL RECEPTOR 23

MECANISMOS DE MODULACIÓN DEL NACHR 23
1 | LIGANDOS AGONISTAS 24
2 | LIGANDOS ANTAGONISTAS 25

LÍNEA CELULAR CHO-K1/A5 27

LÍPIDOS DE MEMBRANA 27

RELACIÓN ENTRE EL NACHR Y LÍPIDOS CIRCUNDANTES 29

MATERIALES Y METODOS 32

CULTIVO DE LÍNEA CHO-K1/A5 32

PLÁSMIDO CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA MRUBY-LIFEACT 32

DATOS RELEVANTES DEL PLÁSMIDO LIFEACT 33
MORFOLOGÍA DE LA ACTINA EN LA CELULA CHO-K1/A5 35

PLÁSMIDO CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA LL5β-EGFP 36

PLÁSMIDO CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA LRP4-EGFP 37

DATOS RELEVANTES DEL PLÁSMIDO LRP4 38

PLÁSMIDO CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA RAPSINA-EGFP 38

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR EL MÉTODO DE ELECTROPORACIÓN DEL PLÁSMIDO LL5β 39

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR EL MÉTODO DE SHOCK TÉRMICO DE LOS PLÁSMIDOS LRP4-EGFP Y RAPSINA-EGFP 40

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS LRP4, RAPSINA, LIFEACT Y LL5β 42

TINCIONES 42
1| MOLÉCULAS ORGÁNICAS 42
2| PUNTOS CUÁNTICOS (QDOT'S) 44
3| PROTEICOS 45
MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA 46
MICROSCOPIO OPTICO 47
TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN CÉLULAS CHO-K1/A5 49
ANÁLISIS DE IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ÓPTICA 53
IMAGEJ SOFTWARE 53
TRANSFECCIÓN LL5β + BTX-555 55
MERGE DE IMÁGENES 56
PROTOCOLOS 56
PROTOCOLO DE REPIQUE DE CÉLULAS 56
PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CHO-K1/A5
LIPOFECTAMINA 2000 (VOLÚMENES PARA 2 VIDRIOS) 57
PROTOCOLO DE MONTADO 57
PROTOCOLO DE TINCIÓN CON BTX 58
PREPARACIÓN CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES 58
PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR ELECTROPORACIÓN 58
PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR SHOCK TÉRMICO 59
PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO 59
COMPOSICIÓN DE MEDIO DE CULTIVOS Y SOLUCIONES 60
MEDIO HAM'S F12 (1L) 60
LB PARA CRECIMIENTO DE BACTERIAS (1L) 60
PBS 10X (1L) 61
SN1 (10 ML) 61
SN 2 (10 ML): PREPARAR EN EL MOMENTO DE USO 61
SN3 (10ML) 61
PFA 4% SACAROSA (50 ML) 61
M1 (100ML) 61
RESULTADOS 63
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS 63
ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TINCIÓN DEL NACHR CON BTX-555 65
DISPOSICIÓN DE LAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES EN LAS CÉLULAS 68
PROTEÍNA LL5β 68

RAPSINA 76
LRP4 78

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVA 81

BIBLIOGRAFÍA 89

GLOSARIO 94

OBJETIVO

Familiarizarse con el método científico a través experimentación en un laboratorio de prestigio internacional en Neurobiología Molecular.

Generar la síntesis de proteínas de andamiaje por medio del método de transfección transiente de plásmidos elegidos, partiendo de células de ovario de hamster chino (CHO) genéticamente modificadas, las cuales sobreexpresan el receptor de acetilcolina nicotinico (nAChR) y no sintetizan de manera natural dichas proteinas. Dichas proteínas de andamiaje juegan un papel fundamental en la construcción, mantenimiento y estabilidad de la sinapsis colinérgica periférica, y por tanto dilucidar la interacción de las mismas con el receptor contribuye a comprender el proceso fisiologico de desarrollo de la unión neuromuscular y ciertas patologías de la misma, tal como la miastenia gravis, enfermedad en la que autoanticuerpos contra el nAChR o dichas proteínas de andamiaje comprmeten la estructura y función de la unión neuromuscular. .

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

UNIÓN NEUROMUSCULAR

La formación de sinapsis neuromuscular implica una señalización elaborada entre terminales nerviosas musculares y fibras musculares esqueléticas, una unión altamente especializada. La sinapsis controla el movimiento de todos los músculos esqueléticos. Clave para una transmisión sináptica rápida, robusta y confiable, los receptores de acetilcolina (nAChRs), los receptores musculares para el neurotransmisor están altamente enriquecidos en la membrana postsináptica. La alta densidad de los nAChR sinápticos, que se aproximan a las 20,000 moléculas / μm^2, asegura que la acetilcolina se une y activa un número suficiente de nAChR para iniciar de manera confiable un potencial de acción muscular y una contracción muscular *(Sanes and Lichtman 1999)*. La unión neuromuscular es una sinapsis periférica operada por el neurotransmisor acetilcolina, por lo cual se la denomina colinérgica.

La formación, mantenimiento y estabilidad de esta sinapsis requiere la participación de proteínas que provee el nervio, como la agrina, las varias proteínas Wnt (grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de la superficie receptora de dicha célula hasta su interior), la proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (Lrp4), la tirosina quinasa específica de músculo (MuSK) y proteínas de la matriz extracelular para la diferenciación y la alineación precisa de las estructuras pre- y postsinápticas. Las señalizaciones a través de agrina / Lrp4-MuSK (dominios Ig1 /2, participando en la etapa inervada del músculo) y Wnt / Lrp4-MuSK (dominio rico en cisteína, participando en la etapa no inervada del músculo y la guía axonal) contribuyen a la agrupación de receptores de acetilcolina (nAChR) en el periodo de diferenciación ontogenética de la sinapsis neuromuscular (también denominada unión neuromuscular o placa neural)), y luego, ya establecida la sinapsis, intervienen en la comunicación trans-sináptica y en la estabilidad sináptica.

La unión neuromuscular es una sinapsis entre las neuronas motoras y las fibras del músculo esquelético, y es fundamental para el control de la contracción muscular. Su formación requiere agrina neuronal que actúa uniéndose a LRP4 para estimular MuSK.

La enfermedad autoinmune denominada miastenia gravis (MG) es causada principalmente por la generación de autoanticuerpos contra el nAChR, pero una proporción menor de los pacientes alberga anticuerpos contra la MuSK o LRP4, que son responsables de

las deficiencias pre- y postsinápticas y contribuyen, al menos en parte, a un defecto en la regulación de la liberación de ACh, mecanismo compensatorio de la disfunción postsináptica.

Se han identificado mutaciones en agrin, MuSK y LRP4 en pacientes con síndrome miasténico congénito, y los pacientes con miastenia gravis desarrollan anticuerpos contra agrin, LRP4 y MuSK. Sin embargo, no está claro si la vía de señalización de agrina es crítica para el mantenimiento de UNM porque la mutación nula de cualquiera de los tres genes es letal perinatal *(Barik et al. 2014)*.

La heterogeneidad de los anticuerpos postsinápticos MuSK y LRP4 en su unión a epitopes de moléculas sinápticas que constituyen dominios funcionales son responsables de las deficiencias pre y postsinápticas sufridas en las diversas formas de miastenia, ya que los mediadores moleculares clave como Wnt, MuSK y LRP4 actúan bidireccionalmente para formar arquitecturas pre y postsináptica; la regulación ascendente compensatoria de la liberación de ACh cuántica depende a su vez de la modulación a través de receptores muscarínicos y de adenosina en el terminal nervioso, así como de proteínas extracelulares como la red de laminina y el colágeno sináptico (que se unen a MuSK) y que participan en la estabilización sináptica *(Takamori 2017)*.

La unión neuromuscular (UNM) está comprendido por tres tipos de células diferentes:

1 | LAS NEURONAS MOTORAS

También conocidas como motoneuronas, son un conjunto de neuronas del sistema nervioso central cuya principal misión es la de enviar una serie de impulsos nerviosos hasta los músculos o glándulas.

Son consideradas neuronas eferentes, ya que son las encargadas de enviar la información desde la médula espinal y en el área 4 de Brodman, donde se ubican, al resto de los músculos del cuerpo. Esta transmisión de impulsos nerviosos tiene como finalidad ejercer un control sobre la musculatura esquelética y la musculatura lisa que constituye los órganos y las glándulas. La parte de la neurona motora involucrada en la UNM es el terminal axónico.

2 | FIBRA MUSCULAR O MIOCITO

Es una célula fusiforme y multinucleada, con capacidad contráctil. El músculo esquelético humano está compuesto por una colección heterogénea de tipos de fibras

musculares. Esta gama de tipos de fibras musculares permite la amplia variedad de capacidades que muestran los músculos humanos.

Además, las fibras musculares pueden adaptarse a las demandas cambiantes cambiando el tamaño o composición de tipo fibra. Esta plasticidad sirve como base fisiológica para numerosas intervenciones de fisioterapia diseñadas para aumentar el desarrollo de la fuerza o la resistencia.

Según estudios, durante las últimas décadas, el número de técnicas disponibles para la clasificación de las fibras musculares ha aumentado, lo que ha dado lugar a varios sistemas de clasificación.

Los tipos de fibras musculares pueden describirse usando características histoquímicas, bioquímicas, morfológicas o fisiológicas; sin embargo, las clasificaciones de las fibras musculares mediante diferentes técnicas no siempre coinciden. Por lo tanto, las fibras musculares que pueden agruparse mediante una técnica de clasificación pueden ubicarse en diferentes categorías utilizando una técnica de clasificación diferente *(Scott, Stevens, and Binder–Macleod 2001)*.

En el músculo esquelético humano se distinguen dos clases de fibras en función de sus propiedades enzimáticas y contráctiles, que se denominan tipos I y II.

Las fibras de tipo I tienen un metabolismo energético predominantemente oxidativo *(Brooke and Kaiser 1970) (Meijer and Elias 1976)*; Se han caracterizado por ser lentos, pequeños y resistentes a la fatiga. Su ATPasa miofibrilar es estable frente a la preincubación en medios ácidos pero no alcalinos. Sobre la base de estos criterios, las fibras de tipo I pueden distinguirse histoquímicamente de las fibras de tipo II.

La mayoría de las fibras de tipo II, por otro lado, tienen un metabolismo predominantemente glucolítico. Su ATPasa miofibrilar es estable a la preincubación alcalina, pero es variablemente sensible a la preincubación en ácido, lo que permite que las fibras se subgrupen en tipos IIA, IIB e IIC *(Billeter et al. 1980)*.

3 | CÉLULA DE SCHWANN

Descriptas desde 1839 por Theodor Schwann, constituyen la glía del sistema nervioso periférico (SNP). Rodean todos los axones del nervio, en algunos casos envolviendo con su citoplasma varios de ellos y en otros, elaborando la vaina de mielina alrededor de los de mayor diámetro. Estas células cumplen múltiples funciones relacionadas con la protección y el

soporte metabólico axonal. Además contribuyen en los procesos de conducción nerviosa, así como en los mecanismos de regeneración de los axones lesionados *(Lombana and Giraldo 1993)*. La principal característica de estas células es que son altamente especializadas, ya que contienen altas concentraciones de organoides y moléculas que se encuentran en bajas concentraciones de forma extrasináptica.

La membrana plasmática de la célula muscular está eléctricamente polarizada. Un estímulo apropiado despolariza la membrana y produce la contracción. Normalmente, la despolarización es producida por un estímulo nervioso. El músculo está inervado por terminales nerviosas de neuronas motoras de la médula espinal. En el punto de inervación, el nervio pierde su vaina de mielina, y se asocia a una región especializada de la superficie de la fibra muscular, para formar la placa motora. En una fibra muscular esquelética, cada terminal axónico motor forma sólo una placa motora.

En la zona de contacto, la terminal axónica forma una dilatación que se aloja en una depresión poco profunda de la superficie de la fibra llamada hendidura sináptica primaria.

El sarcolema que reviste la hendidura sináptica primaria muestra numerosos pliegues que constituyen las hendiduras sinápticas secundarias. En la zona de unión, la lámina basal de la célula de Schwann se fusiona con la lámina basal de la célula muscular. Está cubierta celular fusionada se extiende hacia la hendidura sináptica primaria, separando la fibra nerviosa de la fibra muscular, y penetra al interior de cada hendidura sináptica secundaria. Cuando el potencial de acción alcanza a la placa motora, el neurotransmisor acetilcolina, contenido en las vesículas sinápticas, se libera y difunde a través de la hendidura. Este mediador se une a receptores de acetilcolina presentes en la membrana postsináptica, concentrados principalmente en la entrada de los pliegues sinápticos secundarios, e induce la despolarización del sarcolema que es transmitida a los tubos T.

Resumiendo, la UNM es una estructura altamente especializada en la transmisión de impulsos nerviosos rápidos y repetitivos, propiedades que asegura mediante la liberación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) contenido en un gran número de vesículas sinápticas (50 nm de diámetro) y, en la postsinapsis, un correspondientemente alto número de receptores (10^7) empacados a altísima densidad en la placa motora. Además de mitocondrias, que proporcionan la energía para la síntesis y liberación del transmisor ***(Figura 1)***.

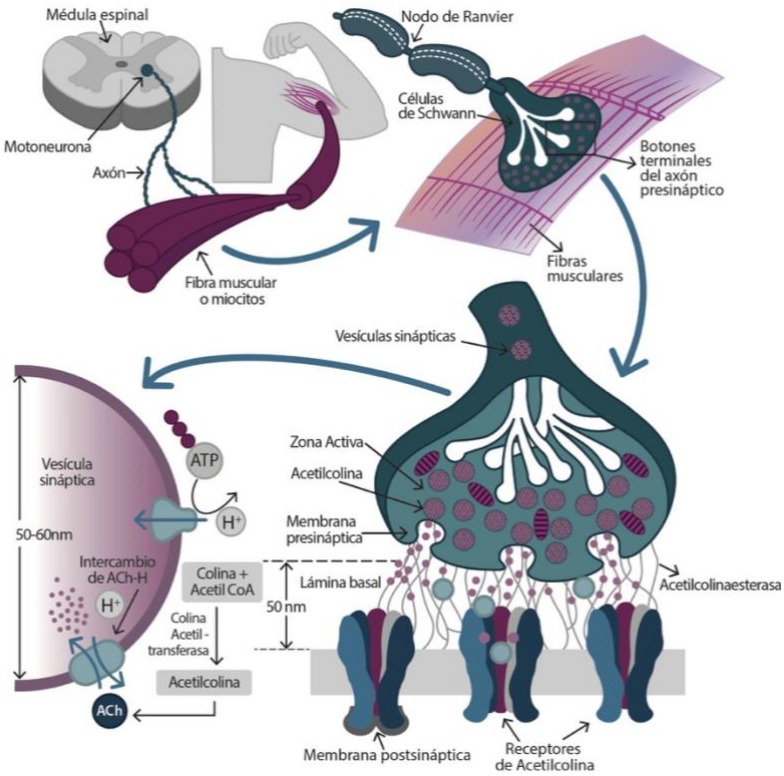


Figura 1|
Interacción de moléculas de la unión NMJ
Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Representacion-de-la-ruta-de-la-N-glicosilacion-Rodeadas-por-un-ovalo-rojo-se_fig4_320879884

Las moléculas mejor estudiadas del terminal nervioso son las proteínas de la vesícula sináptica, así como el neurotransmisor endógeno, la ACh, la colina-acetiltransferasa (enzima sintetizadora de la ACh) y el transportador de colina vesicular, que re-capta esta parte de la molécula del neurotransmisor tras su escisión en colina y acetato por la potente enzima acetilcolinesterasa. La UNM se encuentra asociada con los canales de calcio y potasio dependientes del voltaje.

Al llegar el potencial de acción a la terminal axónica despolariza la membrana generando la activación de los canales de Ca^{2+} por la variación del voltaje en la membrana. El Ca^{2+} fluye por el mismo, permitiendo que las vesículas sinápticas liberen los neurotransmisores, en nuestro caso, la ACh.

Los neurotransmisores se unen a los receptores de las células blanco generando que cambien su conformación y permitiendo la entrada de Na^{+} a través de canales selectivos para el Na^{+}, transmitiéndose la despolarización por el sarcolema. La membrana postsináptica está especializada para responder de manera rápida y confiable al neurotransmisor liberado desde

la terminal nerviosa suprayacente. Posee una concentración extremadamente alta de nAChRs (> 10,000 y hasta 20.000 /μm^2).

La membrana postsináptica de la fibra muscular presenta invaginaciones o canales profundos debajo de la terminal nerviosa denominados crestas neurales, y luego se invagina en pliegues de unión de ∼1 μm de profundidad. Los nAChR se concentran en las crestas y en parte a lo largo de los lados de los pliegues, mientras que los canales de sodio y la molécula de adhesión celular neural (N-CAM) se concentran en las profundidades de los pliegues, un arreglo que puede mejorar la eficacia de la transmisión sináptica.

Se necesitan dos vías de señalización, una transcripcional y una segunda post-traduccional, para formar y mantener las sinapsis asegurando que los nAChR se expresen a una alta concentración en la membrana postsináptica.

Las células musculares postsinápticas proporcionan señales a los axones motores, y estas señales regulan la formación, maduración, estabilización y plasticidad de las sinapsis neuromusculares. Durante el desarrollo, los axones motores se acercan y forman sinapsis con el músculo en una región previamente preparada, marcada por la expresión elevada y la agrupación de proteínas postsinápticas clave, incluidos los nAChRs. La preparación previa de la sinapsis neuromuscular depende de MuSK y LRP4, que forma un complejo con MuSK y estimula la actividad de la quinasa MuSK. La estabilización de las sinapsis en desarrollo requiere agrina derivada de la neurona motora, que se une a LRP4, estimula una mayor asociación entre LRP4 y MuSK, y aumenta la actividad de la quinasa MuSK, lo que lleva al anclaje de proteínas clave en la membrana postsináptica y la transcripción elevada de 'genes sinápticos' en miofibra núcleos sinápticos *(Yumoto, Kim, and Burden 2012)*.

Ambas vías requieren de la proteína agrina, una de cuyas formas (la agrina de origen neural), se secreta por los terminales nerviosos motores, así como LRP4, el receptor muscular de agrina. La unión de agrina a LRP4 conduce a la activación de la quinasa músculo-específica MuSK ("*muscle specific kinase*") el receptor de la tirosina quinasa, lo que lleva al reclutamiento de Dok-7, una proteína adaptadora citoplásmica que ayuda en la activación de MuSK y también funciona en la cascada hacia abajo de MuSK. Estos funcionan tanto en la vía transcripcional específica de la sinapsis como en la vía de anclaje post-traduccional.

En cambio, la rapsina, una proteína periférica de membrana de 43 KDa que se une al bucle intracelular principal en las subunidades del nAChRs, es crucial para el anclaje del nAChR en la membrana postsináptica, además de tener un papel esencial en la formación y el

mantenimiento de las sinapsis neuromusculares, pero no actúa en la vía transcripcional *(Oury et al. 2019)*.

Como se mencionara previamente, la ACh es degradada por la enzima acetilcolinesterasa para generar colina y acetato. La colina es recaptada por el botón presináptico. La onda de despolarización que se extiende por el sarcolema permite la liberación de los iones de calcio desde el retículo sarcoplásmico.

Los iones de calcio inducen la contracción muscular haciendo que las fibras de actina se deslicen sobre la miosina ***(Figura 2)***.

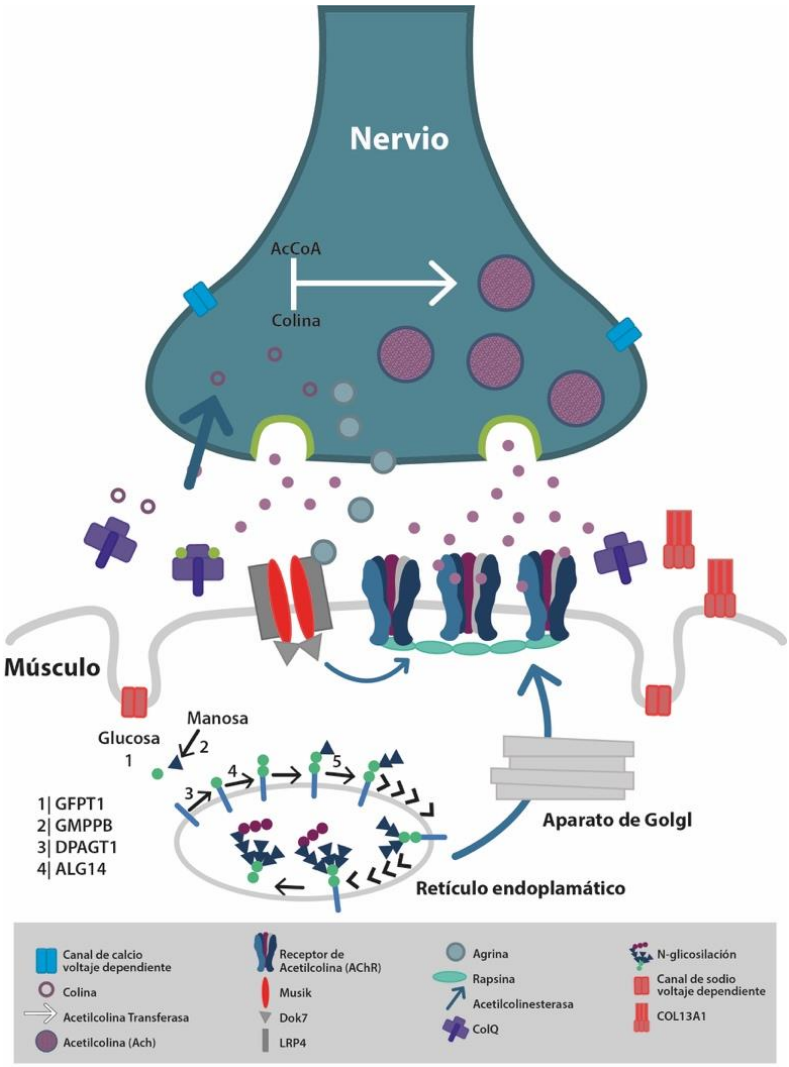


Figura 2|
Interacción molecular entre una Neurona y una célula muscular. Moléculas involucradas y circulación de las mismas.

EL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO

El receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) es la molécula arquetípica en la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (LGIC). Los miembros de esta superfamilia median la comunicación intercelular rápida en respuesta a neurotransmisores endógenos *(F J Barrantes 2004)*.

Es una macromolécula de alrededor de 250 kDa. Se trata de una proteína integral de membrana compuesta de 5 subunidades, que se expresa tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el periférico (SNP). El receptor nicotínico se divide en dos subtipos. El subtipo muscular, expresado en la unión neuromuscular, y el subtipo neuronal, que puede adoptar la forma de homopentámero (por ejemplo: el α7, compuesto por cinco subunidades idénticas de α7), o de heteropentámero, siendo el más común el α4β2, involucrado en la adicción a la nicotina, o el heteromérico α9 α10, expresado en el órgano de Corti en el oído interno (***Figura 3***) *(Unwin 2005)*.

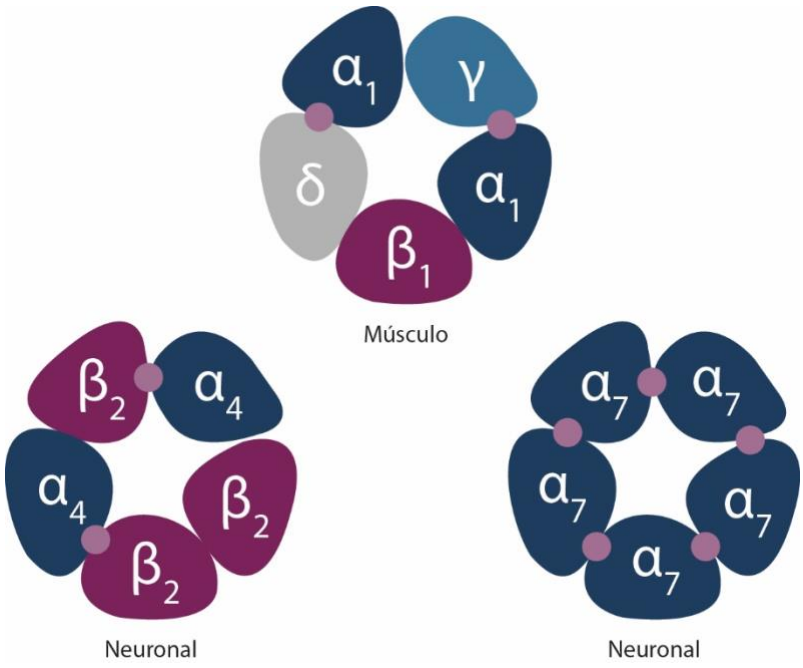


Figura 3|
Receptores de acetilcolina nicotínicos.
A) Receptor de subtipo muscular de forma fetal o embrionaria.
B) Receptor de subtipo neuronal heteropentamérico (α4-β2)
C) Receptor de subtipo neuronal homopentamérico α7.

Cada una de estas subunidades está compuesta, a su vez, por 5 segmentos transmembrana, constituyendo una estructura oligomérica, pentamérica y pseudosimétrica,

que rodea un poro o canal iónico central. La proteína receptora se encuentra en alta concentración en la sinapsis periférica -la denominada unión neuromuscular- transmitiendo rápidamente señales electroquímicas desde la terminal del nervio hasta la hendidura sináptica, en respuesta a la liberación del neurotransmisor natural, la acetilcolina u otras sustancias neuroactivas sobre dicha sinapsis. De allí que este receptor se denomine *nicotínico*, ya que puede ser estimulado por la nicotina, insecticida natural producido por la planta solanácea *Nicotiana tabacum* para protegerse de su plaga natural, la polilla *Phthorimaea operculella.*

La movilidad traslacional de los nAChR en la superficie celular difiere entre los receptores musculares y neuronales en términos de coeficientes de difusión e intervalos de residencia en la sinapsis, que cubren un amplio rango de regímenes de tiempo. Una característica peculiar del α7 nAChR cerebral es su capacidad de pasar gran parte de su tiempo confinado peri-sinápticamente, vecino a las sinapsis glutamatérgicas (excitatorias) y GABAérgicas (inhibitorias). Una función importante del α7nAChR puede ser visitar los territorios de otros receptores de neurotransmisores, regulando diferencialmente el equilibrio dinámico entre la excitación y la inhibición, dependiendo de su tiempo de residencia en cada dominio *(Francisco J Barrantes 2014)*.

El nAChR periférico participa en muchos procesos fisiológicos, como la contracción muscular, la generación de bioelectricidad (p.ej. en el órgano eléctrico del pez marino del género Torpedinidae (*Torpedo marmorata* o raya eléctrica jaspeada, *Torpedo californica*, etc.) y se encuentra relacionado al control de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF-α *(Lichtman and Conchello 2005)*. Es el canal iónico activado por ligando mejor caracterizado, y por lo tanto, en el laboratorio se lo utiliza como modelo experimental de otros receptores de similares características. De hecho, el nAChR pertenece a una súper-familia de receptores o canales iónicos activados por ligandos, la que comprende a importantes proteínas involucradas en la transmisión nerviosa y blancos de importantes enfermedades en el sistema nervioso central (SNC), los nAChR contribuyen a los mecanismos patológicos de trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer que es una de las enfermedades más devastadoras del SNC, se asocia con la degeneración de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal que inervan la corteza cerebral y el hipocampo. Se caracteriza por dos hallazgos neuropatológicos: placas amiloides y ovillos neurofibrilares. También se acompaña de un déficit funcional extenso en el sistema colinérgico, que involucra el nAChR de tipo neuronal.

Además, cada vez hay más pruebas que muestran una mala regulación del metabolismo del colesterol en el desarrollo de la enfermedad. Dado que el colesterol afecta la proteína AChR en múltiples niveles, el deterioro cognitivo y otras correlaciones neurológicas podrían estar asociadas en parte con una diafonía anormal entre la proteína receptora y el esterol en esta sinaptopatía *(Francisco J Barrantes, Borroni, and Vallés 2010)*.

