

Fig 2.18: Evolución de la relación PL/Col en eritrocitos humanos y bovinos. Relación molar PL/Col de los lípidos en la fracción insoluble (DRM) de eritrocitos humanos y bovinos intactos, en función de la concentración de Triton. En el gráfico se muestran los valores experimentales y en líneas llenas los ajustes de cada conjunto de datos calculado como el cociente de las funciones de ajuste de los datos de PL y Col insoluble
IHE: eritrocitos humanos intactos
IBE: eritrocitos bovinos intactos

En este gráfico se puede observar que, para eritrocitos bovinos (los cuales poseen un alto contenido de SM) existe una primera etapa de la solubilización en donde la relación molar PL/Col en el material insoluble disminuye llegando a un mínimo a alrededor de 1,8% de Triton. Para concentraciones mayores, esta relación varía muy poco, manteniéndose alrededor de 1,1. En los eritrocitos humanos (que poseen un proporción de SM menor que los eritrocitos bovinos), la relación PL/Col disminuye más pronunciadamente llegando a un mínimo a una concentración de Triton de alrededor de 1,4%, a partir de la cual la relación PL/Col se mantiene aproximadamente constante, también en un valor próximo a 1,1.

Vale la pena destacar que el ajuste de los datos experimentales es bastante bueno sólo para valores bajos de concentración de Triton, debido a que al aumentar la cantidad de detergente los valores absolutos de PL y Col disminuyen rápidamente y el error en la determinación es mayor.

2.3.4 ROL DEL COLESTEROL EN LA SOLUBILIZACIÓN DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO BOVINO

Resulta interesante estudiar ahora el efecto de una reducción del colesterol sobre la solubilidad de la membrana del eritrocito bovino, rica en SM.

Al tratar a la membrana de la célula bovina con metil-beta ciclodextrina (M β CD) en las mismas condiciones que a los eritrocitos humanos, se obtiene un porcentaje de reducción de colesterol menor (35% en bovinos contra 45% en humanos). Este hecho indica de por sí una estructuración del colesterol en la bicapa lipídica diferente en ambas especies.

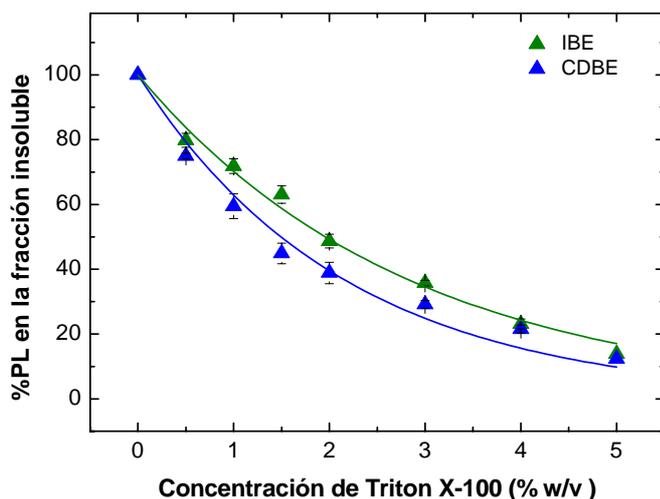


Fig 2.19: *Efecto de la reducción del Col/aumento de SM_L:* solubilización de PL de eritrocitos bovinos. Porcentaje de fosfolípidos (PL) en el material resistente a detergente (DRM) relativo al contenido de PL en la membrana original sometida a la acción del Triton X-100. Los eritrocitos bovinos intactos y los reducidos en su contenido de colesterol fueron incubados con diferentes concentraciones de Triton a 4°C por 30 min. El contenido de fósforo en cada muestra fue evaluado colorimétricamente y normalizado al contenido de fósforo de la membrana original correspondiente, el cual fue considerado como el 100%. Las líneas llenas corresponden a los mejores ajustes con la función exponencial, como se detalla en la siguiente sección. Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar.

IBE: eritrocitos bovinos intactos

CDBE: eritrocitos bovinos reducidos en colesterol.

En la *figura 2.19* se ve un ligero aumento en el efecto solubilizador del Triton sobre los PL de la membrana del eritrocito bovino reducida en colesterol en comparación con la membrana intacta. Para los eritrocitos reducidos en colesterol incubados con 1% de Triton, se recupera como material insoluble el 59% de los PL presentes en la membrana original (contra un 70% para los eritrocitos intactos) y para concentraciones de detergente tan altas como 5%, aun permanece insoluble el 12% de los PL. Los valores del parámetro de resistencia a detergente (D_0) para la membrana del eritrocito bovino intacto y reducido en colesterol son de 3,1(1) y 2,4(1) % (w/v), respectivamente.

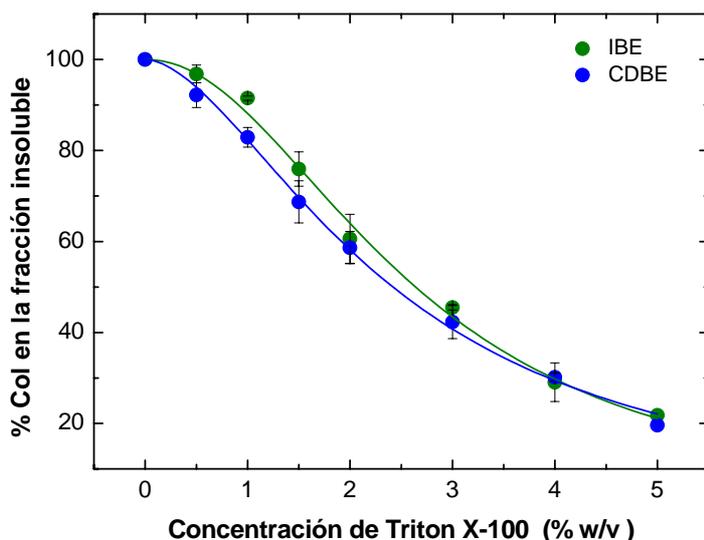


Fig 2.20: *Efecto de la reducción del Col/aumento de SM. II: solubilización de Col de eritrocitos bovinos.* Porcentaje de colesterol (Col) en el material resistente a detergente (DRM) obtenido a partir de la membrana eritrocitaria bovina intacta y de la reducida en su contenido de colesterol, en función de la concentración de Triton usada en el tratamiento de las muestras. El contenido de colesterol en la membrana original se consideró como el 100%. Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar. Las líneas continuas corresponden al mejor ajuste con la función de ajuste propuesta
 IBE: eritrocitos bovinos intactos
 CDBE: eritrocitos bovinos reducidos en colesterol

En la *figura 2.20* se muestra la curva de solubilización del colesterol para las dos membranas. Aquí es posible observar cómo una reducción previa del colesterol de la membrana hace que el colesterol remanente sea algo más susceptible a la acción del Triton. Los valores de los parámetros de ajuste obtenidos a partir de la *ec. 2.2* se muestran en la *Tabla 2.3*

	k	n
Eritrocitos bovinos intactos (IBE)	2,64(6)	2,07(9)
Eritrocitos bovinos reducidos en Col (CDBE)	2,42(4)	1,74(6)

Tabla 2.3: Valores de los parámetros de ajuste de los datos de solubilización de Col en eritrocitos bovinos de la **Fig 2.20** según la **ec. 2.2**.

2.3.5 ¿CUÁL ES LA RELACIÓN ENTRE LA SUSCEPTIBILIDAD AL DETERGENTE DE UNA MEMBRANA CON SU COMPOSICIÓN LIPÍDICA?

A partir de los resultados previos es posible llevar a cabo un análisis de la susceptibilidad de las diferentes membranas eritrocitarias a la acción del Triton X-100 y relacionarla con la composición lipídica de cada una de ellas. Tengamos en cuenta para este análisis que contamos con datos provenientes de cuatro sistemas de membrana (eritrocitos humanos intactos y reducidos en colesterol, eritrocitos bovinos intactos y reducidos en colesterol) con características funcionales y de composición proteica similares pero con diferencias importantes solo en las proporciones de SM y Col (y de PC). En la *Tabla 2.4* mostramos la composición molar porcentual aproximada de cada uno de los sistemas de membrana

calculada a partir de los datos en las referencias [Florin-Christensen y col., 2000; Voet y Voet, 1995].

	IBE	CDBE	IHE	CDHE
SM	28	33	16	20
Col	44	34	43	29
PC	3	3	17	21
PS	6	7	7	9
PI	1	2	1	1
PE	17	20	16	19
PA	1	1	1	2

Tabla 2.4: *Composición lipídica (mol%) de las membranas eritrocitarias estudiadas.* Los valores fueron calculados a partir de las referencias [Florin-Christensen y col., 2000; Voet y Voet, 1995] considerando masas molares aproximadas, y teniendo en cuenta el grado de reducción de Col de 45% en eritrocitos humanos y de 35% en eritrocitos bovinos (ver Materiales y métodos). Los glicolípidos (alrededor del 5% molar en ambas membranas) y otros lípidos minoritarios no fueron tenidos en cuenta por lo que el 100% corresponde a la suma de los lípidos detallados.

IBE: eritrocito bovino intacto, **CDBE:** eritrocito bovino reducido en Col, **IHE:** eritrocito humano intacto, **CDHE:** eritrocito humano reducido en Col. **Lípidos:** **SM,** esfingomielina; **Col,** colesterol; **PC,** fosfatidilcolina; **PS,** fosfatidilserina; **PI,** fosfatidilinositol; **PE,** fosfatidiletanolamina; **PA,** ácido fosfatídico.

En la *figura 2.21* se resumen los valores de D_0 para los cuatro sistemas de membrana. Se observa que los mayores valores de D_0 corresponden a los eritrocitos bovinos (que son los que poseen mayor proporción de SM) y que, para cada especie, la membrana del eritrocito intacto presenta un mayor valor de D_0 que la correspondiente membrana reducida en colesterol.

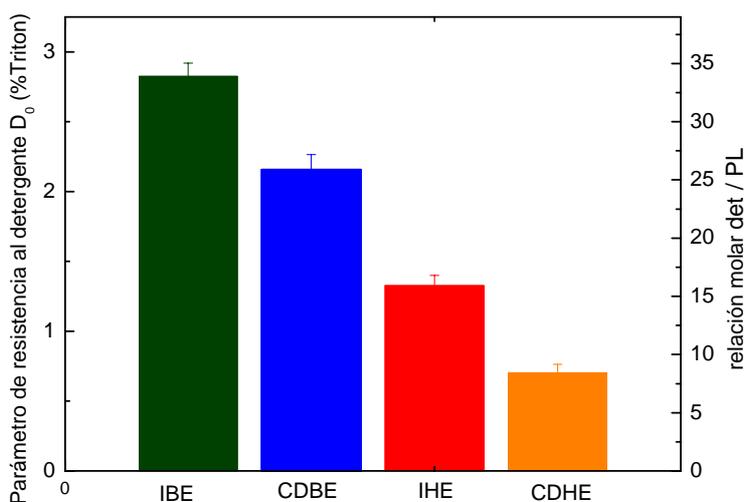


Fig. 2.21: Parámetro de resistencia al detergente D_0 , que indica la concentración de triton X-100 necesaria para solubilizar el 63% de los PL de la membrana original a 4° C. Los valores fueron obtenidos de los ajustes de las curvas de solubilización de PL en función de la concentración de detergente usando la ecuación 2.1. El eje derecho de la gráfica da los valores de D_0 en términos de relación molar detergente/lípido.

A partir de estos resultados, se podría esperar que la cantidad (molar) de SM y Col, lípidos que gobiernan el ordenamiento y el empaquetamiento lipídico, debieran influir en la solubilidad al detergente. Para probar esta hipótesis, el parámetro de resistencia a detergente D_0 fue graficado (figura 2.22) en función de los contenidos molares porcentuales de SM y Col tomados de los datos de la Tabla 2.4.

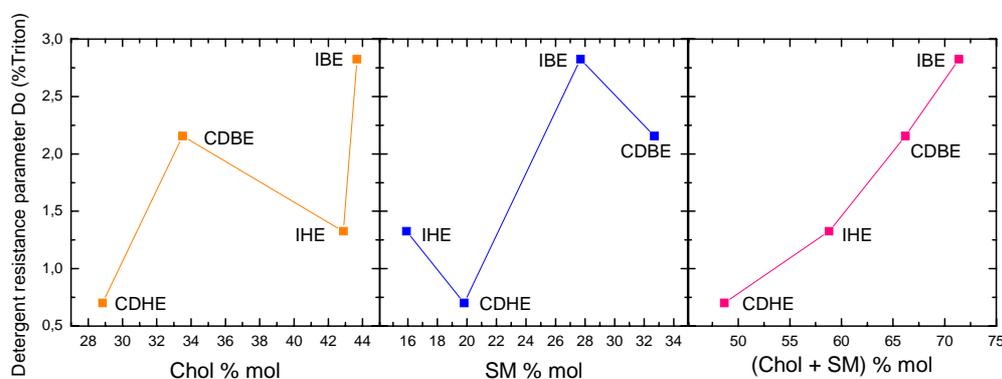


Fig. 2.22. Parámetro de resistencia al detergente D_0 graficado en función del contenido molar porcentual de colesterol (primer panel), esfingomielina (segundo panel), y del contenido conjunto colesterol-esfingomielina (tercer panel) en los cuatro sistemas de membrana eritrocitaria.

Puede observarse que D_0 no tiene una buena correlación con el contenido de Col (primer panel) ni con el de SM (segundo panel), pero cuando se lo grafica contra (Col+SM) (tercer panel), D_0 muestra un comportamiento regular, incrementándose monótonamente con la suma del contenido de ambos lípidos.

2.3.6 ¿CUÁL ES LA RELACIÓN ENTRE EL ORDENAMIENTO LIPÍDICO DE LA MEMBRANA Y SU COMPOSICIÓN LIPÍDICA?

A partir de estudios en sistemas modelo se puede esperar que la composición lipídica de la membrana determine en alguna manera la organización de los lípidos en una membrana biológica. Es por ello que decidimos analizar el ordenamiento lipídico de las membranas de eritrocitos humanos y bovinos, tanto intactos como reducidos en colesterol, ya que de esta manera tenemos cuatro sistemas naturales de membrana con cantidades variables de SM y Col, que son los lípidos que gobiernan el empaquetamiento lipídico [Simons y Vaz, 2004]. La determinación se realizó con espectroscopía de EPR mediante la incorporación de marcadores de espín liposolubles que pueden sentir el orden dinámico a diferentes niveles de la bicapa lipídica.

Se obtuvieron espectros de EPR para los cuatro sistemas de membrana antes mencionados. A partir de los espectros se obtuvieron los parámetros hiperfinos A_{MAX} (por cuestiones experimentales la determinación del parámetro de orden aparente en eritrocitos bovinos es imprecisa, y A_{MAX} permite igualmente determinar el grado de ordenamiento)

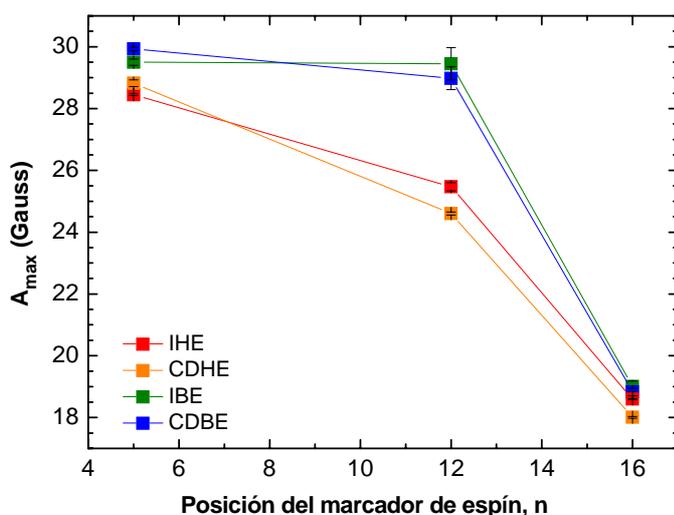


Fig. 2.23: Gradiente de flexibilidad de los cuatro sistemas de membrana. Parámetro hiperfino A_{max} calculado a partir de los espectros de EPR de los marcadores de espín 5-, 12-, y 16-SASL en las membranas eritrocitarias originales, graficados en función de la posición del radical nitróxido a lo largo de la cadena de ácido esteárico (profundidad del marcador de espín dentro de la bicapa). Valores mayores de A_{max} indican mayor orden/rigidez de las cadenas acílicas a cada nivel de profundidad en la bicapa

IHE: eritrocito humano intacto, **CDHE:** eritrocito humano reducido en Col, **IBE:** eritrocito bovino intacto, **CDBE:** eritrocito bovino reducido en Col.

La *figura 2.23* muestra el “gradiente de flexibilidad”, i.e., el parámetro hiperfino A_{MAX} calculado a partir de los espectros de EPR, graficado en función de la posición del radical nitróxido en la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico (profundidad de la marca de espín en la bicapa). Los valores posibles de A_{MAX} varían entre el límite isotrópico de alrededor de 16 G, esperado para un marcador de espín llevando a cabo una reorientación rápida e irrestricta en un medio isotrópico (completamente desordenado), y el valor límite de alrededor de 32 G [Griffith y Jost, 1976], correspondiente al marcador de espín inmovilizado. Así, el gráfico de la *figura 2.23* constituye un perfil de profundidad de la movilidad de la cadena lipídica hacia el interior de la bicapa (menor A_{MAX} indica mayor flexibilidad). El gradiente de flexibilidad creciente hacia el grupo metilo terminal, debido a la acumulación de isomerizaciones trans-gauche, es un claro indicador de estructuras tipo bicapa [Cassera y col., 2002; Veiga y col., 2001].

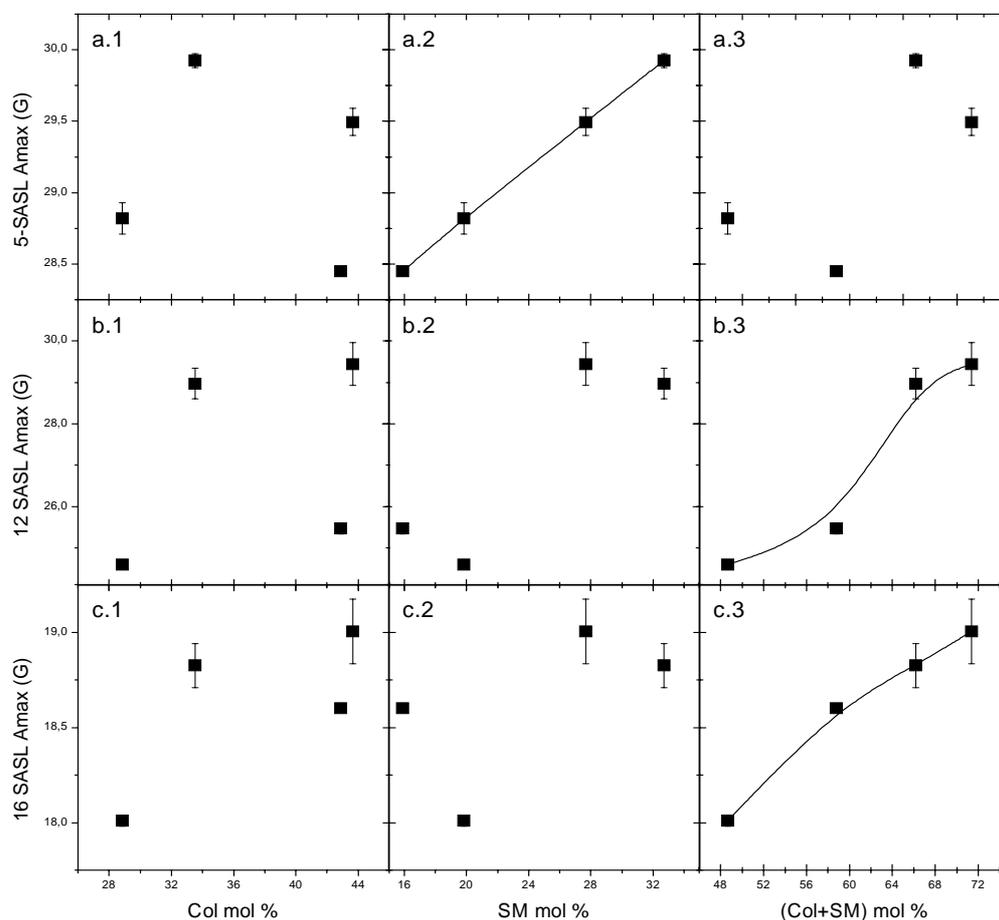


Fig. 2.24: Parámetro hiperfino A_{MAX} , indicativo del orden dinámico a diferentes profundidades de la bicapa (5-SASL, cercano a la zona polar; 12- y 16- cercanos al centro hidrofóbico) graficado en función del contenido molar porcentual de Col (paneles 1), SM (paneles 2), y del contenido conjunto de Col+SM (paneles 3) en los cuatro sistemas de membrana eritrocitaria. Se incluyen líneas de unión de los puntos experimentales para ayudar a la vista sólo en los casos donde se observa una tendencia definida de variación.

Finalmente, a partir de los datos mostrados en la *Tabla 2.4* y de los datos de la *figura 2.23* podemos analizar de manera completa la relación que existe entre el ordenamiento lipídico a distintas profundidades de la bicapa lipídica (evaluado a través del parámetro hiperfino A_{MAX} de los n-SASL) y la composición lipídica para los cuatro sistemas de membrana estudiados.

En la *figura 2.24* se observa una correlación positiva entre el A_{MAX} y la cantidad de SM en la zona más cercana a las cabezas polares de la membrana (*panel a.2*) mientras que hacia el centro de la membrana el ordenamiento está relacionado con la suma de los contenidos de SM y Col.

2.3.7 ¿ESTÁN RELACIONADOS EL ORDENAMIENTO DE LA BICAPA LIPÍDICA Y LA RESISTENCIA AL TRITON?

Anteriormente mostramos como el parámetro de resistencia a detergente D_0 de membranas eritrocitarias depende de la composición lipídica. Mostramos que los sistemas de membrana que poseen mayores contenidos conjuntos de Col y de SM son los que presentan una mayor resistencia al detergente. Por otra parte vimos, mediante EPR, que la composición lipídica también afecta el grado de empaquetamiento de la bicapa lipídica.

Nos proponemos ahora investigar la relación entre el ordenamiento lipídico y la susceptibilidad al Triton X-100.

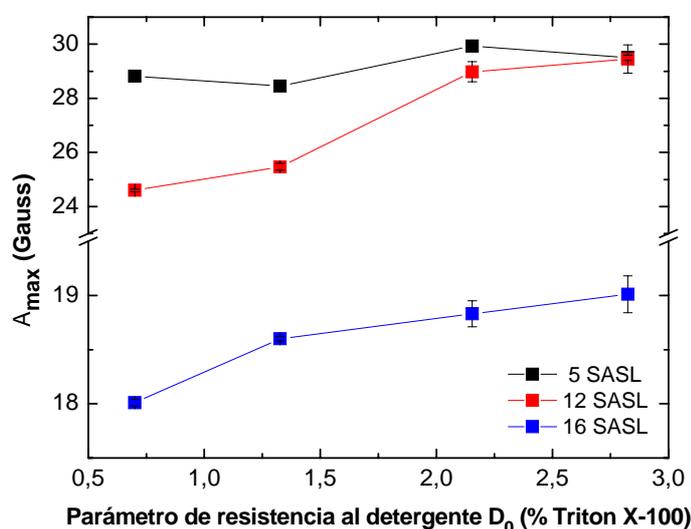


Fig. 2.25: Relación entre ordenamiento lipídico y resistencia al detergente. Parámetro hiperfino A_{MAX} , indicativo del orden/rigidez de las cadenas acílicas detectado por los marcadores de espín a diferentes profundidades de la bicapa lipídica graficado en función del parámetro de resistencia al detergente D_0 de cada sistema de membrana. Notar la correlación positiva entre A_{MAX} y D_0 para los marcadores de espín que sensan la zona más cercana al centro hidrofóbico de la bicapa (12- y 16-SASL). El 5-SASL, en cambio, no muestra este comportamiento.

En la *figura 2.25* observamos que existe una clara correlación positiva entre el parámetro A_{MAX} para los marcadores 12 y 16 SASL y el D_0 . Esto nos está indicando que, independientemente de como varíe la composición lipídica, el ordenamiento lipídico en la zona hidrofóbica de la membrana es un buen parámetro para predecir el comportamiento de

las membranas eritrocitarias frente al Triton X-100. En cambio, no se evidencia correlación entre el ordenamiento lipídico en la región de la membrana más próxima a las cabezas polares (marcador 5 SASL) con la resistencia al detergente.

2.3.8 ¿CUÁL ES LA NATURALEZA DE LAS DRMs?

a) ¿Que sucede con el ordenamiento lipídico en las DRMs?

Cabe preguntarse ahora la naturaleza del material insoluble obtenido mediante el tratamiento con diferentes concentraciones de Triton. Para ello realizamos un estudio de las propiedades de ordenamiento lipídico de las fracciones resistentes a detergente obtenidas a partir de eritrocitos bovinos intactos (el sistema de membrana que presenta mayor resistencia al detergente) Incorporamos los marcadores de espín liposolubles a estas muestras y obtuvimos los respectivos espectros de EPR.