La UNM es responsable de la transmisión de la señal desde los terminales del axón de las neuronas motoras al músculo, traduciendo rápidamente los potenciales de acción de las neuronas en la contracción muscular. La acetilcolina liberada por los terminales del axón se une y activa los nAChR, lo que desencadena la apertura del canal receptor y la despolarización de la membrana muscular. Los nAChR se agrupan en la UNM dando como resultado una alta densidad localizada de grupos de receptores, lo que aumenta la eficiencia de la transmisión de señal. La agrupación de AChR es impulsada por la proteína agrina, segregadas tanto por el terminal nervioso como por el musculo. La agrina neural, al liberarse de las terminales nerviosas se une a la proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP4), activándola para formar un complejo con la quinasa muscular específica (MuSK), causando así la autofosforilación y activación de MuSK. Esto da como resultado una cascada de señalización que promueve la agrupación de AChR mediada por Rapsina en la UNM *(Lazaridis and Tzartos 2020)*.

Para comprender su funcionamiento, podemos dividir al nAChR en tres zonas (***Figura 4***): una zona extracelular , que interactúa con el ligando, una zona intracelular pequeña, involucrada principalmente en modificaciones post-translacionales que afectan la biosíntesis del receptor y su estabilidad, y un poro central al que contribuyen las cinco subunidades, la zona del receptor involucrada en la permeabilidad iónica. En el SNP las cinco subunidades conocidas para el nAChR son α, β, γ, δ y ε en el receptor adulto, y el reemplazo de la subunidad ε por la γ en el receptor de tipo embrionario ***(Figura 5)***. Una importante diferencia funcional ocurre en el curso del desarrollo ontogenético: la forma fetal o embrionaria (2 α y una copia de cada una de las β, γ y δ) es reemplazada en la adultez por la combinación 2 αβεδ, es decir, en una relación estequeométrica 2:1:1:1. Ambas formas difieren en sus propiedades funcionales. En esta Tesis hemos empleado la forma adulta del nAChR *(Francisco Jose Barrantes 2013)*.

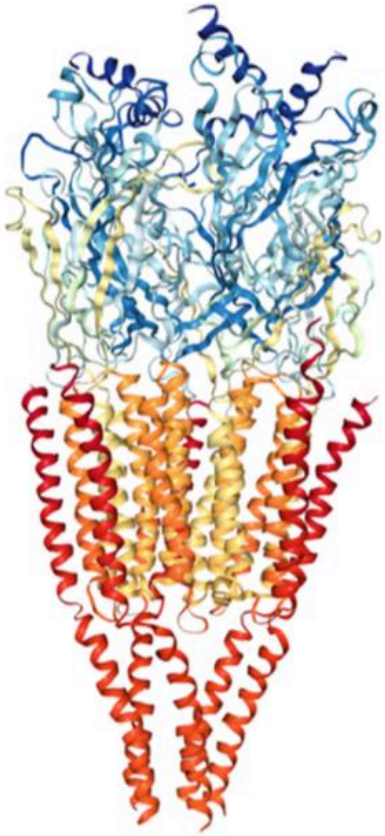


Figura 4|
Molécula nAChR. Tres dominios son evidentes: un gran dominio extracelular con abundante estructura secundaria de cadena β (parte superior, en varios grados de azul y amarillo claro), la región transmembrana todo helicoidal (parte media, en amarillo y rojo), que comprende 20 hélices, 4 de cada subunidad, y la región citoplásmica más pequeña con una sola hélice de cada subunidad (parte inferior, color salmón). El modelo molecular se dibujó utilizando las coordenadas moleculares de los mapas de densidad depositados en el Banco de Datos de Proteínas en Europa del archivo PDB con el número de acceso 4BOR, 25 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/ y el software MolSoft Navegador vers. 3.8. Fuente: Paz and Barrantes 2019

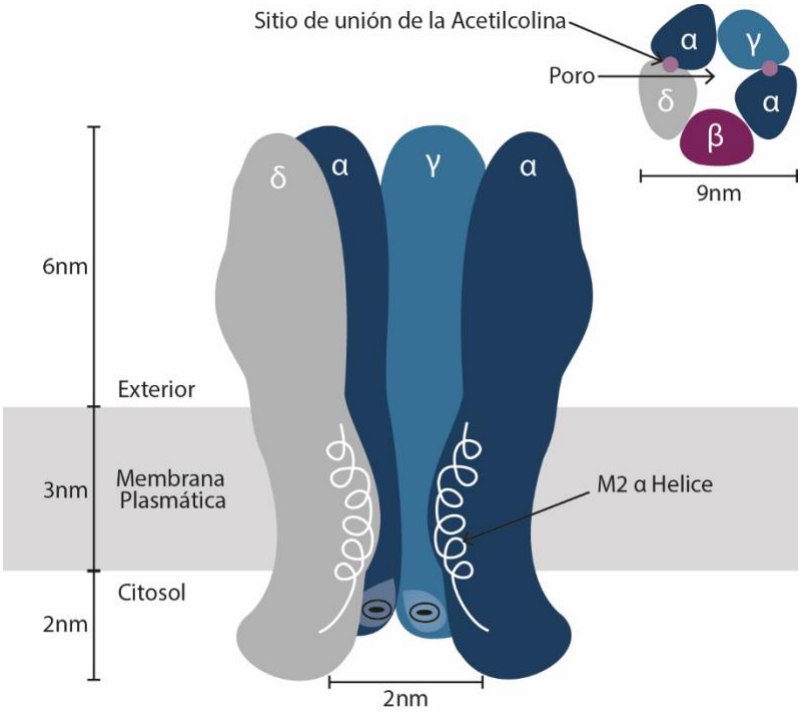


Figura 5|
Vista transversal del receptor nicotínico. Se pueden ver las 3 regiones o zonas, sus subunidades en este corte.

La función principal de los receptores nicotínicos y otros pertenecientes a la superfamilia de los activados por ligandos es la transducción de señales *rápidas*, lo cual logran mediante la apertura y cierre de canales iónicos con duraciones de milisegundos, y que en el curso de la evolución han logrado combinar en la misma molécula un sitio de unión para el neurotransmisor y el canal iónico responsable de transmitir la señal hacia el interior de la célula mediante el rápido pasaje de miles de iones.

Por otro lado, existen receptores que interactúan con proteínas unidas a nucleótidos de guanina, que pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G. Una variedad de los mismos responde al mismo neurotransmisor, la acetilcolina; es el llamado receptor de acetilcolina muscarínico, del cual existen varios subtipos. Se encuentran presentes en órganos y tejidos de la periferia, así como en el SNC. En el cerebro, los receptores muscarínicos están presentes en terminales sinápticas, regulando la liberación de neurotransmisores autorreceptores y heterorreceptores (***Figura 6***) *(Flores Soto and Segura-Torres 2005)*.

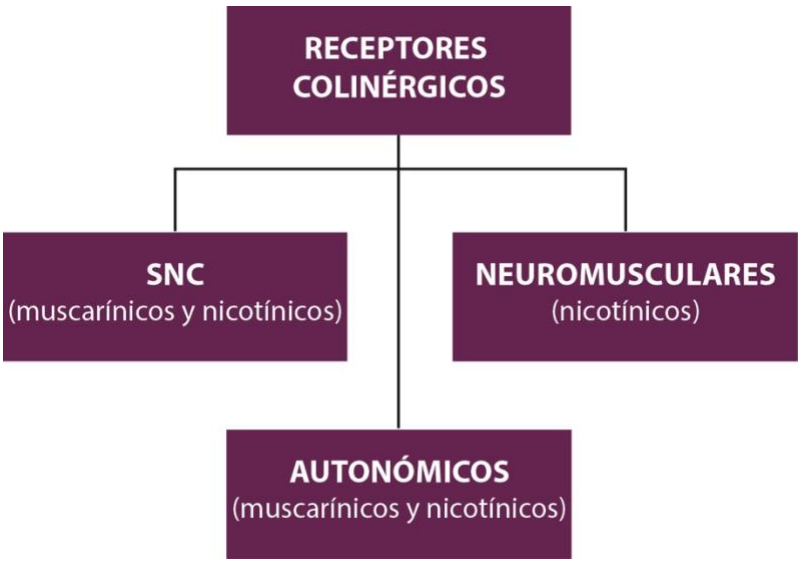


Figura 6|
El sistema nervioso autónomo ejerce sus acciones a través de sus dos ramas antagónicas: simpático (adrenérgico) y parasimpático (colinérgico).
Observando la imagen de abajo se puede apreciar que tanto el sistema simpático como el parasimpático están modulados a nivel preganglionar por la acetilcolina. Esta molécula se une a receptores nicotínicos en los ganglios autonómicos para producir la liberación de noradrenalina (si se estimula una sinapsis simpática) o de acetilcolina (en caso de la sinapsis

Los receptores poseen tres estados fundamentales: abierto, inactivado (desensibilizado) o cerrado ***(Figura 7)***. El estado abierto ocurre cuando un ligando agonista, como la acetilcolina o la nicotina, se une al sitio de reconocimiento; esto provoca la apertura del canal. Luego de unos 20 milisegundos de presencia continuada del ligando, el receptor

puede pasar al estado inactivado (se hace refractario a la presencia del agonista; se desensibiliza). Este estado es resultado de un cambio conformacional que impide el flujo de iones, a pesar de poseer el ligando unido. En el caso del receptor nicotínico, por ejemplo, a pesar de encontrarse unida la acetilcolina o la nicotina, el receptor no permite el paso de iones. Por lo general la acetilcolina, o el ligando activador, se suele hidrolizar con rapidez cerrándose el canal en aproximadamente 1 milisegundo, antes de que ocurra una desensibilización importante *(Shen and Yakel 2009)*.

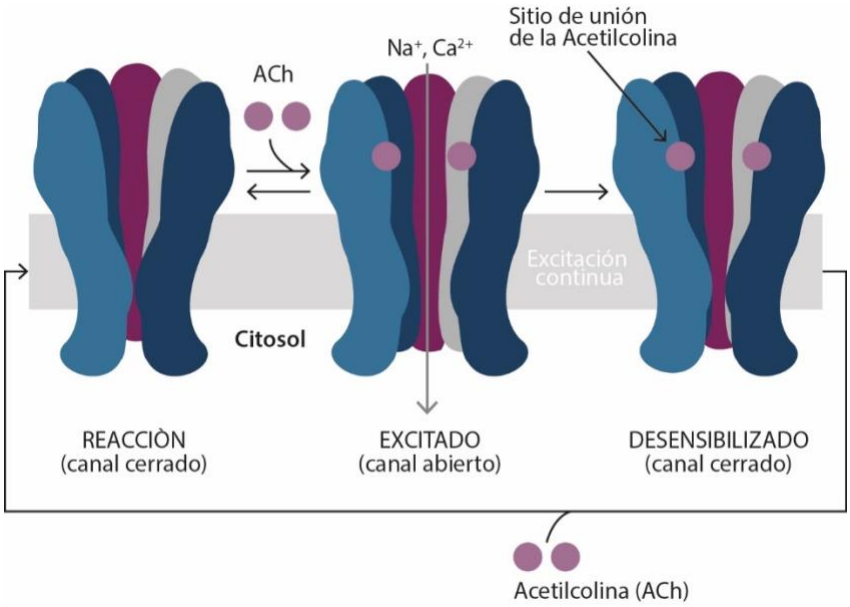


Figura 7|
Estados fundamentales del receptor acetilcolínico. Vista transversal de la membrana plasmática.
Estos pueden ser: Estado de reacción o canal cerrado, donde no hay tránsito de iones. Estado excitado o canal abierto, la Ach se ubica en la zona de unión del receptor permitiendo así, la apertura del mismo para el pasaje de iones. Y por último, Estado desensibilizado o canal cerrado donde comienza a cerrarse mientras la Ach sigue unida.

LIGANDOS DEL RECEPTOR

MECANISMOS DE MODULACIÓN DEL NACHR

Las moléculas que modulan el nAChR pueden unirsea este grupos de proteínas que lo conforman en distintas regiones y mediar sus efectos por distintos mecanismos:

1| Algunas moléculas actúan uniéndose en el interior del canal, cuando éste se encuentra abierto, lo que impide el paso de iones a través de el. Este bloqueo, conocido como "de canal abierto" es de tipo estérico, no competitivo, y no es estático, ya que las moléculas inhibitorias se unen a su lugar específico y se disocian continuamente (flickering), generándose un equilibrio entre las especies unidas y las libres *(Neher and Steinbach 1978)*.

Este mecanismo de bloqueo se observa principalmente, pero no exclusivamente, con moléculas cargadas y su efecto es dependiente del potencial de membrana celular.

2| Otras moléculas presentan afinidad por el sitio ortostérico (zona de unión del ligando), por lo que compiten o interfieren con el agonista en su unión al receptor. Estas moléculas, que pueden ser agonistas, actúan como inhibidores competitivos clásicos.

3| Hay moléculas que no bloquean estéricamente la luz del canal, ni actúan en la región ortostérica y, genéricamente, se denominan moduladores alostéricos, que pueden ser de carácter positivo (MAP) o negativo (MAN), según aumenten o disminuyan la actividad del nAChR, respectivamente. Estos moduladores alostéricos pueden actuar en distintas regiones del nAChR, pues la unión de una molécula a cualquier lugar del nAChR puede modificar su estabilidad en una conformación y/o las barreras energéticas para cambios conformacionales *(Bertrand and Gopalakrishnan 2007)*. Entre los moduladores alostéricos se incluyen:

A| Moléculas que actúan a nivel extracelular, cuando los canales se encuentran en estado cerrado, generando un cambio conformacional que puede dificultar o facilitar/estabilizar su apertura y/o modificar el grado de desensibilización *(Yakel 2013).*

B| Una gran variedad de moléculas hidrófobas, que pueden difundir al interior de la membrana e interaccionar con lugares situados en la interfase proteína-lípidos.

C| Algunos ligandos que interaccionan con residuos del interior del canal que, aparte del bloqueo estérico, pueden evocar un aumento en la desensibilización, lo que reduce el número de nAChRs susceptibles de ser abiertos por el agonista molecular (por ejemplo, cargada y neutra). Incluso las moléculas más simples modulan la función del nAChR por distintos mecanismos, uniéndose en diferentes puntos de la proteína.

El receptor nicotínico puede ser activado por los siguientes ligandos ***(Figura 8)***:

1| LIGANDOS AGONISTAS

Los cuales activan al receptor; por ejemplo, acetilcolina, nicotina y colina.

2 | LIGANDOS ANTAGONISTAS

Los cuales bloquean la actividad del receptor, pudiendo ser competitivos como la α-bungarotoxina o el curare -este último y sus derivados usado en anestesiología, o no competitivos, como el dexametonio.

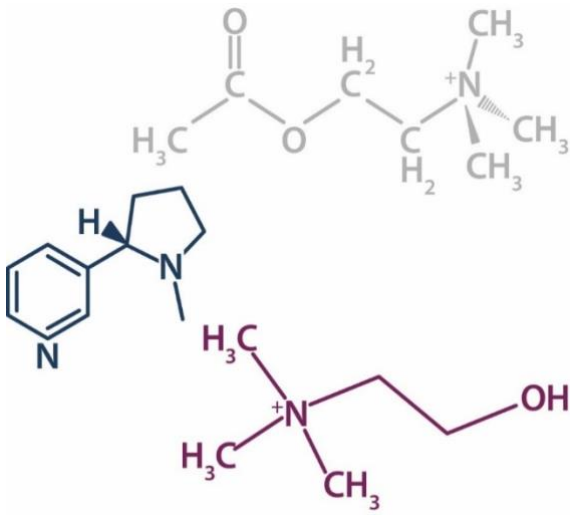


Figura 8 | Ligandos agonistas del Receptor Nicotínico de Acetilcolina. Favorecen la actividad del mismo.

- *Acetilcolina*
- *Nicotina*
- *Colina*

Al unirse la acetilcolina (***Figura 9***), u otro ligando agonista, se genera un cambio conformacional en la proteína que permite el flujo de cationes, principalmente sodio y calcio. Tanto el ingreso de sodio como el de calcio producen la despolarización de la membrana provocando un potencial postsináptico excitatorio. Además, el ingreso de calcio, entre otras cosas, puede actuar liberando neurotransmisores, recuperando al receptor nicotínico de la desensibilización vía cascada de señalización y puede activar un mecanismo de neuroprotección vía modulación de la expresión de genes.

La acetilcolina se encuentra almacenada en vesículas en la parte terminal de la neurona. Estas vesiculas sinapticas se encuentran conectadas al citoesqueleto mediante proteínas de union como la actina, que fusionan las vesiculas con la membrana terminal.

Mediante la entrada de calcio en las terminaciones finales de la neurona y a través de los canales de calcio P/Q se produce la liberación de las moleculas de acetilcolina. Un potencial de acción libera entre 50 y 300 vesículas postsinápticas y cada vesícula sináptica libera alrededor de 10000 moléculas de acetilcolina en el espacio sinaptico, además de liberar ATP que se consideraun modulador de la liberación de acetilcolina. La inactivación de la

acetilcolina se produce mediante la acción de esterasas en la línea basal de la membrana postsináptica, así mismo la disminución de esterasas aumenta la actividad de acetilcolina. Una vez que las moléculas de acetilcolina se encuentran en el espacio postsináptico, se unen al sitio de union de la acetilcolina que se encuentra situado en el segmento extracelular N-terminal. La unión de la molécula ocasiona cambios conformacionales en los segmentos M1 y M2 que se alinean para formar el canal iónico. Con la apertura de estos canales ionicos se produce el ingreso de sodio y salida de potasio a la neurona, el flujo de estos iones al interior de la neurona produce la despolarización de la membrana. La despolarización de la membrana provoca la apertura de canales de sodio dependientes de voltaje a lo largo de la membrana postsináptica, que finalmente generan el potencial de acción de membrana.

La participación de la ACh en una gran cantidad de funciones fisiológicas y su carácter de neurotransmisor en la UNM ha propiciado el desarrollo de una farmacología exuberante, destinada a bloquear o incrementar la actividad colinérgica en el sistema nervioso periférico. En el sistema nervioso central, y muy particularmente en el cerebro de los mamíferos, el efecto fisiológico más importante de la ACh es una reducción de la permeabilidad al K^+, de tal forma que las neuronas sensibles a la acetilcolina son más susceptibles a otras influencias excitatorias.

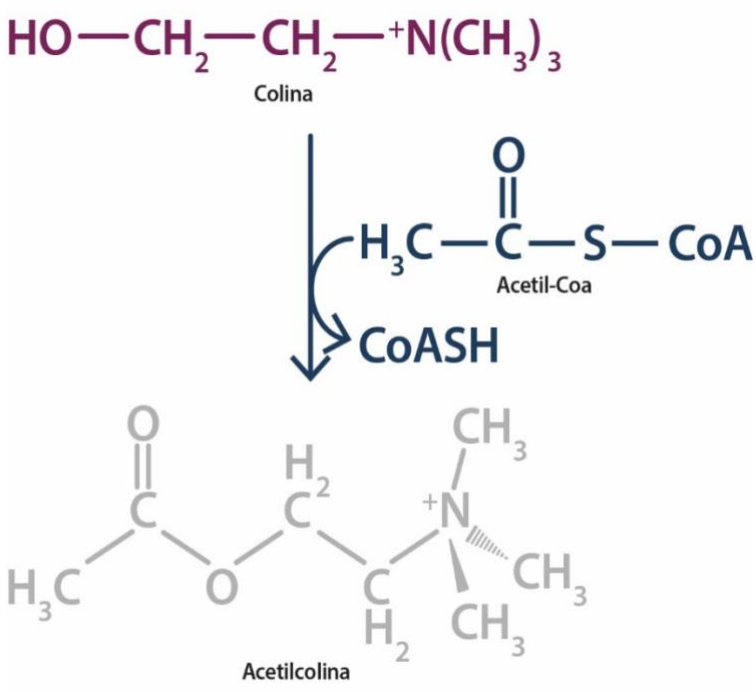


Figura 9|
Síntesis de Acetilcolina. La acetilcolina es sintetizada a partir de Colina y Acetil CoA, derivados del metabolismo de la glucosa a través de la enzima Colina acetiltransferasa.

LÍNEA CELULAR CHO-K1/A5

En 1999 es creada la línea celular CHO-K1/A5 por Barrantes y su equipo *(Roccamo et al. 1999)*. Esta línea celular expresa las subunidades α1, β1, δ y ε en relación 2:1:1:1, es decir la correspondiente al receptor nicotínico muscular adulto. Fue desarrollada como control en un trabajo que demostró que la deficiencia en esfingomielina, un lípido de membrana provoca una disminución en la cantidad de nAChR expresado en membrana.

En este trabajo se estudia la relación del receptor muscular de acetilcolina nicotínico expresado en la línea celular CHO-K1/A5, con su entorno lipídico circundante y las proteínas de andamiaje asociadas al mismo.

Estas células no expresan los genes de las proteínas accesorias presentes en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular, ya que carecen de los genes que las codifican.

LÍPIDOS DE MEMBRANA

La membrana plasmática de las células eucariotas contiene varios tipos de lípidos que muestran una alta variabilidad bioquímica tanto en su resto apolar (la cadena de acilo de los glicerolípidos) como en su cabeza polar (la estructura del azúcar de los glicoesfingolípidos) *(Fantini and Barrantes 2013)*.

Al igual que todas las otras proteínas transmembrana monoméricas o multiméricas, los receptores para neurotransmisores están rodeados por una capa de lípidos que forman un límite interfacial entre la proteína y la membrana. Entre estos lípidos, el colesterol y los esfingolípidos han atraído mucha atención debido a su propensión conocida a segregarse en dominios de plataforma ordenados comúnmente conocidos como balsas lipídicas *(Fantini and Barrantes 2009)*.

Los fosfolípidos y el colesterol (Chol) son los dos lípidos clave para mantener el correcto funcionamiento de las proteínas integrales de la membrana en la superficie celular. El chol está confinado en gran parte a la membrana celular y constituye el 90% del contenido celular total *(Lange and Ramos 1983)*. El contenido de Chol de las membranas celulares está fuertemente regulado y las células que se dividen retienen todas las enzimas necesarias para la colesterogénesis. En los seres humanos, el 50% o más del Chol corporal total se deriva de

la síntesis de novo. La enzima microsomal 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) constituye un paso limitante importante en la biosíntesis de Chol, por lo que esta enzima es un objetivo de elección para la regulación farmacológica del contenido de Chol *(Pediconi et al. 2004)*.

El colesterol tiene una variabilidad estructural restringida, casi exclusivamente, a la oxidación de su grupo polar -OH. Aunque generalmente se considera el lípido de membrana más rígido, el colesterol puede adoptar una amplia gama de conformaciones debido a la flexibilidad de su cadena isobutílica unida a la cadena principal de esterano policíclico. Además, es una molécula asimétrica que muestra una cara α plana y una cara β rugosa. En general, estas características estructurales abren una serie de posibles interacciones entre el colesterol, los lípidos y proteínas de la membrana, de acuerdo con las funciones reguladoras prominentes que este lípido único ejerce sobre los componentes de la membrana *(Fantini and Barrantes 2013)*.

Las lipoproteínas plasmáticas constituyen un sistema polidisperso y heterogéneo de partículas de morfología cuasi-esférica, poseyendo un núcleo ("core") hidrofóbico formado por lípidos no polares como el colesterol esterificado y los triglicéridos (TAG), y por una capa superficial hidrofílica que contiene colesterol no esterificado, fosfolípidos (FL) y la zona central de la proteína sin el lípido unido (Apo)).

Las lipoproteínas de baja densidad pueden inducir reorganizaciones moleculares en la placa motora.

RELACIÓN ENTRE EL NACHR Y LÍPIDOS CIRCUNDANTES

La función del AChR depende de la composición de los lípidos que lo rodean en la membrana y entre éstos el colesterol (Chol) parece ser necesario para mantener la estructura del AChR *(Borroni et al. 2007)*. El Chol también es necesario para la formación y estabilización de los agregados del AChR en la membrana.

Debido a la importancia de este lípido sobre distintos aspectos del AChR se analizará la influencia en la estabilidad del receptor en la membrana de las células CHO-K1/A5.

Las proteínas incluidas en la membrana necesariamente exhiben contactos cercanos y relativamente extensos con los lípidos circundantes. En la periferia hidrofóbica de la proteína,

una primera capa de lípidos constituye la región del "cinturón" o "anillo" lipídico, una interfaz parcialmente ordenada pero dinámica en el intercambio activo con la bicapa de membrana. lípidos a granel. Se informó que el colesterol estaba excluido de la región de lípidos anulares. Investigaciones previas de estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), resonancia de espín electrónico (ESR) y espectroscopía de fluorescencia, han proporcionado información sobre las propiedades biofísicas de los lípidos anulares en la periferia inmediata de varias proteínas de membrana y recientemente se ha aplicado la espectrometría de masas en fase gaseosa *(Francisco J Barrantes 2016)*.

El efecto inhibidor de ácidos grasos libres sobre la función nAChR se atribuyó a la perturbación de las interacciones proteína-lípidos, y se descubrió que la magnitud del efecto dependía de la estructura del acido graso. Las alteraciones en la función nAChR causadas por estos, particularmente ácido linolénico, o por productos de hidrólisis de fosfolipasa A2 se correlacionaron directamente con las perturbaciones de la estructura nAChR *(Antollini and Barrantes 2016)*.

Varios genes que codifican las subunidades del AChR exhiben una homología de secuencia de aminoácidos y presumiblemente motivos estructurales de orden superior. Dentro de la superfamilia de canales iónicos activados por ligandos (por neurotransmisores) (*ligand-gated ion channels,* LGIC), el nAChR y el receptor 5-HT3 pertenecen a dos familias de canales selectivos de cationes, mientras que los receptores de glicina y ácido gama aminobutírico tipo A ($GABA_A$) son canales selectivos de aniones. Los miembros de esta superfamilia también se conocen como receptores de bucle Cys porque en su terminal amino todas sus subunidades contienen mitades extracelulares de un par de cisteínas separadas por disulfuro solo por 13 residuos. Al igual que muchas otras proteínas transmembrana (TM) de la superfamilia de canales iónicos activados por ligandos grandes, el nAChR expone aproximadamente la mitad de su masa al espacio extracelular, aproximadamente un tercio se encuentra en el compartimento intracelular, y cada subunidad nAChR contribuye con cuatro segmentos hidrofóbicos, 20-30 aminoácidos longitud de ácidos, la extensión de membrana M1, M4 o segmentos TM ***(Figura 10)***. De este modo, el segmento M2 de cada subunidad contribuye estructuralmente a la formación del canal iónico propiamente dicho. M4 es el segmento más expuesto al lípido de la bicapa. M1 y M3 incorporan de manera efectiva sondas fotoactivables de separación de membrana y también están expuestas, aunque menos que M4,

a la fase lipídica. La extensa interfaz entre los restos de proteínas y lípidos, que comprende tanto las porciones TM expuestas a lípidos de la proteína AChR como el lípido vecino AChR, constituye un dominio funcional del AChR *(F J Barrantes 2004)*.

Desde un punto de vista estructural, el resto lipídico de esta interfaz constituye el lípido cinturón ("anular "vecinal") región, que es la fracción lipídica en el perímetro inmediato de la proteína nAChR, descubierta utilizando técnicas de resonancia de espín electrónico (ESR) y caracterizada adicionalmente posteriormente en términos de selectividad de lípidos y estequiometría representa una representación esquemática de la macromolécula nAChR en la capa lipídica, destacando (en rojo) la capa más interna de moléculas lipídicas que constituyen la región anular utilizando nAChR reconstituido.

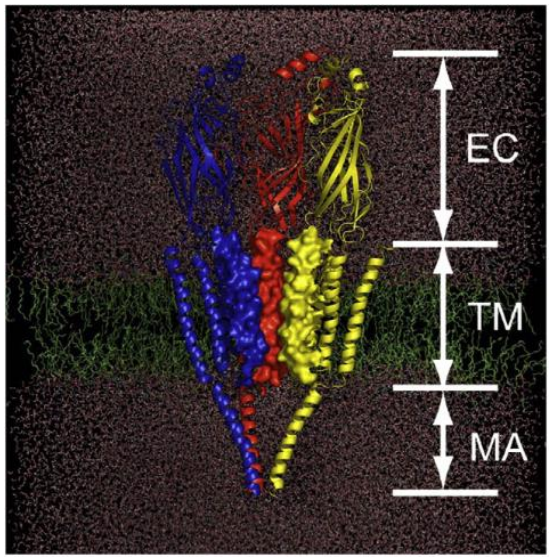


Figura 10|
Los dominios extracelulares (EC), transmembrana (TM) y MA del AChR se muestran en una bicapa lipídica. La estructura 3D se basa en datos de microscopía de crioelectrones del AChR a una resolución de 4 Å. La proteína receptora está inmersa en una capa lipídica (cadenas de acilo fosfolípidico mostradas en verde) y moléculas de agua (rojo). Solo se muestran tres subunidades (codificadas por color en rojo, azul y amarillo). El anillo más interno de las hélices M2 se representa con una superficie de potencial electrostático para resaltar la forma del poro.

Los lípidos anulares o vecinales de proteínas son relativamente inmóviles con respecto al resto de los lípidos de membrana *(Marsh and Barrantes 1978)*. El colesterol influye en la función del canal iónico, la distribución y la agrupación en la membrana, la endocitosis y la clasificación exocítica del nAChR. las regiones transmembrana de las subunidades nAChR que tienen un contacto extenso con el lípido circundante y, por lo tanto, son ideales para transmitir la señalización mediada por colesterol de este último. Se podrían acoplar tres moléculas de colesterol en los segmentos transmembrana de cada subunidad del nAChR, lo

que generaría un total de 15 moléculas de colesterol por cada molécula de nAChR *(Baier, Fantini, and Barrantes 2011)*.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO DE LÍNEA CHO-K1/A5

Para llevar a cabo los experimentos se contó con un cultivo de células CHO-K1/A5. Se partió de un stock de estas (pasaje 7) mantenidas en nitrógeno líquido. Mediante el protocolo de descongelamiento, se llevaron las células a temperatura ambiente y posteriormente se sembraron.

Para su mantenimiento y repique, se mantuvieron los cultivos en estufa a 37ºC perfundida con 5% de CO_2. Pasados 4 días, luego del descongelado, se aplicó el protocolo de repique. Las células se lavaron con tampón de fosfato salino (PBS). Una vez extraído todo el PBS del frasco plástico p100, para romper las proteínas de adhesión a soporte y célula-célula, se utilizó tripsina durante 2 min en la estufa a 37ºC.

A continuación, se retiró el contenido del frasco y se traspasó a un tubo Falcon con 5 mL de medio. Esto permite frenar la progresión de la digestión enzimática, evitando destruir la integridad de la membrana celular.

El material sobrenadante se centrifugó a continuación durante 5 min a 1000 RPM para precipitar las células. Descartado el sobrenadante, se resuspendieron las células en 5 mL de medio.

Luego, se contaron las células obtenidas en una cámara de Neubauer, sembrando 10 µL de la suspensión en cada hemicámara, para luego determinarse la cantidad de células por unidad de volumen en el microscopio.

Para repicar cada 4 días, se sembraron 100000 células por botella con 5 mL de medio. Y para el cultivo en multiwell de 12 pocillos con cubreobjetos de alta resolución de 18 mm, se colocaron entre 30000 y 40000 células para todos los ensayos.

PLÁSMIDO CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA MRUBY-LIFEACT

Este fue utilizado como control positivo ya que sabíamos de su buen funcionamiento y mediante él regulamos las variables del método de transfección.

Lifeact ***(Figura 11)***, es un péptido de 17 aminoácidos que tiene la capacidad de teñir, gracias a estar conjugado a un cromóforo ***(Figura 12)***, estructuras como los filamentos de actina en células y tejidos eucariotas. Esto permite ver *in vivo* el citoesqueleto de actina,

crucial para el estudio de procesos biológicos. Una de las ventajas de este péptido es que no interviene la dinámica de la actina en ninguna condición, es decir, ni *in vivo*, ni *in vitro* *(Riedl et al. 2008)*.

La longitud de onda utilizada para la excitación y la visualización del plásmido es del rango del color verde 500/550 nm ***(Figura 13)***.

DATOS RELEVANTES DEL PLÁSMIDO LIFEACT

Excitation = 558; Emission = 605

pmRuby-Lifeact-7 **Sequence Number: LACT-112**

ATGAACAGC - mRuby Sequence (681 Nucleotides - 227 Amino Acids)

ATGTACGGC - mRuby Chromophore (MYG)

GCCCGAACT - LifeAct Sequence (51 Nucleotides - 17 Amino Acids)

LINKER - 7 Amino Acids (21 Nucleotides) between mRuby and LifeAct

ATG - Methionine Start Codon

TAG TAA TGA - Stop Codons

Antibiotic = Kan/Neo

Lifeact = N-terminal 17 amino acids from *S. Cerevisiae* Abp140

CAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
AGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCCACCGACGTCAGATCCGCTAGCGCC
ACCATGGGCGTGGCCGACTTGATCAAGAAGTTCGAGTCCATCTCCAAGGAGGAGGGGGATC
CACCGGTCGCCACCATGAACAGCCTGATCAAAGAAAACATGCGGATGAAGGTGGTGCTGGA
AGGCAGCGTGAACGGCCACCAGTTCAAGTGCACCGGCGAGGGCGAGGGCAACCCCTACAT
GGGCACCCAGACCATGCGGATCAAAGTGATCGAGGGCGGACCTCTGCCCTTCGCCTTCGAC
ATCCTGGCCACATCCTTCATGTACGGCAGCCGGACCTTCATCAAGTACCCCAAGGGCATCC
CCGATTTCTTCAAGCAGAGCTTCCCCGAGGGCTTCACCTGGGAGAGAGTGACCAGATACGA
GGACGGCGGCGTGATCACCGTGATGCAGGACACCAGCCTGGAAGATGGCTGCCTGGTGTA
CCATGCCCAGGTCAGGGGCGTGAATTTTCCCAGCAACGGCGCCGTGATGCAGAAGAAAACC
AAGGGCTGGGAGCCCAACACCGAGATGATGTACCCCGCTGACGGCGGACTGAGAGGCTAC
ACCCACATGGCCCTGAAGGTGGACGGCGGAGGGCACCTGAGCTGCAGCTTCGTGACCACC
TACCGATCCAAGAAAACCGTGGGCAACATCAAGATGCCCGGCATCCACGCCGTGGACCACC
GGCTGGAAAGGCTGGAAGAGTCCGACAACGAGATGTTCGTGGTGCAGCGGGAGCACGCCG
TGGCCAAGTTCGCCGGCCTGGGCGGAGGGTAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGC

CATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACC TGAAACATAAAATGAATGCAATT

mRuby = eqFP611 + 29 Mutations

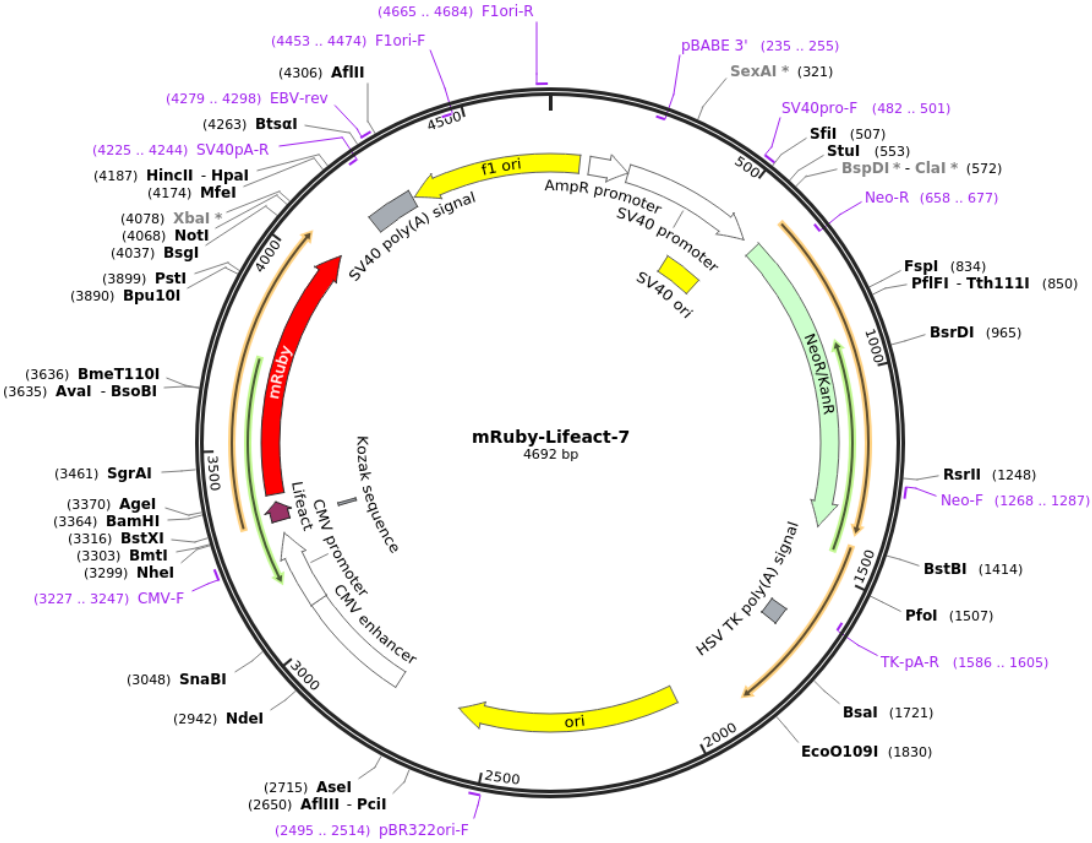


Figura 11|
Mapa del plásmido mRuby-LifeAct

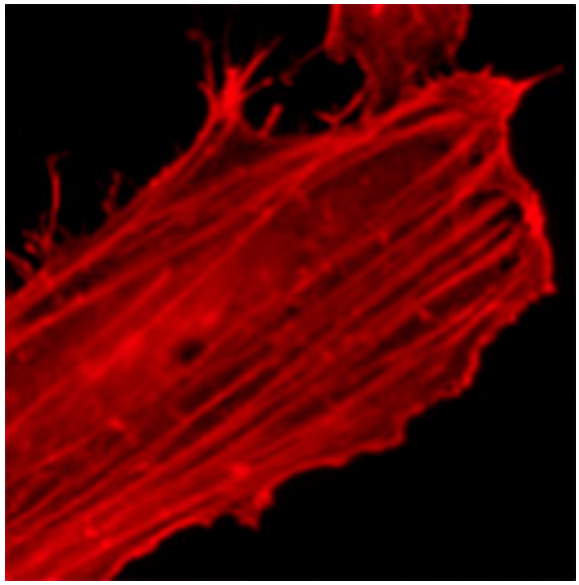


Figura 12|
mRuby-Lifeact-7 in HeLa Cells. Filamentos de Actina teñidos gracias a la transfección del plásmido.
Fuente: Addgene

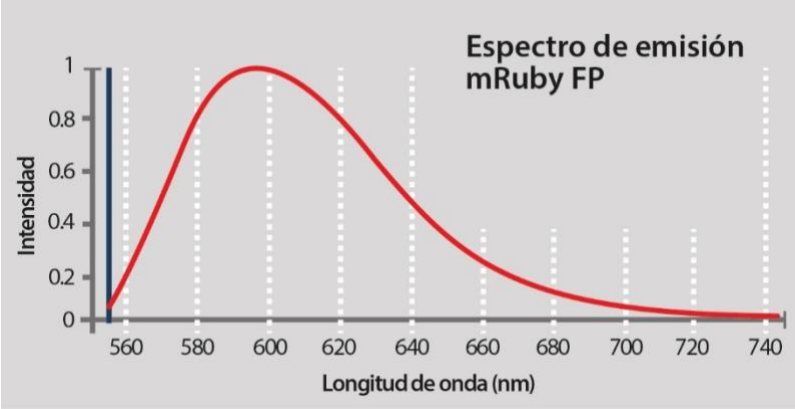


Figura 13|
Espectro de emisión, mRuby FP
Fuente: Addgene

MORFOLOGÍA DE LA ACTINA EN LA CELULA CHO-K1/A5

A las 20 horas de haber realizado el experimento de transfección, momento de máxima expresión del plásmido, se miraron los especímenes mediante microscopia de fluorescencia, a un aumento 60X ***(Figura 14)***.

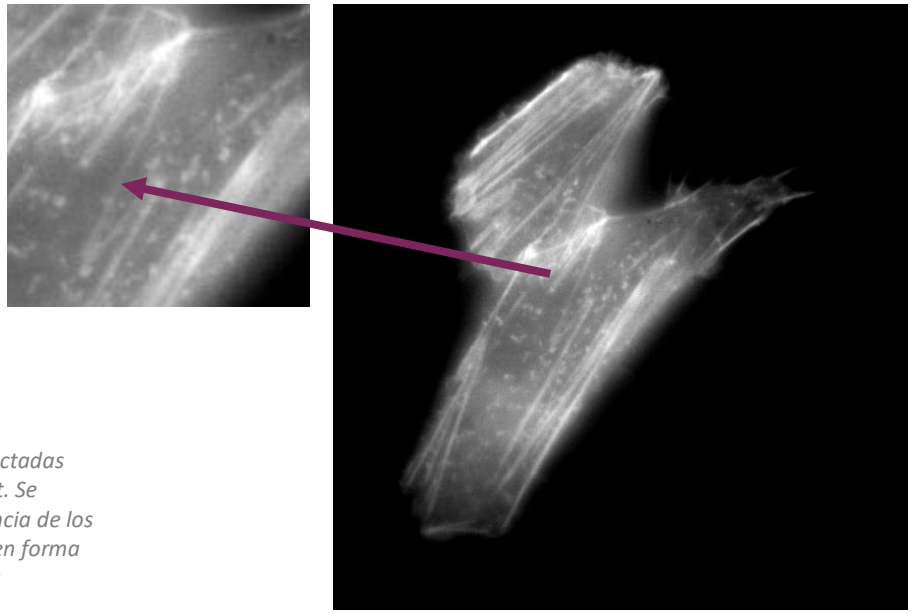


Figura 14|
Células CHO- K1/A5, transfectadas con plásmido mRuby-LifeAct. Se puede apreciar la fluorescencia de los filamentos de actina,tanto en forma de fibras como en pequeñas estructuras puntiformes. Excitación: 500/550nm

PLÁSMIDO CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA LL5β-EGFP

LL5 es una proteína con un peso molecular de 160 kDa, compuesta por dos dominios de bobina enrollada sumado a una región rica en serina con múltiples sitios de fosforilación de la proteína quinasa C y PH, un dominio de unión a fosfoinositido (inositol fosfato o simplemente inosítido, es un fosfolípido que contiene en su estructura uno o más inositoles modificados por adición de uno o más grupos fosfato). Estos, se unen selectivamente a los fosfoinositidos 3-fosforilados que se generan en el prospecto interno de la membrana plasmática por la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que activada, es capaz de regular la asociación de filamina (proteína adaptadora del citoesqueleto) con la membrana.

Se encuentra en la cara citoplásmica de la membrana postsináptica; sus niveles más altos son las regiones fronterizas de la densidad más alta del receptor de acetilcolina (nAChR). De acuerdo con esta idea, la perturbación de la expresión LL5 en los miotubos inhibe la agregación de nAChR *(Kishi et al. 2005)*.

PLÁSMIDO CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA LRP4-EGFP

La formación de la unión neuromuscular (NMJ) requiere una interacción precisa entre las motoneuronas y las fibras musculares. LRP4 es un receptor de lipoproteínas de baja densidad *(Karakatsani et al. 2017)*, tales como agrina (proteína 4). Esta, es un factor derivado del nervio que puede inducir reorganizaciones moleculares en la placa motora, que se cree (el mecanismo de acción de la agrina sigue siendo poco conocido según las investigaciones) que actúa in situ para estimular la quinasa especifica de musculo (MuSK), un receptor tirosina quinasa localizado en la placa terminal motora, aparentemente bien posicionada para recibir una señal derivada del nervio sobre las fibras musculares para la diferenciación postsináptica ***(Figura 15)*** *(Wu et al. 2012) (Glass et al. 1996)*.

Funciona como una señal retrógrada directa derivada del músculo para los primeros pasos en la diferenciación presináptica. Es necesario, independientemente de la activación de MuSK, para la diferenciación presináptica in vivo, y se une a los axones motores e induce la agrupación de vesículas sinápticas y proteínas de la zona activa.

Por lo tanto, LRP4 actúa bidireccionalmente y coordina la formación de sinapsis uniendo a la agrina, activando MuSK y estimulando la diferenciación postsináptica, y funcionando a su vez como una señal retrógrada derivada del músculo que es necesaria y suficiente para la diferenciación presináptica.

Esta doble función, en la diferenciación presináptica y postsináptica, representa un medio parsimonioso para mediar la señalización recíproca entre las células adyacentes y se asemeja a la doble función que tienen los receptores Eph (los receptores de Eph tirosina quinasas, moldean el comportamiento de muchos tipos de células al unir ligandos anclados a membrana, en los sitios de contacto célula-célula. Las señales de Eph afectan a ambas células en contacto y pueden producir diversas respuestas biológicas *(Pasquale 2005)* y los receptores ErbB en responder a sus respectivos ligandos y en estimular la señalización en las células presentadoras de ligandos. Se puede concluir que LRP4 funciona como un punto de control crítico en tres pasos durante la formación de la sinapsis.

Primero, antes de la inervación, LRP4 forma un complejo con MuSK para establecer la preparación previa del músculo; segundo, a medida que los axones motores se acercan al músculo, LRP4, agrupado como consecuencia de la activación de MuSK, actúa como una señal retrógrada para promover su diferenciación; y tercero, una vez que los axones motores

establecen contacto con el músculo, LRP4 se une a la agrina, que se libera de las terminales nerviosas motoras, estimulando la fosforilación de MuSK y estabilizando las sinapsis neuromusculares.

DATOS RELEVANTES DEL PLÁSMIDO LRP4

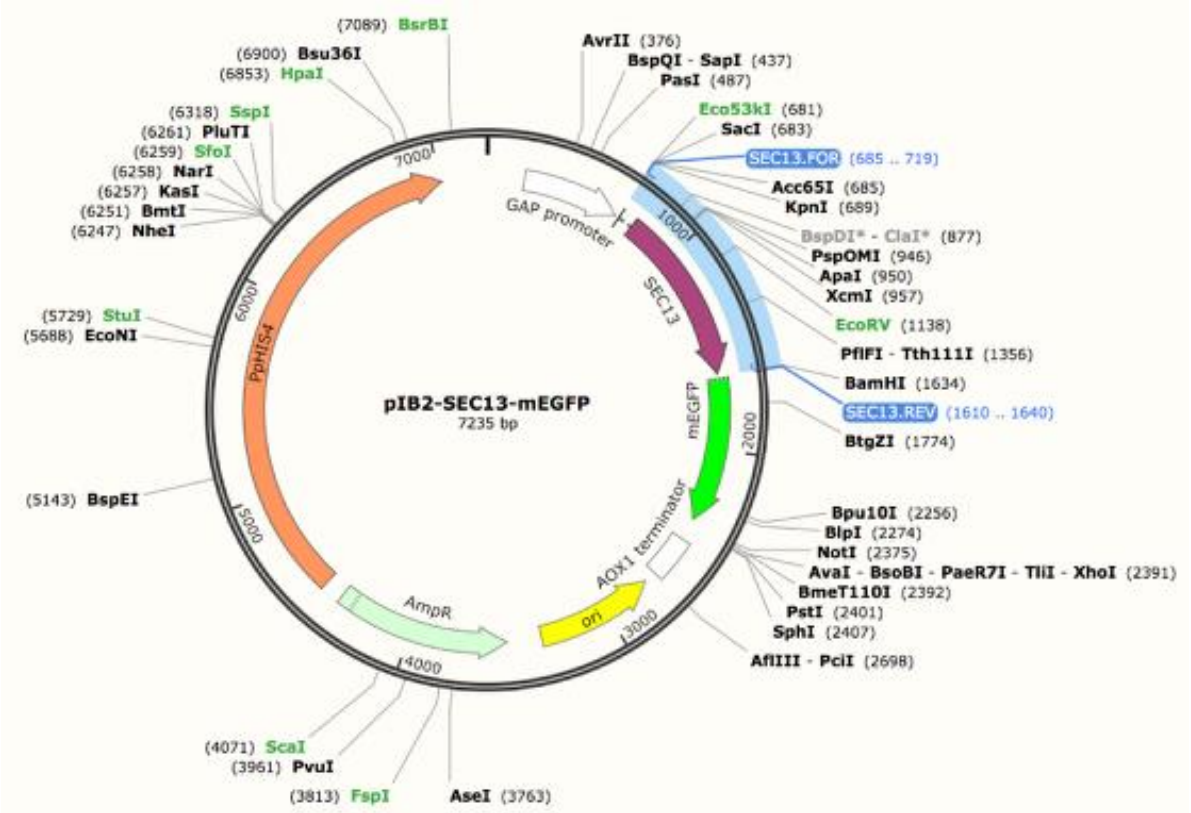


Figura 15|
Mapa del plásmido LRP4-EGFP

PLÁSMIDO CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA RAPSINA-EGFP

La proteína Rapsina asociada al receptor es una proteína periférica de andamiaje con un peso molecular de 43 kDa, miristoilada (modificación irreversible de proteínas por lipidación que consiste en la adición por enlace amida covalente de un grupo miristoilo) derivado del ácido mirístico, al grupo alfa-amino de un residuo de glicina, generalmente en el

extremo N-terminal de la proteína), que desempeña un papel central en la formación de agregados o acumulos del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) en la unión neuromuscular, es decir, se requiere para la agrupación de los nAChRs en los sitios sinápticos entre las neuronas motoras de los mamíferos y las células musculares *(Chen et al. 2016)*.

La UNM de los vertebrados garantiza una transmisión sináptica rápida y eficiente a través del agrupamiento altamente organizado de nAChRs en los sitios postsinápticos subyacentes al área presináptica de la liberación de neurotransmisores. Varios niveles de mecanismos reguladores participan en la acumulación y el mantenimiento de los nAChR en los sitios sinápticos recién formados de la unión neuromuscular, que involucran la regulación transcripcional de los genes que codifican las subunidades del nAChR, el agrupamiento y la estabilización del nAChR a través del citoesqueleto *(Apel et al. 1995) (Marchand et al. 2002)*.

Los datos y mapas de estos dos plásmidos no han sido aún publicados. Contamos con ellos en el laboratorio del Dr. Barrantes, gracias a una colaboración con otros laboratorio del extranjero.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR EL MÉTODO DE ELECTROPORACIÓN DEL PLÁSMIDO LL5β

Esta técnica consiste en la aplicación de fuertes pulsos eléctricos a células y tejidos causado algún tipo de reordenamiento estructural de la membrana celular. Algunas de estas reorganizaciones consisten en vías acuosas temporales ("poros"), con el campo eléctrico desempeñando el doble papel de causar la formación de poros y proporcionar una fuerza impulsora local para el transporte iónico y molecular a través de ellos.

La introducción de ADN en las células in vitro es ahora la aplicación más común, además se ha utilizado para introducir en las células enzimas, anticuerpos y otros reactivos bioquímicos para ensayos intracelulares; cargar células más grandes preferentemente con moléculas en presencia de muchas células más pequeñas; para introducir partículas en las células, incluidos los virus; para matar células a propósito bajo condiciones suaves; e insertar macromoléculas de membrana en la membrana celular misma.

Para introducir el ADN plasmídico deseado se realizó la electroporación de bacterias electrocompetentes. Para ello, se las coloco en una cuba de 1 mm de gap con el plásmido. Se

colocó la cuba de manera adecuada en el electroporador y se seteo el equipo de la siguiente manera:

Modo: Lv

Voltaje: 500V

Tiempo: 15 mSeg

Luego, rápidamente, se introdujo la cuba a la campana y con la ayuda de 100 µL de LB se recuperaron las bacterias. Este procedimiento, se realizó de manera muy rápida ya que las bacterias sufren daños físicos y estrés; de no ser así, los cultivos no prosperan. Todo el contenido de la cuba se trasvaso a un Eppendorf con más volumen de LB, el cual fue dejado en un Shaker durante 1 hora a 37°C.

Pasada la hora, se plaqueo en placa con LB más agar-agar con el antibiótico correspondiente a cada plásmido amplificado por este método. Las placas fueron colocadas en estufa a 37°C entre 24 y 48 horas, de acuerdo con el crecimiento bacteriano.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR EL MÉTODO DE SHOCK TÉRMICO DE LOS PLÁSMIDOS LRP4-EGFP Y RAPSINA-EGFP

Se partió de bacterias *E. coli* cepa *DH5 α* termo-competentes, descongeladas y mantenidas posteriormente a 4ºC en hielo. Luego, en condiciones de esterilidad, se templó en dos Eppendorf (uno para cada uno de los plásmidos) 1 mL de medio LB en estufa a 37ºC, para su posterior uso.

En dos tubos Eppendorf diferentes se colocaron 100 µL de las bacterias, con 10 µL de cada uno de los plásmidos (cada uno con una concentración entre 10 y 11 ng/µL). Ambos tubos fueron incubados en hielo durante 30 min.

Luego se les hizo un shock térmico, es decir, se colocaron los Eppendorf a 42ºC por 1 min. Transcurrido este tiempo, se colocó el contenido de cada Eppendorf, en los previamente preparados con LB templado. Se los dejo en un shaker a 37ºC, durante 1 hora.

Finalmente, se sembraron las bacterias en placas de agar-agar con el respectivo antibiótico para cada plásmido, LRP4-EGFP con Ampicilina y-EGFP con Kanamicina. Se las dejo en estufa a 37ºC durante un día ***(Figura 16).***

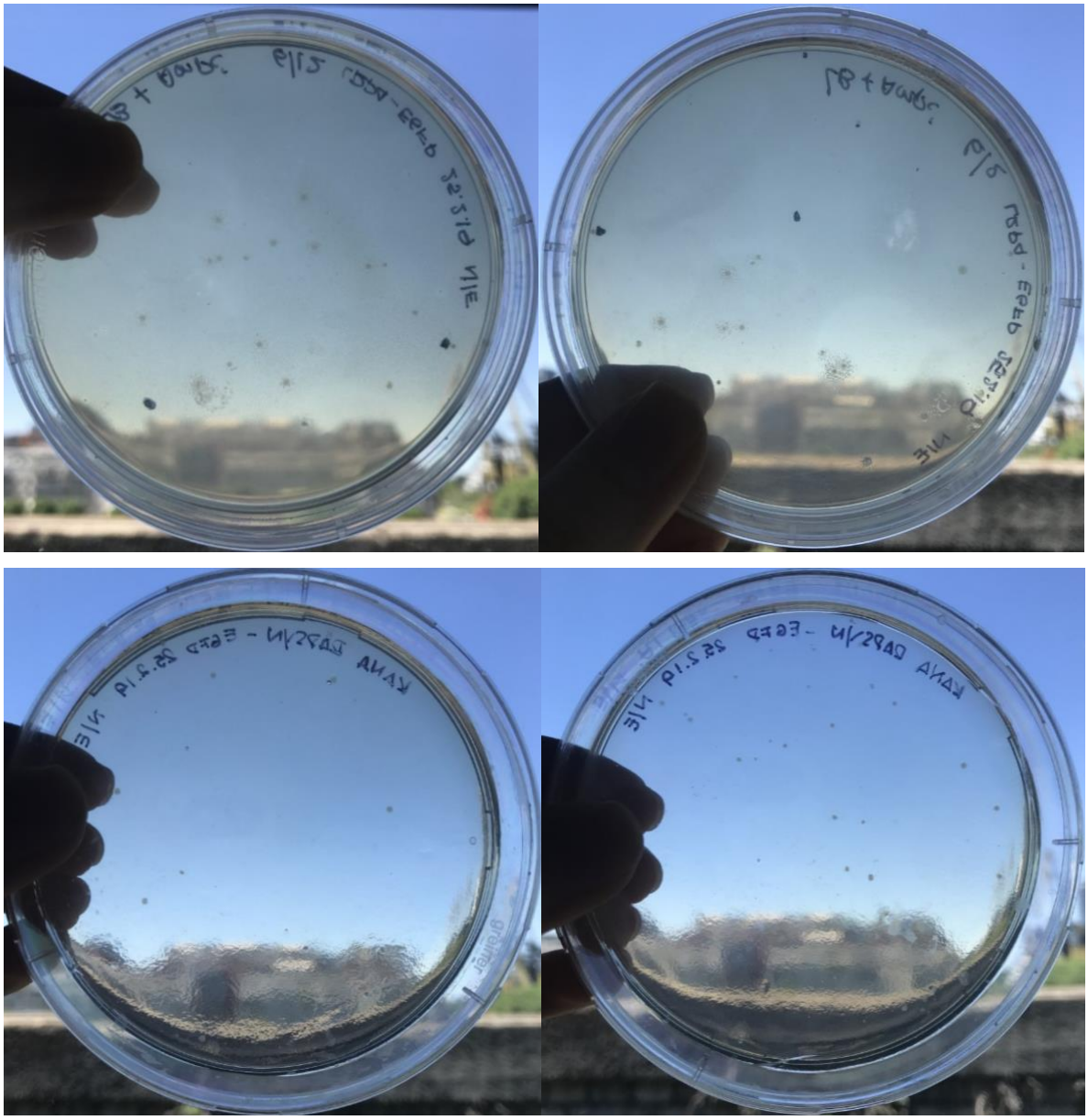


Figura 16|
Placas de Bacterias transformadas con plásmidos LPR4 (superiores) y Rapsina (inferiores).