Fig. 2.26. Ordenamiento lipídico en DRMs de eritrocitos bovinos. I: espectros de EPR. Espectros de EPR de los marcadores liposolubles incorporados a las membranas de eritrocitos humanos intactos (IHE) y bovinos intactos (IBE) y del material insoluble al detergente (DRM) obtenido a partir de los IBE con la concentración de Triton X-100 indicada. Espectros tomados a 25°C, frecuencia de microondas de 9.75GHz, barrido de campo magnético de 100G. Los espectros están normalizados en amplitud para permitir comparaciones entre las diferentes muestras. Los espectros correspondientes a 2% y 3% de Triton no se muestran en la figura para lograr una mayor claridad. Grupo superior: 5-SASL (radical nitróxido en el carbono 5, cercano a las cabezas polares); grupo intermedio: 12-SASL (radical nitróxido en el carbono 12); grupo inferior: 16-SASL (radical nitróxido en el carbono 16, el más cercano al centro de la bicapa). Las líneas señalan las características del espectro cuya posición en campo magnético permite calcular el parámetro hiperfino A_{MAX} , indicativo del orden/rigidez de las cadenas acílicas. Las flechas en el espectro de 6% de Triton y 16-SASL señalan estructuras espectrales relacionadas con lípidos inmovilizados.

A partir de los espectros de la *figura 2.26* se obtiene el gradiente de flexibilidad para cada una de las muestras, graficando el parámetro hiperfino A_{MAX} en función de la posición del anillo doxilo en la cadena de ácido esteárico.

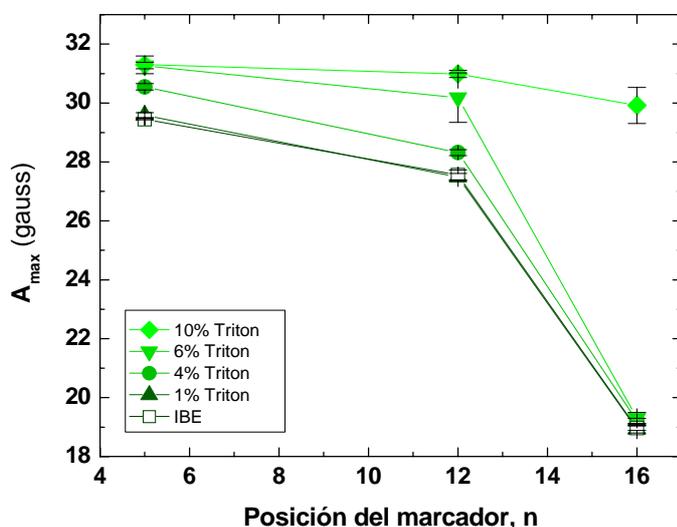


Fig. 2.27. Ordenamiento lipídico en DRMs de eritrocitos bovinos. II: Gradiente de flexibilidad. Parámetros hiperfinos A_{MAX} obtenidos de los espectros de la **Fig 2.26**, en función de la posición n del radical nitróxido en la cadena de ácido esteárico. Los datos corresponden a eritrocitos bovinos intactos (**IBE**) y al material resistente al detergente (DRM) obtenido luego de la incubación de los eritrocitos bovinos con Triton X-100 en las concentraciones indicadas. Los datos correspondientes a 2% y 3% de Triton no se muestran en la figura para lograr una mayor claridad, pero presentan valores intermedios entre 1% y 4%. Una disminución del valor de A_{MAX} corresponde a una disminución de las restricciones de la movilidad de los lípidos, indicando un incremento de la fluidez. Notar que los datos correspondientes a eritrocitos bovinos intactos no pueden distinguirse de los correspondientes al material insoluble obtenido con 1% de Triton. Notar también que el gradiente de flexibilidad se aplana para el material insoluble obtenido con 10% de Triton, indicando un entorno de similar rigidez para los 3 marcadores (las barras indican \pm sd, $n=3$)

Como se ve en la *figura 2.27*, el material insoluble extraído con Triton 1% muestra valores de A_{MAX} coincidentes con los del eritrocito bovino. Al aumentar la concentración de Triton, hasta 6%, el valor de A_{MAX} aumenta para los tres marcadores, indicando un incremento de las restricciones en la movilidad (menor fluidez) a todas las profundidades, y mantiene la forma característica de un gradiente de flexibilidad correspondiente a un medioambiente de bicapa (los valores de A_{MAX} correspondientes a 2% y 3% de Triton no se incluyen por claridad, pero son intermedios entre los de 1% y 4% de Triton). Sin embargo, para 10% de Triton, el gradiente de flexibilidad está prácticamente ausente, y el valor de A_{MAX} es casi constante (y cercano a su valor máximo) en los tres niveles detectados por los marcadores de espín. Este hecho indica que los marcadores de espín en el material insoluble obtenido con 10% de Triton no se encuentran en un medioambiente de bicapa.

El origen de esta clase de espectro, y la desaparición del gradiente de flexibilidad para las DRMs obtenidas con elevadas concentraciones de Triton será discutido en la siguiente sección.

b) Evidencia de un entorno lipídico inmovilizado en el material insoluble. Análisis espectral

Los espectros de EPR del material insoluble obtenido con concentraciones crecientes de Triton muestran evidencias de la coexistencia de un medioambiente correspondiente a una bicapa más o menos fluida y de otro altamente inmovilizado (señalado con flechas en la *figura.2.26*, a los lados del espectro de 16-SASL de las muestras obtenidas con 6% de Triton). El valor de A_{MAX} en el espectro de 16-SASL de las DRM obtenidas con 10% de Triton, cercano al límite rígido, está indicando que todo el marcador de espín se encuentra prácticamente inmovilizado.

Con el objetivo de estimar la proporción de los diferentes componentes en el espectro compuesto obtenido a partir del 16-SASL en la muestra de 6% de Triton, adoptamos las siguientes suposiciones: (a) el espectro de material insoluble obtenido con 10% de Triton corresponde a un 100% de la población de marcadores de espín fuertemente inmovilizados (probablemente en un “cinturón” lipídico alrededor de los dominios hidrofóbicos de las proteínas de membrana); (b) el espectro de material insoluble obtenido con 2% de Triton corresponde al 100% del marcador de espín en un medio ambiente de tipo membrana y con un grado de ordenamiento lipídico típico de la bicapa de las DRMs (esta suposición está justificada en el hecho de que no se observa, en este caso, ninguna estructura adicional, y la cantidad de lípidos no solubilizados en esta muestra es más de 20 veces mayor que la de la muestra de 6% de Triton, como puede verse en la *figura 2.16*); (c) el espectro de material insoluble obtenido con 6% de Triton contiene contribuciones de ambos componentes; (d) el marcador de espín se distribuye con igual probabilidad en ambos componentes. Los resultados de esta descomposición se muestran en la *figura 2.28*.

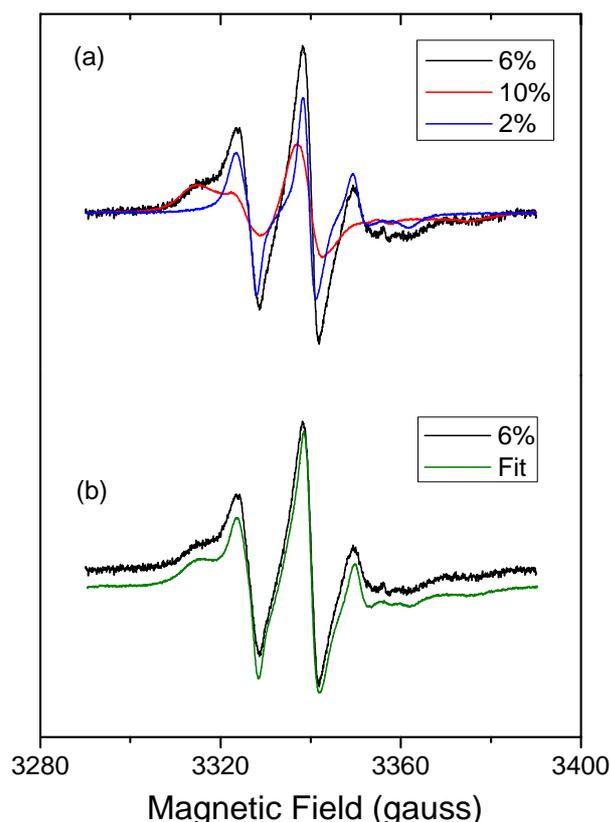


Fig. 2.28. Coexistencia de entorno de tipo membrana y de lípidos inmovilizados en el material insoluble. Análisis del espectro de EPR compuesto de 16-SASL en el material insoluble obtenido con 6% de Triton. Se ha asumido que el espectro de 10 % de Triton corresponde sólo a lípidos inmovilizados y el espectro de 2% de Triton corresponde sólo a lípidos en un entorno de membrana. Se muestra que el espectro de 6% se puede reproducir por una combinación lineal de los espectros antes mencionados. **(a)** Espectros normalizados (con el valor de la doble integral, proporcional al número de espines). El espectro correspondiente a 2% de Triton (fluido) fue afectado por un factor de 0,3 y el espectro de 10% (inmovilizado) fue afectado por un factor de 0,7. **(b)** suma de los espectros ponderados de 2 y 10% (verde) en comparación con el espectro de 6% de Triton (negro).

Teniendo en cuenta las suposiciones antes mencionadas, la suma espectral de la doble integral de los espectros nos permitió estimar que en el pellet insoluble obtenido con 6% de Triton, el 70% de los lípidos se encuentran inmovilizados (probablemente en los límites de las proteínas integrales de membrana [Marsh y Horvath, 1998]), mientras que el restante 30% corresponde a lípidos en un medioambiente de membrana.

c) Aislamiento de DRMs mediante gradiente de densidad. Estudio del ordenamiento lipídico

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con nuestro método de aislamiento de DRMs por microcentrifugación con los obtenidos mediante el método habitualmente usado en la literatura, se realizó una serie de ensayos adicionales donde las DRMs obtenidas a través del tratamiento con detergente fueron aisladas mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad (Protocolo II, ver *sección 2.2.5*).

En un primer ensayo se sometió a la acción de Triton X-100 un paquete de eritrocitos bovinos en condiciones similares a las utilizadas en ensayos previos. Luego de la incubación con detergente se sometió a la mezcla a la separación por gradiente de densidad mediante ultracentrifugación de equilibrio (ver *sección 2.2.5*). En el tubo de ultracentrífu-

ga se pudo observar una banda blanquecina muy tenue (o un par de bandas según el caso) flotando a una densidad correspondiente a la parte inferior de la región de 35% de sacarosa, mayor a la correspondiente a DRMs reportada en la literatura [Civenni y col., 1998; Lauer y col., 2000; Salzer y Prohaska, 2001]. Esta fracción, denominada DRM-H (por heavy, pesado), fue separada del resto y se la marcó con 16-SASL para investigar el ordenamiento lipídico. Sin embargo, la cantidad de muestra obtenida fue muy escasa y la señal de EPR resultó casi indetectable.

En base a trabajos de otros autores [Ciana y col., 2005], se supuso que la alta densidad de estas DRMs se debía a la presencia de proteínas del citoesqueleto. Existen también algunos reportes [Luna y col., 2004;] que las DRMs obtenidas a partir de células altamente móviles (como los leucocitos), bajo ciertas condiciones experimentales de obtención, permanecen asociadas a elementos proteicos del citoesqueleto (fodrina y supervillina).

En la literatura existen numerosos reportes acerca de la posibilidad de alterar la estabilidad en las interacciones entre proteínas que mantienen unida la red del citoesqueleto cortical del eritrocito utilizando diversos agentes fisicoquímicos, tales como un fuerte aumento o una marcada disminución de la fuerza iónica, el aumento del pH, etc [Bennett y Lambert, 1991, Lange y col., 1982]. Un agente desestabilizante es el carbonato, que por medio de un aumento de la fuerza iónica y el pH logra debilitar las uniones entre las proteínas transmembrana de anclaje con las proteínas periféricas del citoesqueleto [Song y col., 1996; Nagao y col., 2002].

En función de lo anterior, llevamos a cabo la separación por gradiente de densidad de las DRMs en presencia de una solución concentrada de carbonato de sodio. En esta oportunidad, la banda correspondiente a las DRMs apareció flotando en la zona que ocupaba originalmente la interfase entre 5 y 35% de sacarosa (ver materiales y métodos), zona reportada usualmente en la literatura [Murphy y col., 2004; Nagao y col., 2002]. Esta fracción, denominada DRM-L (por *light*, liviana), tuvo un rendimiento mucho mayor que en el caso anterior. Fue marcada con 16-SASL y se midió por EPR. En la *figura 2.29* se muestran el espectro de EPR de la muestra de DRM aislada mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad, comparada con la muestra de DRM obtenida por microcentrifugación.

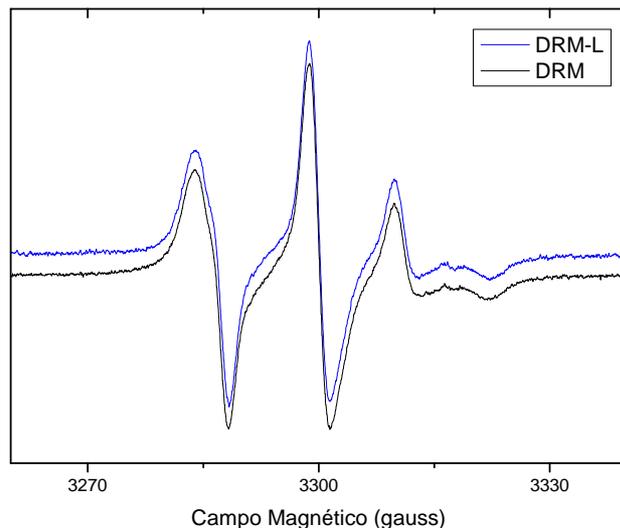


Fig 2.29: Espectros de EPR del marcador de espín 16 SASL incorporado a la muestra de DRM-L obtenida de eritrocitos bovinos intactos con 1% de Triton X-100 y aislada por separación en gradiente de densidad, previo tratamiento con Na_2CO_3 (azul). En el gráfico se muestra también (negro) el espectro correspondiente a DRM obtenida en las mismas condiciones pero aislada por microcentrifugación, mostrado anteriormente en la **Fig 2.26**. T= 25°C

En este caso se observa una clara similitud entre los espectros obtenidos a partir de las dos muestras. Esto indica que el ordenamiento lipídico en las DRMs obtenidas con 1% de Triton y aisladas por microcentrifugación es similar al de aquellas aisladas por separación en gradiente de densidad, previa extracción del citoesqueleto con carbonato de sodio.

Por otra parte, también se investigó el material aislado en la fracción más densa del gradiente de sacarosa (pellet de la ultracentrifugación). A esta fracción también se le incorporó el marcador de espín 16-SASL y se obtuvo su espectro de EPR. Este espectro presenta algunas similitudes con el espectro de 16-SASL en las DRM obtenidas con 10% de Triton y aisladas por microcentrifugación. Ambos espectros se muestran en la *figura 2.30*.

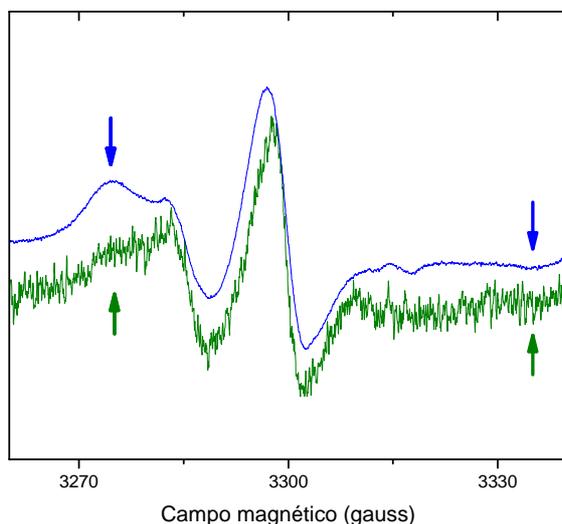


Fig 2.30: espectros de EPR (normalizados) de 16-SASL incorporado a la fracción de la membrana eritrocitaria bovina insoluble a 10% de Triton aislada por microcentrifugación (azul) y a la fracción de la membrana eritrocitaria bovina tratada con 1% de Triton y aislada en el fondo de los tubos de ultracentrifugación en gradiente de densidad (verde). Pese a las diferencias en el ancho de línea debidas a diferente amplitud de modulación (2,5G (verde) y 4,0G (azul)), se observa la presencia de componentes inmovilizadas en los mismos valores de campo magnético (señalados con flechas para cada espectro).

En conjunto, los resultados expuestos están mostrando que, luego de la extracción de la membrana del eritrocito con sólo 1% de Triton, y la posterior separación por gradiente de densidad (método "estándar" de obtención de DRM), se obtiene una fracción rica en lípidos, de baja densidad, que presenta un grado de ordenamiento similar a las DRMs

aisladas por microcentrifugación en las mismas condiciones; y en la zona de máxima densidad del gradiente, se obtiene una fracción que presenta estructuras muy ordenadas similares a las obtenidas en el pellet de microcentrifugación al tratar los eritrocitos con grandes concentraciones de Triton (10%).

También se realizaron ensayos de obtención de DRM por separación en gradiente de densidad, utilizando mayores concentraciones de Triton (2, 6 y 10% w/v) junto con el tratamiento con Na_2CO_3 para desestabilizar el citoesqueleto. Sin embargo en este caso no se obtuvieron cantidades significativas de material en las zonas de baja densidad (correspondiente a las DRM-L) ni en la de densidad media (correspondiente a las DRM-H). Vale la pena recordar que con el método de microcentrifugación (Protocolo I), todavía es posible aislar estructuras de membrana en el material insoluble obtenido utilizando concentraciones de Triton de hasta 6% (ver *figuras 2.26 y 2.27*).

2.4 Discusión

2.4.1 COMPOSICIÓN Y ORDENAMIENTO LIPÍDICO DE LAS DRMs DE ERITROCITOS HUMANOS

El patrón proteico correspondiente a las DRMs obtenidas a partir de eritrocitos humanos es bastante complejo, como puede observarse en las figuras de la *sección 2.3.1*, y a primera vista resulta difícil detectar diferencias con la membrana original.

Al comparar los geles correspondientes a las DRMs con los de la membrana eritrocitaria completa, se observa en las DRMs la desaparición de las bandas tentativamente asignadas a la GAPDH (proteína periférica) y la PAS-3 (glicoforina B, proteína integral). Ninguna de estas dos proteínas ha sido reportada como marcadora de rafts. Por otro lado, también se observa en los geles de SDS-PAGE de muestras de DRM la presencia de una serie de bandas polipeptídicas (*figura 2.6*) tentativamente asignables a actina, banda 4.1 y espectrina, todas ellas constituyentes del citoesqueleto cortical del eritrocito, pero reportadas en algunos trabajos como proteínas solubles en Triton X-100 [Samuel y col., 2001; Murphy y col., 2004]. Esto se explica teniendo en cuenta que en nuestro proceso de obtención de DRMs, la fracción insoluble de membrana se aísla mediante un proceso de microcentrifugación, por lo que en esa fracción también se encuentran proteínas que conforman el citoesqueleto. Vale la pena mencionar el hecho de que estas proteínas sólo pueden aislarse mediante microcentrifugación si se encuentran formando el citoesqueleto o asociadas a vesículas insolubles, ya que si se encontraran en solución como monómeros o pequeños oligómeros, se aislarían en la fracción sobrenadante de la centrifugación. Este hecho confirma que el tratamiento con detergente, sin ningún otro tipo de manipulación extra como las utilizadas en algunos trabajos (por ejemplo el tratamiento con soluciones hipotónicas, hipertónicas y de alto pH, o el estrés mecánico), no interfiere en las interacciones que mantienen unidas a las proteínas del citoesqueleto [Yu y col., 1973; Svoboda y col., 1992]. Por otro lado, la composición y características de las DRMs obtenidas pueden ser afectadas si se utilizan algunos de estos procedimientos adicionales al del tratamiento con detergente [Ciana y col., 2005; Luna y col., 2004].

Se debe recordar que para todas las experiencias de caracterización del patrón proteico se utilizó únicamente la técnica de electroforesis SDS-PAGE. Resultaría muy adecuado poder confirmar los resultados obtenidos mediante otras técnicas de identificación, como por ejemplo el Western Blotting.

En cuanto a la composición lipídica, observamos que las DRMs de eritrocitos humanos presentan un enriquecimiento en esfingomielinina y colesterol, en relación a la

membrana original. El aumento del contenido relativo de estos lípidos se ve acompañado con un aumento en el ordenamiento lipídico detectado mediante espectroscopía de EPR (*figura 2.9*).

2.4.2 ROL DEL COLESTEROL EN LA SOLUBILIDAD DE LAS MEMBRANAS

En la bibliografía existe un amplio acuerdo acerca de que el colesterol es un componente fundamental de los dominios lipídicos ordenados de la membrana, y que una reducción del contenido de colesterol provoca la disgregación de estos dominios [Xavier y col., 1998; Ilangumaran y col., 1999; Vereb y col., 2000; Matkó y Szöllosi, 2002].

A partir de las curvas de solubilidad (*figuras 2.12 y 2.13*) es posible determinar que la membrana del eritrocito humano reducido en colesterol presenta una mayor tendencia a la solubilización por el Triton que la membrana del eritrocito intacto (los ensayos de solubilidad en eritrocitos bovinos intactos y reducidos en colesterol muestran la misma tendencia, ver más adelante). Sin embargo, luego del tratamiento con M β CD para reducir el contenido de colesterol de la membrana original, aún es posible aislar una fracción insoluble que contiene cantidades significativas de PL y Col cuando se utiliza 1% de Triton en la obtención de DRMs (la concentración utilizada en los protocolos estándares que generalmente reportan la disgregación de las DRMs luego de la reducción de colesterol). Estos resultados están en línea con trabajos anteriores [Rivas y Gennaro, 2003] que muestran que, más allá de lo que ocurre con la asociación de las proteínas a las DRMs, aún es posible aislar vesículas de lípidos insolubles luego de la reducción parcial del contenido de colesterol de la membrana eritrocitaria.

2.4.3 ROL DE LA ESFINGOMIELINA EN LA SOLUBILIDAD DE LAS MEMBRANAS

Para estudiar el papel que juega la SM en la susceptibilidad de la membrana al detergente se utilizaron para los ensayos de solubilización eritrocitos bovinos, los cuales presentan una composición lipídica muy parecida a la de los eritrocitos humanos (ver *figura 2.14*), excepto por el alto contenido de SM (y un bajo contenido de PC). Las curvas de solubilización de eritrocitos bovinos (*figuras 2.16 y 2.17*) indican que la membrana de estas células posee una alta resistencia a la acción del detergente, y muestran que para 1% de Triton (relación molar detergente/lípidos aproximadamente igual a 12) permanece insoluble el 72% de los PL y el 90% del colesterol de la membrana. Inclusive, a concentraciones de Triton tan altas como 5%, la cantidad de lípidos recuperada en la fracción insoluble es considerable.

También se estudió el efecto conjunto de una reducción de Col en estos eritrocitos con alto contenido de SM. El tratamiento con M β CD realizado en las mismas condiciones que con los eritrocitos humanos produjo una reducción de sólo el 35% del colesterol de la membrana original. Las curvas de solubilización (*figuras 2.19 y 2.20*) muestran una susceptibilidad al detergente de esta membrana mayor a la del eritrocito bovino intacto, pero menor que la del eritrocito humano.

2.4.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS PROCESOS DE SOLUBILIZACIÓN

Utilizando eritrocitos humanos y bovinos, tanto intactos como reducidos en colesterol se pudo contar con cuatro sistemas de membranas biológicas con diferentes proporciones de SM y Col siendo el resto de los lípidos (salvo la PC) similares para todos. A partir de las curvas de lípido remanente en la fracción insoluble en función de la concentración de Triton se hicieron ajustes experimentales que permitieron cuantificar la susceptibilidad de cada uno de los sistemas frente al detergente. El parámetro de ajuste D_0 (parámetro de resistencia a detergente) resulta particularmente útil para cuantificar la resistencia a la solubilización de los fosfolípidos (componente mayoritario de la membrana). Los valores más altos de D_0 corresponden a membranas que necesitan más detergente para ser solubilizadas. El parámetro k corresponde a la concentración de Triton que solubiliza el 50% del contenido original de colesterol de la membrana y también permite cuantificar la resistencia de la membrana al detergente. A continuación se resumen los valores de estos parámetros para cada sistema.

	D_0 (g%)	k (g%)
Eritrocitos bovinos intactos (IBE)	2,82(9)	2,64(6)
Eritrocitos bovinos reducidos en Col (CDBE)	2,2(1)	2,42(4)
Eritrocitos humanos intactos (IHE)	1,33(7)	1,53(4)
Eritrocitos humanos reducidos en Col (CDHE)	0,70(6)	1,08(7)

2.4.5 ¿CUÁL ES LA RELACIÓN ENTRE LA SUSCEPTIBILIDAD AL DETERGENTE DE UNA MEMBRANA CON SU COMPOSICIÓN LIPÍDICA?

El comportamiento característico de cada sistema de membrana sometido a la acción del Triton está reflejado por las notables diferencias de los valores de D_0 (y de k), que disminuye en la secuencia IBE>CDBE>IHE>CDHE. Se podría esperar que la cantidad (molar) de SM y Col, que son los lípidos que gobiernan el ordenamiento y el empaquetamiento lipídico [Simons y Vaz, 2004], debieran influir en la solubilidad al detergente.

Para probar esta hipótesis, el parámetro de resistencia a detergente D_0 fue graficado en función de los contenidos molares porcentuales de SM y Col tomados de los datos de la *Tabla 2.4* (*figura 2.22*). Pudimos observar que D_0 no presenta una correlación significativa con el contenido de cada uno de los lípidos por separado, pero muestra un incremento monótono cuando se lo grafica contra el contenido conjunto de los dos lípidos (Col+SM) (tercer panel).