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS LRP4, RAPSINA, LIFEACT Y LL5β

Se partió de bacterias *E. coli* previamente transformadas con el plásmido LifeAct, que permite la tinción de filamentos de actina, crecidas en una placa de LB con agar-agar y el antibiótico Kanamicina, por la resistencia que presentaba el mismo al igual que el plásmido Rapsina y de bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido LRP4 en placas con LB, agar-agar y antibiótico Ampicilina.

Las placas fueron dejadas 24 horas en estufa a 37ºC. Pasado este tiempo, se picó una colonia y se dejó crecer en LB líquido con antibiótico, en shaker a 37ºC (por no más de 18 horas). Luego se prosiguió con el protocolo de purificación. Esta técnica utiliza una solución de acondicionamiento o solución 1 (SN1; 0,09 g Glucosa, 0,0372 g EDTA 0,0302 g Tris-Base); una solución de lisis o solución 2 (SN2; NaOH 0,2 N y SDS 1% p/v) la cual debe ser preparada en el momento y usada a temperatura ambiente, y una solución de neutralización o solución 3 (SN3 (10mL); 1,15 mL ácido acético glacial, 4,9 g Acetato de K, 0,285 mL H_2O mQ).

TINCIONES

Dada la enorme cantidad de moléculas biológicas en la superficie de las células, es necesario recurrir a la marcación específica de las mismas para poder identificarlas. Las tinciones histoquímicas y las inmunocitoquímicas ofrecen la posibilidad de visualizar y localizar las moléculas de interés. Estas técnicas nos permiten marcar el receptor nicotínico de acetilcolina utilizando diferentes tipos de compuestos, entre ellos:

1| MOLÉCULAS ORGÁNICAS

Los fluoróforos Alexa Flúor *(Invitrogen)* que conjugan a la alfa-bungarotoxina (α-BTX) ***(Figura 17)***, son compuestos orgánicos, derivados de rodamina y de veneno de algunas especies de serpientes, respectivamente, y son utilizados como marcadores de biomoléculas. Estos fluoróforos pueden ser usados, además, para conjugar anticuerpos para aumentar la señal de emisión ***(Figura 18)***.

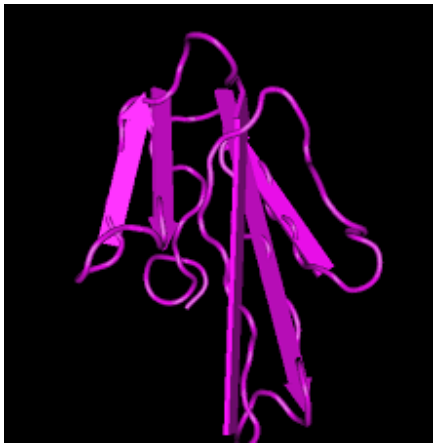


Figura 17|
Estructura de la molécula Alfa-Bungarotoxina resuelta con RMN. Fuente: https://www.rcsb.org/3d-view/1IDI/0

Alexa Fluor® tintes	Absorción máx.	Emisión máx. (nm)	Emisión de Color*	Coeficiente de extinción**
Alexia Fluor® 350	346	442	Azul	19,000
Alexia Fluor® 405	401	421	Azul	34,000
Alexia Fluor® 430	433	541	Verde | Amarillo	16,000
Alexia Fluor® 455	496	519	Verde	71,000
Alexia Fluor® 532	532	553	Amarillo	81,000
Alexia Fluor® 546	556	573	Naranja	104,000
Alexia Fluor® 555	555	565	Naranja	150,000
Alexia Fluor® 568	578	603	Naranja | Rojo	91,000
Alexia Fluor® 594	590	617	Rojo	73,000
Alexia Fluor® 610	612	628	Rojo	138,000
Alexia Fluor® 633	632	647	Infrarroja	239,000
Alexia Fluor® 635	633	647	Infrarroja	140,000

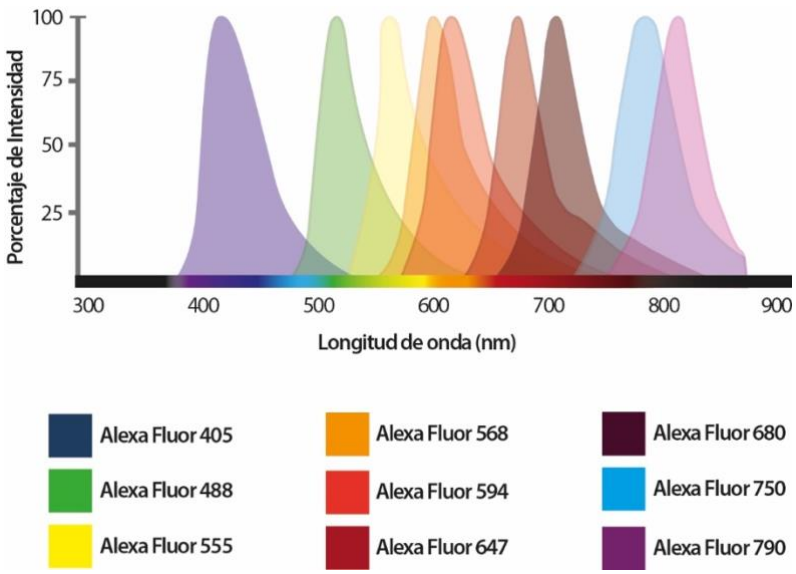


Figura 18|
Espectro de emisión de los compuestos orgánicos Alexa Fluor.

2| PUNTOS CUÁNTICOS (QDOT'S)

Son nanocristales (2-50 nm) semiconductores que, al ser iluminados, re-emiten luz en una longitud de onda muy específica y que depende del tamaño de este. Cuanto más pequeños sean los puntos, menor es la longitud de onda y más acotadas las propiedades cuánticas de la luz que emiten. Por ello la luz emitida vira del azul al rojo a medida que el tamaño del punto se incrementa ***(Figura 19)***.

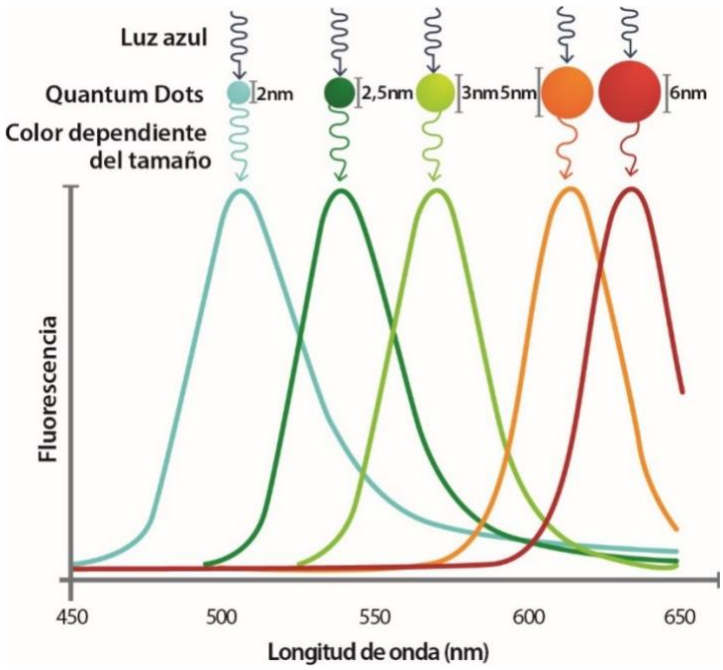
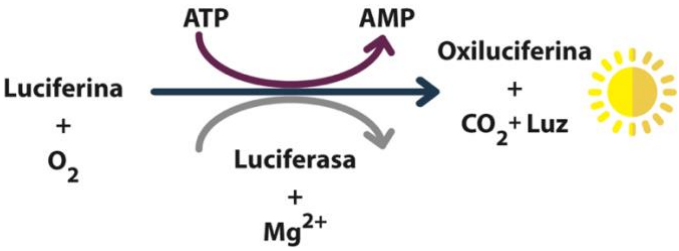


Figura 19|
Reacción Qdots tamaño/fluorescencia

3| PROTEICOS

La principal proteína utilizada para marcar mediante fluorescencia es la proteína Luciferasa de *photinus pyralis*, que fue purificada, cristalizada y parcialmente caracterizada por Green and McElroy en 1956 ***(Figura 20)***.

Figura 20|
Reacción de la D-luciferina. La energía que genera una reacción química se manifiesta como luz. La enzima Luciferasa cataliza la oxidación de un sustrato de proteína luciferina que emite luz. La reacción se denomina quimioluminiscencia: una reacción de emisión de luz que no produce calor, lo que hace que sea eficiente en términos de energía. La bioluminiscencia tiene distintas funciones en los ambientes naturales, entre ellas la defensa, la comunicación, la reproducción y la atracción de presas. Una amplia variedad de organismos emiten luz, incluyendo bacterias, hongos, insectos, crustáceos, moluscos y peces.



Posteriormente, se descubrió la proteína verde fluorescente por el doctor Osamu Shimomura en 1968 se produjo cuando estudiaba la capacidad de emitir luz verde de la medusa *Aequorea victoria*. Tiene una estructura formada por 238 aminoácidos organizados de la siguiente manera, una estructura en el denominado barril beta, formado por 11 cadenas, e incluye una hélice alfa central que atraviesa el barril en toda su longitud. En esta hélice hay tres aminoácidos consecutivos que forman un cromóforo natural, de forma que cuando la GFP es iluminada con luz ultravioleta, produce una brillante fluorescencia verde *(Osamu 2006)*.

La GFP ***(Figura 21)*** puede ser sintetizada en sistemas heterólogos sin generar toxicidad. Se ha descubierto que la proteína parcialmente purificada proveniente de estos sistemas emite y absorbe a diferente longitud de onda que la proteína nativa, purificada. Las propiedades espectrales de la proteína recombinante sugieren que el cromóforo puede formarse en ausencia de otro producto de A.Victoria *(Chalfie et al. 1994)*.

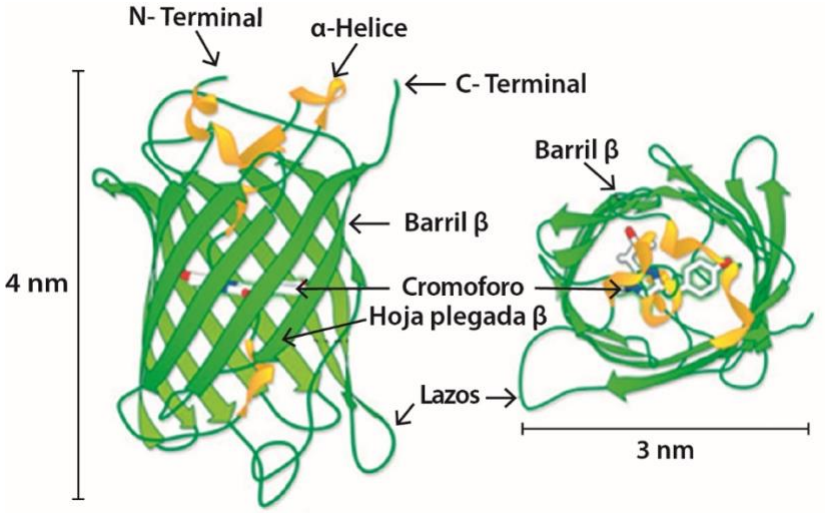


Figura 21|
Estructura de la proteína GFP. La proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein) es una proteína producida por la medusa Aequorea victoria que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. El gen que codifica esta proteína ha sido clonado y se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador.

En este trabajo las técnicas de tinción empleadas fueron las moléculas orgánicas como Alexa Flúor α-BTX 488, 555 y 633 (la numeración indica la longitud de onda de excitación del fluoróforo).

Además, se utilizaron plásmidos con expresión de genes de proteínas fluorescentes, entre ellas la proteína fluorescente verde expresada por los plásmidos LL5β, Rapsina-EGFP y LRP4-EGFP y la mRuby de color rojo.

MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Esta metodología consta de un proceso de interacción entre la radiación y la materia en el cual un material absorbe radiación de una fuente específica y muy rápidamente emite luz cuya energía es menor (de mayor longitud de onda) que la de la radiación que ha absorbido. Esto es conocido como cambio de Stokes, que representa la diferencia entre las longitudes de onda excitantes y emitidas.

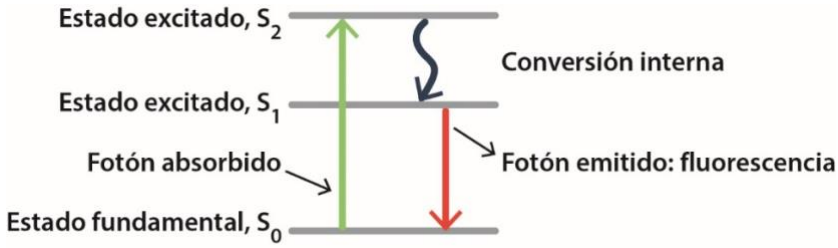
Permite filtrar en casi su totalidad la luz de excitación y concomitantemente permitir la emisión de luz visible (la fluorescencia) emitida a una mayor longitud de onda que la de excitación (es decir, a menor energía), y de este modo poder identificar los objetos que son fluorescentes.

La fluorescencia requiere moléculas con características fluorescentes. Las longitudes de onda de absorción y emisión, y la eficiencia del mismo, están determinadas por el orbital

de electrones más externo del mismo. El mecanismo de la fluorescencia parte de la excitación de la molécula fluorescente, por medio de la *absorción* de energía lumínica, sacando a la molécula de su estado fundamental. Esto genera alteraciones en los estados eléctrico, vibracional y rotacional de la molécula.

La absorción lleva a la molécula fluorescente a su estado excitado. Para volver a su estado basal, la molécula sufre una relajación vibracional y la emisión de fluorescencia ***(Figura 22)*** *(Lichtman and Conchello 2005)*.

Figura 22|
Estados energéticos de los electrones. Los electrones que forman parte del átomo están distribuidos en "capas" o niveles energéticos. En función de la capa que ocupe un electrón tiene una u otra energía de ahí que se diga que ocupa una capa de cierto nivel energético.



MICROSCOPIO OPTICO

Para los estudios desarrollados en esta Tesis empleé un microscopio invertido Nikon modelo Eclipse TE-300 ***(Figura 23)***. Proporciona distancias de trabajo más largas que se adaptan a una amplia variedad de recipientes de cultivo y especímenes gruesos, mientras se mantienen altas aperturas numéricas para garantizar niveles adecuados de brillo, contraste de imágenes, resolución y nitidez.

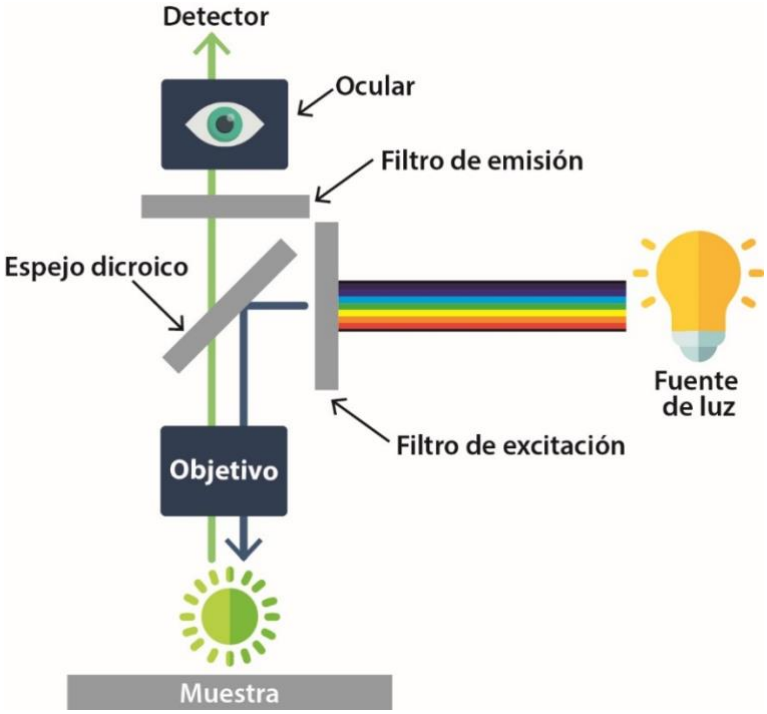


Figura 23 |
Ilustración del funcionamiento de un microscopio de fluorescencia.
los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda.

Los oculares del instrumento proporcionan un campo de visión estándar de 22 milímetros. El microscopio Nikon TE-300 ***(Figura 24)*** consiste en un conjunto de lentes de alta corrección de las aberraciones cromáticas y de esfericidad. Esencialmente, el microscopio óptico compuesto posee una lente condensador (0.46 apertura numérica), varias lentes objetivo y dos oculares en el caso del microscopio binocular como el que he empleado. El diseño multipuerto del TE-300 se adapta a una variedad de dispositivos y su sistema de distribución de luz de cuatro vías garantiza una asignación adecuada de la luz.

Figura 24|
Microscopio invertido Nikon Eclipse TE300.

TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN CÉLULAS CHO-K1/A5

Se transfectaron células CHO-K1/A5, fibroblastos de ovario de Hámster Chino, las cuales, por haber sido modificadas y creadas especialmente, no expresan las proteínas que están codificadas en los genes de los plásmidos a transfectar.

Se utilizó Lipofectamina 2000 *(Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent)* y plásmidos purificados según el protocolo descriptos. La concentración de ADN plasmídico fue de 1 µg/µL con 2 µL de Lipofectamina 2000 para un volumen final de 250 µL por cada pocillo.

Cuando se extrae el medio de los pocillos, se debe guardar y reservar para el posterior uso. Las células sufren estrés durante el procedimiento y esto permite, cuando se cambia el medio luego de las dos horas de incubación, no perder las proteínas de adhesión y los factores de transcripción previamente sintetizados por las células, reduciendo así, lo más posible daño que podría generar el procedimiento. De la misma manera se transfectaron los 4 plásmidos previamente descriptos.

Para ellos, se partió de la amplificación de los plásmidos extraídos de papel. Las bacterias *E. coli DH5α,* provenientes del stock del Laboratorio, fueron transformadas mediante el método de shock térmico para que incorporen los plásmidos LRP4-EGFP y Rapsina-EGFP; y electroporación para que incorporen el plásmido LL5β-EGFP y así poder expresar las proteínas estudiadas y la resistencia a los antibióticos.

Una vez obtenidas las colonias crecidas en sus respectivas placas diferenciadas por los distintos plásmidos, se prosiguió a picar una de ellas (por cada placa), para generar un cultivo bacteriano en suspensión.

Pasadas entre 16 y 20 horas, los cultivos fueron retirados de la estufa con agitación, para seguir con la purificación de los 3 plásmidos.

Las soluciones del protocolo de purificación de ADN plasmídico fueron preparadas nuevamente cada vez que se realizaba el procedimiento ya que el mecanismo utilizado era de forma casera y no mediante un kit comercial, favoreciendo así, la eficiencia de la extracción.

La concentración de ADN plasmídico purificado fue medida mediante un Nanodrop, el cual nos permitió analizar la calidad de lo extraído, controlar los ratios, la presencia de contaminantes, entre otros ***(Figura 25)***.

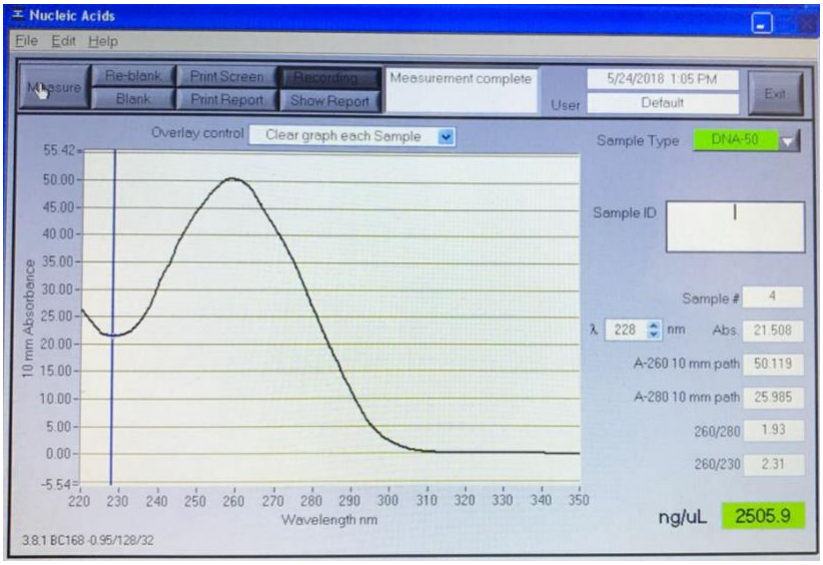


Figura 25|
Interfaz del programa informático del Nanodrop, Permite el análisis de la purificación, en este caso de ADN Plasmídico.

Una vez calculada la concentración y realizada la dilución adecuada para los posteriores ensayos, se siguió con la transfección de las células CHO K1-A5. Línea celular, creada por el Dr. Barrantes Francisco, las cuales, sobre-expresan el receptor Nicotínico de

Acetilcolina (nAChR) y carecen de la información genética necesaria para sintetizar las proteínas de andamiaje.

Se comenzó por la siembra de aproximadamente entre 15000 y 25000 células por cada multiwell de 12 pocillos sobre vidrios de 18 mm de alta calidad, con 1 mL de medio HAM´s F12 más suero fetal bovino, fuente de nutrientes y factores de adhesión y transcripción para las células. Una vez realizada la siembra, el multiwell fue mantenido en estufa a 37 ºC, 5% CO_2 (regulador de pH), permitiendo así, el crecimiento y desarrollo de las células.

Pasados los dos días y alcanzado el 90% de confluencia (valor elevado y necesario para aumentar las probabilidades de células transfectadas y para tener un alto número de células restantes sin sufrir post transfección), se retiraron de la estufa y bajo flujo laminar se continuo con la transfección ***(Figura 26)***.

Para ello, en dos Eppendorf diferentes, ambos rotulados, se colocó una cantidad de HAM´s F12 sin suero fetal bovino, los volúmenes dependen de la cantidad de pocillos utilizados y la disponibilidad de los materiales para la transfección, en este caso se calculó para un volumen final de 250 mL por well, a uno se le agrego 1 µg/mL del plásmido de interés (también calculado por pocillo) y al otro, 2 µL de Lipofectamina 2000 y se los dejo reposar 1 minuto. Pasado el tiempo se trasvaso el contenido del tubo con ADN al Eppendorf que contenía la Lipofectamina, en forma de goteo constante.

La Lipofectamina contiene subunidades lipídicas que pueden formar liposomas en un ambiente acuoso, que atrapa la carga útil de transfección, en este caso el ADN plasmídico que codifican para las proteínas de interés.

Esta etapa del protocolo consiste en la formulación catiónica de liposomas , siendo estos complejos con moléculas de ácido nucleico cargadas negativamente permitiéndoles superar la repulsión electrostática de la membrana celular. Las moléculas de lípidos catiónicos de Lipofectamina están formuladas con un co-lípido neutro (lípido auxiliar). Los liposomas que contienen ADN (cargados positivamente en su superficie) pueden fusionarse con la membrana plasmática cargada negativamente de las células vivas, debido a la fusión neutral de los liposomas que media los lípidos con la membrana celular, permitiendo que las moléculas de carga de ácido nucleico cruzar al citoplasma para replicación u expresión.

Para generar los liposomas, una vez mezclado el contenido de cada Eppendorf, se dejó reposar por 2 minutos, luego se le genero un leve movimiento golpeando suavemente el tubo

por 1 minuto y nuevamente, se lo dejo reposar por otros 2 minutos. Estos pasos se repitieron 3 veces en total cada uno.

Una vez finalizados los procedimientos anteriores, se prosiguió a retirar el medio de cultivo celular del multiwell. Este, se lo reservo en un falcon para su posterior uso y se lo reemplazo por la mezcla realizada que contiene el ADN plasmídico y la Lipofectamina. El multiwell se lo llevo a la estufa para su incubación por 2 horas.

Pasado este periodo de tiempo, se retiró la mezcla de las células y se les colocó el medio de cultivo separado anteriormente, sumado a medio de cultivo nuevo. Se realiza de esta manera para recuperar las células del estado de estrés que les genera la transfección.

Utilizar el medio "viejo" les aporta todos los factores de transcripción, proteínas de adhesión y de uniones intercelulares que ellas mismas, en su momento, habían sintetizado; disminuyendo así, la necesidad de volver a sintetizarlos si se le hubiera agregado únicamente, medio nuevo. Este último, les provee a las células, nutrientes frescos no agotados.

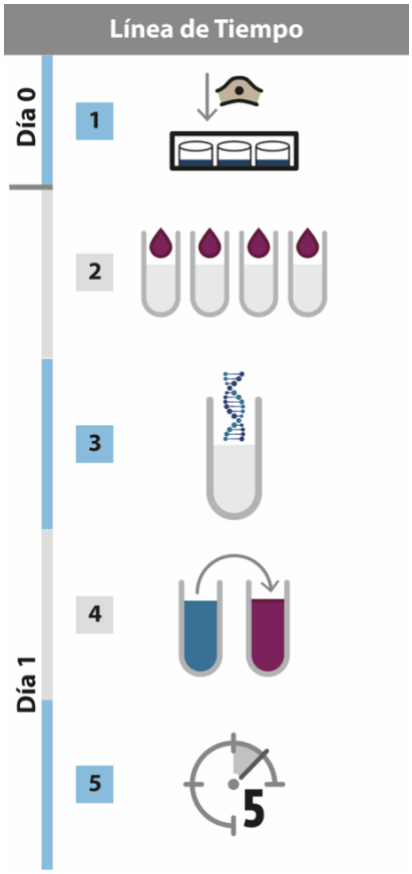


Figura 26|
Descripción gráfica del protocolo de transfección con Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent.

Se las dejo incubar entre 18 y 20 horas. Pasado este tiempo, se las retiro de la estufa para continuar con la visualización de los resultados de la transfección. Se les extrajo el medio de cultivo y se las lavo con M1, 3 veces para sacar cualquier remanente de medio y su colorante que pueden interferir a la hora de interpretar los resultados en el microscopio ya que pueden generar auto-fluorescencia y distorsionar la fluorescencia propia de la transfección.

Se retiraron los vidrios y fueron colocados sobre la cámara portaobjetos para poder ver *in vivo* los resultados. De esta manera, se visualizaron las células y se obtuvieron las imágenes que aparecen anteriormente en el presente escrito.

Comenzando con el análisis de las micrografías a simple vista, las células no sufrieron un alto grado de modificación morfológica que pueda llevar al mal funcionamiento o muerte prematura de las mismas. Si comparamos ambos experimentos, la transfección es un ensayo mucho más invasivo que una tinción, ya que ingresa ADN plasmídico ajeno por completo al material genético propio de cada célula, mediante los liposomas capaces de penetrar la membrana plasmática reduciendo al mínimo el rechazo de cargas.

En cambio, la tinción, no se realiza con ningún componente toxico como puede ser la Lipofectamina, si las células son expuestas mucho tiempo. Los dos buffers utilizados tanto para los lavados como para el procedimiento en sí, a la hora de la preparación de la dilución, son inofensivos para las celas. Tanto el M1, como el PBS son un conjunto de sales que permiten la regulación del pH y la estabilidad celular.

ANÁLISIS DE IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ÓPTICA

IMAGEJ SOFTWARE

ImageJ es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health. Fue diseñado con una arquitectura abierta que proporciona extensibilidad vía plugins Java y macros (macroinstrucciones) grabables. Se pueden desarrollar plugins de escaneo personalizado, análisis y procesamiento usando el editor incluido en ImageJ y un compilador Java. Estos, hacen posible resolver muchos problemas de procesado y análisis de imágenes.

Se destaca por su capacidad en el análisis de co-localización. Dado que ninguna técnica de cuantificación de co-localización es apropiada para todas las circunstancias, el gran

conjunto de plugins de ImageJ ofrece opciones para esta funcionalidad adicional. Dado que los usuarios no están restringidos a un enfoque específico, se puede elegir la técnica de co-localización más apropiada de la caja de herramientas. Entre otros, los complementos están disponibles para realizar superposiciones cualitativas y convertirlos de Rojo-Verde-Azul (RGB) a Magenta-Verde-Azul compatible con daltonismo, generar coeficientes de Pearson, generar coeficientes de Mander y realizar varias operaciones aleatorias.

La naturaleza de código abierto de ImageJ también permite el desarrollo de nuevas rutinas de co-localización. Para este trabajo se lo utilizo para el análisis de las imágenes obtenidas con el microscopio TE-300. Estas, se encontraban en escala de grises, por ende, se prosiguió a abrirlas con dicho Software para editarlas. Se les aplico el pseudo color correspondiente a la fluorescencia que las células adquirieron en cada uno de los procedimientos, ya sea: verde ***(Figura 27)*** para las imágenes las cuales se observaba la transfección con actina o proteínas de andamiaje, y rojo ***(Figura 28)*** para aquellas que muestran la tinción del nAChR con BTX-555. Este procedimiento se realizó para todas las imágenes presentes en este escrito, para poder apreciar en los colores reales cada imagen.

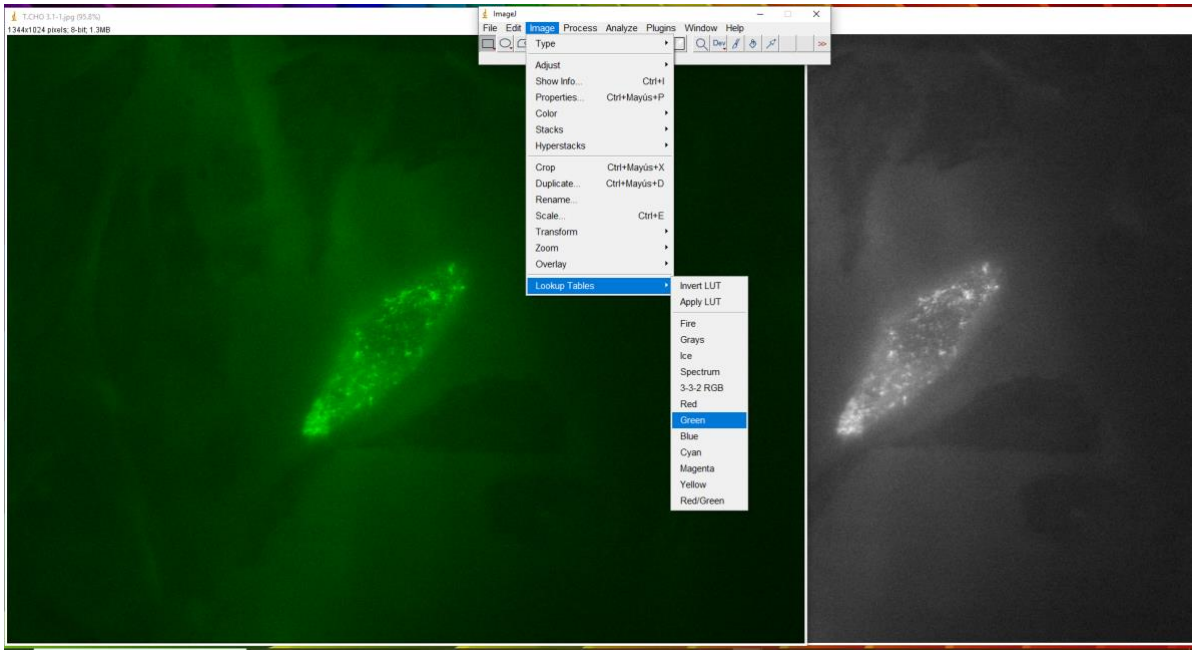


Figura 27|
Interfaz del Software informático ImageJ. Mediante la ruta seleccionada, se pueden modificar los colores de la imagen según corresponda. El rojo, en este caso, representa la tinción con BTX-555.

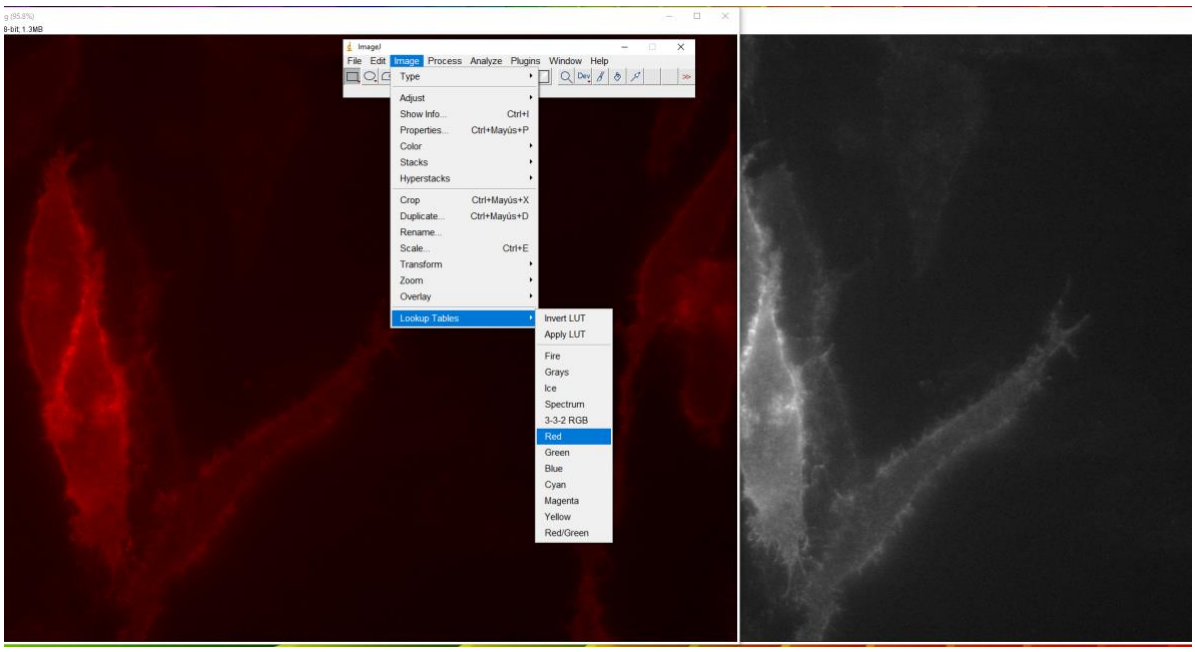


Figura 28|
Interfaz del Software informático ImageJ. Mediante la ruta seleccionada, se pueden modificar los colores de la imagen según corresponda, en este caso verde, representando a la proteína fluorescente LL5β-EGFP.

TRANSFECCIÓN LL5β + BTX-555

Para el análisis de las imágenes y el estudio del receptor, se realizó la transfección de las células CHO-K1/A5 con el plásmido LL5β-EGFP. Posteriormente, se tiñeron los preparados con BTX-555. Para ello, se retiró el multiwell con las células transfectadas, de la estufa pasadas las 20 horas del cambio de medio.

Se preparó una dilución 1/250, de BTX-555 en PBS. Una vez retirado el medio y lavadas las células con M1 (3 veces), fueron colocadas en hielo para disminuir las funciones y actividad metabólicas de las mismas; y así, evitar la internalización de la BTX.

Luego, de unos minutos, se colocó el volumen necesario de la dilución para cubrir los vidrios sembrados. Se los dejó en oscuridad y en frío durante 45 minutos. Pasado el tiempo de tinción, los vidrios fueron lavados con M1, para eliminar cualquier residuo que influya en el background o excedente de BTX que haya sido adherida de manera inespecífica.

MERGE DE IMÁGENES

La técnica de Merge Sort, es el algoritmo de ordenamiento por mezcla, un algoritmo de ordenamiento externo estable basado en la técnica "divide y vencerás". Es de Complejidad O (n log n). Fue inventado por John von Neumann en el año 1945 *(Eckhardt 1987; Neumann and Neumann 1957; Von Neumann 1988)*.

En este caso, consta de la superposición de la misma imagen expuesta a dos longitudes de onda diferentes, para la visualización conjunta de ambos colores dando como resultado la aparición de un tercer color, Amarillo/Naranja.

Las dos imágenes de entrada tienen colores diferentes para poder llevar a cabo y que sea visible el Merge, por ello, la longitud de onda de excitación de la transfección con el plásmido LL5β-EGFP es azul y su emisión en color verde, y la longitud de onda para la excitación de la tinción con BTX-555 en verde y su respectiva emisión en color rojo.

PROTOCOLOS

PROTOCOLO DE REPIQUE DE CÉLULAS

1| Retirar el medio de la botella.

2| Lavar 2 veces la botella con 3 mL de PBS 1X.

3| Agregar 3 mL de PBS 1X y 300 µL de Tripsina.

4| Colocar la placa en estufa a 37ºC durante 2 minutos.

5| Una vez transcurrido el tiempo observar en microscopio que las células se hayan despegado.

6| Retirar con una pipeta Pasteur el contenido de la botella y colocarlo en un Falcon con 5mL de medio HAM'S F12.

7| Centrifugar durante 5 minutos a 1000 RPM, temperatura ambiente.

8| Retirar el sobrenadante.

9| Resuspender con 5 mL de medio HAM'S F12.

10| Repetir pasos 8 y 10.

11| Tomar 10 µL y cuantificar en cámara de Neubauer.

12| Sembrar en vidrios la cantidad de células requeridas.

Protocolo de transfección de células CHO-K1/A5 Lipofectamina 2000 (Volúmenes para 2 vidrios)

1| Tener preparados vidrios con células con una densidad del 90%.

2| Rotular dos Eppendorf (A y B). En el tubo A, colocar 250 µL de medio Ham's F12 sin suero y 1 µg/mL del plásmido de interés.

3| En el tubo B, colocar 250 µL de medio Ham's F12 sin suero y 4 µL de Lipofectamina.

4| Dejar reposar ambos tubos por 5 minutos.

5| Colocar por goteo el contenido del tubo A en el B, lentamente.

6| Incubar por 6 minutos y cada dos golpear levemente el fondo del Eppendorf B.

7| Sacar el medio de los wells que contienen las células y pasarlo a un Falcon. Agregarle la misma cantidad de medio Ham's F12 con 10% de SFB y reservarlo.

8| Colocar el contenido del tubo B (A+B) en cada well.

9| Dejar en estufa a 37º, 2,5 horas.

10| Pasado el tiempo, retirar el medio de transfección y colocarle el medio preparado en el ítem 8.

11| Ver resultado entre 18 y 20 horas posteriores al experimento.

Protocolo de montado

1| Rotular los cubreobjetos.

2| Colocar una gota en el centro del cubreobjetos de Fluroshield.

3| Lavar el vidrio con M1 y sacarlo del multiwell.

4| Colocar el vidrio, del lado de las células, sobre la gota del punto 2.

5| Sellar con esmalte el contorno.

6| Dejar secar.

PROTOCOLO DE TINCIÓN CON BTX

1| A partir de vidrios de 18 mm de alta calidad sembrados con 20000 células, retirar el medio de siembra.

2| Lavar 3 veces con medio M1, por goteo.

3| Agregarle la Bungarotoxina (1/250 en PBS) cubriendo parejo todo el vidrio.

4| Dejar por 45 minutos a oscuras en frío.

5| Retirar y descartar la BTX.

6| Lavar 3 veces con M1.

7| Controlar al microscopio que haya fluorescencia.

8| Colocarle 500 µL de PFA 4% Sacarosa durante 10 minutos. A temperatura ambiente.

9| Dejar en heladera hasta ser visto o montar en portaobjetos.

PREPARACIÓN CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

1| Crecer un cultivo over night de células *E.coli* en medio LB hasta una densidad óptica de 600 nm (0.8).

2| Retirar el medio centrifugando a 5000 RPM 4°C por 10 minutos.

3| Lavar resuspendieron en 500 mL de glicerol 10 % enfriado en hielo y centrifugar nuevamente a 5000 RPM 4°C por 15 minutos.

4| Volver a lavar realizando el mismo protocolo que en el punto 3.

5| Resuspender en glicerol 10% (volumen total 2 mL).

6| Guardar a -80 °C hasta el momento de la electroporación.

PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR ELECTROPORACIÓN

1| Poner a templar a 37ºC (en estufa), 1 mL de medio LB en un Eppendorf.

2| Descongelar las bacterias en hielo.

3| Tomar 50 µL del criovial de bacterias y colocarlas en un Eppendorf rotulado.

4| Al Eppendorf con las bacterias, incorporar 1 µL de plásmido (1 µg/µL). Homogeneizar con pipeta de manera suave. Volumen final 51 µL.

5| Retirar el LB de la estufa.

6| Poner en una cuba de 1 mm de gap, los 51 µL y tener preparado 100 µL de LB cargado en una pipeta.

7| Electroporar. Modo: Lv, Voltaje: 500V, Tiempo: 15 mseg.

8| Rápidamente introducir la cuba a la campana e incorporar los 100 µL de LB para recuperar las bacterias.

9| Sacar todo el contenido de la cuba y colocarlo en el Eppendorf con LB.

10| Dejar en shaker a 37ºC, por una hora.

11| Plaquear en placa con antibiótico correspondiente.

PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR SHOCK TÉRMICO

1| En un tubo Eppendorf estéril, colocar 100 µL de bacterias *E.coli DH5α* con 5 µL de DNA (0,1-1 µg DNA plasmídico).

2| Incubar en hielo durante 30 minutos.

3| Realizar el shock térmico a 42ºC por 1 minuto.

4| Poner en hielo durante 2 minutos.

5| Agregar a las bacterias, 1 mL de LB templado y dejar en shaker a 37ºC por 1 hora.

6| Plaquear.

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

1| Realizar un overnight de las bacterias ya transformadas con el plásmido de interés (no más de 18 horas), en 5 mL de LB y el antibiótico adecuado (1X).

2| Centrifugar 2 minutos, 4000 RPM.

3| Descartar sobrenadante.

4| Resuspender con 100 µL de SN 1, paso todo el volumen a un Eppendorf.

5| Agregar 200 µL de SN 2.

6| Incubar no más de 5 minutos a temperatura ambiente.

7| Agregar 150 µL de SN 3.

8| Mezclar por inversión 5 o 6 veces.

9| Incubar en hielo entre 10 y 15 minutos.

10| Centrifugar 15 minutos, a 4ºC, 10000 RPM.

11| Tomar el sobrenadante, traspasarlo a un Eppendorf nuevo.

12| Agregar 1mL de etanol 100%.

13| Incubar 6 minutos a -20ºC.

14| Centrifugar 30 minutos, a 4ºC, 10000 RPM.

15| Descartar sobrenadante.

16| Agregar al pellet 1 mL de etanol 70% sobre las paredes del Eppendorf.

17| Centrifugar 5 minutos, 10000 RPM.

18| Descartar sobrenadante. Dejar secar el pellet entre 5 y 10 minutos al aire.

19| Resuspender en agua bidestilada.

20| Cuantificar.

COMPOSICIÓN DE MEDIO DE CULTIVOS Y SOLUCIONES

MEDIO HAM'S F12 (1L)

- 1,176g de NaHCO3
- 1 sobre de F12 Nutrient Mixture
- 10% SFB
- Antibacterial - Antimicótico y G418
- Agua MilliQ hasta llevar a volumen final 1L

LB PARA CRECIMIENTO DE BACTERIAS (1L)

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 10 g NaCl
- Agua bidestilada hasta completar volumen final de 1 litro.

PBS 10X (1L)

- 80 gr NaCL
- 2,01 gr KCL
- 12,48 gr Na_2HPO_4
- 2,72 gr KH_2PO_4

SN1 (10 mL)

- 0,09 g Glucosa
- 0,0372 g EDTA
- 0,0302 g Tris-Base

SN 2 (10 mL): Preparar en el momento de uso

- 0,08 g NaOH
- 0,1 g SDS

SN3 (10mL)

- 1,15 mL Ácido Acético Glacial
- 4,9 g Acetato de K
- 0,285 mL H_2O MilliQ

PFA 4% Sacarosa (50 mL)

- 45 mL PBS, luego llevar a volumen final.
- 2 g Paraformaldehido
- NaOH/HCL regulación de pH 6,9/7
- 4% Sacarosa

M1 (100mL)

- NaCl 150 mM 0,8766 g
- KCl 5 mM 0,0373 g

- $MgCl_2$ 1 mM 0,0203 g
- CaCl 1 mM 0,0147 g
- Hepes 1M 2 mL
- H_2O mQ ≅ 98 mL

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS

Las células CHO son células derivadas de ovario de hámster chino, cuyo uso está ampliamente extendido en el campo de la biotecnologia como cultivos celulares para la expresión y producción de proteínas recombinantes.

Las CHO-K1/A5 ***(Figura 29)***, es la línea celular utilizada para todos los experimentos realizados, crecidas en matraces de cultivo de forma adherente. Los cultivos en monocapa representan una de las formas de crecimiento *in vitro* de las células provenientes de cultivos primarios o de líneas celulares dependientes de anclaje. En general, las células que se desarrollan de esta manera son estables genéticamente y tienen una naturaleza diploide normal. La monocapa celular crece (confluencia) cubriendo la superficie de soporte hasta que se establece contacto entre las células, lo que causa que éstas detengan su crecimiento (quiescencia). Existen algunas líneas celulares que tienen la capacidad de crecer tanto en monocapa como en suspensión (el caso de las CHO y células de insecto, BHK21, hibridomas), sin embargo son muy pocas las que tienen esta dualidad *(Montalván et al. 2009)*.

Son fibroblastos que no expresan ningún tipo de proteína relacionada con la sinapsis neuromuscular, ya que no son portadoras de los genes codificantes para dichas proteinas.

Tienen como características principales, que las hacen muy adecuadas para estudios microscópicos, ser relativamente planas y ahusadas, con finas prolongaciones y núcleo oval. Poseen escaso citoplasma.

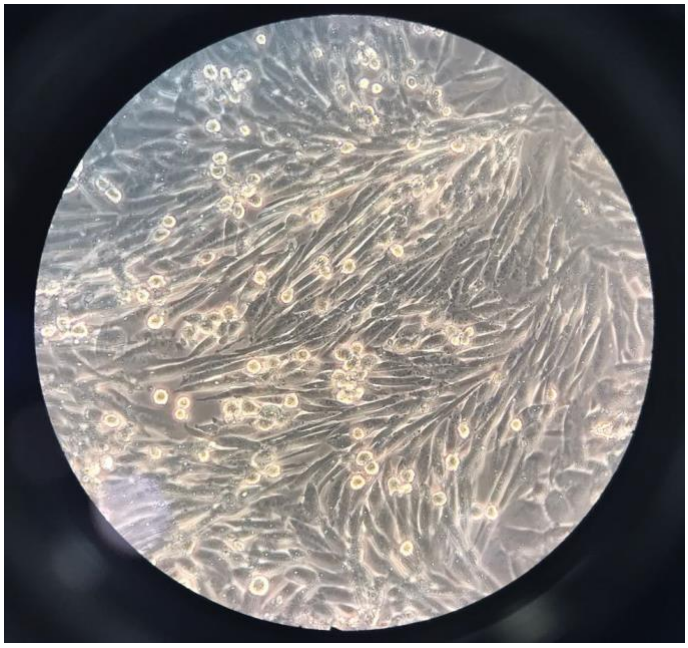


Figura 29|
Células CHO-K1/A5, en cultivo, condiciones control (sin la aplicación de ningún tratamiento). Largas, delgadas y muy ramificadas. Los fibroblastos pueden estar en contacto unos con otros por uniones tipo nexo o por contactos físicos simples.

Una vez diferenciados, los fibroblastos poseen la capacidad de replicarse mediante divisiones mitóticas. En cultivos de fibroblastos de tejido embrionario, éstos pueden experimentar aproximadamente unas 50 divisiones antes de que adquieran una condición de senescencia y mueran.

Comenzamos analizando las imágenes de las células transfectadas y teñidas de manera general para luego enfocarnos de manera puntual en las características de cada plásmido.

Las células, sufren un alto grado de stress durante el proceso de transfección ya que son expuestas a Lipofectamina, que luego de varias horas puede ser tóxica para las mismas. Para reducir las alteraciones lo máximo posible, una vez colocada la solución de transfección se la deja incubando dos horas y media y una vez pasado este tiempo se extrae y se cambia por el medio que tenían las células previo al experimento, más medio nuevo. Se realiza esta combinación, ya que, el medio de incubación de las células cuenta con nutrientes, proteínas de adhesión previamente sintetizadas y factores de transcripción, esto ayuda a la rápida recuperación de las condiciones ambientales de la célula recién transfectada. De lo contrario, es decir, si solo se colocara medio nuevo, la célula debería recuperarse y además sintetizar nuevamente todas las moléculas necesarias para la adhesión al vidrio, comunicación intercelular, entre otras.

Es por estos motivos que se realiza la mezcla de ambos, para tener moléculas previamente sintetizadas y nutrientes frescos del medio nuevo *(Acosta 2006)*.

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TINCIÓN DEL NACHR CON BTX-555

La técnica fue puesta a punto luego de varios ensayos. Se probaron diferentes soluciones, tanto de medio M1 como de PBS, para diluir las BTXs, diferentes concentraciones, temperaturas y tiempo de exposición, además de varias BTXs con distintos fluoróforos activos a sus respectivas longitudes de onda. La BTX elegida para los posteriores ensayos, fue la marcada con Alexa Fluor555. Esta se encuentra en el rango de excitación entre 500/550 nm y de emisión 650/800 nm. Es decir, se excita con el láser verde y emite en rojo lejano. Fue elegida porque todos los plásmidos finales utilizados contienen proteínas fluorescentes EGFP, excitándose en el rango azul y emitiendo en el verde.

Como protocolo final, para la obtención de las imágenes posteriores ***(Figura 30)***, se obtuvieron los mejores resultados utilizando una dilución 1/250 (por cada pocillo) en PBS, durante 45 minutos en hielo.

La unión del antagonista competitivo α-bungarotoxina (αBTX) o el entrecruzamiento con anticuerpos induce la internalización de los AChR de la superficie celular. Este proceso ocurre en dos etapas: primero los complejos AChR-αBTX son secuestrados en un compartimiento tubular conectado con la superficie. Subsecuentemente el AChR es internalizado a través de un mecanismo independiente de clatrina, de dinamina y de caveolina. La desorganización de la actina inhibe estos dos procesos, lo que indica que ambos requieren la integridad del citoesqueleto.

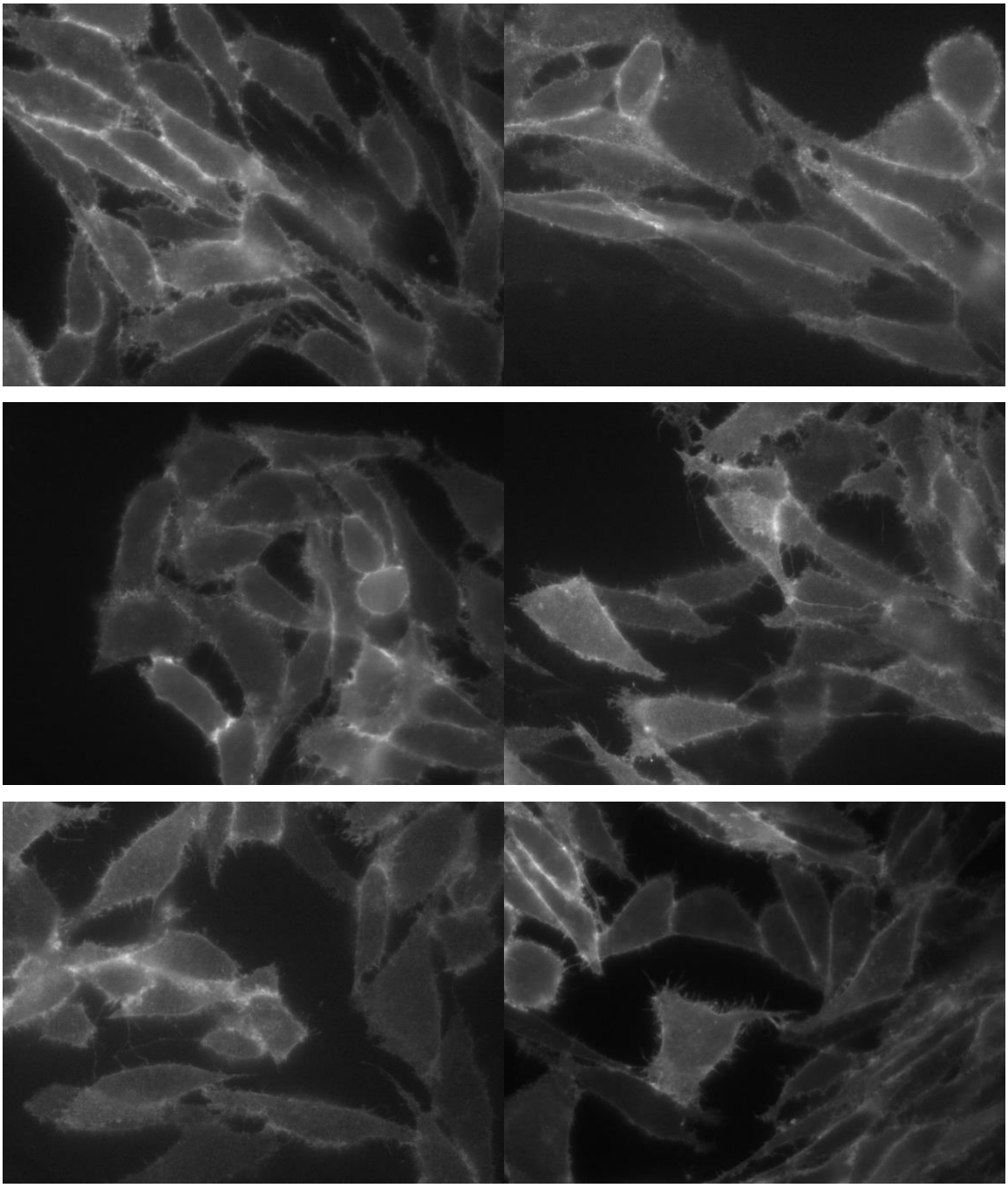


Figura 30·A|
Células CHO-K1/A5, teñidas con BTX-555..