Con el objetivo de llevar a cabo una comparación de estos resultados experimentales con el comportamiento de sistemas modelo, consideraremos las relaciones aproximadas detergente/lípido (R) correspondientes a cada uno de los valores de D_0 que aparecen en el eje derecho de la *figura.2.21* (como hemos estado trabajando con concentraciones de detergente mucho más altas que la concentración micelar crítica del Triton X-100, que es de 0,25 mM o 0.02%, R coincide prácticamente con la concentración “efectiva” de Triton [Lichtenberg, 1985]). Podemos ver que son necesarias cerca de 8 moléculas de Triton por molécula de lípido para solubilizar el 63% de los PL de la membrana del eritrocito humano reducido en colesterol, mientras que son necesarias 34 moléculas de Triton por lípido para la membrana del eritrocito bovino intacto. En comparación, una relación detergente/lípido de $R=2$ provoca la completa solubilización de liposomas de PC de huevo a 4 °C [Sot y col., 2002], pero los sistemas modelo que contienen SM y Col tienen un comportamiento muy diferente. Sot y colaboradores [Sot y col., 2002] han estudiado mezclas de PC de huevo/SM/Col en proporciones N:1:1, mostrando que son necesarios valores muy altos de R para solubilizar las vesículas cuando $N < 3$.

Una estimación aproximada de la relación molar glicerofosfolípidos(GPL)/SM/Col en los sistemas de membrana reducidos en colesterol (bovina y humana), realizada en base a los datos de la *Tabla 2.4*, indican que los contenidos molares de SM y Col son similares y la relación GPL/SM (N) está entre 1 y 2. Así, la composición lipídica de estas membranas se asemeja a la de los sistemas modelo estudiados en [Sot y col., 2002], y los mecanismos que gobiernan la resistencia a detergente podrían estar relacionados con interacciones selectivas entre SM y Col. La membrana de los eritrocitos bovinos reducidos en colesterol presenta una proporción molar de GPL/SM/Col de 1,1:1,0:1,0 y un D_0 de 2,2%(w/v) (con un R correspondiente a 26 moléculas de detergente por molécula de lípido), mientras que la membrana de los eritrocitos humanos reducidos en colesterol posee una relación molar de GPL/SM/Col de 1,9:1,0:1,1 y un D_0 de 0,70 %(w/v) ($R = 8$). Vemos entonces que, en concordancia con el trabajo de Sot y colaboradores, un aumento de la proporción de GPL conduce a una mayor susceptibilidad al detergente. Por otra parte, los sistemas de membrana intactos poseen una relación molar de Col/SM de entre 1,6 a 2,0 por lo que el contenido extra de colesterol puede ser la causa de la mayor resistencia de estas membranas. El D_0 de bovinos es de 2,82 %, con 1,1 moles de GPL

por mol de SM, y el D_0 de humanos de 1,33% con 2,6 moles de GPL por mol de SM. En este caso también vemos como un incremento de la cantidad de GPL aumenta la susceptibilidad al detergente.

Sot y colaboradores concluyen que es necesaria la presencia conjunta de SM y Col para disminuir la solubilidad de sistemas modelo que contienen PC de huevo, y muestran evidencias a partir de FTIR de la formación de puentes de hidrógeno entre la SM y el Col, cuyo número se reduce al incrementarse la cantidad de PC [Sot y col., 2002]. Cálculos de dinámica molecular [Aittoniemi y col., 2007] también muestran una interacción preferencial entre Col y SM, pero se sugiere que las interacciones responsables de este hecho no son los enlaces de hidrógeno. En los sistemas que hemos estudiado, que son membranas celulares con alto grado de complejidad, y que contienen proteínas, también observamos que la resistencia al detergente está relacionada al contenido conjunto de SM y Col, por lo que los procesos de solubilización en este caso parecen regirse por mecanismos similares a los de sistemas modelo simples.

2.4.6 ¿CUÁL ES LA RELACIÓN ENTRE EL ORDENAMIENTO LIPÍDICO DE LA MEMBRANA Y SU COMPOSICIÓN LIPÍDICA?

En la *figura 2.23* se observa que los marcadores de espín en la membrana del eritrocito bovino poseen un valor de A_{MAX} más alto que el de los eritrocitos humanos, a todos los niveles de la bicapa lipídica. Esto permite concluir que los movimientos segmentales de las cadenas acílicas están más restringidos en la membrana bovina, resultando esto en una menor fluidez y un empaquetamiento más denso. Este hecho puede atribuirse al alto contenido de SM en eritrocitos bovinos comparado con los humanos, teniendo ambos la misma proporción de colesterol. Por otra parte, la reducción de colesterol provoca un incremento en la fluidez de la porción hidrofóbica (carbonos 12 y 16), indicando una menor rigidez y un menor empaquetamiento de las cadenas acílicas en la región hidrofóbica de la bicapa de la membrana en ambas especies (el efecto es más notorio en eritrocitos humanos que en bovinos). El 5-SASL, que sensa la región más cercana a los grupos de cabeza de los lípidos, presenta un comportamiento opuesto.

Es bien conocido que tanto el Col como la SM son lípidos que promueven el estiramiento de las cadenas acílicas restringiendo la movilidad segmental [Simons y Vaz, 2004; Ramstedt y Slotte, 2002]. El ordenamiento lipídico en la zona hidrofóbica de la membrana se relaciona principalmente con el estiramiento de las cadenas acílicas de los lípidos. En cambio, en la zona más externa, el ordenamiento está mayormente relacionado con las interacciones entre los grupos de cabeza polar [Cassera y col., 2002]. En coincidencia con esto, vemos en la *figura 2.24* (*paneles b3 y c3*) que en la región más

hidrofóbica de la bicapa el ordenamiento está gobernado por un efecto conjunto SM+Col. En cambio, en la zona más externa de la membrana (*figura 2.24, panel a2*) vemos que la SM por sí sola gobierna el ordenamiento en la región más externa de las cadenas acílicas. En este caso se espera que el colesterol tenga un efecto espaciador de los grupos de cabeza polares y no contribuya al ordenamiento de la membrana [Cassera y col., 2002]. Es interesante notar que en ninguno de los casos es el colesterol por sí solo el determinante del orden de la bicapa en presencia de cantidades variables de SM, y que en la región hidrofóbica es la asociación de ambos lípidos la que regula el ordenamiento.

Estos resultados experimentales se pueden racionalizar considerando resultados de simulaciones de dinámica molecular en sistemas de Col/SM/POPC [Aittoniemi y col., 2007]. En ese trabajo se muestra que sólo una molécula de Col vecina es suficiente para promover el incremento del ordenamiento de las cadenas acílicas en una molécula de SM, y que el hecho de tener sólo un vecino de SM reduce significativamente el “tilt” del colesterol en la bicapa. En este sentido, puede esperarse que una reducción parcial del Col provoque una menor disminución en el empaquetamiento de las cadenas acílicas en un sistema con gran cantidad de SM comparado con otro con menor cantidad. Esto es lo que ocurre con los eritrocitos bovinos, que poseen un alto contenido de SM, y muestran una disminución del orden dinámico de las cadenas acílicas más pequeña que los eritrocitos humanos, luego de la reducción de Col (*figura 2.23*).

2.4.7 ¿ESTÁN RELACIONADOS EL ORDENAMIENTO DE LA BICAPA LIPÍDICA Y LA RESISTENCIA AL TRITON?

Finalmente, al graficar el parámetro de orden A_{MAX} en función de D_0 (*figura 2.25*) observamos que el ordenamiento lipídico de las cadenas acílicas de la membrana (en el centro de la bicapa lipídica) está relacionado con la resistencia a la acción del detergente. Un mayor ordenamiento lipídico de la región hidrofóbica de la membrana implica una mayor resistencia al detergente, independientemente de la composición lipídica de la membrana de los sistemas estudiados. De esta manera, parece claro que la insolubilidad en las membranas de eritrocito está directamente relacionada con el ordenamiento de las cadenas acílicas.

Es interesante remarcar que en los sistemas modelo estudiados en [Sot y col., 2002], no se observaron conexiones claras entre insolubilidad al detergente y fluidez de membrana. Podemos argumentar, por un lado, que los sistemas de membrana utilizados en nuestros ensayos, compuestos no sólo de una gran variedad de lípidos, sino también por proteínas de membrana, presentan un grado de complejidad superior al de los sistemas modelo. Pero por otro lado, podemos comparar nuestros resultados con los obtenidos

por Ahyayauch y colaboradores [Ahyayauch y col., 2006] donde utilizan vesículas unilamelares grandes formadas por diferentes fosfatidilcolinas en el estado fluido. Ellos encontraron, mediante polarización de fluorescencia de DPH, que en estos sistemas el ordenamiento molecular de las cadenas hidrocarbonadas facilita la solubilización. Si aceptamos como válida la extrapolación a sistemas de membrana más complejos como los que utilizamos en este trabajo, el comportamiento opuesto que hemos observado en las membranas eritrocitarias, i.e. mayor resistencia al detergente en las membranas de mayor ordenamiento lipídico, sugeriría que una importante porción de los lípidos en la membrana no se encuentran en una fase fluida líquido cristalina, sino más bien en una fase similar al estado líquido ordenado. El alto contenido de SM y Col también apoya esta hipótesis [Bartels y col., 2008]

2.4.8 ¿CUÁL ES LA NATURALEZA DE LAS DRMs?

El material insoluble al Triton X-100 obtenido a partir de eritrocitos humanos fue observado por microscopía electrónica hace ya más de 30 años, y según los autores de ese trabajo parecía ser un “retículo filamentososo con vesículas y láminas lipídicas adheridas” [Yu y col., 1973]

Cuando analizamos los espectros de EPR del material insoluble obtenido con concentraciones crecientes de Triton a partir de eritrocitos bovinos (*figura 2.26*) obtuvimos evidencias de la coexistencia de un medioambiente altamente inmovilizado y de otro correspondiente a una bicapa más o menos inmovilizada. Una de estas evidencias es la aparición de un componente espectral adicional, señalada con flechas en la *figura 2.26*, a los lados del espectro de 16-SASL de las muestras obtenidas con 6% de Triton. También, puede verse en la *figura 2.27* que los valores de A_{MAX} correspondientes a la muestra de 10% de Triton (que son las que sufrieron una mayor extracción de lípidos) no muestran el gradiente de fluidez característico asociado a un entorno de bicapa. El valor de A_{MAX} en el espectro de 16-SASL es cercano al límite rígido, indicando que el marcador de espín se encuentra inmovilizado. Estos hechos, junto con la apariencia visual del pellet insoluble (ver *sección 2.2.5a*), sugieren que el material insoluble resultante de la incubación de eritrocitos bovinos con Triton contiene lípidos y proteínas en diferentes proporciones. De manera similar a lo que ocurre con los eritrocitos humanos (*figuras 2.4 y 2.5*), los resultados del contenido proteico de la membrana del eritrocito bovino indican que numerosas proteínas de la membrana, incluyendo proteínas de alto peso molecular que pueden ser identificadas como espectrina, están presentes en el pellet insoluble para todas las concentraciones de Triton analizadas. Numerosos trabajos reportan la recuperación de componentes del citoesqueleto en el material insoluble al Triton X-100 obtenido

tanto por microcentrifugación como por ultracentrifugación en gradiente de densidad [Shen y col., 1986; Svoboda y col., 1992; Ciana y col., 2005; Luna y col., 2004].

El espectro de EPR compuesto correspondiente a las DRMs obtenidas con 6% de Triton y marcadas con 16-SASL (*figura 2.28*) muestra que el 70% de los lípidos se encuentran inmovilizados, mientras que el restante 30% corresponde a lípidos en un medioambiente de membrana. Para evaluar el origen de este componente inmovilizado se pueden considerar algunos trabajos experimentales realizados con sistemas modelo. Marsh y Horvath han obtenido espectros similares en numerosos trabajos en donde estudian proteoliposomas con altas proporciones de proteína/lípido [Marsh y Horvath, 1998]. En estos trabajos se pone en evidencia la existencia de dos poblaciones de marcadores de espín, donde la movilidad de una de ellas está fuertemente obstaculizada por la interacción directa con el dominio hidrofóbico de las proteínas integrales. Estos efectos pueden verse claramente cuando el electrón desapareado del marcador de espín se encuentra cerca del metilo terminal de la cadena (como es el caso de 16-SASL), ya que en este caso los espectros de EPR de membranas con bicapas lipídicas fluidas poseen líneas finas, y permiten detectar espectros superpuestos de marcadores inmovilizados, los cuales aparecen en los extremos [Marsh y Horvath, 1998]. En función de lo anterior el componente inmovilizado en el espectro de la muestra de 6% parece provenir de una fracción del marcador de espín ubicado en el entorno lipídico de proteínas, cuya proporción en el pellet insoluble se incrementa al aumentar la concentración de detergente.

2.4.9 ACERCA DE LOS PROTOCOLOS DE OBTENCIÓN DE DRMs

a) Relación detergente/membrana

Uno de los aspectos más curiosos acerca de los trabajos de obtención de DRMs en el estudio de rafts lipídicos es la relativa desaprensión a explicitar la proporción de detergente a membrana (ya sea que esta se cuantifique con la concentración de proteína o la de lípidos) utilizado en la incubación de las membranas. Es notable observar la falta de precisión en los protocolos de trabajo utilizado por diversos autores acerca de este aspecto de la metodología utilizada. En relación a lo anteriormente mencionado, ciertos autores [Samuel y col., 2001; Murphy y col., 2004; Salzer y Prohaska, 2001; Lauer y col., 2000; Ciana y col., 2005] han encontrado importantes diferencias en la composición de las DRMs cuando se altera la relación detergente/membrana.

De acuerdo con los modelos de solubilización de membrana [Helenius y Simons, 1975; Lichtenberg y col., 2000; le Maire y col., 2000] se espera que tanto el punto de saturación de la membrana con detergente y la posterior micelización, como la etapa

final de solubilización completa dependen de las concentraciones relativas de detergente y de membrana. Es por ello que decidimos llevar a cabo un estudio de la resistencia de la membrana eritrocitaria al Triton, abarcando un amplio rango de concentraciones de detergente.

En la *figuras 2.10 y 2.11* se muestran las curvas de solubilidad de los fosfolípidos y del colesterol de la membrana del eritrocito humano. En ellas se observa un proceso de solubilización monótono creciente con el aumento de la concentración de Triton, lo que indica que, al menos desde el punto de vista de los lípidos, no existe un rango de concentración de detergente para el cual la cantidad de lípido insoluble se mantenga constante. Esto implica que, muy probablemente, una variación de la proporción de detergente a membrana conduzca al aislamiento de fracciones insolubles de diferentes características como se puede ver en la *figura 2.23*.

Murphy y colaboradores [Murphy y col., 2004], obtuvieron DRMs de eritrocitos humanos utilizando diferentes concentraciones de Triton, y encontraron que, con una solución del detergente de 2% no obtenían material en la zona de baja densidad del gradiente. Los autores incuban una suspensión de ghosts de 7,5 mg/ml de proteínas, que según nuestros cálculos corresponde a 13,4 mM de lípidos totales para la membrana eritrocitaria, con una solución de 2% de Triton X-100. Según hacen referencia en el paper, las relaciones de volumen son las correspondientes a [Civenni y col, 1998]: 19 vol de solución de detergente por vol de ghosts. La relación molar detergente/lípido en el ensayo de Murphy y colaboradores es estimada entonces en 46 para una concentración de TX-100 de 2%. Este valor corresponde a una concentración cercana a 4% de Triton en nuestros ensayos. En esas condiciones, el material insoluble que aislamos por microcentrifugación contiene un 23% de los PL y un 29% del Col del contenido original de la membrana del eritrocito bovino (sólo un 10% del PL y un 17% del Col en los eritrocitos humanos, ver *figuras 2.16 y 2.17*). Por otra parte, este material insoluble presenta características de membrana cuando se lo analiza por espectroscopía de EPR (ver *figura 2.27*). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que luego del tratamiento con detergente (con una relación detergente/lípido de 46) aún existen vesículas de lípidos que resisten la solubilización. Estas vesículas son obtenidas por microcentrifugación junto con el citoesqueleto cortical del eritrocito. En el caso de que existiera una interacción entre el citoesqueleto y las vesículas de lípidos insolubles, y la estructura del citoesqueleto no se viera afectada por el método de obtención de las DRMs, tanto el citoesqueleto como las vesículas serían arrastradas hacia la zona de mayor densidad del gradiente y no se obtendría material “insoluble” en las zonas de baja densidad utilizando el protocolo estándar de obtención de DRMs. Esto evidencia una ventaja de nuestro protocolo para la detección fina de la real sensibilidad de las membranas a la acción del detergente.

Los datos de colesterol y fosfolípidos insolubles permiten realizar un análisis de la relación entre estos dos lípidos en las DRMs obtenidas a partir de eritrocitos humanos y bovinos a distintas concentraciones de Triton. En la *figura 2.18* podemos observar que debido a una pronunciada solubilización preferencial de los fosfolípidos por sobre el colesterol, la relación PL/Col en los eritrocitos humanos disminuye hasta alcanzar un valor de aproximadamente 1,1 a una concentración de Triton cercana a 1,4%. En el caso de las DRMs obtenidas a partir de eritrocitos bovinos observamos un comportamiento similar, esto es, una disminución inicial de la relación molar PL/Col hasta llegar a un valor de 1,1 alrededor de 1,8% de Triton. Es decir que, a pesar de la notable diferencia de proporción de SM (y de PC) en las membranas eritrocitarias de ambas especies, el material insoluble obtenido con $R > 20$ presenta una relación molar PL/Col similar en ambos casos.

Si se considera que la gran mayoría de los PL que aun permanecen insolubles corresponden a la SM debido a la elevada resistencia de este componente de la membrana a la solubilización con Triton X-100 en presencia de Col. [Sot y col., 2002; Aittoniemi y col., 2007], esta relación PL/Col de aproximadamente 1 estaría de acuerdo con lo reportado en la literatura acerca de la formación de complejos SM/Col, en una proporción 1:1 luego del tratamiento con Triton en frío [Lichtenberg y col., 2005; Aittoniemi y col., 2007].

b) Método de aislamiento de las DRMs

Cabe ahora preguntarse acerca de la identidad de las estructuras de tipo membrana en el material insoluble obtenidas mediante el *protocolo I*. Como no existe un paso de separación mediante gradiente de densidad, se espera que sean vesículas lipídicas cerradas constituidas por los componentes insolubles al detergente. También se espera la presencia de componentes del citoesqueleto en el pellet de la centrifugación [Yu y col., 1973; Svoboda y col., 1992].

Para comparar si estas estructuras se asemejan a las membranas resistentes a detergente (DRM), operacionalmente definidas como fracciones de membrana resistentes a la solubilización por Triton X-100 a 4 ° C y aisladas después de ultracentrifugación por flotación en la zona menos densa de los gradientes de sacarosa [Edidin 2003; Simons y Vaz, 2004; Brown y London, 2000, Salzer y Prohaska, 2001, Samuel y col., 2001], llevamos a cabo un breve estudio del material obtenido mediante los procedimientos reportados en la literatura [Brown, E. London, 2000; Samuel y col., 2001; Murphy y col., 2004]. En estos procedimientos de obtención de DRMs, el volumen completo de la suspensión de extracción con detergente es sometido a equilibrio de ultracentrifugación

en gradiente de densidad, sin una centrifugación previa del material insoluble (una excepción a este procedimiento puede encontrarse en [Salzer y Prohaska, 2001]).

Al igual que en trabajos previos [Ciana y col., 2005] encontramos que, utilizando los procedimientos estándares [Civeni y col., 1998; Samuel y col., 2001; Murphy y col., 2004] no es posible aislar el material flotante en la zona de la interfase entre 5% y 35% de sacarosa, y que en cambio aparecen una o dos bandas muy tenues flotando en zonas de mayor densidad. Sólo un tratamiento con Na_2CO_3 previo a la ultracentrifugación [Nagao y col., 2002; Ciana y col., 2005] permite la obtención de cantidades adecuadas de DRM en la zona de baja densidad. Estas muestras de DRM fueron estudiadas mediante EPR y muestran un ordenamiento lipídico prácticamente idéntico al observado en las muestras tratadas en condiciones similares pero aisladas por microcentrifugación (*figura 2.29*).

Varios autores han señalado la asociación de proteínas del citoesqueleto a las DRM [revisado en Luna y col., 2004] e inclusive han detectado la aparición de estas DRM “pesadas” o DRM-H en la membrana plasmática de neutrófilos [Nebl y col., 2002].

En el caso de la obtención de DRMs en eritrocitos es común observar variantes significativas al procedimiento de obtención que incluyen la lisis hipotónica de los eritrocitos previamente al tratamiento con Triton, la aplicación de estrés mecánico mediante el pasaje de la mezcla de incubación a través de una aguja hipodérmica, y el agregado de carbonato de sodio para aumentar el pH y la fuerza iónica del medio de incubación. A pesar de que no se lo aclara explícitamente, todos estos tratamientos apuntan a desestabilizar la estructura del citoesqueleto para liberar a las vesículas de DRMs y permitirles alcanzar la zona de flotación de baja densidad. Por otra parte se ha reportado que bajo estas condiciones de obtención se aísla en la fracción de DRM, entre otras proteínas, la Banda 3 [Murphy y col., 2004], un transportador de Cl^- que sirve como anclaje a la membrana de la red de espectrina a través de la formación de un complejo con otras proteínas, como la ankirina y la banda 4.2 [Yawata, 2003]. Es entonces razonable esperar que, si el citoesqueleto de actina y espectrina no es previamente desestabilizado, permanezca asociado a las vesículas de DRMs

En nuestros ensayos de obtención de DRMs fue posible aislar estructuras de membrana en el pellet insoluble obtenido por microcentrifugación utilizando concentraciones de TX-100 de hasta 6%. En cambio, cuando se utilizó la ultracentrifugación en gradiente de densidad para aislar DRMs, no fue posible detectar cantidades significativas de material insoluble utilizando concentraciones de Triton de 2% o mayores, en concordancia con lo reportado en la literatura [Murphy y col., 2004].

En nuestro procedimiento de obtención de DRMs, la microcentrifugación de 30 min usada para aislar el material insoluble probablemente no sea capaz de sedimentar

vesículas unilamelares muy pequeñas (hemos realizado ensayos donde comprobamos que para sedimentar el 95% de liposomas unilamelares de 100 nm de diámetro se requieren tiempos del orden de 60 min a 27.000 g). De esta manera, una cierta cantidad de vesículas ligeras formadas por lípidos insolubles podrían ser lavadas en nuestro procedimiento. Sin embargo, esperamos que nuestras vesículas sedimentadas, aunque se encuentran mezcladas con proteínas ancladas a restos de citoesqueleto, tengan una composición lipídica similar a las DRMs “convencionales”, ya que han sido recuperadas como estructuras insolubles a detergente.

En cuanto a la composición lipídica, un gran número de datos experimentales indican que las DRMs están enriquecidos tanto en Col como en SM [Edidin 2003; Simons y Vaz, 2004; Brown y London, 2000]. En nuestro trabajo, el pellet insoluble obtenido a partir de eritrocitos humanos con 1% de Triton está enriquecido en SM y en Col, cuando se lo compara con la membrana original (figura 2.7). Sin embargo, las DRMs de eritrocitos bovinos obtenidas con 1% de TX-100 (R=12) poseen una composición y un ordenamiento lipídico similar al de la membrana original (figura 2.15). Parece evidente que la naturaleza y composición del material insoluble obtenido a la concentración “estándar” de TX-100 depende de la composición lipídica de las membranas.

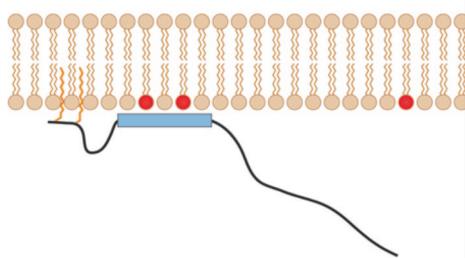
En el análisis de la susceptibilidad de los diferentes sistemas de membrana (eritrocitos humanos y bovinos, tanto intactos como reducidos en su contenido de colesterol) hemos observado que el contenido conjunto de SM y Col determina fuertemente el ordenamiento lipídico de la membrana. Esta relación se manifiesta claramente en las zonas más internas de la membrana, ya que en la zona más cercana a los grupos de cabeza polares, el principal determinante del ordenamiento lipídico es la SM. Estos resultados coinciden con trabajos donde se muestra que el colesterol aumenta el grado de desorden de la membrana en las zonas más externas de la misma [Cassera y col., 2002]

2.4.10 DRMs Y RAFTS LIPÍDICOS

La relevancia de los resultados obtenidos mediante la técnica de DRMs en el estudio de rafts lipídicos sigue siendo un tema ampliamente discutido [Lingwood y col., 2009; Hancock, 2006]. En nuestro trabajo realizado con eritrocitos hemos mostrado que: (1) las características del material insoluble obtenido dependen tanto de la relación detergente/lípido como de la composición de la membrana original; (2) la asociación del citoesqueleto cortical del eritrocito con las vesículas de lípidos insolubles interfiere en el aislamiento de DRMs mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad; (3) no parece existir un rango de concentración de TX-100 para el cual la cantidad de lípidos insolu-

bles se mantenga constante, es decir que no existe un rango de “insolubilidad efectiva” de cierto subconjunto de lípidos de la membrana.

A pesar de todo lo anterior, la utilización del TX-100 nos permitió explorar las interacciones lipídicas en sistemas de membrana complejos. Por otra parte, la metodología de DRMs ha demostrado ser una herramienta útil en el estudio de dominios de membrana, porque la mayoría de las proteínas que están normalmente presentes en DRMs han demostrado estar asociadas a rafts cuando fueron examinadas por diferentes métodos [Salzer y col. 2007]. Es decir que pese a las inevitables alteraciones que produce la interacción de detergente con la membrana, los productos insolubles pueden dar una pista sobre las estructuras presentes en la membrana original.



CAPÍTULO 3

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
DE GAP CON SISTEMAS
MODELO DE MEMBRANA**

3.1 Introducción

La proteína neuronal GAP-43 (por Growth-Associated Protein y peso molecular aparente de 43 kDa), denominada en un principio neuromodulina, B-50, P-57 F1 y pp46, es una proteína intracelular específica y muy abundante en las células del sistema nervioso. Su función se encuentra asociada al crecimiento neuronal durante el desarrollo y la regeneración neuronal en el adulto, y además participa en funciones variadas como la liberación de neurotransmisores, la endocitosis y el reciclado de las vesículas sinápticas. También se ha mostrado su vinculación con la potenciación a largo plazo, la formación de la memoria espacial, y el aprendizaje.

GAP-43 es sintetizada en forma soluble en el citosol y luego se asocia a la hemicapa interna de la membrana plasmática presináptica. Su estructura no se ha dilucidado aún y se la considera como una proteína “intrínsecamente desordenada”, ya que naturalmente posee muy poca estructura nativa. [Vucetic y col., 2007]. Numerosos estudios [revisado en Denny, 2006] muestran que GAP-43 se encuentra asociada a rafts en las células del tejido nervioso. Se une a membranas a través de palmitoilación y de la interacción de tres residuos básicos en el extremo N-terminal. Se cree que la unión a membrana se produce en la vía secretora temprana, y luego es transportada hacia la cara interna de la membrana plasmática presináptica. Sin embargo existen reportes donde se señala un cambio conformacional de una segunda región de la proteína no palmitoilada (el dominio efector) cuando se une a membranas de vesículas lipídicas [Hayashi y col., 1997; Wertz y col., 1996]. Por otra parte las cadenas de palmitato no son necesarias como anclas permanentes, porque en estado estacionario la mayor parte de GAP-43 en una célula está unida a la membrana, aun sin estar palmitoilada. [Liang y col., 2002]

En esta sección se presenta una breve descripción de la síntesis de GAP-43 y de los modelos que explican su mecanismo de acción, y se tratará en mayor detalle la asociación de la proteína a la membrana y a los rafts lipídicos.

3.1.1 BIOSÍNTESIS Y ASOCIACIÓN A MEMBRANA DE GAP-43

a) Biosíntesis de GAP-43

El gen de GAP-43 contiene tres exones. El primero codifica sólo los primeros 10 aminoácidos del extremo N-terminal de GAP-43, mientras que el segundo contiene la mayor parte de la región codificante, e incluye a la Ser-41, el sitio de fosforilación por la

proteína kinasa C (PKC). El último exón incluye sólo unos pocos codones junto con una larga secuencia no codificante [Benowitz y Routtenberg, 1997].

El mRNA de GAP-43 puede hallarse en los axones y en los conos de crecimiento en mamíferos [Campbell y Holt, 2001; Smith y col., 2004]. A pesar de ello, algunos autores consideran que si la síntesis en el soma celular está disponible, la síntesis proteica axonal puede ser un evento secundario [Zheng y col., 2001]. Es posible, sin embargo, que la síntesis proteica local sea necesaria para producir proteínas relacionadas al crecimiento que sensibilicen la membrana presináptica frente a diversos estímulos [Goldberg, 2003].

La GAP-43 de rata contiene 226 aminoácidos (ver *figura 3.1*). El valor real de la masa molecular de alrededor de 25 kDa es mucho menor que la aparente de 43 kDa que se observa en SDS-PAGE. Esto ocurre debido a que la naturaleza altamente cargada (25% de aminoácidos ácidos) de GAP-43 provoca que se le una menos cantidad de SDS que el promedio por aminoácido [Benowitz y Routtenberg, 1997]. La proteína contiene pocos residuos hidrofóbicos (1 Phe, 2 Leu, 3 Ile, 7 Val y ningún Trp o Tyr) y muchos residuos cargados (30 Lys, 5 Arg, 3 His, 35 Glu, y 22 Asp; pI teórico = 4,61). La Met está presente sólo en las posiciones 1 y 5. GAP-43 contiene una inusualmente alta cantidad de Pro (17) y de Ala (46, equivalente al 20,4 % del total de aminoácidos). Debido a esto último no es de extrañar que la proteína tenga muy poca estructura secundaria y se la pueda considerar “intrínsecamente desordenada” [Hayashi y col., 1997; Vucetic y col., 2007].

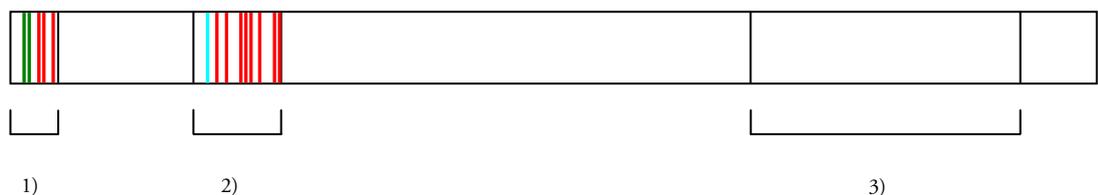


Fig 3.1: *Diferentes sitios y dominios de la molécula de GAP-43.* En la figura se muestran los siguientes dominios: (1) 1-10, dominio de unión a membrana y de activación de la proteína G₀; (2) 38-56, dominio efector (IQ) de unión a calmodulina y a membrana; (3) 154-210, dominio hipotético de unión al citoesqueleto. También se muestran algunos residuos de especial importancia: en verde, Cys-3 y -4, sitios de palmitoilación; en celeste, Ser-41, sitio de fosforilación por PKC; en rojo, residuos básicos relevantes en la unión a membrana (ver en el Texto)

b) Unión de GAP-43 a membranas.

Inicialmente se propuso que GAP-43 se unía a membrana como resultado de la palmitoilación [Skene y Virag, 1989]. Trabajos posteriores mostraron que la proteína es palmitoilada en Cys-3 y Cys-4, dado que una mutación en estos residuos elimina la unión de GAP-43 a membranas [Liu y col., 1994; Zuber, 1989]. Aunque la secuencia consenso

de palmitoilación de GAP-43 no está clara, la presencia de Met-1 y Leu-2 junto a Cys 3 y 4 parece ser parte de lo que es reconocido por una palmitoiltransferasa [Linder y Deschenes, 2003; Resh, 1999]

En estado estacionario la mayor parte de GAP-43 se encuentra no palmitoilada, pero sin embargo permanece asociada a la membrana. Estos resultados indican que las cadenas de palmitato no funcionan como un anclaje permanente a la membrana [Hayashi y col., 1997; Liang y col., 2002]. Una proteína acil-tioesterasa citosólica sería la encargada de llevar a cabo la depalmitoilación de GAP-43 [Duncan y Gilman, 1998; Linder y Deschenes, 2003; Resh, 1999].

Se ha propuesto que GAP-43, luego de ser sintetizada en ribosomas libres del soma neuronal, no se asocia directamente a la membrana plasmática. En lugar de ello, se une primero a las membranas de la vía secretoria temprana, la cual incluye el compartimento intermedio de ER-Golgi (ERGIC), la red del *cis*-Golgi (CGN), y el *cis*-Golgi, y luego viaja por transporte vesicular a través de la vía secretoria hacia la membrana plasmática [Appenzeller-Herzog y Hauri, 2006]. En este modelo, la palmitoilación de GAP-43 es el evento inicial y es seguido por la interacción de tres residuos básicos del extremo N-terminal, Arg-6, Arg-7, y Lys-9, con la bicapa lipídica [Liu y col., 1994; Zuber, 1989]. Esto sugiere que uno de los propósitos de la palmitoilación es acercar a los tres residuos básicos de GAP-43 y alinearlos con la membrana, de manera tal de que la unión pueda tener lugar. Estos tres residuos básicos son necesarios y suficientes para completar y mantener la interacción con la hemicapa interna de la membrana, rica en fosfolípidos cargados negativamente. Una vez que esto se ha conseguido, las cadenas de palmitato parecen no ser necesarias y pueden ser removidas [Denny, 2006]

Por otra parte, se ha encontrado que GAP-43, en su forma no palmitoilada, se une *in vitro* a liposomas compuestos de 20% de fosfatidilserina y 80% de fosfatidilcolina [Hayashi y col., 1997]. Ciertos autores consideran que este trabajo fue llevado a cabo con concentraciones muy elevadas de la proteína, lo cual puede conducir a interacciones que pueden no ocurrir a bajas concentraciones. En un estudio realizado utilizando concentraciones mucho menores de GAP-43 se encontró que la proteína se une a membrana cuando es incubada con microsomas aislados que contienen al compartimento intermedio de ER-Golgi. Esta asociación es bloqueada por agentes que inhiben las palmitoiltransferasas, tales como el ditiotreitól y la tunicamicina, así como también condiciones de baja temperatura [McLaughlin y Denny, 1999], sugiriendo que se requiere de la palmitoilación enzimática para que la GAP-43 se una a membrana, y que esta palmitoilación es lo que inicia la unión de la proteína citosólica a la membrana. Sin embargo, más allá de la concentración de proteína utilizada no existe una estimación de la relación de proteína a membrana utilizada en estos ensayos. Por otra parte ya se ha mencionado la

presencia de síntesis de GAP-43 en el axón y en los conos de crecimiento en donde la proteína no puede acceder a las palmitoiltransferasas del ER y el aparato de Golgi para ser palmitoilada.

Numerosos trabajos muestran que los dominios de unión a calmodulina de diversas proteínas parecen servir también como dominios de unión a la membrana [Taniguchi y Manenti, 1993; Kim y col., 1994; Venema y col., 1995]. Estos dominios asumen una estructura de *hélice α* , separando los aminoácidos en dos grupos que se orientan a ambos lados de la hélice [O'Neil y DeGrado, 1900; Blumenthal y col., 1985]. El dominio de unión a calmodulina de GAP-43, que es al mismo tiempo, el dominio de fosforilación por PKC, pertenece al mismo motivo de unión a la membrana dependiente de la fosforilación, y parece sufrir un cambio conformacional desde una estructura de *random coil* a otra de hélice α que le permite unirse a la membrana. [Dyson y col., 1992; Manning y col., 1988]. El dominio de unión a calmodulina de GAP-43 interactúa con los fosfolípidos de membrana, y la fosforilación por PKC reduce la interacción. La fosforilación parece afectar a la interacción, no sólo por la reducción de la carga positiva del dominio, sino también por la disminución de la capacidad del dominio para formar una estructura helicoidal [Hayashi y col., 1997]. Es razonable suponer que el mismo mecanismo está en funcionamiento en la regulación de la unión de ese dominio a la calmodulina por fosforilación dependiente de PKC [Liu y Storm, 1990]. Debido a que la unión de la calmodulina, a su vez, afecta la interacción de los dominios con PKC y con los fosfolípidos, las funciones fisiológicas del GAP-43 están reguladas de manera muy compleja e implican diversos componentes de las vías de transducción de señales. El dominio de naturaleza de hélice α básica y anfifílica puede funcionar como uno de los puntos de entrecruzamiento en la transducción de señales dependiente de calcio.

Estos diferentes enfoques no parecen ser necesariamente excluyentes, ya que se puede pensar en dos tipos de asociación de GAP-43 a membranas. Por una parte, la síntesis de la proteína ocurre mayoritariamente en el soma celular y luego de ser sintetizada en el citosol se asocia a la membrana del ER y el Golgi a través de la palmitoilación de su extremo N-terminal y de una posterior interacción del cluster de residuos básicos de ese dominio de la membrana (y/o de otros presentes en el resto de la cadena polipeptídica), para posteriormente viajar hacia la membrana presináptica. Por otra parte, es posible que ocurra una interacción de la proteína con la membrana en los conos de crecimiento neuronal mediada por el dominio de unión a calmodulina, lo cual permitiría una regulación fina de la actividad del pool de moléculas de proteína presentes en la célula, pero también de la sintetizada *de novo* en las cercanías de la membrana postsináptica.

3.1.2 GAP-43 Y SU VINCULACIÓN CON DOMINIOS DE MEMBRANA.

Existen reportes del enriquecimiento de GAP-43 en DRMs aisladas a través de extracción con Triton X-100 a partir de células neuronales PC12 (línea celular derivada de un feocromocitoma de la médula adrenal de rata que constituye un sistema modelo útil para el estudio de la diferenciación neuronal). [Arni y col., 1998]

Algunos autores proponen que GAP-43 se incorpora a los rafts lipídicos de las células del tejido nervioso en algún punto a continuación de la unión inicial a membrana del ER/Golgi y previo a su transporte a la membrana plasmática, [Denny, 2006; McCabe y Berthiaume, 2001]. Los primeros 10 o 20 residuos de la proteína parecen ser suficientes para la localización en rafts lipídicos, y se requiere de la palmitoilación para que ello ocurra [Arni y col., 1998] Sin embargo, también se ha sugerido que ciertas partes de GAP-43 más allá del extremo N-terminal son responsables de dirigir a GAP-43 hacia los rafts, y que puedan ser necesarias interacciones proteína-proteína [McCabe y Berthiaume, 2001]. Resulta probable entonces que los palmitatos deban estar presentes para que la asociación de GAP-43 a rafts se mantenga. Los palmitatos pueden no ser necesarios si GAP-43, una vez que ha sido conducida por ellos hacia los rafts, se une a otras proteínas y lípidos que se encuentran en estos dominios.

En estado estacionario, GAP-43 se encuentra altamente concentrada en la membrana plasmática de los conos de crecimiento neuronal, a concentraciones estimadas en 50-100 μM [He y col., 1997]. Se ha propuesto que GAP-43 se acumula en rafts enriquecidos en el fosfolípido ácido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI (4,5) P_2), en la hemicapa interna de la membrana plasmática [Caroni, 2001; Laux y col., 2000]. La adición de ciclodextrina (agente secuestrante de colesterol) disminuye la presencia de GAP-43 en estas estructuras [Laux y col., 2000]. Se ha propuesto que GAP-43 se asocia electrostáticamente con PI (4,5) P_2 [Laux y col., 2000] a través de la región con carga positiva neta que se extiende desde Ile-38 a Lys-56, y que se ha llamado *dominio efector* [Laux y col., 2000] o *dominio IQ* [Chapman, 1991] (ver *figura 3.1*). La secuencia de esta región en GAP-43 de rata corresponde a IQASFRGHITRKKLKDEKK [Chapman, 1991]. Esta región contiene una gran cantidad de residuos cargados positivamente (señalados en rojo), y también contiene al sitio de fosforilación por la proteína kinasa C, Ser-41 (en celeste). Debido a que GAP-43 contiene varias cargas positivas y PI (4,5) P_2 múltiples cargas negativas, la interacción de las dos moléculas puede conducir a enlaces cruzados y a la formación de dominios [Laux y col., 2000]. En concordancia con esta propuesta, la adición de péptidos básicos también produce la segregación lateral de PI (4,5) P_2 en las membranas [Wang, 1986].

GAP-43 parece atravesar ciclos de palmitoilación y depalmitoilación en la membrana plasmática, posiblemente en respuesta a la unión de componentes extracelulares [Baker y Storm, 1997]. Debido a que en la membrana plasmática están presentes palmitoiltransferasas, siempre puede ser posible palmitoilar a la GAP-43 unida a la membrana plasmática si Cys-3 y Cys-4 están disponibles y existe un exceso de palmitoil-CoA, y a continuación podría ocurrir la depalmitoilación por una enzima acil-tioesterasa. De esta manera podrían ocurrir ciclos de palmitoilación y depalmitoilación de la GAP-43 en la membrana plasmática sin necesidad de tener algún efecto biológico. Sin embargo, no se puede descartar que exista un mecanismo de control de palmitoilación y depalmitoilación.

3.1.3 MECANISMO DE ACCIÓN Y FUNCIONES DE GAP-43.

GAP-43 está asociada con la formación de filopodios, en respuesta a señales extracelulares [Steketee y Tosney, 2002; Gallo y Letourneau, 2004]. Han sido propuestos dos modelos para su mecanismo de acción, que tienen en consideración el hecho de que GAP-43 es fosforilada por la proteína kinasa C en la célula estimulada. El primer modelo propone que GAP-43 no fosforilada se une al extremo en crecimiento de los filamentos de actina, estabilizándolos pero inhibiendo su extensión. Esta función de “*capping*” atenúa la extensión de los filopodios en los conos de crecimiento. Cuando GAP-43 se encuentra fosforilada en Ser-41 funcionaría como un estabilizador lateral de los filamentos de actina, lo que favorece la extensión de filopodios [He y col., 1997]. En este modelo GAP-43 también interactúa con otra proteína del citoesqueleto, fodrina o espectrina del cerebro [Riederer y Routtenberg, 1999]. En el segundo modelo que propone el mecanismo de acción de GAP-43, la proteína se une al PI (4,5) P₂, y esta unión secuestra a estos fosfolípidos en los rafts lipídicos de la hemicapa interna de la membrana plasmática [Laux y col., 2000; Tong y col., 2008]. Esta capacidad de modular la distribución lateral y la disponibilidad de PI (4,5) P₂ en la membrana interfiere en la función de este fosfolípido en la regulación del citoesqueleto de actina.

Estos dos modelos del mecanismo de acción de GAP-43 no son mutuamente excluyentes. Una vez que GAP-43 ha sido fosforilada por la PKC y ha sido liberada del PI (4,5) P₂, sería competente para unirse a la F-actina y actuar como un estabilizador lateral. Del mismo modo, la GAP-43 fosforilada sería liberada de la calmodulina y estaría disponible para la interacción con F-actina.

GAP-43 también se ha asociado con la liberación de neurotransmisores y con la endocitosis y el reciclaje de las vesículas sinápticas en la membrana plasmática presináptica. Todos estos efectos están relacionados de diversas maneras con proteínas de unión a

GTP. Estas proteínas funcionan como transductoras de señales extracelulares y están asociadas a rafts lipídicos [Brown, 2006]. La función de GAP-43 también está asociada, actuando como un efector “downstream”, con ciertos miembros de la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas, extensamente involucradas en el desarrollo neuronal y vinculadas a los rafts lipídicos [Grovek y col., 2005].

La localización de GAP-43 junto con estas proteínas de señalización en los rafts lipídicos, así como su interacción con PI (4,5) P₂ es fundamental en el mecanismo de funcionamiento de GAP-43. Es por ello que resulta de particular interés investigar los factores que determinan la asociación de esta proteína con los rafts lipídicos. En particular cuáles son las interacciones específicas involucradas en la unión a membrana y que sectores de la proteína participan de ellas.

3.1.4 OBJETIVOS.

En esta parte del trabajo de tesis nos proponemos investigar los mecanismos de interacción de GAP-43 con la membrana. En particular, deseamos estudiar los factores que determinan la afinidad de la proteína por los dominios lipídicos ordenados. Para llevar a cabo este objetivo nos proponemos:

- Cuantificar la asociación de GAP-43 a la membrana utilizando sistemas lipídicos modelo (liposomas) de varias composiciones que presenten diferente ordenamiento lipídico. La composición lipídica de los liposomas estará formulada de manera de poder evaluar también la presencia de interacciones electrostáticas con la proteína.
- Investigar el mecanismo de asociación a liposomas tanto de la proteína palmitoilada como la de la no palmitoilada.
- Detectar y caracterizar la unión de la proteína a la bicapa lipídica utilizando marcadores de espín liposolubles y espectroscopía de EPR.
- Investigar las características de la interacción del extremo N-terminal de GAP-43 unida a liposomas incorporando a la proteína no palmitoilada un marcador de espín en las cisteínas 3 y 4 de la cadena polipeptídica.

3.2 Materiales y Métodos.

3.2.1 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS.

Se tomó el volumen adecuado de soluciones stock en cloroformo de los lípidos indicados. Para los experimentos de EPR se agregó a los lípidos una alícuota de solución etanólica del marcador de espín n-SASL (1% molar del total de lípidos) y se evaporó con nitrógeno. En algunos ensayos se utilizó un 3% molar de n-SASL para mejorar la sensibilidad. El depósito seco se sometió a vacío para evaporación completa del solvente orgánico y posteriormente se resuspendió con buffer Hepes 50 mM, pH 8,00 a 50°C para obtener una suspensión de entre 8 y 10 mM de lípidos totales.

Esta suspensión de vesículas multilamelares (MLVs) fue extrudida para obtener LUVs (vesículas unilamelares). Se utilizó un extrusor (Avanti Mini-Extruder) con bloque calefactor a 40-50°C y se utilizaron membranas de policarbonato de 400 nm.

Finalmente se determinó la concentración lipídica de la suspensión de LUVs mediante técnica analítica [Rouser y col., 1970].

3.2.2 OBTENCIÓN DE GAP-43.

El plásmido pRK-172 con el inserto correspondiente a la proteína GAP-43 de rata fue gentilmente cedido por el Dr. Díez-Guerra [Tejero-Diez y col., 1999]. Se transformaron células competentes de *E. coli* Top10 con el plásmido para su amplificación y se purificó por minipreparación. El plásmido purificado se corrió en un gel de agarosa y se verificó el tamaño correcto. También se analizó el tamaño del inserto realizando cortes con EcoRI y NdeI. Finalmente se transformaron células BL21 y la expresión de la proteína se indujo a 22°C, durante toda la noche con 0.4mM de IPTG. Se realizó un lizado por sonicación de las células y se procedió a un primer paso de purificación mediante calor (80 °C) y ácido perclórico [Gerendasy y col., 1994]. En una segunda etapa se realizó una cromatografía de intercambio iónico en el equipo FPLC-AKTA. Finalmente se verificó la identidad e integridad de la proteína mediante Western blot revelado con anticuerpos monoclonales y se estableció la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE, observándose una banda única en tinción con Coomassie blue.

3.2.3 OBTENCIÓN DE GAP-43 PALMITOILADA.

La palmitoilación *in vitro* de GAP-43 se realizó a través del intermediario químico palmitoil-CoA, el cual reacciona con las cisteínas 3 y 4 de la proteína incorporándose a tra-

vés de una unión tioester (S-palmitoilación) [Quesnel y Silvius, 1994; Drisdell y col., 2006] Se utilizó una relación 1:20 proteína/palmitoil-coA, incubando durante una hora a 30° C, pH: 8,00, obteniéndose una eficiente S-palmitoilación (ver *figura 3.2*). La eficiencia de palmitoilación se analizó mediante la técnica de marcación de cisteínas libres con Biotina-maleimida. La biotina se incorpora en las cisteínas no palmitoiladas y se revela luego por la técnica de western blot con estreptavidina-peroxidasa. Por lo tanto, a mayor incorporación de palmitatos se produce una menor incorporación de biotina en las dos cisteínas y disminuye la señal quimioluminiscente.

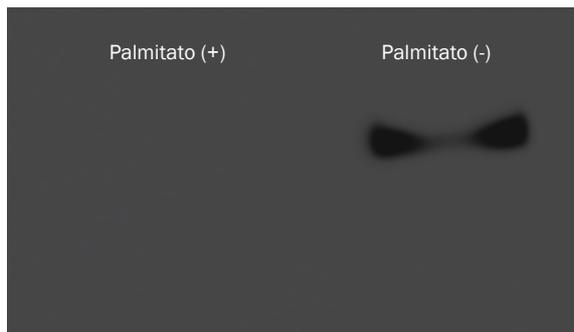


Figura 3.2: Revelado por quimioluminiscencia del ensayo de palmitoilación. En la imagen se puede ver que, en las condiciones del ensayo, el grado de palmitoilación de GAP-43 fue prácticamente del 100% (la banda correspondiente a GAP-43 palmitoilada no pudo ser detectada)

3.2.4 ENSAYO DE ASOCIACIÓN DE GAP-43 A LUVs.

La proteína fue suspendida en buffer Hepes 50 mM, pH: 8,00 y se desechó el excedente de DTT utilizado para la resuspensión mediante filtración por centrifugación (Amicon filter devices, corte de 10 kDa). El ensayo se realizó a 37° C, durante una hora con una proporción molar de lípidos a proteína de 1500 a 1. Se agregó NaCl 150 mM para reproducir la fuerza iónica del medio intracelular. La suspensión se centrifugó 1 hora a 25.000 g para separar los liposomas (con la fracción de la proteína asociada) y se cuantificó la proteína en el sobrenadante mediante densitometría-PAGE. La cantidad de lípidos en el sobrenadante fue menor al 5% del originalmente agregado.

Para el ensayo de detección de la asociación de GAP-43 a LUVs mediante EPR, con los marcadores de espín liposolubles incorporados en los liposomas, se utilizó una relación molar de lípidos a proteína de 39 a 1 y las mismas condiciones experimentales antes mencionadas.

Para el ensayo de análisis de cambios conformacionales en GAP-43 en ausencia o presencia de LUVs se utilizó una relación molar de lípidos a proteína de 2000 a 1, y las mismas condiciones experimentales antes mencionadas.

La proteína recombinante fue obtenida y purificada como se indica en la *sección 3.2.2*. La solución utilizada para realizar los ensayos de asociación mostraba una única banda en los geles de SDS-PAGE (*figura 3.3a*). Sin embargo, luego de la incubación a

37°C, el control de proteína (sin liposomas) presentó un par de bandas (figura 3.3b). Las posibles causas de este efecto se discuten más adelante, en la sección 3.4.

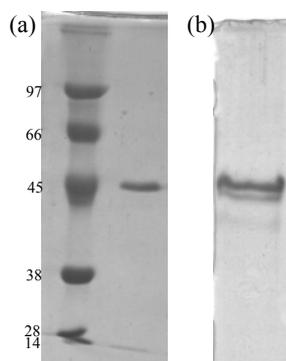


Figura 3.3: SDS-PAGE de GAP-43. (a) Muestra de la proteína luego del proceso de purificación donde se observa una banda única (a la izquierda se muestra un patrón de pesos moleculares) (b) sobrenadante de incubación, control (sin agregado de liposomas) luego de una hora a 37°C

3.2.5 MARCACIÓN DE GAP-43 CON EL MARCADOR DE ESPÍN MALEIMIDO-TEMPO.

Se depositó en el fondo de un tubo un volumen adecuado de una solución 20 mM de 6-maleimido-tempo (4-maleimido-1-oxyl-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) (MT) en etanol, y luego se evaporó el solvente con nitrógeno. La proteína fue suspendida en buffer Hepes 50 mM, pH: 8,00 y se desechó el exceso de DTT utilizado para la resuspensión mediante filtración por centrifugación (Amicon filter devices, 10 kDa cutoff). Luego se agregó un volumen adecuado de esta solución al tubo que contenía el MT. Se utilizó una relación de 10 a 1 MT/GAP. Se incubó toda la noche (aproximadamente 17 hs.) a 4°C y se procedió a lavar el MT en exceso por filtración centrífuga. Se realizaron entre 3 y 4 lavados, hasta verificar en el último lavado la ausencia de señal de EPR proveniente del marcador de espín libre.