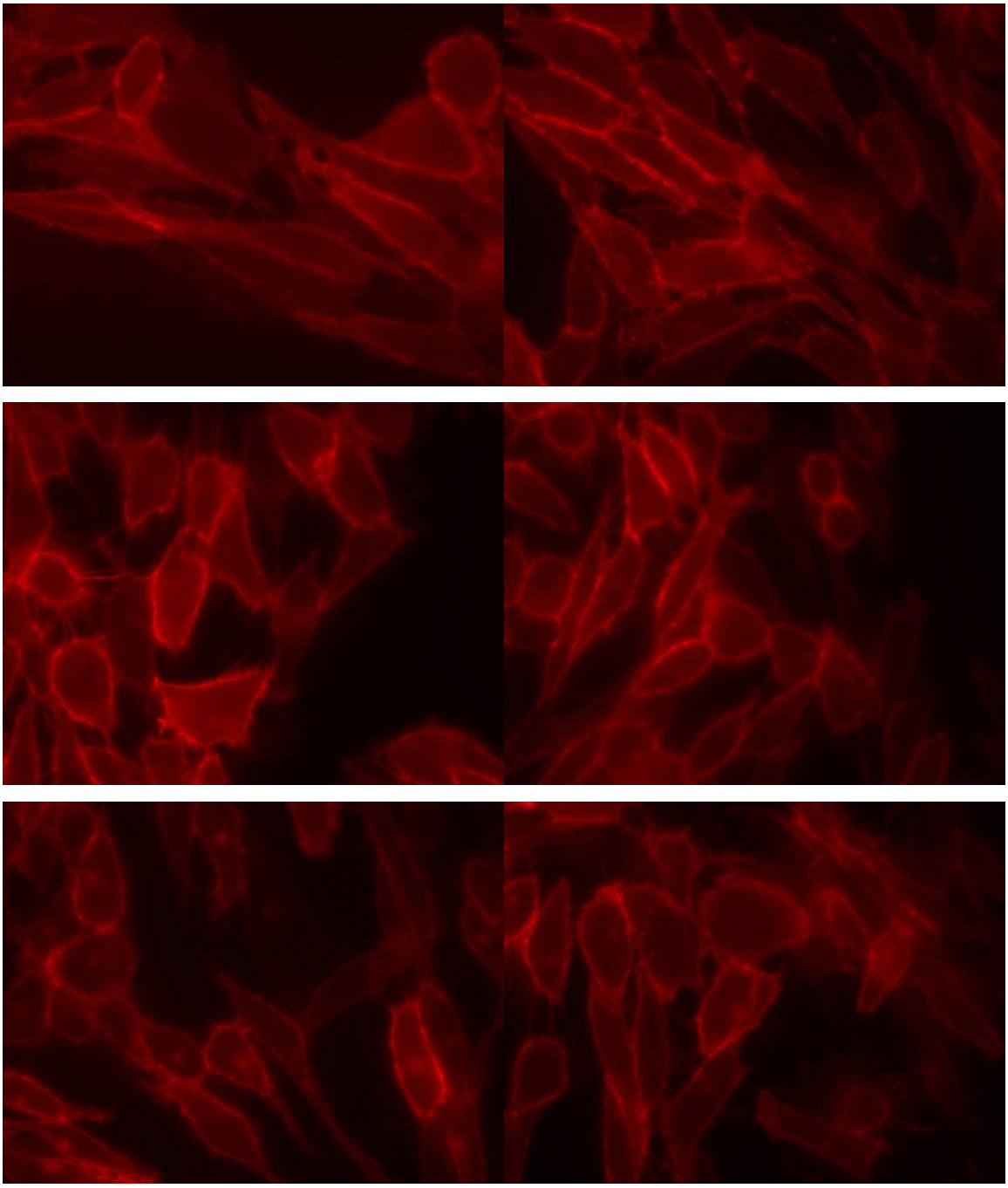


Figura 30·B|
Células CHO-K1/A5, teñidas con BTX-555.
Aplicando pseudo-color rojo, mediante el software de análisis de imágenes ImageJ.
Excitación BTX-555: 500/550nm
Emisión BTX-555: 650/800nm. Rojo lejano

Disposición de las Proteínas Fluorescentes en las células

Como se puede observar en el conjunto de imágenes, la distribución y la localización de las proteínas no es igual en las transfecciones de los diferentes plásmidos, no solo, por la ubicación final de las mismas, sino también, por la agrupación de ellas.

Proteína LL5β

La proteína LL5β se une selectivamente a los fosfoinosítidos 3-fosforilados que se generan en la cara interna de la membrana plasmática por acción de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Interactúa con el citoesqueleto a través de la filamina su reclutamiento hacia la corteza celular está influenciado por la actividad de la quinasa PI3, pero no requiere microtúbulos intactos *(Paranavitane et al. 2003)*. De acuerdo con esta idea, se sabe que la activación de la PI3 quinasa se produce en los bordes principales y en las adhesiones focales (Haugh et al., 2000;). La distribución espacial de LL5b puede estar determinada por otros socios o factores reguladores, posiblemente dependientes de la interacción celular con la matriz extracelular, ya que los complejos de LL5b están fuertemente enriquecidos en la corteza ventral *(Lansbergen et al. 2006)*.

El ARNm de LL5β se enriquece en las placas terminales y la proteína se localiza en las Uniones Neuromusculares, especialmente a lo largo de los bordes de los grupos de los nAChR. En estudios previos, se demostro que la localización de LL5 se basa en las integrinas del receptor de laminina y que las LL5 estabilizan la localización de la integrina α3 en la corteza basal. También, que la activación de la integrina α3 es suficiente para iniciar la acumulación de LL5 y que las LL5 se asocian con las colas citoplasmáticas de estas integrinas receptoras de laminina. Finalmente, la distribución tridimensional dependiente de LL5 de microtúbulos en láminas epiteliales totalmente polarizadas *(Hotta et al. 2010)*.

Las células transfectadas con el plásmido LL5β-EGFP ***(Figura 31)*** exhiben una distribución no homogénea de la proteína LL5β, que aparece en forma de acúmulos puntiformes en la superficie celular. El puntillado que se genera es de gran tamaño (>1 μm) y su fluorescencia es muy intensa ***(Figura 32)***.

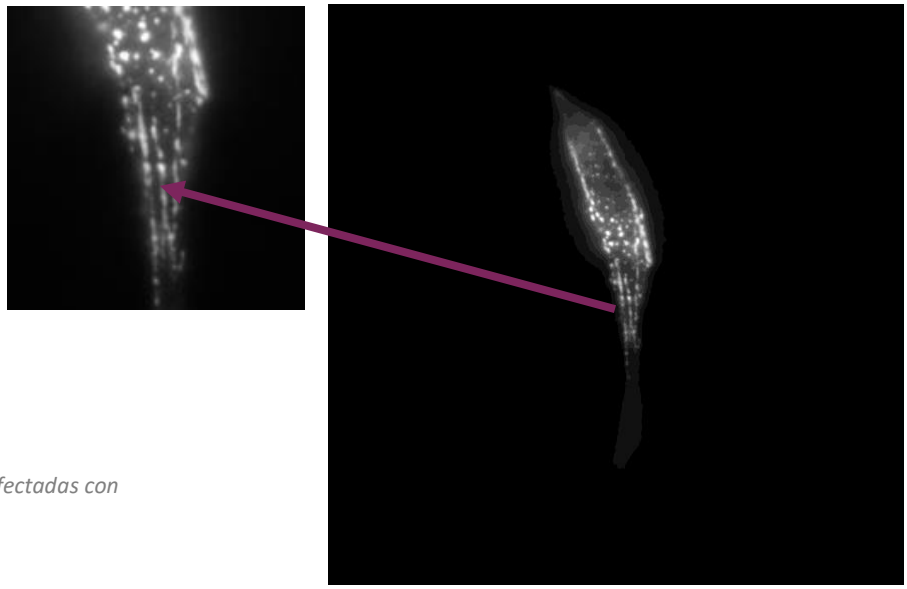
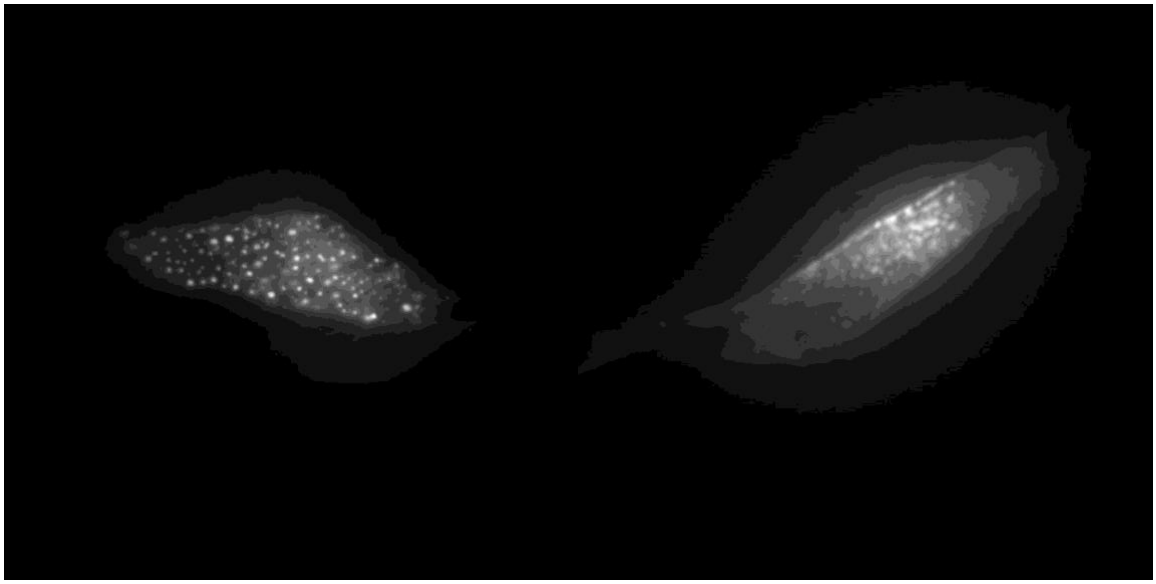


Figura 31|
Células CHO- K1/A5, transfectadas con plásmido LL5β-EGFP
Excitación: 460/480nm
Emisión: 500/550nm



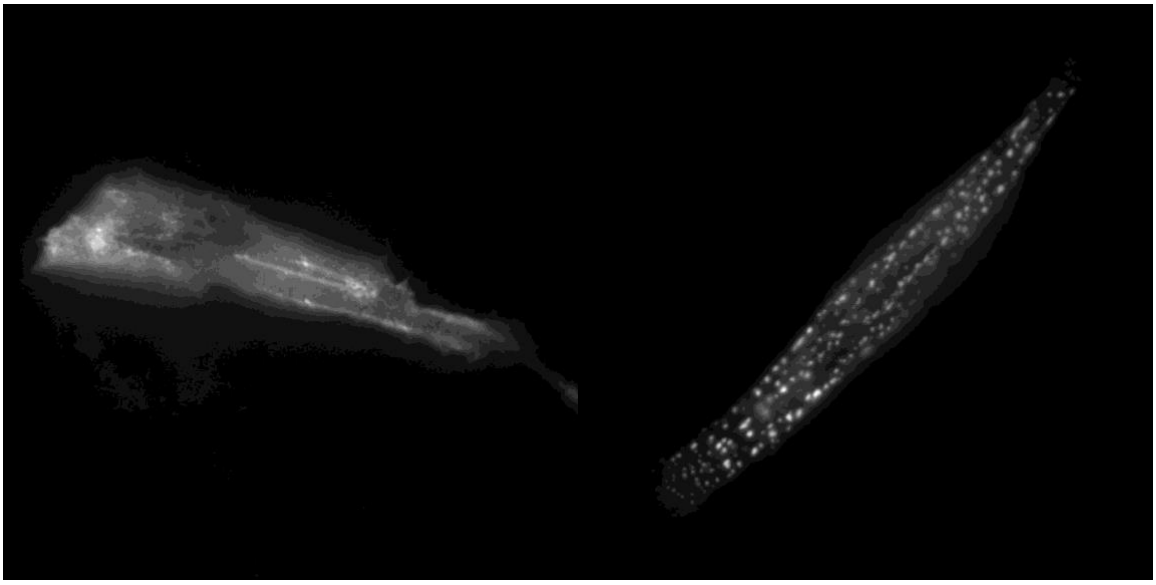
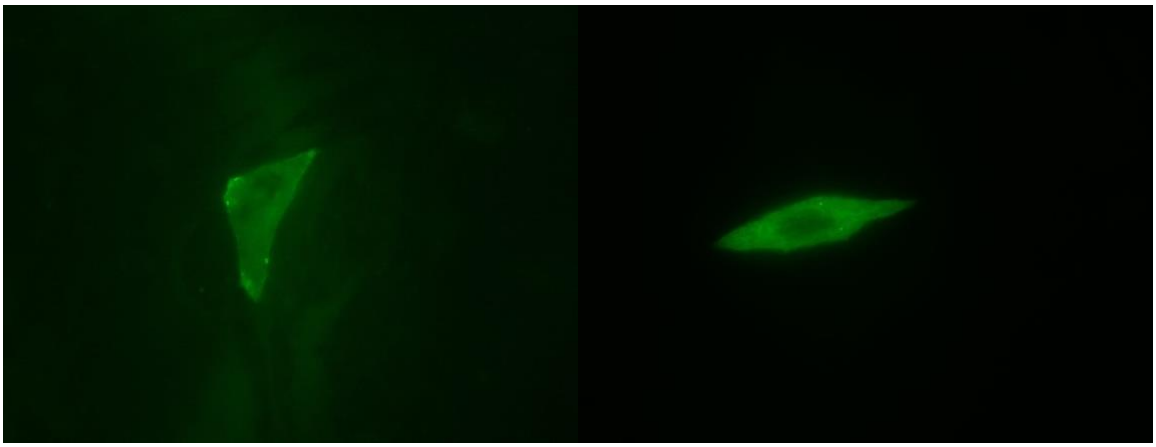


Figura 32·A |
Células CHO- K1/A5, transfectadas con plásmido LL5β-EGFP.
Excitación: 460/480nm
Emisión: 500/550nm



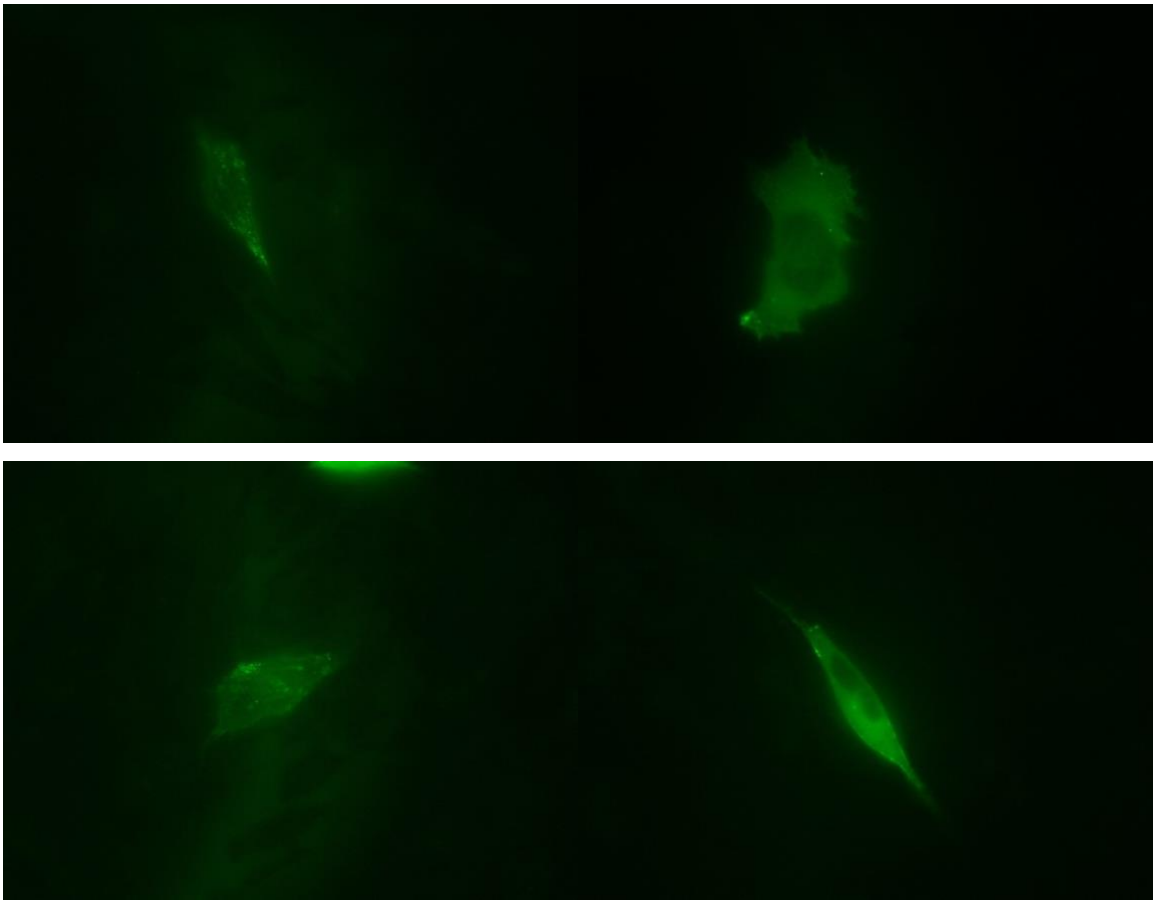


Figura 32·B|
Células CHO- K1/A5, transfectadas con plásmido LL5β-EGFP, con pseudo color Verde aplicado.
Excitación: 460/480nm
Emisión: 500/550nm

La co-localización de la proteína fluorescente y de la BTX, se realizó mediante el merge de imágenes ***(Figura 33)***. Es decir, mediante la superposición de las dos imágenes de colores diferentes. En este caso, verdes y rojas, que generan un tercer color, amarillo anaranjado, cuando existe co-localización del receptor teñido por la BTX con las proteínas fluorescentes asociadas al mismo ***(Figura 34)***.

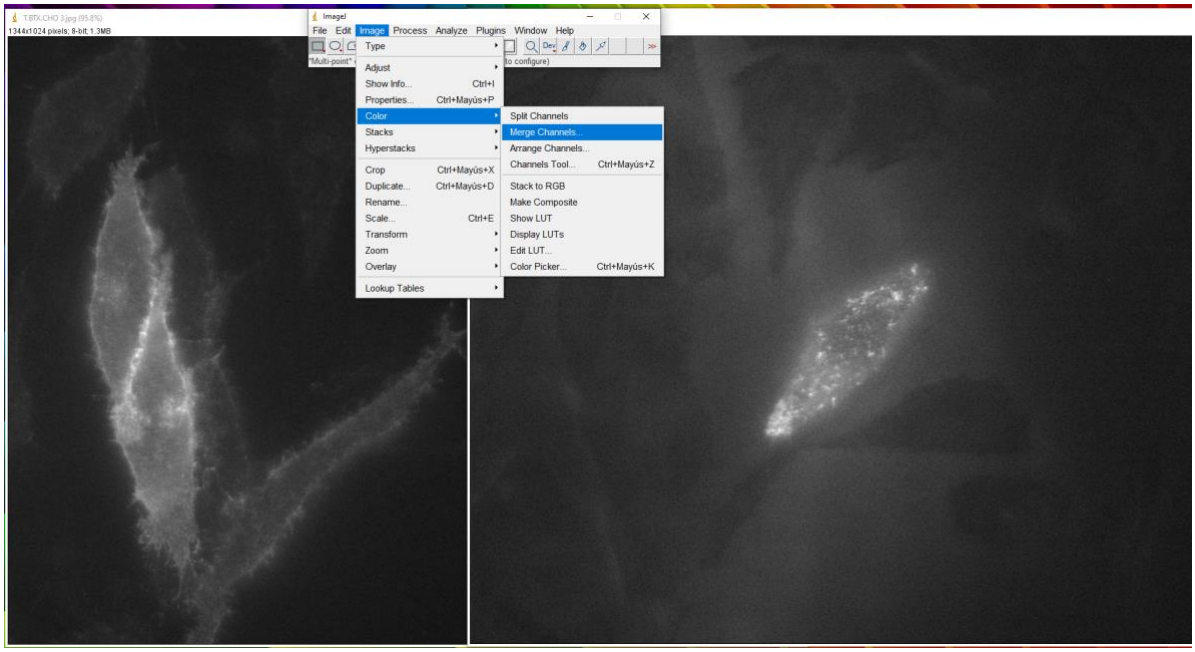


Figura 33·A |
Interfaz del Software informático ImageJ. Una vez aplicado el pseudo-color, el programa superpone ambas imágenes generando un tercer color en el caso de que haya un co-localización entre las proteínas de andamiaje fluorescentes y la BTX-555.

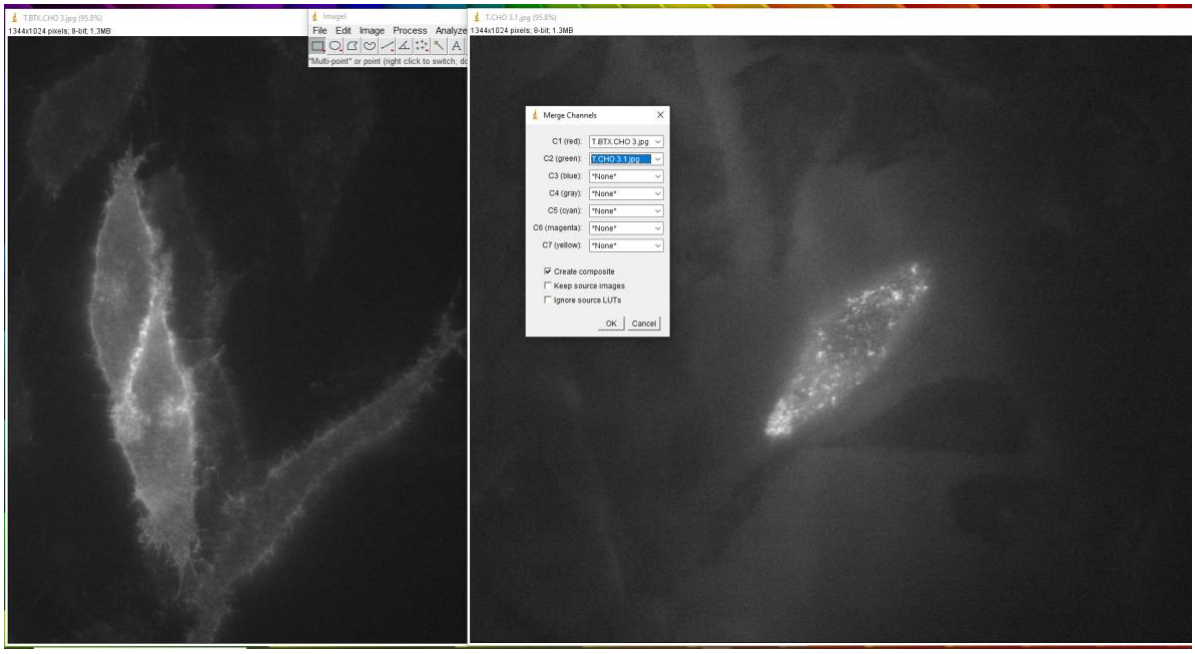


Figura 33·B |
Interfaz del Software informático ImageJ. Ruta de ventanas hasta la opción necesaria para la creación del Merge.

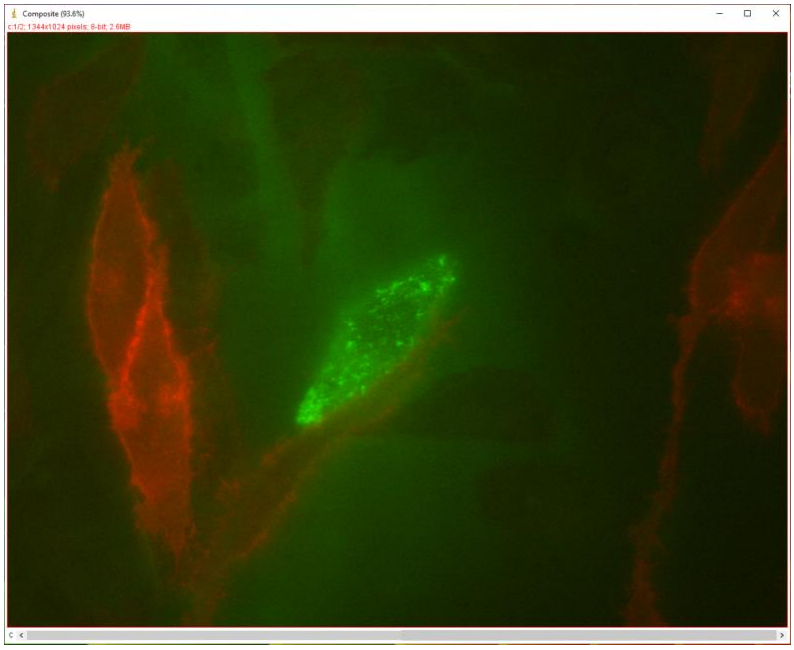
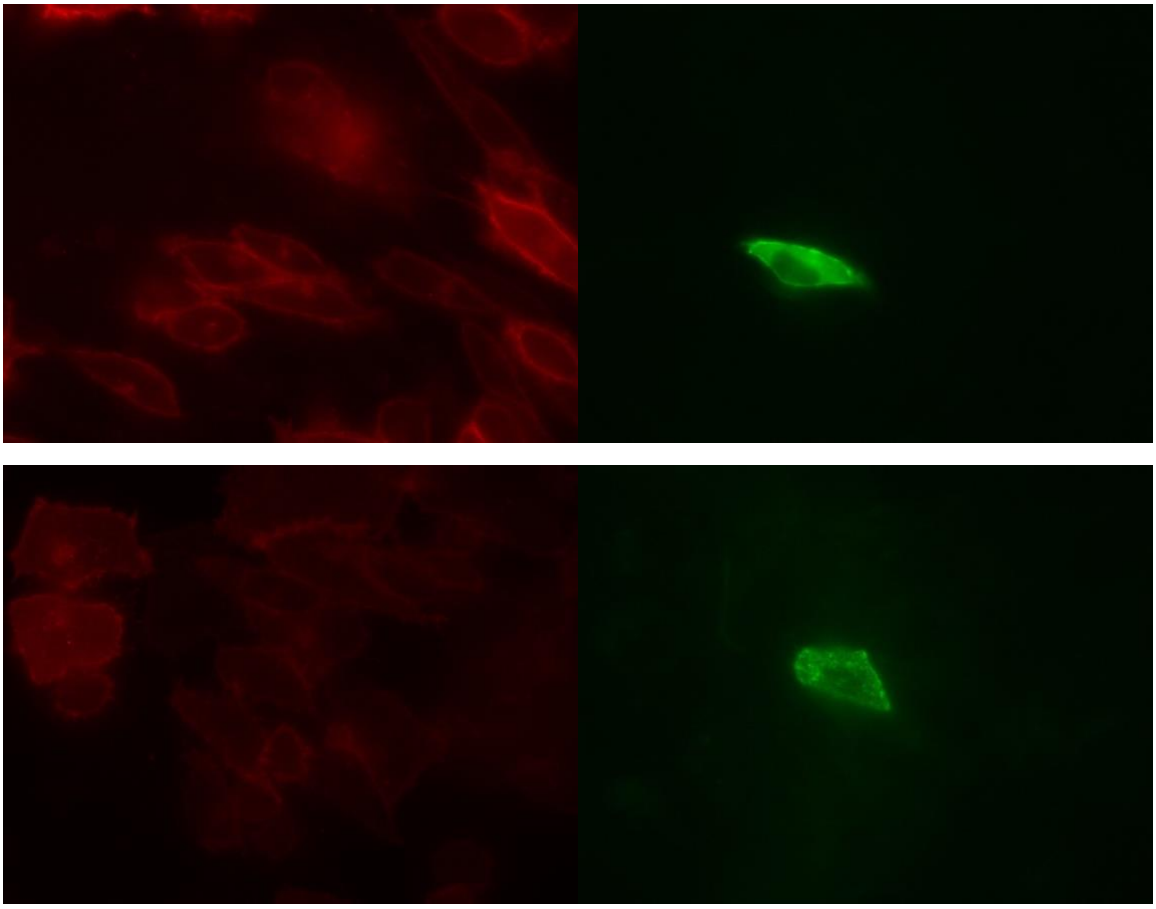


Figura 33·C|
Interfaz del Software informático ImageJ. Con esta ventana emergente se elige que imagen va con cada pseudo-color, para que luego el programa genere automáticamente el Merge de ambas imágenes.