De esta manera se consiguió unir covalentemente el grupo MT a las Cys 3 y 4 de la GAP, lo cual permite detectar cambios conformacionales del extremo amino terminal de la proteína frente a la interacción con LUVs.

3.2.6 ENSAYOS DE EPR (RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA).

Se utilizó espectroscopía de EPR para detectar cambios en el grado de ordenamiento de las cadenas acílicas de los lípidos a diferentes profundidades en la bicapa lipídica usando 5, 12 y 16 doxil ácido esteárico (5, 12 o 16-SASL). Se obtuvieron espectros de EPR a diferentes temperaturas a 9,8 GHz (banda X). En este caso, y a diferencia de casos anteriores, se evaluó el parámetro hiperfino A_{MIN} , ya que brinda una información similar a la proporcionada por A_{MAX} y se evita la interferencia del componente espectral producido por el marcador de espín que se particiona por fuera de la bicapa lipídica. Un incremen-

to de este parámetro indica una disminución del grado de ordenamiento de las cadenas acílicas. El aumento de este parámetro a mayor profundidad en la bicapa lipídica (gradiente de fluidez) es característica de estructuras de bicapa (*ver sección 1.3.3*).

También se utilizó EPR para detectar y caracterizar la conformación espacial de la GAP-43 marcada con MT, analizando cambios en el espectro de la proteína marcada en distintas situaciones.

3.3 Resultados

3.3.1 CARACTERIZACIÓN POR EPR DE LOS LIPOSOMAS UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE ASOCIACIÓN

Se utilizaron LUVs (Large Unilamellar Vesicles) como sistemas modelo de membrana lipídica. Se prepararon a partir de seis composiciones lipídicas diferentes (como se muestra en la *figura 3.4*), agrupadas en dos conjuntos. El primer conjunto (A, B, C) consiste en mezclas de lípidos conteniendo un 20% molar de DPPS para proporcionarles a los LUVs una carga eléctrica negativa, de manera de reproducir las características electrostáticas de la monocapa interna de la membrana plasmática [Lodish y col., 2008]. En el segundo conjunto de LUVs (α , β , γ), la DPPS fue reemplazada por DPPC. De esta manera, las composiciones y el estado de fase a 37°C son similares a los del primer conjunto, pero los liposomas carecen de carga eléctrica.

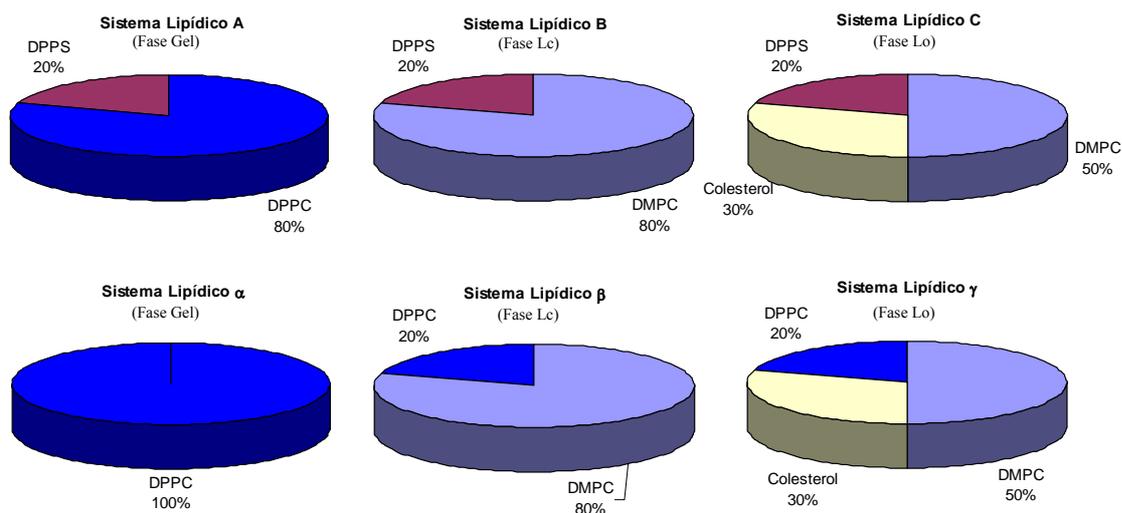


Figura. 3.4: Composición lipídica de los sistemas lipídicos utilizados en el trabajo. En cada caso se indica la fase en la que se encuentra a 37°C

Se llevo a cabo una caracterización física de los sistemas lipídicos mediante espectroscopía de EPR utilizando los marcadores de espín liposolubles 5-, 12- y 16-SASL, que sennan la bicapa lipídica a diferentes profundidades.

El marcador de espín incorporado a los liposomas genera un espectro con estructuras hiperfinas características, cuyas separaciones en campo dependen del grado de ordenamiento lipídico sentido por el marcador. El parámetro hiperfino A_{MIN} , que disminuye al aumentar el ordenamiento lipídico, puede usarse para caracterizar el comportamiento termotrópico de los sistemas de membrana (Ver *sección 1.3.3a*).

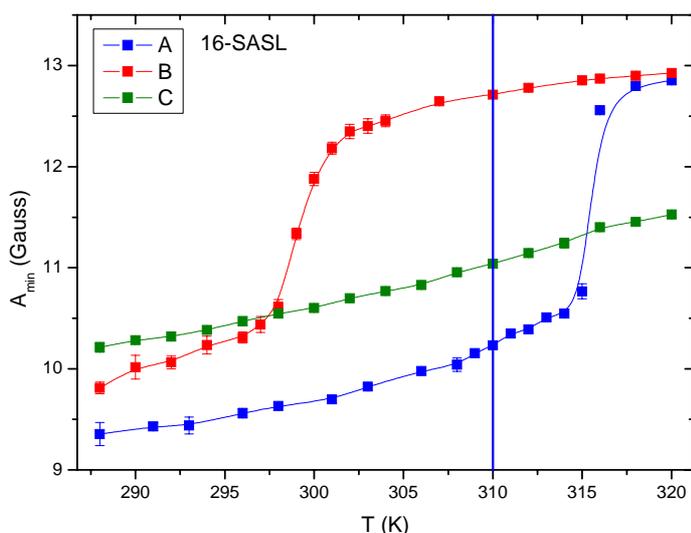


Figura. 3.5: Gráficos del parámetro hiperfino A_{MIN} en función de la temperatura para los 3 sistemas con carga negativa. Un aumento de este parámetro implica un aumento del desorden de las cadenas acílicas (ver Materiales y Métodos). Se evidencian las transiciones de fase gel-líquido cristalino para los sistemas lipídicos A y B. La línea vertical azul a 310K (37°C) indica la temperatura de incubación de los ensayos de asociación con liposomas (ver más adelante)

En la *figura 3.5* se muestra el comportamiento del parámetro hiperfino A_{MIN} frente a la temperatura para los 3 sistemas lipídicos que contienen DPPS, utilizando el marcador de espín 16-SASL. Se observa que los sistemas A y B presentan transiciones de fase bien definidas, mientras que el sistema C muestra una variación monótona del parámetro hiperfino con la temperatura, característica de un sistema en fase líquido ordenada (L_O).

Con el objetivo de calcular la temperatura de transición de fase de los sistemas A y B a partir de los datos de la *figura 3.5*, se ajustaron los datos experimentales con la siguiente ecuación empírica, donde P_5 corresponde a la temperatura de transición de fase:

$$A_{\text{min}} = \frac{1}{2} \left[\frac{P_1}{1 + \exp(-(T - P_5).P_2)} + (T - P_5).P_3 + P_4 \right] \quad (\text{ec. 3.1})$$

El ajuste de los datos experimentales dio como resultado una temperatura de transición de 42,5°C (315,5K) para el sistema lipídico A (que por lo tanto está en fase gel a 37°C) y de 26,0°C (299,0K) para el sistema lipídico B (que está en fase líquido cristalina o

desordenada L_c a 37°C). En cambio, el sistema C muestra una disminución gradual del orden lipídico con la temperatura y no presenta transición de fase (como es esperable para un sistema en fase líquido ordenada, L_o).

De esta manera, a 37°C (310 K, temperatura del ensayo de asociación) el ordenamiento lipídico de los tres sistemas es marcadamente diferente.

Los otros tres sistemas lipídicos que no contienen DPPS (α , β y γ) fueron también estudiados por EPR y presentan, a 37°C , un grado de ordenamiento lipídico equivalente al de los correspondientes LUVs cargados negativamente. Esto es, α está en fase Gel, β está en fase L_c y γ está en fase L_o a 37°C . En la *figura 3.6* se muestra una comparación de los espectros de EPR de los 6 sistemas lipídicos marcados con 5-SASL.

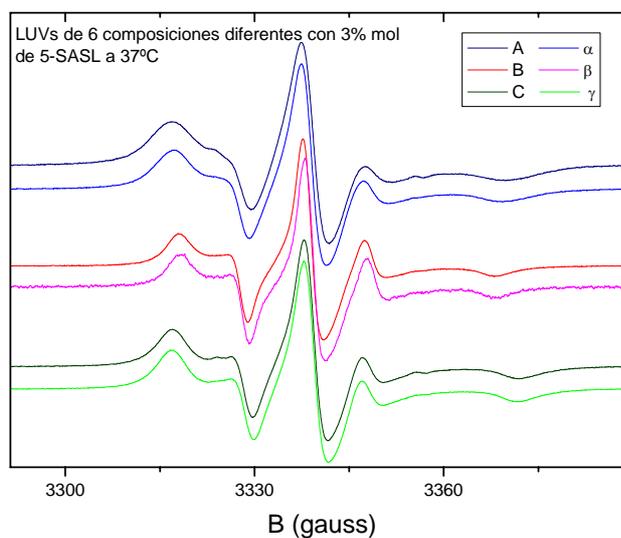


Figura 3.6: Espectros de EPR tomados a 37°C de LUVs de las seis diferentes composiciones lipídicas utilizadas en los ensayos de asociación a GAP-43. Los LUVs fueron marcados con 3% molar de 5-SASL para mejorar la sensibilidad del ensayo (ver Materiales y Métodos)

3.3.2 ENSAYO DE ASOCIACIÓN DE GAP-43 A LIPOSOMAS.

CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA.

Con el objetivo de estudiar la interacción de GAP-43 con sistemas modelo de membrana se llevó a cabo la incubación de la proteína con LUVs de las seis composiciones lipídicas diferentes (ver *sección 3.3.1*) en condiciones de temperatura (37°C) y pH (8,00) controlado, y en presencia de 0,15 M de NaCl. Luego se centrifugó la suspensión y se cuantificó el porcentaje de GAP-43 remanente en el sobrenadante de incubación (no unida a liposomas) y en la solución original de la proteína (control) mediante densitometría de SDS-PAGE.

En estos ensayos de asociación se utilizó la proteína original, sin palmitoilar (GAP). Las imágenes de los geles se muestran en la *figura 3.7*. Los resultados de la cuantificación densitométrica se resumen en la *Tabla 3.1*

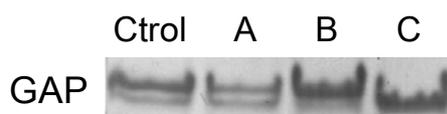


Figura 3.7: *Ensayo de asociación de GAP-43:* Sobrenadantes de incubación de GAP-43 (GAP, proteína no palmitoilada) incubada con LUVs de diferente composición y con una con buffer sin LUVs (Ctlol). Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE. La proteína no palmitoilada no presentó una asociación significativa con los LUVs no cargados α , β y γ (no se muestran los datos).

Nota: el volumen de sobrenadante sembrado en el gel de SDS-PAGE fue menor para el caso del Ctlol que para las muestras incubadas con LUVs con el objetivo de mejorar la cuantificación densitométrica.

Sistema Lipídico	A	B	C	α	β	γ
Fase a 37°C	Gel	Lc	Lo	Gel	Lc	Lo
GAP	43±2	24±1	34±2	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 3.1: *Ensayo de asociación:* Porcentaje de proteína asociada a cada uno de los sistemas modelo de membrana luego de la incubación. El 100% corresponde al contenido total de proteína en la solución original y por diferencia con el contenido de proteína en el sobrenadante se determina el porcentaje de asociación. En la tabla se menciona la fase lipídica en la que se encuentra cada sistema a temperatura fisiológica. n.d.: no detectable

Los resultados que se muestran en la *Tabla 3.1* indican que la proteína no palmitoilada sólo se une significativamente a los LUVs cargados negativamente, y dentro de este conjunto tiene mayor afinidad por los sistemas lipídicos ordenados (A y C). Teniendo en cuenta que estos tres sistemas lipídicos poseen la misma carga electrostática (todos poseen un 20 %mol de DPPS), las diferencias en el grado de afinidad deben atribuirse al estado físico en el que se encuentra cada bicapa lipídica.

En los ensayos de asociación, GAP-43 aparece como una doble banda en el sobrenadante de incubación con liposomas, cuando en la solución original aparece como una única banda (ver *sección 3.2*). En la *figura 3.7* se observa cómo el grado de asociación de las dos bandas difiere para los tres distintos sistemas lipídicos. Este resultado se discutirá en la *sección 3.4*.

3.3.3 ENSAYOS DE DETECCIÓN DE LA UNIÓN DE GAP-43 A LIPOSOMAS POR ALTERACIÓN EN EL ORDENAMIENTO LIPÍDICO.

Se llevaron a cabo ensayos mediante espectroscopía de EPR para detectar alteraciones en el ordenamiento lipídico debidas a la asociación de la GAP-43 a liposomas. Los LUVs fueron preparados incluyendo el marcador liposoluble 5-SASL y se los incubó en presencia de GAP-43 no palmitoilada. En la *figura 3.8* se muestran los espectros correspon-

dientes a liposomas de las tres composiciones lipídicas marcados con 5-SASL. Los espectros fueron tomados a dos temperaturas: 37°C (temperatura del ensayo de asociación) y 20°C. Un análisis detallado de los espectros correspondientes al sistema A a 20°C muestra una disminución del ordenamiento lipídico producido por la unión de GAP. En la *figura 3.8a* (señalado con flechas) se ve un corrimiento del pico de campo alto y un cambio de forma del lado derecho de la línea central. El parámetro A_{MAX} correspondiente al marcador 5-SASL en liposomas en ausencia de GAP-43 es de 30,9(1) G, y en presencia de la proteína es de 30,6(1) G, lo que significa una disminución en el orden dinámico. La inserción de la proteína en la bicapa lipídica debería restringir los movimientos y por lo tanto ordenar los lípidos en un sistema que se encuentra en fase fluida L_C , pero en una fase gel como en este caso, en la que los lípidos están empaquetados densamente, se espera una disminución del orden ya que la inserción de la proteína dificulta el acomodamiento de los lípidos.

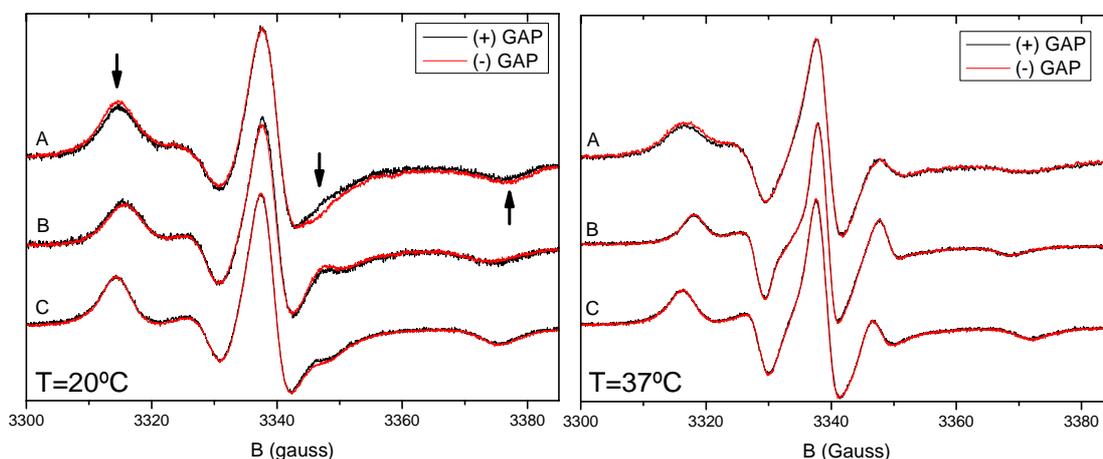


Fig. 3.8: *Estudio de la asociación GAP-43/LUVs por EPR.* Espectros de EPR de los LUVs marcados con 1% de 5-SASL. En rojo se muestran los espectros de los LUVs en ausencia de GAP-43 y en negro, en presencia de la proteína. Ambos ensayos corresponden a la proteína no palmitoilada. Los espectros fueron tomados a 20°C (293 K, izquierda) y 37°C (310 K, derecha).

A 37°, el sistema A se encuentra en la fase ripple y probablemente la proteína puede insertarse sin producir mayores efectos en el ordenamiento lipídico por las ondulaciones de la bicapa. En este caso las diferencias observadas entre los espectros de los liposomas con y sin proteína no son significativas. En los otros dos sistemas lipídicos (B y C), en los cuales el porcentaje de asociación es menor al del sistema A, tampoco se observan diferencias significativas (tanto a 20 como a 37°C) en los espectros luego de la incorporación de GAP-43.

3.3.4 ESTUDIO DE LA DINÁMICA Y LA INTERACCIÓN ESPECÍFICA DEL EXTREMO N-TERMINAL DE GAP-43 CON LA BICAPA LIPÍDICA DE LUVs.

Con el objetivo de estudiar la asociación de GAP-43 con sistemas modelo de membranas se llevó a cabo la marcación de la proteína no palmitoilada (con sus dos cisteínas libres) con el marcador de espín Maleimido-Tempo (MT), que se une covalentemente a las cisteínas libres de la proteína, y se tomaron espectros de EPR de la proteína en solución y asociada a liposomas unilamelares (LUVs).

a) Marcación de GAP con MT.

La primera parte del estudio consistió en ensayos preliminares de marcación con BSA, a partir de los cuales se pueden observar la presencia de dos componentes espectrales (ver *sección 1.3.3a*), que fueron comparados con los del espectro de GAP-43 marcada con MT (GAP-MT). Finalmente se estudió la interacción de GAP-MT con LUVs.

A una solución de GAP-43 no palmitoilada, es decir con sus únicas dos cisteínas libres, se le agregó una solución del marcador de espín MT en las proporciones adecuadas para obtener la marcación de la proteína. Luego de separar el exceso de marcador no unido se obtuvieron espectros de la proteína en solución. Típicamente, la marcación de una proteína con MT genera un espectro de dos componentes, una más móvil y otra más inmovilizada, correspondientes a poblaciones de marcador de espín con diferente grado de interacción con el resto de la cadena polipeptídica [Alonso y col., 2001]. En la *figura 3.10* se muestra el espectro de EPR de GAP-43 comparada con el de BSA, ambas marcadas con MT.

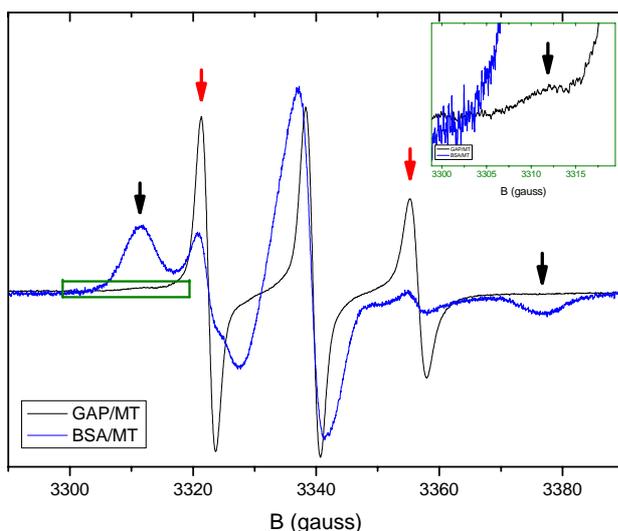


Figura. 3.10: Espectro del marcador de espín MT unido a GAP-43 en su extremo N-terminal (negro) y unido a BSA (azul). Los espectros presentan dos componentes espectrales, una inmóvil (señalada con flechas negras) y otra de alta movilidad (flechas rojas). En el espectro de BSA se notan claramente las dos componentes espectrales. En cambio, el componente fuertemente inmóvilizado de GAP-43 es proporcionalmente muy pequeño. El rectángulo verde señala la región del espectro, ampliada arriba a la derecha, en donde se observa la componente inmóvilizada de GAP-43.

Como puede observarse en la *figura 3.10*, el espectro de EPR del MT unido a GAP-43 consiste prácticamente en sólo una componente espectral isotrópica y de alta movilidad, porque la componente inmóvilizada está en una proporción muy baja. Para la componente móvil, es posible calcular el tiempo de correlación rotacional (τ_c) y compararlo con el del marcador MT libre en solución. Este tiempo de correlación fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula estándar para un régimen de alta movilidad medido en banda X [Raison y col., 1971; Gennaro y col., 1996]:

$$\tau_c = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_0 [(h_0 / h_{-1})^{1/2} - 1] \quad (\text{ec. 3.2})$$

donde τ_c está en segundos, ΔH_0 es el ancho pico a pico de la línea central del espectro de EPR (en gauss), y h_0 y h_{-1} son las amplitudes de la línea central y de la línea de campo alto, respectivamente. El factor numérico depende tanto del campo magnético como de las anisotropías del factor g y de la interacción hiperfina. El valor de $6,5 \cdot 10^{-10}$ es el que se usa habitualmente para experimentos de banda X. Un aumento de τ_c puede interpretarse como una disminución en la movilidad de la especie marcada.

El tiempo de correlación rotacional así calculado es de 0,63 ns para el MT unido a GAP-43 (a 18°C), casi 16 veces mayor que el del marcador MT libre en solución (0,04 ns). Por lo tanto, si bien el espectro de GAP-MT sugiere que el radical nitróxido continúa con un movimiento casi isotrópico al unirse a la proteína, su movilidad está disminuida. Por otro lado, la interacción hiperfina isotrópica (indicativa de la polaridad del medio y evaluada a partir de la separación en campo entre picos del espectro) es similar para el marcador en solución y el incorporado a GAP-43. En la consideración de estos resultados experimentales debe tenerse en cuenta que debido a su estructura química (ver

figura 1.18), el marcador de espín unido a la proteína se ve limitado en sus movimientos principalmente al establecer enlaces de hidrógeno con diferentes partes de la cadena polipeptídica. Pero si estos enlaces no están presentes, la componente W (débilmente inmovilizada) representará la mayor parte del espectro de EPR, como sucede en este caso. Esto indica que el marcador unido a la proteína está expuesto a un entorno acuoso. Por lo tanto, concluimos que el extremo N terminal de GAP-43 no palmitoilada presenta poca interacción con el resto de la cadena polipeptídica, permitiendo que el marcador de espín unido a ella tenga una gran libertad de movimiento. Esto se manifiesta en tiempos de correlación suficientemente bajos como para producir un espectro de EPR isotrópico, pero mayores que el de la molécula de MT en solución.

b) Ensayos de asociación de GAP-43 marcada con MT a liposomas

Se incubó la proteína marcada con MT (GAP-MT) en presencia de LUVs de composición definida: 80% DPPC+20% DPPS (correspondiente al sistema lipídico "A" que es el que presenta mayor porcentaje de asociación a GAP-43), utilizando condiciones experimentales de pH, temperatura y fuerza iónica similares a la del ensayo de asociación (sección 3.3.2) pero incorporando a la GAP-43 marcada con MT en una proporción proteína/lípidos de 1:2000. Después de centrifugar las muestras, se tomaron espectros de EPR a diferentes temperaturas, tanto del pellet (GAP-MT incorporada a LUVs) como del sobrenadante (GAP-MT en solución). En la figura 3.11 se muestran los resultados obtenidos.

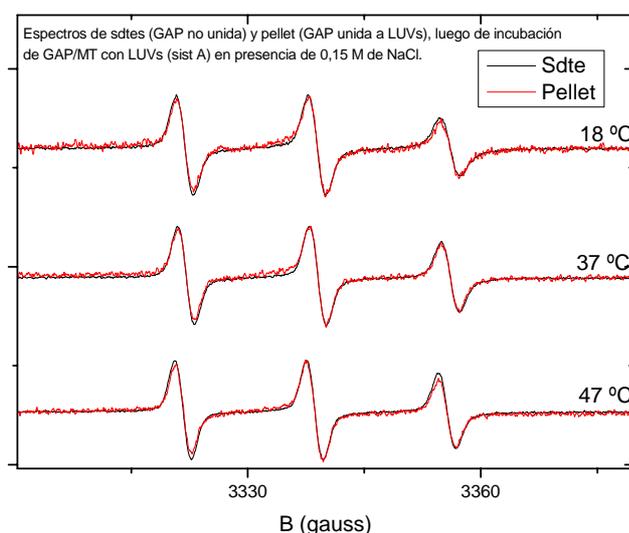


Figura 3.11: Espectros de GAP-MT libre (negro) en el sobrenadante de incubación con LUVs en presencia de 0,15 M de NaCl; y en el pellet (rojo) unido a LUVs compuestos de 80% DPPC y 20% DPPS. Se muestran espectros tomados a tres temperaturas diferentes: 18, 37 y 47°C.