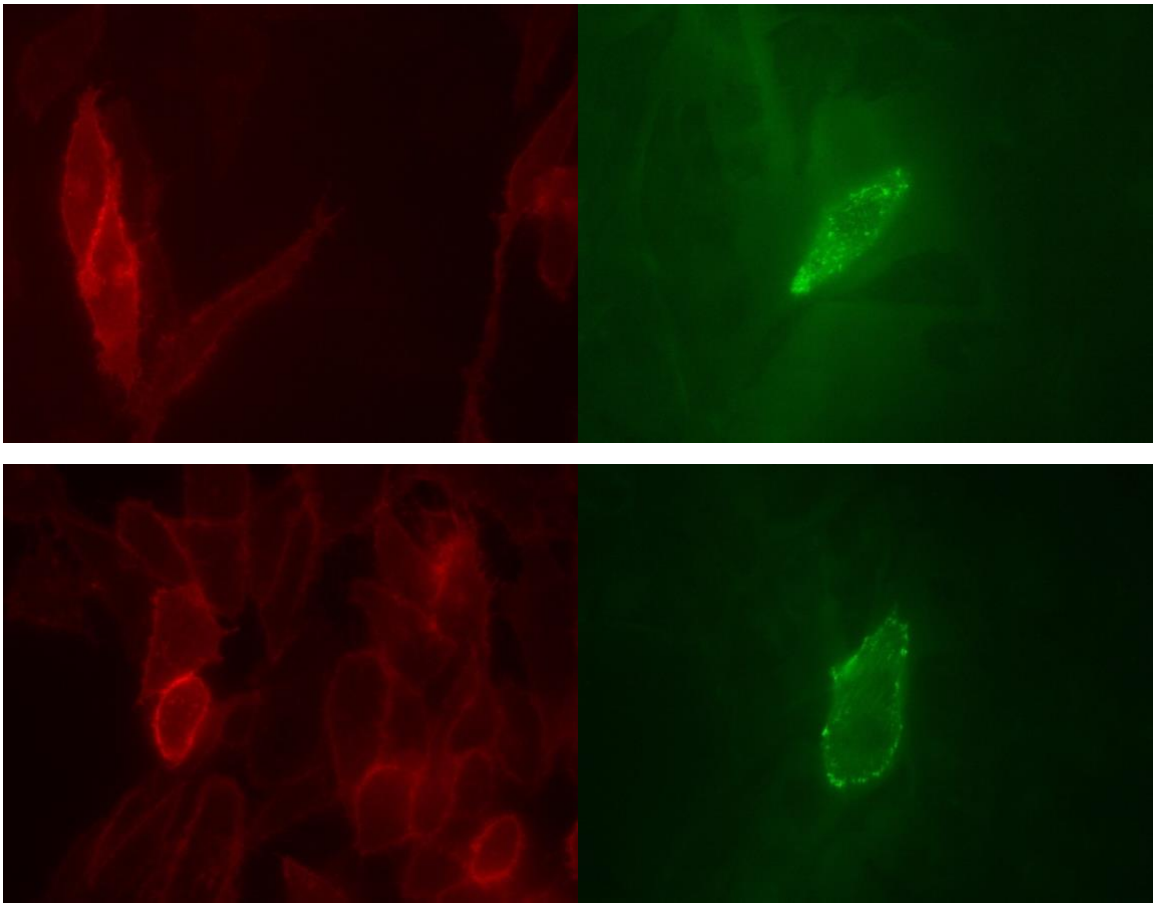


Figura 34·A |
Células CHO-K1/A5, transfectadas con plásmido LL5β-EGFP y teñidas, posteriormente, con BTX-555 (1/250). 45 minutos en frío.
Excitación Transfección: 460/480nm
Emisión Transfección: 500/550nm
Excitación BTX-555: 500/550nm
Emisión BTX-555: 650/800nm. Rojo lejano.

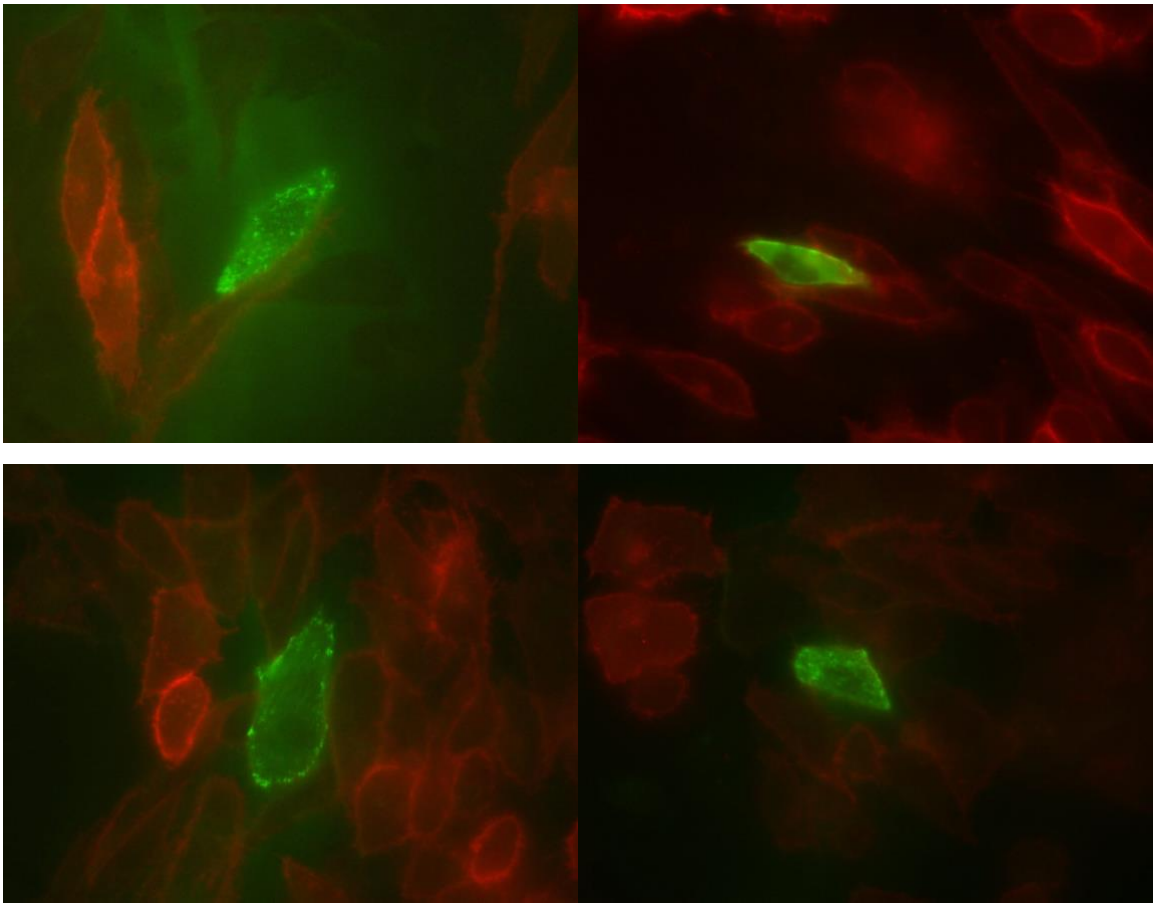


Figura 34·B|
Células CHO-K1/A5, transfectadas con plásmido LL5β-EGFP y teñidas, posteriormente, con BTX-555 (1/250). 45 minutos en frío. Merge de imágenes con pseudo color.
Excitación Transfección: 460/480nm
Emisión Transfección: 500/550nm
Excitación BTX-555: 500/550nm
Emisión BTX-555: 650/800nm. Rojo lejano

Excepcionalmente pudo observarse ***(Figura 35)*** una leve co-localización en un extremo de la célula.

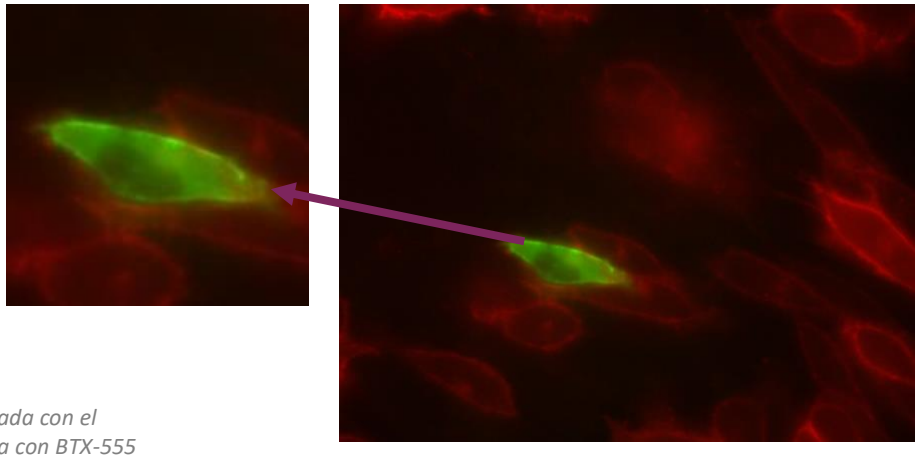


Figura 35|
Célula CHO-K1/A5 transfectada con el plásmido LL5β-EGFP y teñida con BTX-555 (1/250).
Leve co-tinción en el extremo derecho de la célula, por dos posibles razones, una correcta doble tinción o por una superposición celular.

RAPSINA

Rapsina, una proteína de la membrana periférica del músculo esquelético agrupa los receptores nicotínicos de acetilcolina a alta densidad en la membrana postsináptica. El mecanismo de agrupación de nAChR por Rapsina se analizó expresando nAChR en células CHO/K1-A5 luego de la transfección con el plásmido portador de los genes de la Rapsina.

El direccionamiento de Rapsina a la membrana se confiere únicamente por su extremo N-acilado, ya que los 15 aminoácidos N-terminales miristoilados son suficientes para dirigir la proteína verde fluorescente a la membrana plasmática *(Ramarao and Cohen 1998)*.

Se asocia con al nAChR y es necesaria para agruparlos en la UNM. Rapsina puede anclar los nAChR al citoesqueleto uniéndose directamente a la actina, sumado a la participación de otras proteínas que también ayudan a vincular el complejo AChR-Rapsina al citoesqueleto.

Además, participa dirigiendo los nAChR a la superficie muscular, su interacción con los estos aumenta durante el agrupamiento de los receptores inducido por agrina y estabiliza los nAChR presentes en la membrana muscular postsináptica. Estas observaciones sugieren que la Rapsina actúa de varias formas diferentes para asegurar que los grupos de nAChR se desarrollen y se retengan en la UNM.

La Rapsina es una proteína de 43 kD con dominios de repetición tetratricopeptídica (TPR), espiral enrollada y RING. Mientras que los dominios TPR y de bobina enrollada son necesarios para la autoasociación de Rapsina y la agrupación de nAChR mediada por Rapsina, el dominio RING es necesario para la interacción de Rapsina con el distroglicano, un componente del complejo de distrofina que mantiene la integridad de la membrana muscular. La distrofina es una proteína que se une a la actina y el complejo de distrofina se extiende por el sarcolema que une la matriz extracelular con el citoesqueleto de corticalactina en el músculo. Las proteínas del complejo de distrofina se localizan en la UNM y su asociación a través de Rapsina podría vincular los nAChR con el citoesqueleto de actina.

Analizando la expresión en células CHO-K1/A5 transfectadas con el plásmido Rapsina-EGFP ***(Figura 36)***, podemos ver que la fluorescencia se localiza en dos zonas bien definidas. Esta proteína periférica de andamiaje y miristoilada, se asocia directamente con el nAChR, siendo indispensable para la agrupación y formación de acúmulos del mismo, y permitiendo así que se pueda constituir la unión neuromuscular entre neuronas y las células nerviosas motoras.

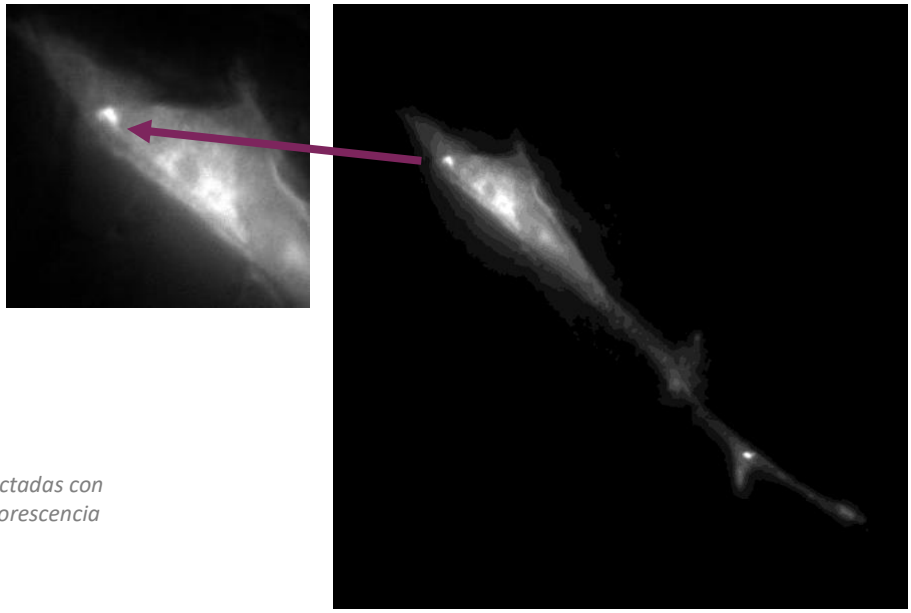


Figura 36·A|
Células CHO- K1/A5, transfectadas con plásmido Rapsina-EGFP. Fluorescencia focalizada en puntos.
Excitación: 460/480nm
Emisión: 500/550nm

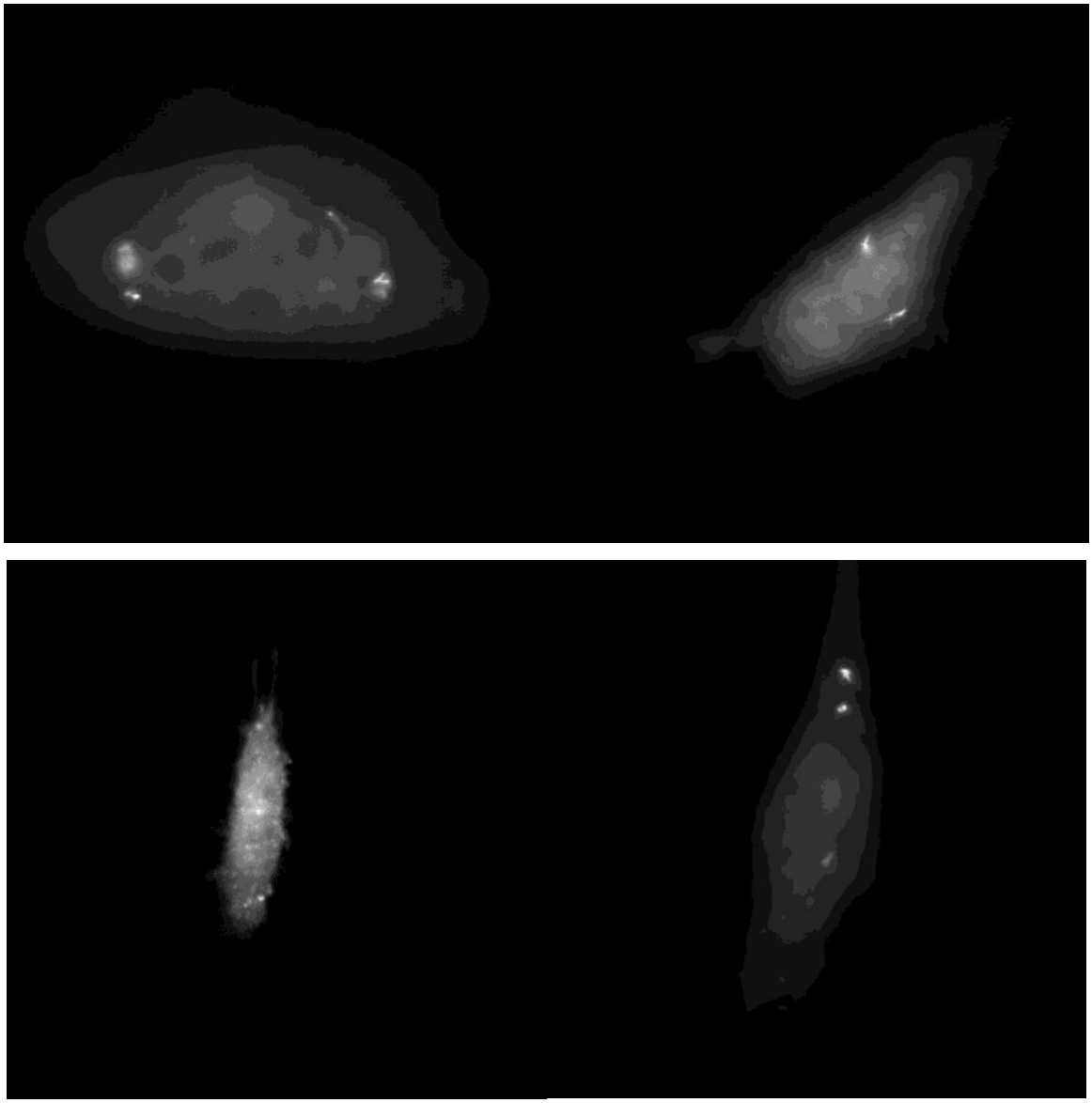


Figura 36·B|
Células CHO-K1/A5, transfectadas con plásmido Rapsina-EGFP. Fluorescencia focalizada en puntos.
Excitación: 460/480nm
Emisión: 500/550nm

LRP4

LRP4 es una proteína transmembrana de ~220 kDa, compuesta de dominios LDL, similares a EGF y de hélice β (YWTD) en la región extracelular y una región intracelular de 158 aminoácidos *(Herz and Strickland 2001)*. La región extracelular se une a Agrina y se asocia con MuSK. La ausencia de LRP4 hace que los miotubos no respondan a Agrina.

Además, LRP4 se expresa preferentemente por señales generadas en núcleos ubicados en la región sináptica, lo que plantea la posibilidad de que desempeñe un papel en la vía de señalización de Agrina/ MuSK *(Weatherbee, Anderson, and Niswander 2006).* Regula la formación de la sinapsis neuromuscular y se une selectivamente a isoformas neurales de Agrina, necesario para la estimulación de la fosforilación de MuSK *(Kim et al. 2008)*.

La proteína LRP4 se agrupa ***(Figura 37)*** y concentra en un punto central de la célula y desde ahí, se va dispersando hacia la periferia de la misma de manera homogénea.

LRP4 fue fácilmente detectable en la región sináptica donde se enriquecieron los AChR. Sin embargo, se encontró poco LRP4 en la región no sináptica. Juntos, estos resultados demostraron que LRP4 se expresa específicamente en miotubos y se enriquece en la UNM, lo que sugiere un papel de LRP4 en la formación de UNM.

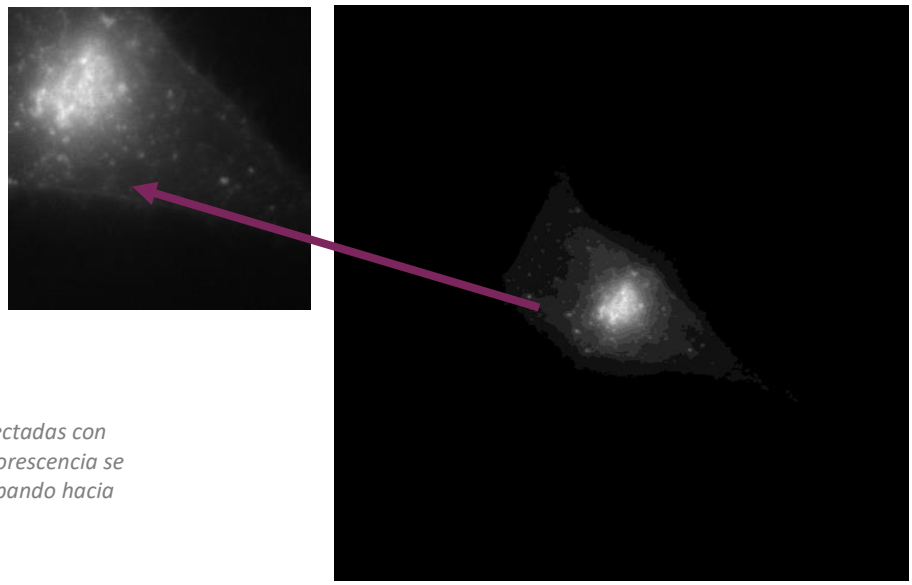


Figura 37·A |
Células CHO- K1/A5, transfectadas con plásmido LRP4-EGFP. La fluorescencia se centraliza y luego se va disipando hacia los costados de la célula.
Excitación: 460/480nm
Emisión: 500/550nm

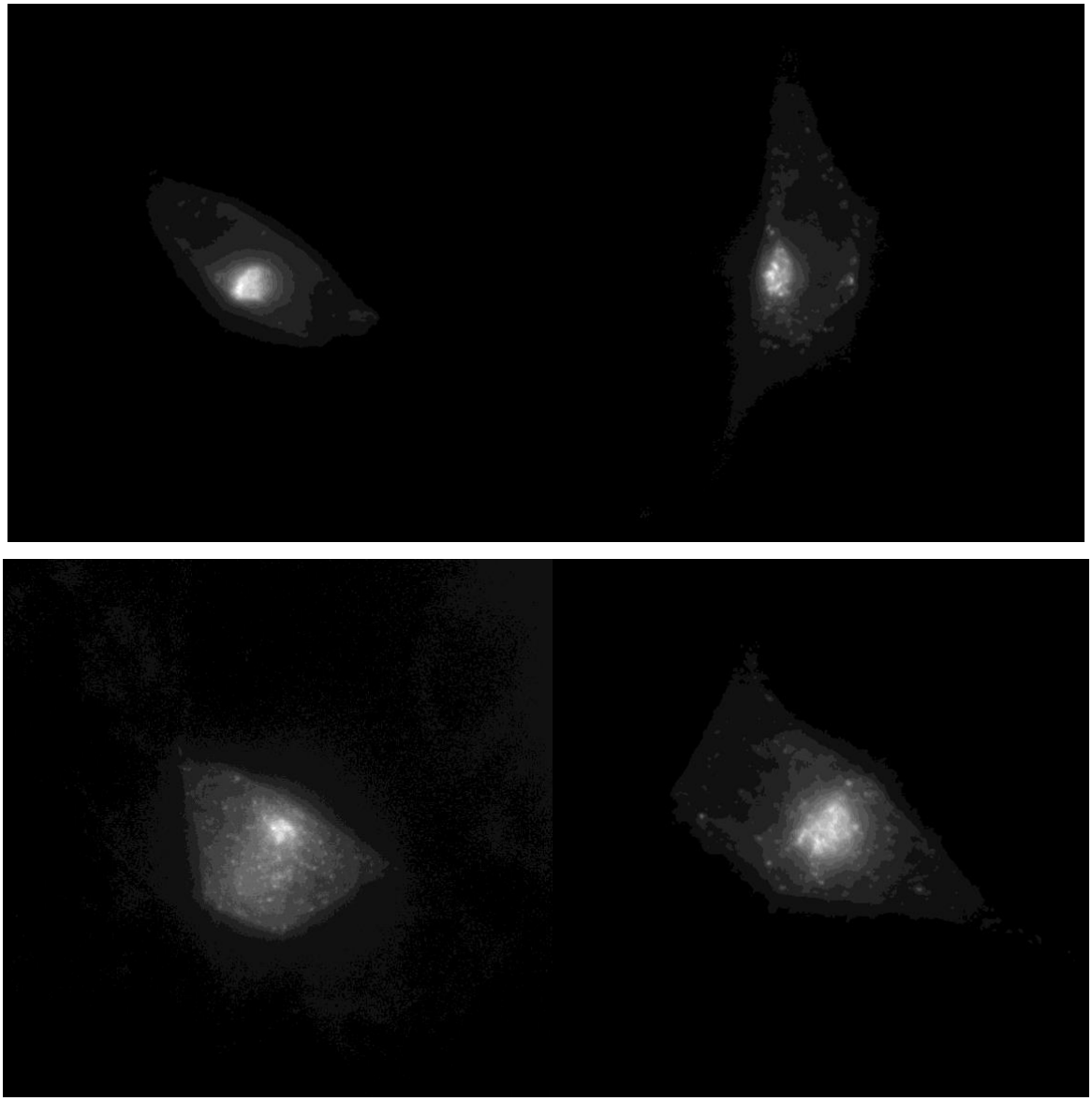


Figura 37·B|
Células CHO-K1/A5, transfectadas con plásmido LRP4-EGFP. La fluorescencia se centraliza y luego se va disipando hacia los laterales de la célula.
Excitación: 460/480nm
Emisión: 500/550nm

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVA

Los receptores para acetilcolina de tipo nicotínico son canales catiónicos que se abren por la unión del neurotransmisor acetilcolina. Estos receptores son proteínas de membrana compuestas por cinco subunidades y son la clave de la transmisión colinérgica nicotínica en la unión neuromuscular, así como en diferentes áreas del Sistema Nervioso Periférico (SNP) y Central (SNC), donde están ampliamente distribuidos.

Los musculares y los del SNP están ubicados postsinápticamente, mediando respuestas excitadoras, mientras que los del SNC se localizan preferentemente en las neuronas presinápticas, donde modulan la liberación de los neurotransmisores tales como la Dopamina, la Serotonina, el Acido γ-aminobutírico, la Noradrenalina, la Acetilcolina y el glutamato.

A la fecha han sido identificados 17 genes diferentes que codifican para las subunidades del receptor. En el SNC, las diferentes combinaciones de las subunidades producen múltiples subtipos del receptor, que muestran diferentes propiedades funcionales, ya sea en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, entre ellos, la contracción muscular, la memoria, la atención, el aprendizaje, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, la ansiedad y la depresión, ect.

La enfermedad de Alzheimer es una condición neurodegenerativa que se caracteriza por un deterioro progresivo de las facultades cognoscitivas, incluyendo la pérdida de la memoria.

Por otro lado, en la enfermedad de Parkinson hay una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y una disfunción motora (rigidez muscular, tremor y bradicinecia) además se hacen presente disfunciones cognoscitivas o demencia. En los enfermos con Alzheimer o con Parkinson se ha identificado una disminución tanto de la inervación colinérgica como de la cantidad de nAChR.

De acuerdo a estudios previos a surgido que la activación de los receptores formados por α4β2, que son predominantes en el SNC, interviene en los procesos de aprendizaje y de memoria, y que su participación es muy importante en los efectos benéficos observados en los pacientes con Alzheimer y probablemente con Parkinson *(López-Valdés and García-Colunga 2003)*.

La unión neuromuscular es una sinapsis que se desarrolla entre una neurona motora y una fibra muscular. Una característica definitoria del desarrollo de la UNM en vertebrados es la redistribución de los receptores musculares de acetilcolina después de la inervación, lo que genera grupos de nAChR de alta densidad en la membrana postsináptica y grupos de nAChR dispersos neuronales formados en el músculo antes de la inervación.

En estudios previos se ha observado que los lípidos, particularmente el colesterol y los esfingolipidos (SL), también participarían en el proceso de biogénesis y mantenimiento de la UNM *(Campagna and Fallon 2006) (Stetzkowski-Marden et al. 2006)*. Estos estudios determinaron que la partición del AChR en "rafts" lipídicos es necesaria para el agrupamiento inicial del AChR así como para la posterior estabilidad de estas agrupaciones.

La agrina estimula la partición del AChR en "rafts" lipídicos y este proceso es precedido por la partición de MuSK a "rafts" y requiere su activación. La alteración de estos dominios lipídicos impide la activación de MuSK y por lo tanto la cascada de señales "río abajo" que desencadenan el agrupamiento de AChR inducido por agrina. La Rapsina se halla constitutivamente en "rafts" lipídicos *(Marchand et al. 2002)* y la perturbación de "rafts" lipídicos altera la interacción entre la Rapsina y el AChR.