A primera vista, los espectros de GAP-43 marcada con MT no muestran diferencias significativas entre la proteína en solución y unida a membrana. Sin embargo, si se calculan

los tiempos de correlación rotacional para cada caso (ver *tabla 3.3*) se puede observar una ligera disminución de la movilidad del MT unido a GAP-43 cuando la proteína interactúa con la bicapa lipídica, en comparación con la de la proteína en solución, para las tres temperaturas. Esto estaría demostrando que el radical Tempo unido al extremo N terminal de GAP-43 no palmitoilada limita muy débilmente sus movimientos cuando la proteína se une a la bicapa lipídica. Por otra parte, la interacción hiperfina isotrópica no sufre cambios, indicando que las cisteínas no pierden contacto con la solución acuosa

GAP/MT con LUVs A	τ_c ($\times 10^{-10}$ s)
sdte 18°C	5,0
Pellet 18°C	5,3
sdte 37°C	2,6
Pellet 37°C	2,9
sdte 47°C	2,2
Pellet 47°C	3,0

Tabla 3.3: Tiempos de correlación rotacional, τ_c , calculados según la **ec. 3.2** correspondientes a GAP-43 marcada con MT en solución (sdte) y unida a LUVs A (pellet), para las tres temperaturas a las que se obtuvieron los espectros de EPR.

Estos resultados indican que el extremo N-terminal de GAP-43 no se incorpora a la región hidrofóbica de la bicapa lipídica en la unión de la proteína, ya que en ese caso la movilidad del marcador hubiese disminuido marcadamente, al igual que la magnitud del desdoblamiento hiperfino. Por otra parte, el ligero aumento del τ_c del radical nitróxido luego de producida la unión a liposomas podría deberse a la rigidización del extremo N-terminal debido a una asociación superficial de carácter electrostático con la bicapa lipídica cargada negativamente. Teniendo esto presente es posible concluir que si el extremo N-terminal de GAP-43 se une a los liposomas, el marcador unido a la proteína (a través de su grupo maleimido) queda expuesto al exterior de la membrana. Sin embargo, no debe descartarse que la ligera disminución de movilidad pueda deberse a cualquier otro cambio conformacional de la proteína resultante de la unión a membrana que limite débilmente los movimientos del marcador de espín.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la fuerza iónica en la interacción de GAP-43 con los LUVs cargados eléctricamente, se repitió el ensayo de asociación, eliminando de la solución de incubación el NaCl. En la *figura 3.12* se muestran nuevamente los espectros de GAP-43/MT en solución y unida a LUVs obtenidos en estas condiciones.

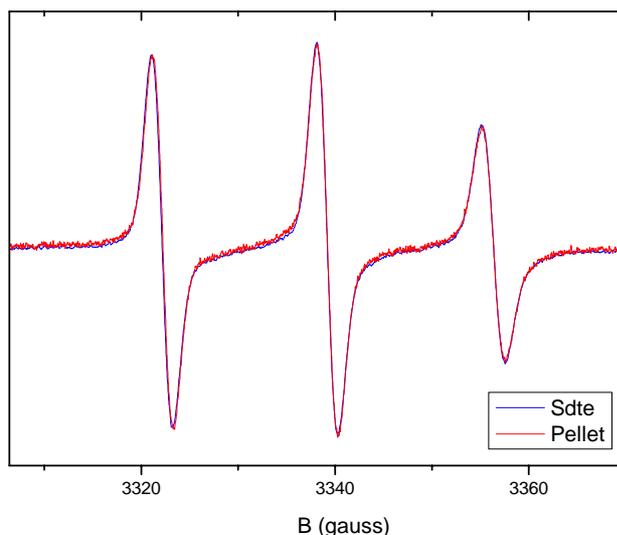


Figura 3.12: Espectros de GAP-MT libre (azul) en el sobrenadante de incubación con LUVs sin NaCl; y en el pellet (rojo) unido a LUVs A, compuestos de 80% DPPC y 20% DPPS. Espectros tomados a 18°C.

Aquí tampoco se pueden observar diferencias significativas entre los espectros de la proteína libre y la unida a liposomas, lo que indicaría que aun con una fuerza iónica menor, la interacción entre el extremo N terminal de la proteína y los LUVs no sufre modificaciones considerables. Sin embargo, al igual que en el ensayo anterior en donde se utilizaba NaCl para aumentar la fuerza iónica del medio, la asociación de la proteína a la bicapa lipídica produce una ligera disminución de τ_c , es decir de la movilidad del MT unido a la proteína. Los valores de τ_c para este caso se muestran en la *tabla 3.4*.

GAP/MT con LUVs A sin NaCl	τ_c ($\times 10^{-10}$ s)
sdte 18°C	4,0
Pellet 18°C	4,3

Tabla 3.4: Tiempos de correlación rotacional, τ_c , calculados según la **ec. 3.2** correspondientes a GAP-43 marcada con MT en solución (sdte) y unida a LUVs A (pellet). Incubación sin NaCl.

Finalmente se llevó a cabo un análisis detallado del efecto de la temperatura sobre los espectros de EPR de GAP-MT asociada a LUVs de tipo A con el objetivo de complementar el estudio de la interacción de la proteína con los liposomas. En la *figura 3.13a* se muestran los espectros a dos temperaturas diferentes: 18 y 47° C, esto es por debajo y por encima, respectivamente, de la temperatura de transición de la bicapa lipídica. Como comparación, en la *figura 3.13b* se muestran los espectros de MT libre en la suspensión de liposomas, a las mismas temperaturas.

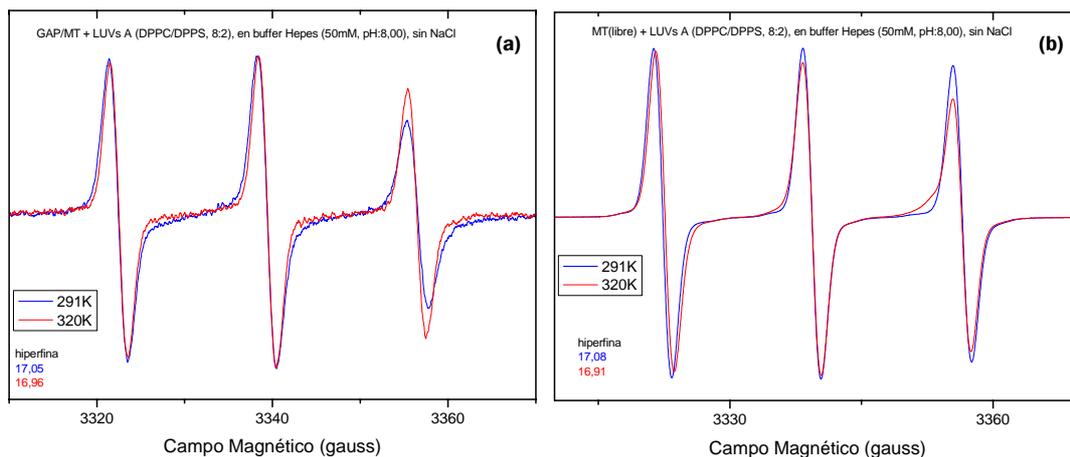


Figura 3.13. Modificación de los espectros de EPR con la temperatura. Espectros de MT (a) unido a GAP-43 y (b) en solución, en presencia de LUVs de tipo A (DPPC/DPPS 8:2, fase gel a T_{amb} , $T_c = 42.5^\circ\text{C}$). En ambos paneles se muestran espectros tomados a dos temperaturas diferentes 18°C (291K, en azul) y 47°C (320K, en rojo). En este ensayo se omitió el agregado de NaCl con el objetivo de maximizar la interacción de GAP/MT con los LUVs. En ambos ensayos la concentración de LUVs y de MT (unida a GAP-43 o libre en solución) fue la misma

Comparando ambas figuras, se observa que los espectros de GAP-MT en LUVs evolucionan con la temperatura en forma diferente a MT libre en presencia de LUVs. Para cuantificar estas diferencias, calculamos los tiempos de correlación isotrópicos usando la *ecuación 3.2* para ambos sistemas y a todas las temperaturas. Los resultados se muestran en la *figura 3.14*.

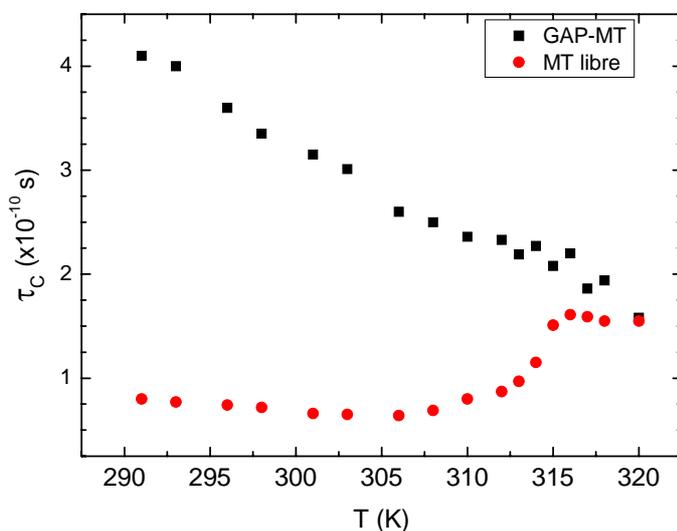


Figura 3.14: Evolución del τ_c de MT libre y unido a GAP-43 con la temperatura en presencia de LUVs. A partir de los espectros de EPR de MT unido a GAP-43 (GAP-MT) y de MT libre en solución, en presencia de una suspensión de LUVs de tipo A se calculó el τ_c , utilizando la *ec. 3.2*, y se lo graficó en función de la temperatura. Notar la disminución monótona de τ_c en GAP/MT y el aumento para MT libre alrededor de la temperatura de transición de la bicapa lipídica.

En la *figura 3.14* se aprecia que para el marcador libre en la suspensión de liposomas (rojo) el tiempo de correlación disminuye inicialmente a medida que aumenta la temperatura, indicando la disminución de viscosidad del medio de suspensión. Pero a medida que la temperatura se aproxima a la transición de fase gel-líquido cristalina de los LUVs ($315,5\text{ K}$ o $42,5\text{ }^\circ\text{C}$), τ_c aumenta abruptamente, y luego de la transición de fase comien-

za a disminuir nuevamente. Hay evidencia experimental de que el marcador Tempo (parte de la molécula de MT) es anfifilo y particiona en la bicapa lipídica en fase líquido cristalina [Polnaszek y col., 1978] y por lo tanto su comportamiento dinámico es sensible a la transición de fase de los liposomas. En este caso, nuestros experimentos parecen indicar que al menos la porción Tempo del MT, si el MT está en solución, puede insertarse en la bicapa cuando los LUVs pasan a la fase líquido cristalina, sufriendo un aumento del tiempo de correlación rotacional debido a la mayor viscosidad de la bicapa lipídica relativa al medio de suspensión. En cambio, según se observa en la *figura 3.14*, el MT unido al extremo N-terminal de GAP-43 (negro) sólo muestra una disminución monótona con la temperatura, producto de la disminución de la viscosidad de la solución, pero no es sensible a la transición de fase de la bicapa lipídica. Esto representa una evidencia adicional de que esta parte de la proteína no se incorpora a la bicapa lipídica

3.3.5 ENSAYO DE ASOCIACIÓN DE GAP-43 PALMITOILADA A LIPOSOMAS. CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA.

GAP-43 sufre una modificación postraduccional en las células del tejido nervioso que consiste en la unión de dos cadenas de palmitato en las cisteínas 3 y 4. Se cree que una palmitoiltransferasa unida a membrana cataliza la palmitoilación [Tsutsumi y col., 2008] aunque la especificidad hacia GAP-43 todavía no ha sido confirmada. En nuestro laboratorio obtuvimos GAP-43 palmitoilada (GAP/Pal) por medio de una tioesterificación química con palmitoil co-A. Una vez purificada la proteína se llevó a cabo un ensayo de asociación a LUVs de las 6 composiciones lipídicas descritas en la *sección 3.3.1*, y se cuantificó el porcentaje de asociación de la proteína mediante centrifugación y SDS-PAGE de manera similar a lo hecho con la proteína no palmitoilada (ver *sección 3.3.3*). En la *figura 3.15* se muestran los geles de SDS-PAGE correspondientes al sobrenadante de incubación de la proteína con los LUVs luego de la centrifugación (GAP/Pal no unida a LUVs), y el resultado de la cuantificación densitométrica se muestra en la *tabla 3.5*

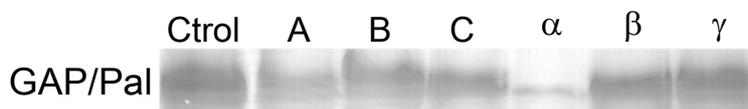


Figura 3.15: *Ensayo de asociación de GAP-43 palmitoilada.* Sobrenadantes de incubación de GAP-43 palmitoilada, (GAP/Pal) incubada con LUVs de diferente composición y con buffer sin LUVs (Ctrol). Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

Sistema Lipídico	A	B	C	α	β	γ
Fase a 37°C	<i>Gel</i>	<i>Lc</i>	<i>Lo</i>	<i>Gel</i>	<i>Lc</i>	<i>Lo</i>
GAP/Pal	51±8	33±3	47±5	89±4	26±3	13±6

Tabla 3.5: *Ensayo de asociación.* Porcentaje de proteína asociada a cada uno de los sistemas modelo de membrana luego de la incubación. El 100% corresponde al contenido total de proteína en la solución original y por diferencia con el contenido de proteína en el sobrenadante se determina el porcentaje de asociación. En la tabla se menciona la fase lipídica en la que se encuentra cada sistema a temperatura fisiológica.

Los resultados mostrados en la *tabla 3.5* indican que la proteína palmitoilada presenta un grado significativo de asociación a LUVs, tanto cargados eléctricamente como sin carga neta. En el caso de los primeros, la tendencia es similar a la proteína no palmitoilada, esto es, mayor afinidad por los sistemas lipídicos ordenados, sin embargo el porcentaje de asociación es algo mayor que en el caso de la proteína no palmitoilada. Esto sugiere que la adición de las dos cadenas de palmitato potencia la unión de la proteína a los LUVs. En cuanto a los liposomas sin carga neta es de particular magnitud la asociación a los LUVs de tipo α , los cuales están compuestos únicamente de DPPC (di-palmitoilfosfatidilcolina).

3.3.6 ENSAYOS DE DETECCIÓN DE LA UNIÓN DE GAP-43 PALMITOILADA A LIPOSOMAS POR ALTERACIÓN EN EL ORDENAMIENTO LIPÍDICO.

Con el objetivo de estudiar la interacción de GAP-43 palmitoilada con la bicapa lipídica se llevaron a cabo ensayos mediante espectroscopía de EPR para detectar alteraciones en el ordenamiento lipídico debidas a la asociación de la proteína a liposomas. Los LUVs fueron preparados incluyendo el marcador liposoluble 5-SASL y se los incubó en presencia de GAP-43. En esta oportunidad se utilizaron LUVs sólo de dos composiciones lipídicas diferentes: C (DMPC/Col/DPPS, 5:3:1) y α (DPPC puro) preparados con un 3% molar de 5-SASL (para aumentar la sensibilidad de la detección de la asociación). Con estos LUVs se llevó a cabo el ensayo de asociación utilizando la GAP-43, tanto la proteína original sin palmitoilar (GAP) como la proteína palmitoilada (GAP/Pal). Luego de la incubación, y la posterior separación por centrifugación de la proteína no asociada, se tomaron espectros de EPR a 19 y a 37° C (temperatura del ensayo de asociación) En la *figura 3.16* se muestran los resultados obtenidos.

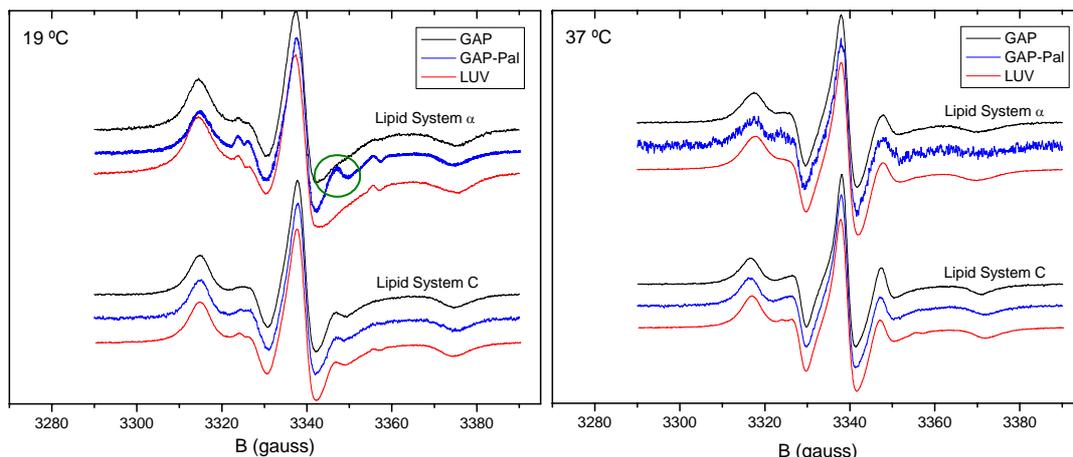


Figura 3.16: *Estudio de la asociación GAP-43/LUVs por EPR.* Espectros de EPR tomados a 19°C (izquierda) y a 37°C (derecha) de 5-SASL en LUVs de dos composiciones lipídicas diferentes (α y C, ver en el texto), en presencia de GAP-43 sin palmitoilar (negro), de GAP-43 palmitoilar (azul) y en ausencia de proteína (rojo). Un círculo verde en el gráfico de la izquierda señala las características que indican una mayor fluidez (además del valor de A_{MAX}) de los LUVs de tipo α , en presencia de GAP-Palm a 19°C con respecto a los LUV sin proteína.

Los datos mostrados en la *figura 3.16* confirman los resultados de ensayos anteriores (*sección 3.3.3*): la asociación de la proteína no palmitoilar a LUVs tipo C no produce cambios significativos en la dinámica del marcador de espín 5-SASL. Sin embargo, en el caso de la GAP-43 palmitoilar asociada a LUVs de DPPC puro (sistema lipídico α) es posible apreciar cambios en el ordenamiento lipídico sentido por el marcador de espín. La asociación de la proteína palmitoilar produce una disminución del orden dinámico de la bicapa lipídica de los LUVs de DPPC puro a 19°C, visible no sólo por la disminución del A_{MAX} , sino también por la aparición de estructuras características del espectro. Se observa a demás, un ligero aumento del orden a 37°C, temperatura a la que DPPC se encuentra en la fase gel ondulada o ripple [Chapman, 1993].

3.4 Discusión

El objetivo principal de esta parte del trabajo de tesis fue investigar los mecanismos de interacción de GAP-43 con la membrana. En particular, deseamos estudiar los factores que determinan la afinidad de la proteína por los dominios lipídicos ordenados.

Muchos autores indican que la unión de GAP-43 a membrana se produce inicialmente como consecuencia de la palmitoilación de la proteína en los residuos Cys-3 y Cys-4, y que la presencia de las cadenas de palmitato dirige la proteína hacia los rafts. Además, la incorporación de las cadenas de palmitato a la membrana induce algún tipo de cambio conformacional en la proteína que permite la interacción electrostática de 3 residuos básicos del extremo N-terminal (Arg-6, Arg-7, y Lys-9) con los fosfolípidos cargados negativamente de la membrana. Debido a esta interacción electrostática la proteína permanece unida a membrana a pesar de que las cadenas de palmitato hayan sido removidas [Denny, 2006]. Muchas de las proteínas de membrana que poseen un ancla lipídica muestran una interacción electrostática adicional con la bicapa lipídica, pero sólo permanecen asociadas a la membrana si se encuentran aciladas [Murray y col., 1997].

Por otra parte, en la literatura existen reportes de la unión de GAP-43 no palmitoilada a vesículas lipídicas artificiales que contienen un 20% de fosfatidilserina (fosfolípido cargado negativamente a pH fisiológico) [Hayashi y col., 1997; Tong y col., 2008] y se muestra que la región correspondiente al dominio efector polibásico experimenta un cambio conformacional (la formación de una hélice α) cuando la proteína se une a liposomas [Wertz y col., 1996; Hayashi y col., 1997].

Con el objetivo de analizar la relevancia de cada uno de estos factores en el proceso de unión de GAP-43 a la membrana se prepararon liposomas unilamelares de diferentes composiciones lipídicas con el objetivo de simular a la membrana biológica en diferentes estados físicos. Se estudiaron las propiedades de los diferentes sistemas lipídicos y se pudo determinar su estado de ordenamiento mediante EPR. Se comprobó que a la temperatura del ensayo, éstos presentan grados de ordenamiento marcadamente diferentes. Luego se realizaron diversos ensayos de asociación a LUVs con la proteína no palmitoilada y con la proteína palmitoilada.

3.4.1 UNIÓN DE GAP SIN PALMITOILAR.

Comprobamos que la proteína se une a LUVs sin necesidad de contar con las cadenas de palmitato. Pero esta unión ocurre sólo a liposomas con carga negativa, lo que permite

concluir que la interacción proteína-lípido para la proteína no palmitoilada es principalmente de carácter electrostático.

Entre los liposomas con carga negativa, se encontró mayor afinidad por los sistemas lipídicos ordenados. Estos resultados son consistentes con la asociación de esta proteína a rafts [Arni y col., 1998], donde las cadenas lipídicas tienen un ordenamiento alto y se postula que están en una fase similar a la líquido ordenada.

La interacción con la bicapa lipídica se pudo detectar como una disminución del ordenamiento lipídico en el sistema A. Si bien el ensayo de asociación se llevó a cabo a 37° C, el efecto de la alteración del ordenamiento lipídico es más notable a 20° C, cuando el sistema se encuentra en fase gel. Cuando la bicapa lipídica se encuentra en esta fase los lípidos están empaquetados densamente. La inserción de la proteína dificulta el acomodamiento de los lípidos, lo que explica la disminución del orden observada. A 37° C, el sistema A se encuentra en la fase ripple y probablemente la proteína puede insertarse sin producir mayores efectos en el ordenamiento lipídico por las ondulaciones de la bicapa.

A continuación llevamos a cabo una serie de ensayos para detectar específicamente una posible interacción del extremo N-terminal de GAP-43 con la membrana. Para tal fin se incorporó el marcador de espín MT en las Cys 3 y 4. En los espectros de EPR de GAP-MT en solución, el componente fuertemente inmovilizado está prácticamente ausente, lo que indica que el marcador de espín unido covalentemente a las cisteínas del extremo N terminal presenta una interacción muy pobre con el resto de la cadena polipeptídica. Como comparación, muestras de BSA marcadas con MT (en diferentes sitios de la proteína) presentan espectros de EPR compuestos con una importante fracción del marcador fuertemente inmovilizado (*figura 3.10*). La marcación de un conjunto heterogéneo de proteínas también presenta estas características (*figura 1.19*) [Alonso y col., 2001]. Por otra parte, las características de los espectros de GAP-MT indican también una movilidad del extremo N-terminal llamativamente elevada. En los trabajos de Alonso y colaboradores [Alonso y col., 2001; Alonso y col., 2003], el componente espectral débilmente inmovilizado W, generado por la subpoblación de moléculas del marcador que interactúan principalmente con el solvente y muy poco con la cadena polipeptídica, presenta tiempos de correlación rotacional significativamente mayores al del componente W de GAP-43. En cambio, en un estudio de la microviscosidad de eritrocitos [Genaro y col., 1996] se obtuvieron espectros de MT unido a glutation (un tripéptido) indicativos de movimientos isotrópicos, con tiempos de correlación del mismo orden de magnitud que los de GAP-MT ($4 \cdot 10^{-10}$ s). De todo lo anterior podemos concluir que el extremo N-terminal de GAP-43, no sólo presenta una interacción muy débil con el resto de la cadena polipeptídica, sino que también muestra una elevada movilidad. Estos resul-

tados están de acuerdo con el alto grado de desorden conformacional de GAP-43 [Hayashi y col., 1997; Vucetic y col., 2007].

Los ensayos de EPR donde se muestra que GAP-MT no detecta la transición de fase de liposomas indican que el extremo N-terminal no se inserta en la bicapa, descartando contribuciones de tipo hidrofóbico de esta porción de la proteína a la interacción de GAP-43 no palmitoilada con los liposomas [Ellena y col., 2003]. El hecho de que el marcador de espín continúe detectando un entorno acuoso cuando la proteína se une a los liposomas también apoya esta interpretación. Estos resultados muestran que, de existir una interacción del extremo N-terminal de GAP-43 con la membrana, ésta sería fundamentalmente de carácter electrostático, de manera similar al reportado en otras proteínas aciladas [Murray y col., 1997]. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que las variaciones en el grado de movilidad del marcador de espín unido al extremo N-terminal de GAP-43, observadas luego de la unión a liposomas, se deban a un cambio conformacional de la proteína no relacionado a la unión del extremo N-terminal a la bicapa lipídica.

3.4.2 UNIÓN DE GAP/PAL

Llevamos a cabo la palmitoilación de GAP-43, a través de la cual se le incorporan a la proteína dos cadenas de palmitato en las cisteínas 3 y 4. La asociación a LUVs cargados (con un 20% de DPPS) de la GAP-43 palmitoilada muestra la misma afinidad hacia los sistemas ordenados que la de la GAP-43 no palmitoilada. Pero la proteína palmitoilada presenta también una asociación significativa a los LUVs sin carga eléctrica neta, especialmente al sistema α (DPPC puro). Por lo tanto, la alta afinidad de la proteína palmitoilada por la bicapa lipídica se debe al efecto conjunto de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas [Murray y col., 1997; Tong y col., 2008].

Una situación particular se produce en la interacción de la proteína palmitoilada con los liposomas de DPPC puro (sistema α). La alta afinidad que presenta la proteína por este sistema puede deberse a la particular facilidad que encuentran las cadenas de palmitato para incorporarse a una bicapa de PC cuyos cadenas acílicas son todas de ácido palmítico. La asociación de GAP-43 palmitoilada a los liposomas de DPPC puro fue evidenciada mediante espectroscopía de EPR. En la *figura 3.16* podemos observar cómo la presencia de la proteína palmitoilada genera un aumento del desorden de las cadenas acílicas de la bicapa lipídica de los liposomas de DPPC puro a 19° C, mientras que a 37°C la inserción de la proteína en la bicapa lipídica genera un aumento del ordenamiento lipídico. La diferencia entre estos comportamientos puede hallarse en que a 19°C, el DPPC se encuentra en fase gel, con sus cadenas ordenadas y fuertemente em-

paquetadas, y la superficie de la bicapa es básicamente plana. La asociación de la proteína provoca un desorden en ese empaquetamiento debido a la inserción de los dos palmitatos asociados a la proteína. En cambio, a 37° C la bicapa se encuentra aun en fase gel, pero en el estado denominado "ripple", donde se postula la coexistencia de regiones ordenadas y desordenadas. En esas condiciones, la inserción de los palmitatos unidos a GAP-43 sería más fácil en las regiones desordenadas, que se volverían más rígidas por la cercanía de la proteína.

3.4.3 RELEVANCIA DE CADA UNA DE LAS INTERACCIONES

Se ha mostrado que las interacciones de carácter hidrofóbico entre la membrana y las proteínas aciladas son de particular importancia en su anclaje a la membrana; sin embargo, en muchos casos, también es necesaria la interacción electrostática de clusters de aminoácidos básicos con fosfolípidos ácidos para mantener dicha asociación [Murray y col., 1997; McLaughlin y col., 2005]. En nuestro sistema experimental observamos por un lado que GAP-43 no palmitoilada se une solamente a liposomas cargados eléctricamente (con un 20% de DPPS), y por otro lado GAP-43 palmitoilada se une a cada uno de estos liposomas con una afinidad mayor que la de la proteína sin palmitoilar. En este caso estaríamos ante el efecto sinérgico de las interacciones electrostática e hidrofóbica. En cambio, el porcentaje de asociación de GAP-43 palmitoilada con liposomas sin carga neta muestra sólo el efecto de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de palmitato y la bicapa lipídica. El hecho de que GAP-43 permanezca asociada a liposomas sin estar palmitoilada implica la intervención de interacciones diferentes a la inserción de los palmitatos en la bicapa lipídica. Es posible que exista una interacción de tipo electrostática entre el cluster de residuos básicos del extremo N-terminal de GAP-43 con los fosfolípidos ácidos de la bicapa lipídica y que esta interacción mantenga al extremo N-terminal unido a la superficie de los liposomas sin penetrar la membrana. Pero, independientemente de esta posible interacción, GAP-43 seguramente interactúa con la bicapa lipídica a través del dominio efector que posee una gran cantidad de residuos básicos, como han demostrado otros autores [Hayashi y col., 1997].

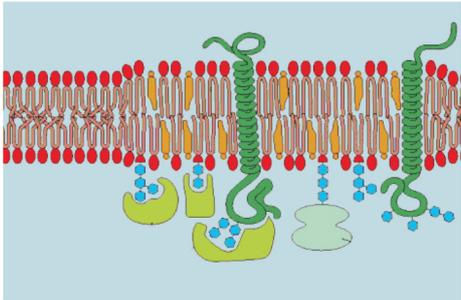
3.4.4 ASOCIACIÓN DE GAP A DOMINIOS ORDENADOS

En función de todos estos resultados es posible discutir los factores que determinan la afinidad de GAP-43 por los dominios lipídicos ordenados de la membrana (rafts). La segregación de proteínas aciladas en este tipo de dominios se ha reportado en un gran número de casos [Resh, 2004]. Sin embargo, en el caso de GAP-43 es probable que la

localización de la proteína en estos dominios esté mediada, no sólo por la afinidad de las cadenas de palmitato unidas al extremo N-terminal, sino también por interacciones de carácter fundamentalmente electrostático entre el cluster de residuos básicos de la cadena polipeptídica y los fosfolípidos ácidos de la hemicapa interna de la membrana plasmática, ya que tanto la proteína palmitoilada como la no palmitoilada muestran mayor afinidad hacia las bicapas ordenadas que hacia las desordenadas.

3.4.5 OBSERVACIONES ACERCA DE LOS ENSAYOS DE ASOCIACIÓN

Un aspecto interesante de los ensayos de asociación de GAP-43 no palmitoilada fue la especificidad de los distintos sistemas lipídicos hacia una u otra banda de la solución de GAP-43 (ver Materiales y métodos). Existen reportes que indican la presencia *in vivo* de GAP-43 junto con dos productos de la proteólisis sitio-específica de la proteína. Uno de los productos es consecuencia de la proteólisis de los primeros 4 aminoácidos del extremo N-terminal, designado como GAP-43₅₋₂₂₆ (para la proteína de rata, de 226 aminoácidos), y el otro es consecuencia de la proteólisis de los primeros 40 aminoácidos, designado como GAP-43₄₁₋₂₂₆. Esta proteólisis estaría mediada por la calpaína presente en el tejido nervioso [Zakharov y Mosevitsky, 2007]. Este fenómeno es impensable en el sistema de expresión transgénica utilizado en este trabajo. Sin embargo es posible que algún tipo de proteasa se haya co-purificado junto con la GAP-43 recombinante, y la segunda banda que aparece en la SDS-PAGE sea GAP-43₄₁₋₂₂₆ (GAP-43₅₋₂₂₆, no difiere significativamente de la proteína entera en cuanto a su peso molecular por lo que no se puede resolver mediante SDS-PAGE). Estos resultados serán objeto de futuras investigaciones.



CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Todas las membranas biológicas están constituidas por una gran variedad de lípidos y proteínas. Durante muchos años se pensó que las biomembranas eran simplemente un fluido bidimensional constituido por la bicapa lipídica en la cual estaban homogéneamente distribuidos sus componentes. Sin embargo, hace algunos años se propuso la existencia de dominios microscópicos segregados lateralmente con una composición lipídica y proteica diferente a la del resto de la membrana denominados rafts (balsas). Se cree que están enriquecidos en esfingolípidos, colesterol y glicerofosfolípidos de cadenas saturadas y que presentan un mayor ordenamiento lipídico que la membrana que los rodea. Los rafts han sido vinculados a un gran número de procesos biológicos, tales como el tráfico de lípidos y proteínas, la transducción de señales intracelulares, la motilidad y adhesión celular y el proceso de infección-entrada de patógenos y/o sus toxinas. A pesar de los numerosos esfuerzos conducidos a dilucidar la naturaleza y función de los rafts aún existe un intenso debate acerca de sus propiedades y características.

En la descripción de estos microdominios todavía no resulta totalmente claro qué papel cumplen los lípidos de la bicapa y cuál las proteínas. En este trabajo nos planteamos dos estrategias diferentes para abordar el estudio de los rafts.

Por una parte utilizamos un sistema biológico sencillo (la membrana eritrocitaria) para investigar las propiedades de los rafts mediante la obtención de DRMs (Membranas Resistentes al Detergente) con detergente no-iónico en frío. Aquí se discute la importancia de la composición lipídica y del ordenamiento de la membrana en la capacidad del detergente de extraer material a partir de la membrana.

Por otro lado llevamos a cabo un estudio de las interacciones de la proteína GAP-43 (reportada como perteneciente a rafts de neuronas e involucrada en el crecimiento neuronal) con sistemas modelo de membrana. Aquí estudiamos la relevancia de las interacciones proteína-lípido que determinan la afinidad de GAP-43 hacia los dominios lipídicos ordenados.

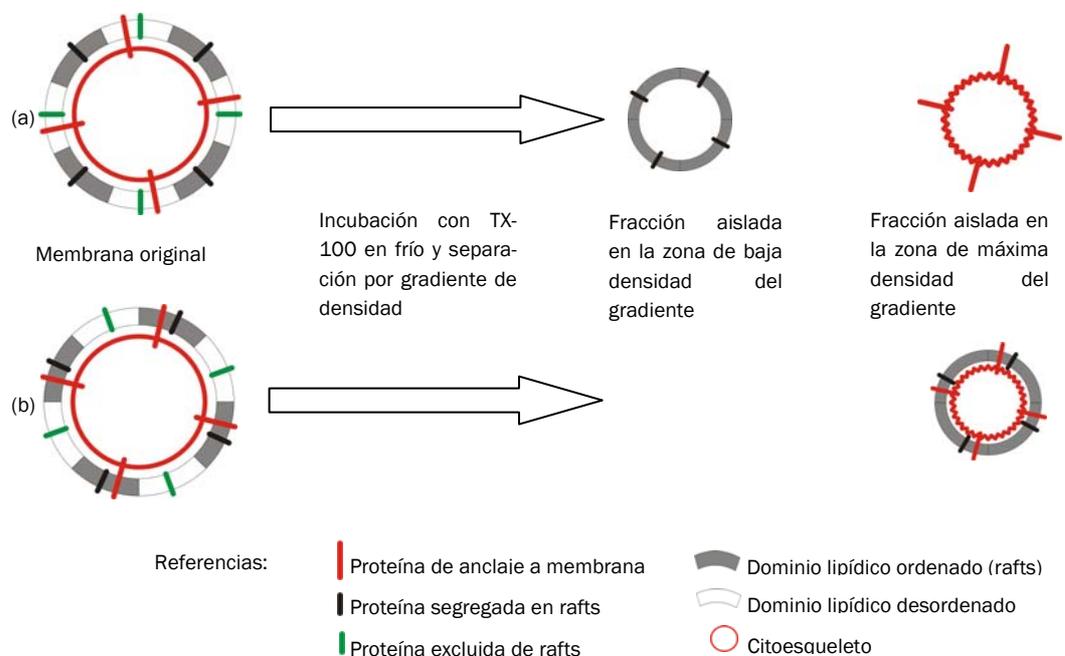
4.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA MEMBRANA ERITROCITARIA Y EL DETERGENTE NO-IÓNICO TRITON X-100

La insolubilidad frente a detergente es la principal herramienta bioquímica para el estudio de rafts lipídicos en la membrana. De hecho, la definición de proteína constituyente de raft es que se obtenga en la fracción de baja densidad (debido a su asociación con lípidos de membrana) después de la extracción en frío con Triton X-100 y la centrifugación en gradiente de densidad (constituido usualmente por fracciones de 40%, 35% y 5% de sacarosa).

La hipótesis de trabajo establece que el tratamiento con detergente desestabiliza la mayoría de las interacciones lípido-lípido, pero una pequeña parte de la membrana original se preserva y puede ser aislada en la interfase entre 5% y 35% de sacarosa del gradiente como una fracción de membrana resistente a detergente denominada *DRMs*. Esta fracción probablemente se origina a partir de los rafts lipídicos, que resisten la extracción debido al estrecho empaquetamiento de sus lípidos. La extracción con detergente también interfiere en las interacciones lípido-proteína de manera tal que la mayoría de las proteínas de membrana se solubilizan. Sólo unas cuantas proteínas mantienen su asociación con los lípidos y se recuperan en las DRMs

Se ha mostrado que el citoesqueleto permanece intacto luego del tratamiento con TX-100. Teniendo presente este hecho se pueden plantear dos situaciones diferentes al momento de aislar membranas resistentes a detergente mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad (ver figura):

- (a) las proteínas integrales de membrana que participan en el anclaje del citoesqueleto a la membrana quedan excluidas de las vesículas resistentes a detergente y por lo tanto el citoesqueleto se desvincula de las DRMs, que pueden por lo tanto ser aisladas en la zona de baja densidad del gradiente, o
- (b) estas proteínas que vinculan el citoesqueleto a la membrana quedan asociadas a las DRMs y por lo tanto el citoesqueleto también. Al someter la mezcla de extracción a un gradiente de densidad, el citoesqueleto arrastra a las vesículas de material insoluble e impide su aislamiento en la zona de baja densidad del gradiente.



En los ensayos de obtención de DRMs a partir de eritrocitos se ha mostrado cómo el citoesqueleto interfiere en el aislamiento de las vesículas insolubles. Utilizando un tratamiento con carbonato se consigue desestabilizar el citoesqueleto, permitiendo que sus componentes se solubilicen, y aislar DRMs en las cuales se encuentra la proteína integral Banda 3 (involucrada en el anclaje del citoesqueleto).

De esta manera, el aislamiento de las membranas resistentes a detergente mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad conduce a alguna de estas dos situaciones:

- (i) Si no se utilizan agentes desestabilizantes del citoesqueleto (como por ejemplo el carbonato de sodio) las vesículas de DRMs que permanecen asociadas al mismo no pueden ser aisladas en la zona de baja densidad (caso (a) en la figura).
- (ii) Si se utiliza una técnica que permita separar el citoesqueleto de la membrana, se pierde información acerca de la interacción de éste con las DRMs.

Ahora bien, si en lugar de aislar las vesículas de proteínas y lípidos insolubles mediante un gradiente de densidad se las sedimenta por microcentrifugación, éstas pueden ser separadas del material solubilizado independientemente de si están o no asociadas al citoesqueleto, ya que éste último también se obtendrá en el pellet de centrifugación. En esta parte del trabajo nos propusimos estudiar de manera integral el proceso de solubilización de la membrana eritrocitaria aislando el material insoluble mediante microcentrifugación.

Con este proceso, al someter a la membrana de eritrocitos humanos a la acción del detergente en las proporciones utilizadas en la literatura para la obtención de DRMs (1% de TX-100) observamos que:

- En la fracción insoluble se obtiene el 45% de PL y el 73% de Col de la membrana original junto con un conjunto complejo de proteínas en el cual se encuentran tres bandas polipeptídicas tentativamente asignables a actina y a la espectrina (α y β) constituyentes del citoesqueleto cortical del eritrocito, pero reportadas en algunos trabajos como proteínas solubles en Triton X-100.
- Las DRMs presentan un enriquecimiento en esfingomielina y colesterol, en relación a la membrana original.
- El aumento del contenido relativo de estos lípidos se ve acompañado con un aumento en el ordenamiento lipídico detectado mediante espectroscopía de EPR

De acuerdo con los modelos de solubilización de vesículas lipídicas, se espera que la composición del material insoluble dependa de las concentraciones relativas de detergente y de membrana. Es por ello que decidimos llevar a cabo un estudio de la resistencia de la membrana eritrocitaria al Triton X-100, abarcando un amplio rango de concentraciones de detergente. Las curvas de solubilidad de los fosfolípidos y del colesterol de la membrana del eritrocito humano muestran un proceso de solubilización monótono creciente con el aumento de la concentración de TX-100, lo que indica que, al menos desde el punto de vista de los lípidos, no existe un rango de concentración de detergente para el cual la cantidad de lípido insoluble se mantenga constante. Esto implica que una variación de la proporción de detergente/membrana conduce al aislamiento de fracciones insolubles de diferentes características. En el caso de que existieran dominios de membrana “relativamente” insolubles, éstos deberían poder detectarse en estas curvas como regiones en las cuales un aumento de la concentración de detergente no provoque un aumento considerable de la cantidad de lípidos solubilizados.

Investigamos la influencia del contenido de Col y SM de la membrana en la susceptibilidad al detergente. Encontramos que los eritrocitos humanos reducidos en Col presentan una mayor tendencia a la solubilización por el TX-100 que la membrana del eritrocito intacto, pero que luego de la reducción del contenido de colesterol de la membrana original, aún es posible aislar una fracción insoluble que contiene cantidades significativas de PL y Col cuando se utiliza 1% de TX-100. Encontramos que la membrana del eritrocito bovino (que posee una composición lipídica similar a la del eritrocito humano pero con mucha mayor proporción de SM) posee una alta resistencia a la acción del detergente. En este caso, para 1% de Triton (relación molar detergente/lípidos aproximadamente igual a 12) permanece insoluble el 72% de los PL y el 90% del colesterol de la membrana. A diferencia de lo que ocurre con eritrocitos humanos, estas DRMs poseen una composición y un ordenamiento lipídico similar al de la membrana original. Parece evidente que la naturaleza y la composición del material insoluble obtenido no sólo depende de la relación detergente a lípido utilizada sino también de la composición lipídica de las membranas.

Se hicieron ajustes experimentales que permitieron cuantificar la susceptibilidad de cada uno de los sistemas de membrana (IHE, CDHE, IBE y CDBE) frente al detergente a través de un parámetro de resistencia al detergente, D_0 :

- Observamos que D_0 muestra un incremento monótono cuando se lo grafica contra el contenido conjunto de los dos lípidos (Col+SM). Encontramos que la composición lipídica de estas membranas se asemeja a la de ciertos sistemas modelo en los cuales

los mecanismos que gobiernan la resistencia a detergente parecen estar relacionados con interacciones selectivas entre SM y Col

- Vimos que la región más hidrofóbica de la bicapa el ordenamiento está gobernado por un efecto conjunto SM+Col, en donde estos lípidos interactúan fuertemente y determinan un mayor ordenamiento lipídico. En cambio, en la zona más externa de la membrana la SM por sí sola gobierna el ordenamiento en la región más externa de las cadenas acílicas. En este caso se espera que el colesterol tenga un efecto espaciador de los grupos de cabeza polares y no contribuya al ordenamiento de la membrana.
- Demostramos que el ordenamiento lipídico de las cadenas acílicas de la membrana (en el centro de la bicapa lipídica) está relacionado con la resistencia a la acción del detergente. Un mayor ordenamiento lipídico de la región hidrofóbica de la membrana implica una mayor resistencia al detergente, independientemente de la composición lipídica de la membrana de los sistemas estudiados. De esta manera, parece claro que la insolubilidad en las membranas de eritrocito está directamente relacionada con el ordenamiento de las cadenas acílicas. La comparación con sistemas modelo de membrana sistemas sugiere que una importante porción de los lípidos en la membrana no se encuentran en una fase fluida líquido cristalina, sino más bien en una fase similar al estado líquido ordenado
- Determinamos la relación PL/Col de las DRMs obtenidas a partir de eritrocitos humanos y bovinos en función de la concentración de TX-100, y encontramos una disminución inicial de la relación molar PL/Col hasta llegar a un valor de 1,1. Es decir que, a pesar de la notable diferencia de proporción de SM (y de PC) en las membranas eritrocitarias de ambas especies, el material insoluble presenta una relación molar PL/Col similar. Sin embargo, la concentración de TX-100 a la que las DRMs de eritrocito bovino alcanzan esta relación de PL/Col es superior a la de los eritrocitos humanos.

Obtuvimos DRMs utilizando el protocolo estándar de ultracentrifugación en gradiente de la mezcla de incubación de membranas de eritrocitos bovinos con 1% de TX-100 ($R=12$) y encontramos que no es posible aislar el material flotante en la zona de la interfase entre 5% y 35% de sacarosa. Un tratamiento con Na_2CO_3 previo a la ultracentrifugación permitió la obtención de cantidades adecuadas de DRM en esa zona. Estas muestras de DRM fueron estudiadas mediante EPR y muestran un ordenamiento lipídico prácticamente idéntico al observado en las muestras tratadas en condiciones similares pero aisladas por microcentrifugación

La relevancia de los resultados obtenidos mediante la técnica de DRMs en el estudio de rafts lipídicos sigue siendo un tema ampliamente discutido. En nuestro trabajo realizado con eritrocitos hemos mostrado que:

- (1) las características del material insoluble obtenido dependen de la composición de la membrana original. Este hecho implica que el protocolo de obtención de DRMs debe adecuarse al tipo de célula utilizado.
- (2) no parece existir un rango de concentración de TX-100 para el cual la cantidad de lípidos insolubles se mantenga constante, es decir que no existe un rango de “insolubilidad efectiva” de cierto subconjunto de lípidos de la membrana. Esto implica que los dominios ordenados en la membrana original no muestran una susceptibilidad al detergente lo suficientemente diferente al resto de la membrana como para tener un criterio objetivo que permita precisar cual es la relación detergente/lípido adecuada para la obtención de una muestra de DRMs que los represente.
- (3) la relación molar PL/Col en función de la concentración de detergente varía de un sistema lipídico a otro, pero a grandes concentraciones de TX-100 esta relación tiende al mismo valor (1,1).
- (4) la asociación del citoesqueleto cortical del eritrocito con las vesículas de lípidos insolubles interfiere en el aislamiento de DRMs mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad. El uso de agentes desestabilizantes del citoesqueleto permite obtener DRMs pero se pierde información de la posible relación in vivo de los dominios ordenados con el citoesqueleto.

La metodología de DRMs ha demostrado ser una herramienta útil en el estudio de dominios de membrana, ya que se ha comprobado por diferentes métodos que la mayoría de las proteínas que están normalmente presentes en DRMs se encuentran asociadas a rafts [Salzer y col., 2007]. Por otra parte, la utilización del TX-100 nos permitió explorar las interacciones lipídicas en sistemas de membrana complejos.

De las conclusiones enumeradas anteriormente surgen numerosos interrogantes y estrategias experimentales para intentar dilucidarlos:

- I. Realizar todo un conjunto de ensayos similares a los de este trabajo utilizando vesículas constituidas a partir de los lípidos de la membrana original.
- II. Ampliar el análisis de las DRMs obtenidas con diferentes concentraciones de TX-100 analizando su contenido proteico mediante técnicas que permitan la identificación específica de dichas proteínas.

- III. Profundizar el estudio de las DRMs obtenidas mediante ultracentrifugación en gradiente para comparar los resultados obtenidos con el método de aislamiento utilizando microcentrifugación.
- IV. Utilizar otras técnicas experimentales que permitan abordar el estudio de los dominios de rafts lipídicos en membranas biológicas.

4.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE GAP CON SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA

En esta parte del trabajo de tesis nos propusimos investigar los mecanismos de interacción de GAP-43 con la membrana, y en particular, los factores que determinan la afinidad de la proteína por los dominios lipídicos ordenados

Preparamos liposomas unilamelares de diferentes composiciones lipídicas y verificamos que a la temperatura del ensayo, éstos presentan grados de ordenamiento marcadamente diferentes

Comprobamos que la proteína se une a LUVs sin necesidad de contar con las cadenas de palmitato. Pero esta unión ocurre sólo a liposomas con carga negativa, lo que permite concluir que la interacción proteína-lípido para la proteína no palmitoilada es principalmente de carácter electrostático

Encontramos que entre los liposomas con carga negativa, GAP-43 presenta mayor afinidad por los sistemas lipídicos ordenados. La interacción con la bicapa lipídica se pudo detectar como una disminución del ordenamiento lipídico en el sistema A.

Investigamos una posible interacción del extremo N-terminal de GAP-43 con la membrana. Observamos que el marcador de espín unido covalentemente a las cisteínas a esa parte de la proteína presenta una interacción muy pobre con el resto de la cadena polipeptídica, y sugiere que el extremo N-terminal posee una movilidad llamativamente elevada. Mostramos que el extremo N-terminal no se inserta en la bicapa, descartando contribuciones de tipo hidrofóbico de esta porción de la proteína. De lo anterior concluimos que, de existir una interacción del extremo N-terminal de GAP-43 con la membrana, ésta sería fundamentalmente de carácter electrostático.

Mostramos que GAP-43 palmitoilada muestra la misma afinidad hacia los sistemas ordenados que la GAP-43 no palmitoilada. Pero la proteína palmitoilada presenta también una asociación significativa a los LUVs sin carga eléctrica neta, especialmente al sistema α (DPPC puro). Concluimos que la alta afinidad de la proteína palmitoilada por la bicapa lipídica se debe al efecto conjunto de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

En cuanto a los factores que determinan la afinidad de GAP-43 por los dominios lipídicos ordenados de la membrana (rafts), es probable que la localización de la proteína en estos dominios esté mediada, no sólo por la afinidad de las cadenas de palmitato unidas al extremo N-terminal, sino también por interacciones de carácter fundamentalmente electrostático entre el cluster de residuos básicos de la cadena polipeptídica y los fosfolípidos ácidos de la hemicapa interna de la membrana plasmática, las cuales muestran una selectividad hacia las bicapas ordenadas

A partir de los resultados y conclusiones de esta parte del trabajo de tesis surgen las siguientes consideraciones para futuras investigaciones acerca de la interacción de GAP-43 con membranas, su segregación en dominios lipídicos y las implicancias de ello en las funciones de la proteína en las células nerviosas:

- I. Generar una serie de proteínas mutantes, mediante técnicas de ADN recombinante, para reemplazar los residuos originales por cisteínas y poder incorporar el marcador de espín MT en distintos sitios de interés en la proteína, como por ejemplo el dominio efector, y de esta manera detectar cambios conformacionales que permitan estudiar la interacción de GAP-43 con membranas.
- II. Construir mutantes con dos residuos de cisteína en posiciones estratégicas, lo que permitirá mediante su doble marcación explorar la posibilidad de estimar las distancias intramoleculares correspondientes por acoplamiento espín-espín
- III. Investigar la localización de GAP-43, tanto palmitoilada como no palmitoilada, en dominios lipídicos utilizando sistemas modelo de membrana de composición adecuada y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). De esta manera se espera poder evaluar la localización de GAP-43 en el plano de la bicapa lipídica. Eventualmente se podrá estudiar el efecto sobre la localización de la proteína de la depalmitoilación con hidroxilamina, del tratamiento con M β CD para reducir el contenido de colesterol, y con detergente TX-100 para separar la fracción insoluble de la bicapa.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografía

- AHMED, S.N.; BROWN, D.A. y LONDON, E. (1997) *On the origin of sphingolipid/cholesterol rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes*. *Biochemistry*. 36: 10944-10953.
- AHYAYAUCH, H.; LARIJANI, B.; ALONSO, A. y GOÑI, F.M. (2006) *Detergent solubilization of phosphatidylcholine bilayers in the fluid state: influence of the acyl chain structure*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1758: 190-196.
- AITTONIEMI, J.; NIEMELA, P.S.; HYVONEN, M.T.; KARTTUNEN, M. y VATTULAINEN, I. (2007) *Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine*. *Biophys. J.* 92: 1125-1137.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS K. y WALTER, P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science. New York, EE.UU.
- ALONSO, A.; DOS SANTOS, J.G. y TABAK, M. (2000) *Stratum corneum protein mobility as evaluated by a spin label maleimide derivative*. *Biochim Biophys Acta*. 1478: 89-101.
- ALONSO, A.; DOS SANTOS, W.P.; LEONOR, S.J.; DOS SANTOS J.G. y TABAK, M. (2001) *Stratum corneum protein dynamics as evaluated by a spin-label maleimide derivative: effect of urea*. *Biophys J.* 81: 3566-3576.
- ALONSO, A.; VASQUES DA SILVA, J. y TABAK, M. (2003) *Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy*. *Biochim Biophys Acta*. 1646: 32-41.
- ANDERSON, R.G.W. y JACOBSON, K. (2002) *A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts and other membrane domains*. *Science* 296: 1821-1825.
- APPENZELLER-HERZOG, C. y HAURI, H.P. (2006) *The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): In search of its identity and function*. *J Cell Sci*. 119: 2173-2183.
- ARNI, S.; KEILBAUGH, S.A.; OSTERMEYER, A.G. y BROWN, D.A. (1998) *Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues*. *J Biol Chem*. 273: 28478-28485.
- BAKER, L.P. y STORM, D.R. (1997) *Dynamic palmitoylation of neuromodulin (GAP-43) in cultured rat cerebellar neurons and mouse N1E-115 cells*. *Neurosci Lett*. 234: 156-160.
- BANERJEE, P.; JOO, J.B.; BUSE, J.T. y DAWSON, G (1995). *Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents*. *Chem. Phys. Lipids* 77: 65-78.