Este proceso in vivo requiere MuSK, un receptor de tirosinaquinasa específico del músculo que desencadena la redistribución del nAChR cuando se activa; Rapsina, una proteína muscular que se une y agrupa los nAChR; agrina, un proteoglicano heparán-sulfato secretado por nervios que activa MuSK; y ACh, un neurotransmisor que estimula los músculos y también dispersa los grupos de nAChR neuronales *(Madhavan and Peng 2005)*.

De los numerosos componentes sinápticos que se han identificado, entre ellos los receptores nicotínicos de acetilcolina de la unión neuromuscular de los vertebrados se distribuyen de manera difusa en los miotubos embrionarios, pero se concentran mucho (~ 10,000 μm^2) en la membrana postsináptica a medida que avanza el desarrollo. Al menos dos procesos distintos contribuyen a esta acumulación. Uno es la síntesis local: los núcleos musculares subsinápticos transcriben los genes de la subunidad AChR a tasas más altas que los núcleos extra-sinápticos, por lo que el ARN mensajero AChR se concentra cerca de los sitios sinápticos. En segundo lugar, una vez que los nAChR se han insertado en la membrana, forman grupos de alta densidad al unirse a un complejo citoesquelético subsináptico. Un componente clave de este complejo es Rapsina, una proteína de membrana periférica de masa

molecular relativa 43K, que se colocaliza precisamente con nAChR en sitios sinápticos desde las primeras etapas de la sinaptogénesis neuromuscular. En sistemas heterólogos, la expresión de Rapsina recombinante conduce a la agrupación de nAChR distribuidos de forma difusa, lo que sugiere que puede controlar la formación de agrupaciones. Rapsina es esencial para la formación de agrupaciones de nAChR, pero que la transcripción específica de sinapsis de genes de la subunidad de nAChR puede proceder en su ausencia *(Gautam et al. 1995)*.

Los músculos en desarrollo expresan múltiples moléculas que son esenciales para la formación y función de la sinapsis y que posteriormente terminarán en la membrana postsináptico.

Las moléculas se agrupan, según en que momento intervienen, ya sea en el desarrollo y la función de la UNM, en dos clases, proteínas importantes para una adecuada trasmisión del impulso nervioso. Estas incluyen las subunidades del nAChR (α, β, γ, δ, ε), la Acetilcolinesterasa (AChE) y los canales de sodio voltaje dependientes.

Y proteínas que organizan estos componentes en una membrana postsináptica funcional. Distinguiendose entre proteínas centrales que son necesarias para el desarrollo y el mantenimiento de la UNM y proteínas auxiliares que contribuyen en diversas vías a la plena maduración y mantenimiento de la UNM.

Las centrales, incluyen a la agrina, la señal proveniente de la inervación del axón motor, requerida para la formación y el mantenimiento de la UNM y proteínas expresadas en las fibras musculares, como la kinasa específica del músculo (MuSK), la proteína 4 relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP4), la cual contra regula las kinasas de tirosina-7 (Dok-7) y receptor asociado a la proteína de la sinapsis de 43 kDa, Rapsina.

Las auxiliares incluyen las neuregulinas, AChRs, los miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (ErbB), Wnts y componentes del complejo de la distrofina-glicoproteína (DGC).

Cada una de estas proteínas se localiza y se asocia a diferentes partes de la membrana plasmática e interaccionan de manera diferente con el receptor nicotínico de acetilcolina.

LRP4 actúa de manera bidireccional, coordinando el desarrollo sináptico, ya que Lrp4 no solo se une a la agrina y regula la diferenciación postsináptica, sino que también funciona como una señal retrógrada derivada del músculo para los primeros pasos en la diferenciación presináptica.

La formación de la unión neuromuscular requiere agrina, un factor liberado por las motoneuronas, y MuSK, una tirosina kinasa transmembrana que es activada por agrina.

LRP4, proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), se expresa específicamente en miotubos y se une a agrina neuronal. Su expresión permite la unión de agrina y la señalización de MuSK en células que, de otro modo, no responden a agrina. La supresión de la expresión de LRP4 en las células musculares atenúa la unión de agrina, la fosforilación de tirosina MuSK inducida por agrina y la agrupación de AChR. LRP4 también forma un complejo con MuSK de una manera que es estimulada por agrina.

Finalmente, LRP4 se convierte en tirosina fosforilada en células musculares estimuladas con agrina. Esto indica que la LRP4 es un correceptor de agrina que es necesario para la señalización de MuSK y la agrupación de AChR e identifica una proteína diana potencial cuya mutación y/o auto inmunización puede causar distrofias musculares *(Zhang et al. 2008).*

La Rapsina, proteína de 43 kDa asociada al receptor, es una proteína periférica de andamiaje, miristoilada (modificación irreversible de proteínas por lipidación que consiste en la adición por enlace amida covalente de un grupo miristoilo , derivado del ácido mirístico, al grupo alfa-amino de un residuo de glicina, generalmente en el extremo N-terminal de la proteína), desempeña un papel central en la agrupación del receptor nicotínico de acetilcolina en la unión neuromuscular, es decir, se requiere para la agrupación de receptores de acetilcolina en los sitios sinápticos entre las neuronas motoras de los mamíferos y las células musculares.

La proteína LL5β se encuentra localizada en la cara citoplásmica de la membrana postsináptica; sus niveles de expresión más altos corresponden a las regiones fronterizas de la densidad más alta del receptor de acetilcolina. De esta manera, la perturbación de la expresión LL5β en los miotubos inhibe la agregación de nAChR.

Posterior al análisis de las transfecciones, se hizo un análisis más profundo para poder ver la relación del receptor con las proteínas de andamiaje y una posible clusterización del mismo.

Para ello, se utilizó el plásmido que mejor resultado generó en la transfección ya sea por su perfecta visualización tanto como la cantidad de células que logro transfectar, el LL5β - EGFP. El método de tinción con las diferentes BTX, fue puesto a punto al inicio del proyecto

realizando únicamente tinciones sin transfecciones, de manera tal de establecer si la misma afectaba el comportamiento de las células, o generaba alguna condición fuera de lo normal. Una vez establecida que la tinción con BTX mostraba la expresión del nAChR en la superficie celular, condición fisiológica de la topografía del receptor, se procedió a realizar la transfección transiente sobre la línea clonal CHO-K1/A5, que como sabemos expresa el receptor en forma estable.

Las preguntas eran si alguna de las proteínas de andamiaje expresadas en forma transiente en estas células colocalizaba con el nAChR o no (es decir, que donde se expresaba la proteína fluorescente también se vea la fluorescencia de la BTX acoplada al receptor), y si la coexpresion redundaba en el agrupamiento del nAChR en acúmulos ("clusters").

Llamativamente, todas las células, sin excepción, que incorporaron los plásmidos de las proteínas de andamiaje y los expresaron, no se tiñeron con la BTX-555. La interpretación mas coherente de tal falta de cotinción, tal como se observa en todas las figuras que muestran las imágenes superpuestas con la doble tinción, es que la expresión de la proteína LL5β mediada por una transfección con Lipofectamina, inhibió la eexpresión del nAChR ende las células CHO-K1/A5, línea celular que expresa las subunidades α1, β1, δ y ε, en relación 2:1:1:1, la correspondiente al receptor nicotínico muscular adulto. Una posible explicación de dicho hallazgo experimental es que la célula CHO-K1/A5, un clon que produce en forma regular una altísima cantidad de dicha proteína, ve superada su capacidad biosintética y al ser sometida a una carga adicional transiente, de carácter excepcional, sacrifica la producción habitual para sostener la sobrexpresión de la proteína de andamiaje. De hecho, las células sometidas a transfección transiente tienen una vida media inferior al de la célula no expuestas a dicho tratamiento, lo cual sugiere que la transfección tiene un efecto deletéreo que incluye la perturbación de la biosíntesis proteica.

Durante el desarrollo de la UNM, se cree que el enriquecimiento de nAChR en los contactos entre los nervios y los músculos se produce mediante un proceso de "difusión-trampa": los nAChR que se mueven libremente a lo largo de la superficie muscular quedan atrapados cuando alcanzan los sitios sinápticos. Debido a que los sitios ricos en nAChR en la UNM están estrechamente asociados con el citoesqueleto de actina subyacente, durante mucho tiempo se sospechó que los enlaces al citoesqueleto son críticos para la concentración de nAChR en las sinapsis.

La formación de acúmulos ("clusters" en inglés) del receptor de acetilcolina es un proceso que, en el curso del desarrollo ontogenético, conduce a la formación de la unión neuromuscular, estructura que contiene receptores en altísima densidad por unidad de superficie en un "cluster" único. Conteniendo en el orden de 15/20 millones de receptores /μm2 en la unión neuromuscular adulta.

La rápida escala de tiempo del mecanismo de señalización que opera en la sinapsis colinérgica requiere volúmenes de reacción pequeños, confinados y concentraciones suficientemente altas de las especies reactivas. Estos requisitos se cumplen mediante la transducción de la señal química codificada en el neurotransmisor acetilcolina en la señal eléctrica mediada por el nAChR. Por lo tanto, el mantenimiento de un número adecuado de AChR en la membrana celular juega un papel crítico en la fisiología del receptor.

El proceso de formación de acúmulos obedece a la acción concertada de varios fenómenos, que pueden dividirse entre aquellos de origen presináptico como en los de índole postsináptica. En el caso del sistema modelo utilizado, las células CHO-K1/A5, constituyen un sistema de expresión heteróloga robusto del nAChR, pero carece tanto de inervación (por lo cual no existe un componente presináptico) como de proteínas de andamiaje postsinápticas (es decir, aquellas que están en la misma membrana que el nAChR) que conduzcan en forma individual a la acumulación de receptores. Los resultados de esta Tesis parecen indicar que las proteínas de andamiaje postsináptica transfectadas en forma transiente en las células que expresan el nAChR no parecen conducir, por si solas, al proceso de acumulación.

Las propiedades del nAChR muscular están reguladas por los lípidos de la membrana. Por tratarse de una proteína integral, desde su síntesis hasta su aparición en la sinapsis y posterior degradación, el nAChR está inmerso en una bicapa lipídica, cuya composición está predeterminada y finamente controlada por la célula.

Los requisitos para la compuerta del canal nAChR ha proporcionado información sobre las relaciones estructurales entre los restos de proteínas y lípidos en la membrana postsináptica rica en nAChR. Los primeros estudios in vitro realizados por investigadores sobre este tema indicaron que la maquinaria de translocación de iones nAChR requiere fosfolípidos cargados negativamente y Chol. Estos primeros hallazgos apuntaron implícitamente al hecho de que la función del canal nAChR es sensible al entorno lipídico.
(F J Barrantes 2004)

Varios estudios han demostrado que las matrices del nAChR están incrustadas en un microambiente lipídico que difiere en términos físicos del resto de la bicapa de la membrana, y que la presencia de colesterol y fosfolípidos con carga negativa es esencial para la función apropiada del receptor.

Las propiedades funcionales del AChR afectadas por el entorno de la membrana abarcan los procesos de activación, apertura y cierre del canal, así como la cinética de desensibilización. La evidencia más convincente sobre la modulación del AChR por el entorno de la membrana circundante es proporcionada por los cambios que ocurren en las propiedades del canal del receptor tras la mutación de residuos de aminoácidos en los supuestos dominios que atraviesan la membrana que se enfrentan a los lípidos.

Los lípidos intracelulares generados por hidrólisis de triglicéridos, fosfolípidos y otros ésteres deben ser transportados desde su sitio de formación para evitar la acumulación de tóxicos, el movimiento intracelular de todas las moléculas se ralentiza por la aglomeración molecular, la tortuosidad y la mayor viscosidad del citosol en relación con el agua.

Sin embargo, los lípidos y otras moléculas anfipáticas se ralentizan aún más debido a su tendencia a unirse a las membranas citoplasmáticas. Las proteínas de unión citoplasmática reducen la unión a la membrana al aumentar la solubilidad acuosa de sus ligandos. Estos portadores acuosos catalizan el transporte de moléculas de lípidos a través de capas de agua hidrofílicas del mismo modo que los portadores de membrana de plasma catalizan el transporte de moléculas hidrofílicas a través de la membrana hidrofóbica, e incluso muestran las características principales del transporte mediado por portadores, que incluyen saturación, competencia mutua y contratransporte. asociado con un transporte citoplasmático más rápido de ácidos grasos de cadena larga. Los datos disponibles sugieren que deben existir gradientes sustanciales de concentración de ácidos grasos intracelulares, y que estos gradientes pueden ayudar a determinar a qué ruta metabólica ingresa el ácido graso *(Weisiger 1996)*.

La influencia del ambiente lipídico de la membrana sobre la funcionalidad del AChR es seguramente el aspecto más importante de la interacción AChR-lípidos *(Marsh and Barrantes 1978)*.

Las alteraciones en el ambiente lipídico de una proteína pueden provocar modificaciones estructurales en los segmentos transmembrana así como cambios en la

orientación y ángulo de las α hélices, conformación o alteraciones en la interacción entras las α hélices de una misma proteína, o entre proteínas vecinas.

Estas alteraciones, a nivel de los segmentos transmembrana, pueden producir cambios estructurales a nivel de las porciones extramembrana de la proteína, lo que se podría traducir en cambios funcionales, en formación o disociación de estructuras oligoméricas *(Nyholm, Özdirekcan, and Killian 2007)*.

En estudios posteriores se determinó la asociación preferencial del AChR con esteroides, ácido fosfatídico y ácidos grasos, más que con otras especies lipídicas *(Ellena, Blazing, and McNamee 1983)*. Se observó que, cuando se reconstituía el AChR en vesículas conteniendo sólo fosfatidilcolina, los receptores no eran funcionales, y que la presencia de colesterol y fosfolípidos cargados negativamente, como el ácido fosfatídico o fosfatidilserina, restauraban la capacidad al AChR de experimentar transiciones de estado inducidas por agonista así como para estabilizar su estructura secundaria. La presencia de ácidos grasos en vesículas conteniendo el AChR bloquean el flujo de iones sodio inducido por agonistas *(Andreasen and McNamee 1980). (Andreasen and McNamee 1980)*

Se pudo establecer una clasificación de lípidos de acuerdo con su selectividad por el nAChR, los cuales pertenecen a tres categorías diferentes: a) un grupo de alta selectividad, constituido por ácidos grasos, androstanol y ácido fosfatídico; b) un grupo con afinidad intermedia, constituido por esfingomielina (SM) y fosfatidilserina; c) y un grupo de afinidad moderada a baja, conformado por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y gangliósidos.

Además, se han postulado varias hipótesis para tratar de explicar cómo los esteroles y demás lípidos afectan la funcionalidad del nAChR. Estas teorías incluyen a) efectos indirectos sobre el nAChR ejercidos sobre las propiedades biofísicas de la membrana (tales como fluidez, formación de dominios lipídicos, etc), y b) efectos directos mediados por la interacción de los lípidos directamente en los segmentos transmembrana del nAChR *(Francisco J Barrantes 2003)*.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, Adriana. 2006. "El Fibroblasto: Su Origen, Estructura, Funciones y Heterogeneidad Dentro Del Periodonto." *Universitas Odontológica* 25(57): 26–33.

Andreasen, Terrence J, and Mark G McNamee. 1980. "Inhibition of Ion Permeability Control Properties of Acetylcholine Receptor from Torpedo Californica by Long-Chain Fatty Acids." *Biochemistry* 19(20): 4719–26.

Antollini, Silvia S, and Francisco J Barrantes. 2016. "Fatty Acid Regulation of Voltage-and Ligand-Gated Ion Channel Function." *Frontiers in physiology* 7: 573.

Baier, Carlos J, Jacques Fantini, and Francisco J Barrantes. 2011. "Disclosure of Cholesterol Recognition Motifs in Transmembrane Domains of the Human Nicotinic Acetylcholine Receptor." *Scientific reports* 1: 69.

Barik, Arnab et al. 2014. "LRP4 Is Critical for Neuromuscular Junction Maintenance." *Journal of Neuroscience* 34(42): 13892–905.

Barrantes, F J. 2004. "Structural Basis for Lipid Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Function." *Brain Research Reviews* 47(1–3): 71–95.

Barrantes, Francisco J. 2003. "Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Function through the Outer and Middle Rings of Transmembrane Domains." *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 6(5): 620–32.

———. 2014. "Cell-Surface Translational Dynamics of Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Frontiers in synaptic neuroscience* 6: 25.

———. 2016. "Cholesterol and Nicotinic Acetylcholine Receptor: An Intimate Nanometer-Scale Spatial Relationship Spanning the Billion Year Time-Scale." *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 5(s1): S67–86.

Barrantes, Francisco J, Virginia Borroni, and Sofía Vallés. 2010. "Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor–Cholesterol Crosstalk in Alzheimer's Disease." *FEBS letters* 584(9): 1856–63.

Barrantes, Francisco Jose. 2013. *The Nicotinic Acetylcholine Receptor: Current Views and Future Trends*. Springer.

Bertrand, Daniel, and Murali Gopalakrishnan. 2007. "Allosteric Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Biochemical pharmacology* 74(8): 1155–63.

Billeter, R et al. 1980. "Myosin Types in Human Skeletal Muscle Fibers." *Histochemistry*

65(3): 249–59.

Borroni, V et al. 2007. "Cholesterol Depletion Activates Rapid Internalization of Submicron-Sized Acetylcholine Receptor Domains at the Cell Membrane." *Molecular membrane biology* 24(1): 1–15.

Brooke, Michael H, and Kenneth K Kaiser. 1970. "Muscle Fiber Types: How Many and What Kind?" *Archives of neurology* 23(4): 369–79.

Campagna, J A, and J Fallon. 2006. "Lipid Rafts Are Involved in C95 (4, 8) Agrin Fragment-Induced Acetylcholine Receptor Clustering." *Neuroscience* 138(1): 123–32.

Chalfie, Martin et al. 1994. "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression." *Science* 263(5148): 802–5.

Eckhardt, Roger. 1987. "Stan Ulam, John von Neumann, and the Monte Carlo Method." *Los Alamos Science* 15(131–136): 30.

Ellena, Jeffrey F, Michael A Blazing, and Mark G McNamee. 1983. "Lipid-Protein Interactions in Reconstituted Membranes Containing Acetylcholine Receptor." *Biochemistry* 22(24): 5523–35.

Fantini, Jacques, and Francisco J Barrantes. 2009. "Sphingolipid/Cholesterol Regulation of Neurotransmitter Receptor Conformation and Function." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1788(11): 2345–61.

———. 2013. "How Cholesterol Interacts with Membrane Proteins: An Exploration of Cholesterol-Binding Sites Including CRAC, CARC, and Tilted Domains." *Frontiers in physiology* 4: 31.

Flores Soto, M E, and J E Segura-Torres. 2005. "Estructura y Función de Los Receptores Acetilcolina de Tipo Muscarínico y Nicotínico." *Rev Mex Neuroci* 6(4): 315–26.

Gautam, Medha et al. 1995. "Failure of Postsynaptic Specialization to Develop at Neuromuscular Junctions of Rapsyn-Deficient Mice." *Nature* 377(6546): 232–36.

Herz, Joachim, and Dudley K Strickland. 2001. "LRP: A Multifunctional Scavenger and Signaling Receptor." *The Journal of clinical investigation* 108(6): 779–84.

Hotta, Azusa et al. 2010. "Laminin-Based Cell Adhesion Anchors Microtubule plus Ends to the Epithelial Cell Basal Cortex through LL5α/β." *Journal of Cell Biology* 189(5): 901–17.

Kim, Natalie et al. 2008. "Lrp4 Is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK." *Cell* 135(2): 334–42.

Kishi, Masashi, Terrance T Kummer, Stephen J Eglen, and Joshua R Sanes. 2005. "LL5β: A Regulator of Postsynaptic Differentiation Identified in a Screen for Synaptically Enriched Transcripts at the Neuromuscular Junction." *The Journal of cell biology* 169(2): 355–66.

Lange, Y, and B V Ramos. 1983. "Analysis of the Distribution of Cholesterol in the Intact Cell." *Journal of Biological Chemistry* 258(24): 15130–34.

Lansbergen, Gideon et al. 2006. "CLASPs Attach Microtubule plus Ends to the Cell Cortex through a Complex with LL5β." *Developmental cell* 11(1): 21–32.

Lazaridis, Konstantinos, and Socrates J Tzartos. 2020. "Autoantibody Specificities in Myasthenia Gravis; Implications for Improved Diagnostics and Therapeutics." *Frontiers in Immunology* 11: 212.

Lichtman, Jeff W, and José-Angel Conchello. 2005. "Fluorescence Microscopy." *Nature methods* 2(12): 910.

Lombana, Adriana del Pilar López, and Hernán Hurtado Giraldo. 1993. "La Célula de Schwann." *Biomédica* 13(4): 207–17.

López-Valdés, Héctor E, and Jesús García-Colunga. 2003. "La Participación de Los Receptores de Acetilcolina Nicotínicos En Trastornos Del Sistema Nervioso Central." *Salud Mental* 26(3): 66–72.

Madhavan, Raghavan, and H Benjamin Peng. 2005. "Molecular Regulation of Postsynaptic Differentiation at the Neuromuscular Junction." *IUBMB life* 57(11): 719–30.

Marchand, Sophie et al. 2002. "Rapsyn Escorts the Nicotinic Acetylcholine Receptor along the Exocytic Pathway via Association with Lipid Rafts." *Journal of Neuroscience* 22(20): 8891–8901.

Marsh, Derek, and F J Barrantes. 1978. "Immobilized Lipid in Acetylcholine Receptor-Rich Membranes from Torpedo Marmorata." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(9): 4329–33.

Meijer, AEFH, and E A Elias. 1976. "The Value of Enzyme Histochemical Techniques in Classifying Fibre Types of Human Skeletal Muscle." *Histochemistry* 48(4): 257–67.

Montalván, Carlos Alberto Tavira et al. 2009. "Alcances y Perspectivas Del Cultivo de Células Animales En La Biotecnología Farmacéutica." *Revista mexicana de Ciencias farmacéuticas* 40(4): 35–46.

Neher, ERWIN, and J H Steinbach. 1978. "Local Anaesthetics Transiently Block Currents

through Single Acetylcholine-receptor Channels." *The Journal of Physiology* 277(1): 153–76.

Von Neumann, John. 1988. "John von Neumann." *American Mathematical Soc*.

Neumann, John Von, and John Von Neumann. 1957. "John von Neumann."

Nyholm, Thomas K M, Suat Özdirekcan, and J Antoinette Killian. 2007. "How Protein Transmembrane Segments Sense the Lipid Environment." *Biochemistry* 46(6): 1457–65.

Osamu, Shimomura. 2006. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. World Scientific.

Oury, Julien et al. 2019. "MACF1 Links Rapsyn to Microtubule-and Actin-Binding Proteins to Maintain Neuromuscular Synapses." *J Cell Biol*: jcb-201810023.

Paranavitane, Varuni et al. 2003. "LL5β Is a Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-Trisphosphate Sensor That Can Bind the Cytoskeletal Adaptor, γ-Filamin." *Journal of Biological Chemistry* 278(2): 1328–35.

Pasquale, Elena B. 2005. "Developmental Cell Biology: Eph Receptor Signalling Casts a Wide Net on Cell Behaviour." *Nature reviews Molecular cell biology* 6(6): 462.

Pediconi, Maria Filomena, Cristina Eugenia Gallegos, Elisa Beatriz de Los Santos, and Francisco Jose Barrantes. 2004. "Metabolic Cholesterol Depletion Hinders Cell-Surface Trafficking of the Nicotinic Acetylcholine Receptor." *Neuroscience* 128(2): 239–49.

Ramarao, Manjunath K, and Jonathan B Cohen. 1998. "Mechanism of Nicotinic Acetylcholine Receptor Cluster Formation by Rapsyn." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(7): 4007–12.

Riedl, Julia et al. 2008. "Lifeact: A Versatile Marker to Visualize F-Actin." *Nature methods* 5(7): 605–7. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18536722.

Roccamo, A M et al. 1999. "Cells Defective in Sphingolipids Biosynthesis Express Low Amounts of Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor." *European Journal of Neuroscience* 11(5): 1615–23.

Sanes, Joshua R, and Jeff W Lichtman. 1999. "Development of the Vertebrate Neuromuscular Junction." *Annual review of neuroscience* 22(1): 389–442.

Scott, Wayne, Jennifer Stevens, and Stuart A Binder–Macleod. 2001. "Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications." *Physical therapy* 81(11): 1810–16.

Shen, Jian-xin, and Jerrel L Yakel. 2009. "Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Calcium Signaling in the Nervous System." *Acta pharmacologica Sinica* 30(6): 673.

Stetzkowski-Marden, Françoise et al. 2006. "Agrin Elicits Membrane Lipid Condensation at Sites of Acetylcholine Receptor Clusters in C2C12 Myotubes." *Journal of lipid research* 47(10): 2121–33.

Takamori, Masaharu. 2017. "Synaptic Homeostasis and Its Immunological Disturbance in Neuromuscular Junction Disorders." *International journal of molecular sciences* 18(4): 896.

Unwin, Nigel. 2005. "Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4 Å Resolution." *Journal of molecular biology* 346(4): 967–89.

Weatherbee, Scott D, Kathryn V Anderson, and Lee A Niswander. 2006. "LDL-Receptor-Related Protein 4 Is Crucial for Formation of the Neuromuscular Junction." *Development* 133(24): 4993–5000.

Weisiger, Richard A. 1996. "Cytoplasmic Transport of Lipids: Role of Binding Proteins." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 115(3): 319–31.

Yakel, Jerrel L. 2013. "Cholinergic Receptors: Functional Role of Nicotinic ACh Receptors in Brain Circuits and Disease." *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 465(4): 441–50.

Yumoto, Norihiro, Natalie Kim, and Steven J Burden. 2012. "Lrp4 Is a Retrograde Signal for Presynaptic Differentiation at Neuromuscular Synapses." *Nature* 489(7416): 438.

Zhang, Bin et al. 2008. "LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin." *Neuron* 60(2): 285–97.

GLOSARIO

ADN| Acido Desoxiribonucleico

ACHE| Acetilcolinesterasa

BSA| Albúmina de suero bovino

CA^{2+}| Calcio

CHO-K1/A5| Células de ovario de Hámster Chino

CHOL| Colesterol

CO_2| Dióxido de Carbono

DMSO| Dimetilsulfóxido

DOK-7| Kinasas de tirosina-7

***E. COLI*|** *Escherichia coli*

EDTA| Ácido etilendiaminotetraacético

DGC| Componentes del complejo de la distrofina-glicoproteína

ERBB| Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ESR| Espin eléctrico

G| Gramo

GABAA| Acido gamma aminobutírico tipo A

G418| Antibiótico aminoglucósido

GFP| Proteína verde fluorescente

GLY| Glicina

H_2O| Agua

HAM'S F-12| Gibco® F-12 Nutrient Mixture

HCL| Ácido Clorhídrico

K^+| Catión Potasio

KCL| Cloruro de Potasio

KH_2PO_4| Fosfato monopotásico

LB| Medio Luria-Bertani

LGIC| Canales iónicos activos por Neurotransmisores

M| Molaridad

mL| Mililitro

mQ/MilliQ| Agua Ultra pura

mSeg| MiliSegundo

MuSK| Kinasa especifica de musculo

N-CAM| Molécula de adhesión de celulas neuronales

Na^+ | Sodio

Na_2HPO_4| Fosfato de disodio

nAChR| Receptor de Acetilcolina Nicotínico

NaCL| Cloruro de Sodio

$NaHCO_3$| Bicarbonato de Sodio

NaOH| Hidróxido de Sodio

nm| Nanómetro

ºC| Grados centígrados

PBS| Buffer Fosfato salino

PFA| Paraformaldehído

QDot's| Puntos Cuánticos

RPM| Revoluciones por minuto

SDS| Dodecilsulfato sódico

SFB| Suero fetal bovino

SM| Esfingomielina

SL| Esfingolipido

SN| Solución

SNC| Sistema Nervioso Central

SNP| Sistema Nervioso Periferico

TM| Transmembrana

TPR| Tetratricopeptídica

UNM| Union Neuromuscular

Wnts| Grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de la superficie receptora de dicha célula hasta su interior.

α-BTX| Alfa Bungarotoxina

µG| Microgramo

µL| Microlitro