- BARTELS, T.; LANKALAPALLI, R.S.; BITTMAN, R.; BEYER, K., BROWN, M.F. (2008) *Raftlike mixtures of sphingomyelin and cholesterol investigated by solid-state 2H NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc. 130:14521-14532.
- BENNETT, V y LAMBERT, S (1991) *The Spectrin Skeleton: From Red Cells to Brain*. J. Clin. Invest. 87: 1483-1489
- BENOWITZ, L.I. y ROUTTENBERG, A. (1997) *GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity*. Trends Neuro-sci. 20: 84–91.
- BERLINER, L.J. y REUBEN J. (editores) (1989) *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 8, “Spin Labeling - Theory and Applications”. Plenum Press. New York, EE.UU.
- BHAT R.A. y PANSTRUGA, R. (2005) *Lipid rafts in plants*. Planta. 223(1): 5-19.
- BLUMENTHAL, D.K.; TAKIO, K.; EDELMAN, A.M.; CHARBONNEAU, H.; TITANI, K.; WALSH, K.A. y KREBS, E.G. (1985) *Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase*. Proc Natl Acad Sci USA. 82(10): 3187-3191.
- BOLARD, J. (1986) *How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?* Biochim. Biophys. Acta 864: 257-304.
- BROWN, D.A. (2006) *Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals*. Physiology (Bethesda). 21 :430-439.
- BROWN, D.A. y LONDON, E. (1998a) *Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes*. J Membr Biol. 164: 103-114.
- BROWN, D.A. y LONDON, E. (1998b) *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol. 14, 111-136.
- BROWN, D.A. y LONDON E. (2000) *Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts*. J. Biol. Chem. 275: 17221–17224.
- BROWN, D.A. y ROSE, J.K.(1992) *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. Cell. 68: 533-544.
- CAMPBELL, D.S. y HOLT, C.E. (2001) *Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation*. Neuron. 32: 1013-1026.
- CAMPBELL, I.D. y DWEK, R.A. (1984) *Biological Spectroscopy*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California.
- CARONI, P. (2001) *Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI (4,5) P2 rafts*. EMBO J. 20: 4332-4336.
- CASSERA, M.B.; SILBER, A.M. y GENNARO, A.M. (2002) *Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study*. Biophys. Chem. 99: 117-127.
- CHACHATY, C.; RAINTEAU, D.; TESSIER, C.; QUINN, P.J. y WOLF C. (2005) *Building up of the liquid-ordered phase formed by sphingomyelin and cholesterol*. Biophys. J. 88: 4032–4044.

- CHAPMAN, D. (1993) *Lipid phase transitions, en Biomembranes, Physical Aspects*, (editado por M.Shinitzky), VCH, Weinheim.
- CHAPMAN, E.R.; AU, D.; ALEXANDER, K.A.; NICOLSON; T.A. y STORM, D.R. (1991) *Characterization of the calmodulin binding domain of neuromodulin. Functional significance of serine 41 and phenylalanine 42*. J Biol Chem. 266: 207-213.
- CHAZAL, N. y GERLIER, D. (2003). *Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67: 226-237.
- CHINI, B. y PARENTI, M. (2009) *G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats*. J Mol Endocrinol. 42:371-379.
- CHRISTIAN, A.E.; HAYNES, M.P.; PHILLIPS, M.C. y ROTHBLAT, G.H. (1997) *Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content*. J. Lipid Res. 38: 2264-2272.
- CIANA, A.; BALDUINI, C. y MINETTI, G. (2005) *Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton*. J Biosci. 30: 317-328.
- CINEK, T. y HOREJS, I. V. (1992) *The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases*. J Immunol. 149: 2262-2270.
- CIVENNI, G.; TEST, S.T.; BRODBECK, U. y BUTIKOFER, P. (1998) *In vitro incorporation of GPI-anchored proteins into human erythrocytes and their fate in the membrane*. Blood 91: 1784-1792.
- COOPER, G.M. (2000) *The Cell - A Molecular Approach*, 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland, Inglaterra.
- DANIELLI, J.F. y DAVSON, H. (1935). *A contribution to the theory of permeability of thin films*. J. Cell Comp. Physiol. 5: 495-508.
- DENNY, J.B. (2006) *Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-Associated Protein GAP-43*. Curr Neuropharmacol. 4(4): 293-304
- DIETRICH, C.; BAGATOLLI, L.A.; VOLOVYK, Z.N.; THOMPSON, N.L.; LEVI, M.; JACOBSON, K. y GRATTON, E. (2001). *Lipid rafts reconstituted in model membranes*. Biophys. J. 80: 1417-1428.
- DRISDEL, R.C.; ALEXANDER, J.K.; SAYEED, A. y GREEN, W.N. (2006) *Assays of protein palmitoylation*. Methods. 40(2): 127-34.
- DUGGAN, J.; JAMAL, G.; TILLEY, M.; DAVIS, B.; MCKENZIE, G.; VERE, K.; SOMEKH, M.G.; O'SHEA, P. y HARRIS, H. (2008) *Functional imaging of microdomains in cell membranes*. Eur Biophys J. 37:1279-1289.
- DUNCAN, J.A. y GILMAN, A.G. (1998) *A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein α subunits and p21RAS*. J Biol Chem. 273: 15830-15837.

- DYSON, H.J.; MERUTKA, G.; WALTHO, J.P.; LERNER, R.A. y WRIGHT, P.E. (1992) *Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding. I. Myohemerythrin*. J Mol Biol. 226(3): 795-817.
- EDIDIN, M. (2001) *Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane*. Trends Cell Biol. 11: 492-496
- EDIDIN, M. (2003) *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 32: 257-283.
- ELLENA, J.F.; BURNITZ, M.C. y CAFISO, D.S. (2003) *Location of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) effector domain in negatively charged phospholipid bicelles*. Biophys J. 85(4): 2442-2448
- ENGELMAN, D.M. (1970) *X-ray diffraction studies of phase transitions in the membrane of Mycoplasma laidlawii*. J. Mol. Biol. 47: 115-117.
- ESMANN, M.; HIDEG, K. y MARSH, D. (1992) *Analysis of thiol-topography in Na,K-ATPase using labelling with different maleimide nitroxide derivatives*. Biochim Biophys Acta. 1112: 215-225.
- FAJER, P.G. (2000) *Electron Spin Resonance Spectroscopy Labeling in Peptide and Protein Analysis*, en: Encyclopedia of Analytical Chemistry (Meyers, R.A., ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Inglaterra.
- FANTINI, J.; GARMY, N.; MALIFOUD, R. y YAHY, N. (2002). *Lipids rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases*. Expert. Rev. Mol. Med. 4(27): 1-22.
- FLORIN-CHRISTENSEN, J.; SUAREZ, C.E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; HINES, S.A.; McELWAIN, T.F. y PALMER, G.H. (2000) *Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite Babesia bovis*. Mol. Biochem. Parasitol. 106: 147-156.
- FRIEDRICHSON, T. y KURZCHALIA, T.V. (1998) *Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking*. Nature 394: 802-805.
- FUKANO, T.; SAWANO, A.; OHBA, Y.; MATSUDA, M. y MIYAWAKI, A. (2007) *Differential Ras activation between caveolae/raft and non-raft microdomains*. Cell Struct Funct. 32: 9-15.
- GALLO, G. y LETOURNEAU, P.C. (2004) *Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues*. J Neurobiol. 58: 92-102.
- GENNARO, A.M.; LUQUITA, A. y RASIA, M. (1996) *Comparison Between Internal Microviscosity of Low Density Erythrocytes and the Microviscosity of Hemoglobin Solutions: an Electron Paramagnetic Resonance Study*. Biophys. J. 71: 389-393.
- GENNARO, A.M.; PINCELLI, M.M. y LEVSTEIN, P.R. (1998) *Efecto del colesterol sobre estructuras supramoleculares de glicolípidos: estudios por resonancia paramagnética electrónica*. Anales AFA. 10: 366-372.

- GERENDASY, D.D.; HERRON, S.R.; WONG, K.K.; WATSON, J.B. y SUTCLIFFE, J.G. (1994) *Rapid purification, site-directed mutagenesis, and initial characterization of recombinant RC3/neurogranin*. J. Mol. Neurosci. 5(3): 133-148.
- GOLDBERG, J.L. (2003) *How does an axon grow?* Genes Develop. 17: 941-958.
- GOÑI, F.M.; ALONSO, A.; BAGATOLLI, L.A.; BROWN, R.E.; MARSH, D.; PRIETO, M. y THEWALT, J.L. (2008) *Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts*. Biochim Biophys Acta. 1781:665-84.
- GORTER, E. y GRENDDEL, F. (1925) *On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood*. J. Exp. Med. 41: 439-443.
- GOVEK, E.E.; NEWEY, S.E. y VAN AELST, L. (2005) *The role of the Rho GTPases in neuronal development*. Genes Develop. 19: 1-49.
- GRAHAM, J.M. y HIGGINS, J.A. (1993). *Methods in Molecular Biology, Vol. 19: Biomembrane Protocols: I. Isolation and Analysis*. Humana Press Inc. Totowa, NJ, EE.UU.
- GRIFFITH, O.H. y JOST, P. (1976) *Spin label in biological membranes, en Spin labeling: Theory and applications*. (Berliner L.J., ed.) Academic Press, New York, EE.UU. pp 454-523.
- GUYTON, A.C. y HALL, J.E. (2006) *Textbook of medical physiology*, 11^o ed. Elsevier Science. Ámsterdam, Países Bajos.
- HAGERSTRAND, H.; MROWCZYNSKA, L.; SALZER, U.; PROHASKA, R.; MICHELSEN, K.A.; Kralj-Iglic, V. y Iglic, (2006) A. *Curvature-dependent lateral distribution of raft markers in the human erythrocyte membrane*. Mol. Membr. Biol. 23: 277-288.
- HANCOCK, J.F. (2006) *Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints*. Nat Rev Mol Cell Biol. 7: 456-62.
- HAYASHI, N.; MATSUBARA, M.; TITANI, K. y TANIGUCHI, H. (1997) *Circular dichroism and 1H nuclear magnetic resonance studies on the solution and membrane structures of GAP-43 calmodulin-binding domain*. J Biol Chem. 272: 7639-7645.
- HE, Q.; DENT, E.W. y MEIRI, K.F. (1997) *Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site*. J Neurosci. 17: 3515-3524.
- HELENIUS, A. y SIMONS, K. (1975) *Solubilization of membranes by detergents*. Biochim Biophys Acta. 415: 29-79.
- HERKLOOTZ, H. (2002) *Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures*. Biophys. J. 83: 2693-2701.
- HUBBELL, W.L.; CAFISO, D.S. y ALTENBACH, C. (2000) *Identifying conformational changes with site-directed spin labeling*. Nat Struct Biol.7: 735-739.

- HWANG, J.; GHEBER, L.; MARGOLIS, L. y EDIDIN, M. (1998) *Domains in cell plasma membranes investigated by Near-field Scanning Optical Microscopy*. *Biophys. J.* 74: 2184-2190.
- IKONEN, E. (2001). *Roles of lipid rafts in membrane transport*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 470-477.
- ILANGUMARAN, S. y HOESSLI, D.C. (1998) *Effect of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane*. *Biochem. J.* 335: 433-440.
- ILANGUMARAN, S.; ARNI, S.; VAN ECHTEN-DECKER, G.; BORISCH, B. y HOESSLI, D.C. (1999) *Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes*. *Mol. Biol. Cell* 10: 891-905.
- IPSEN, J.H.; KARLSTROM, G.; MOURITSEN, O.G.; WENNERSTROM, H. y ZUCKERMANN, M.J. (1987) *Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system*. *Biochim Biophys Acta.* 905: 162-172.
- JACOBSON, K. y DIETRICH, C. (1999) *Looking at lipid rafts?* *Trends Cell Biol.* 9: 87-91.
- JOST, P.C. y GRIFFITH O.H. (1980) *The lipid-protein interface in biological membranes*. *Ann. NY Acad. Sci.* 348: 391-407.
- KAHYA, N.; SCHERFELD, D.; BACIA, K.; POOLMAN, B. y SCHWILLE, P. (2003) *Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy*. *J. Biol. Chem.* 278: 28109-28115.
- KELLER, S.L.; PITCHER, W.H.; HUESTIS, W.H. y MCCONNELL, H.M. (1998) *Red Blood Cell Lipids Form Immiscible Liquids*. *Phys. Rev. Lett.* 81: 5019-5022.
- KENWORTHY, A.K. y EDIDIN, M. (1998) *Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 using imaging fluorescence energy transfer*. *J. Cell Biol.* 142: 69-84.
- KENWORTHY, A.K.; PETRANOVA, N. y EDIDIN, M. (2000) *High resolution FRET microscopy of cholera toxin B subunit and GPI proteins in cell plasma membranes*. *Mol. Biol. Cell* 11: 1645-1655.
- KIM, J.; BLACKSHEAR, P.J.; JOHNSON, J.D. y MCLAUGHLIN, S. (1994) *Phosphorylation reverses the membrane association of peptides that correspond to the basic domains of MARCKS and neuromodulin*. *Biophys J.* 67(1): 227-237.
- KIRAZOV, L.P.; VENKOV, L.G. y KIRAZOV, E.P. (1993) *Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions*. *Anal. Biochem.* 208: 44-48.
- KOUMANOV, K.S.; TESSIER, C.; MOMCHILOVA, A.B.; RAINTEAU, D.; WOLF, C. y QUINN, P.J. (2005) *Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane rafts fractions isolated from human and ruminant erythrocytes*. *Arch. Biochem. Biophys.* 434: 150-158.

- KRUGER, N.J. (1994) *The Bradford method for protein quantitation*. *Methods Mol Biol.* 32: 9-15
- KUSUMI, A. y SAKO, Y. (1996) *Cell surface organization and the membrane skeleton*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 566-574.
- LANGE, Y.; HADESMAN, R.A. y STECK, T.L. (1982) *Role of the Reticulum in the Stability and Shape of the Isolated Human Erythrocyte Membrane*. *J Cell Biol.* 92(3): 714-21.
- LANGMUIR, I. (1917). *The constitution and structural properties of solids and liquids. II. Liquids*. *Journal of the American Chemical Society.* 39: 1848-1906.
- LAUER, S.; VANWYE, J.; HARRISON, T.; MCMANUS, H.; SAMUEL, B.U.; HILLER, N.L.; MOHANDAS, N. y HALDAR, K. (2000) *Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection*. *Embo J.* 19: 3556-3564.
- LAUX, T.; FUKAMI, K.; THELEN, M.; GOLUB, T.; FREY, D. y CARONI, P. (2000) *GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI (4,5) P2 at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism*. *J Cell Biol.* 149: 1455-1471.
- LAWRENCE, J.C.; SASLOWSKY, D.E.; EDWARDSON, J.M. y HENDERSON, R.M. (2003) *Real time analysis of the effect of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy*. *Biophys. J.* 84: 1827-1832.
- LE MARIE, M.; CHAMPEIL, P. y MØLLER J.V. (2000). *Interaction of membrane proteins and lipid with solubilizing detergents*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 86-111.
- LEVSTEIN, P.R.; GENNARO, A.M. y PINCELLI, M.M. (2002) *³¹P-NMR and spin label EPR as complementary techniques for lipid polymorphism studies*, en: *Recent Research Developments in Biophysical Chemistry* (Condat, C.A.; Baruzzi, A.M., ed.). Transworld Research Network. Kerala, India, pp. 165-180.
- LIANG, X.; LU, Y.; NEUBERT, T.A. y RESH, M.D. (2002) *Mass spectrometric analysis of GAP-43/neuromodulin reveals the presence of a variety of fatty acylated species*. *J Biol Chem.* 277: 33032-33040.
- LICHTENBERG, D. (1985). *Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants*. *Biochim. Biophys. Acta.* 821: 470-478.
- LICHTENBERG, D.; GOÑI, F.M. y HEERKLOTZ, H. (2005) *Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts*. *Trends Biochem. Sci.* 30: 430-436.
- LICHTENBERG, D.; OPATOWSKI, E y KOZLOV, M.M. (2000). *Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 1-19.
- LINDER, M.E. y DESCHENES, R.J. (2003) *New insights into the mechanisms of protein palmitoylation*. *Biochemistry.* 42: 4311-4320.
- LINGWOOD, D.; KAISER, H.J.; LEVENTAL, I. y SIMONS, K. (2009) *Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes*. *Biochem Soc Trans.* 37: 955-60.

- LIU, Y.; FISHER, D.A. y STORM, D.R. (1994) *Intracellular sorting of neuromodulin (GAP-43) mutants modified in the membrane targeting domain*. J Neurosci. 14: 5807-5817.
- LIU, Y.C. y STORM, D.R. (1990) *Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration*. Trends Pharmacol Sci. 11(3): 107-111.
- LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H. y MATSUDAIRA, P. (2008) *Molecular Cell Biology*, 6th ed. W. H. Freeman. EE.UU.
- LONDON, E. (2002) *Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes*. Curr. Opin. Struct. Biol. 12: 480-486.
- LONDON, E. y BROWN, D.A. (2000) *Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)*. Biochim Biophys Acta. 1508: 182-195.
- LUNA, E.J.; NEBL, T.; TAKIZAWA, N y CROWLEY, J.L. (2004) *Lipid Raft Membrane Skeletons, en: Membrane Microdomain Signaling: Lipid Rafts in Biology and Medicine* (Mattson, M. ed.) Humana, Totowa, NJ, EE.UU. pp. 47-69.
- LUX, S.E. (1979) *Dissecting the red cell membrane skeleton*. Nature 281: 426-429.
- MAGGIO, B.; CARRER, D.C.; FANANI, M.L.; OLIVEIRA, R.G. y ROSETTI, C.M. (2004) *Interfacial behavior of glycosphingolipids and chemically related sphingolipids*. Curr Opin Colloid Interface Sci. 8: 448-458
- MANNING, M.C.; ILLANGASEKARE, M. y WOODY, R.W. (1988) *Circular dichroism studies of distorted alpha-helices, twisted beta-sheets, and beta turns*. Biophys Chem. 31(1-2): 77-86.
- MARSH, D. y HORVATH, L.I. (1998) *Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin labelling*. Biochim. Biophys. Acta 1376: 267-296.
- MASSERINI, M. y RAVASI, D. (2001) *Role of sphingolipids in the biogenesis of membrane domains*. Biochim Biophys. Acta 1532: 149-161.
- MATKÓ, J. y SZÖLLOSI, J. (2002) *Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated?* Immunol. Lett. 82: 3-15.
- MATKÓ, J. y SZÖLLOSI, J. (2004) *Regulatory aspects of membrane microdomain (raft) dynamics in live cells: A biophysical approach, en: Membrane Microdomain Signaling: Lipid Rafts in Biology and Medicine* (Mattson, M.; ed.) Humana, Totowa, NJ, EE.UU. pp. 15-46.
- MATKÓ, J.; BODNAR, A.; VEREB, G.; BENE, L.; VAMOSI, G.; SZENTESI, G.; et al. (2002) *GPI microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphomalleukemia T cell lines*. Eur. J. Biochem. 269: 1199-1208.

- MCCABE, J.B. y BERTHIAUME, L.G. (2001) *N-terminal protein acylation confers localization to cholesterol, sphingolipid-enriched membranes but not to lipid rafts/caveolae*. *Mol Biol Cell*. 11: 3601-3617.
- MCLAUGHLIN, R.E. y DENNY, J.B. (1999) *Palmitoylation of GAP-43 by the ER-Golgi intermediate compartment and Golgi apparatus*. *Biochim Biophys Acta*. 1451: 82-92.
- MCLAUGHLIN, S.; HANGYÁS-MIHÁLYNÉ, G.; ZAITSEVA, I. y GOLEBIEWSKA, U. (2005) *Reversible - through calmodulin - electrostatic interactions between basic residues on proteins and acidic lipids in the plasma membrane*. *Biochem Soc Symp*. (72): 189-98.
- McMULLEN, T.P.W.; LEWIS, R.N.H.A. y McELHANEY, R.N. (2004) *Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes*. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*. 8: 459-468.
- MUNRO, S. (2003) *Lipid rafts: elusive or illusive?* *Cell* 115: 377-388.
- MURPHY, S.C.; HILLER, N.L.; HARRISON, T.; LOMASNEY, J.W.; MOHANDAS, N. y HALDAR, K. (2006) *Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes*. *Mol. Membr. Biol*. 23: 81-88.
- MURPHY, S.C.; SAMUEL, B.U.; HARRISON, T.; SPEICHER, K.D.; SPEICHER, D.W.; REID, M.E.; PROHASKA, R; LOW, P.S.; TANNER, M.J.; MOHANDAS, N. y HALDAR, K. (2004) *Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection*. *Blood* 103: 1920-1928.
- MURRAY, D.; BEN-TAL, N.; HONIG, B. y MCLAUGHLIN, S. (1997) *Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology*. *Structure*. 5(8): 985-989.
- NAGAO, E; SEYDEL, K.B. y DVORAK, J.A. (2002) *Detergent-resistant erythrocyte membrane rafts are modified by a Plasmodium falciparum infection*. *Exp Parasitol*. 102: 57-59.
- NAKAMURA, K.; HANDA, S. (1984) *Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates*. *Anal Biochem*. 142: 406-10.
- NEBL, T.; PESTONJAMASP, K.N.; LESZYK, J.D.; CROWLEY, J.L.; OH, S.W. y LUNA, E.J. (2002) *Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes*. *J. Biol. Chem*. 277: 43399-43409.
- NEGEBAUER, J.M. (1990). *Detergents: an overview*. *Methods Enzymol*. 182: 239.
- OHTANI, Y.; IRIE, T.; UEKAMA, K.; FUKUNAGA, K. y PITHA, J. (1989) *Differential effects of α -, β - and γ - cyclodextrins on human erythrocytes*. *Europ. J. Biochem*. 186: 17-22.
- O'NEIL, K.T. y DEGRADO, W.F. (1990) *How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices*. *Trends Biochem Sci*. 15(2): 59-64.

- PINCELLI, M.M.; LEVSTEIN, P.R.; FIDELIO, G.D. y GENNARO, A.M. (2000) *Cholesterol induced alterations in the packing properties of gangliosides: an EPR study*. Chem. Phys. Lipids. 104: 193-206.
- POLNASZEK, C.F.; SCHREIER, S.; BUTLER, K.W. y SMITH, I.C.P. (1978) *Analysis of the Factors Determining the EPR Spectra of Spin Probes That Partition between Aqueous and Lipid Phases*. J. Am. Chem. Soc. 100: 8223-8232 (1978)
- PRALLE, A.; KELLER, P.; FLORIN, E-L.; SIMONS, K.; y HÖRBER, J.K.H. (2000) *Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells*. J. Cell Biol. 148: 997-1007.
- QUESNEL, S. y SILVIUS, J.R. (1994) *Cysteine-containing peptide sequences exhibit facile uncatalyzed transacylation and acyl-CoA-dependent acylation at the lipid bilayer interface*. Biochemistry. 33(45): 13340-13348.
- RAISON, J.K.; LYONS, J.M; MEHLHORN, R.J. y KEITH, A.D. (1971). *Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling*. J. Biol. Chem. 246: 4036-4040.
- RAMSTEDT, B. y SLOTTE, J.P. (2002) *Membrane properties of sphingomyelins*. FEBS Lett. 531: 33-37.
- RAUCHER, D.; STAUFFER, T.; CHEN, W.; SHEN, K.; GUO, S.; YORK, J.D.; SHEETZ, M.P. y MEYER, T. (2000) *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion*. Cell. 100: 221-228.
- RESH, M.D. (1999) *Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins*. Biochim Biophys Acta. 1451: 1-16.
- RESH, M.D. (2004) *Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins*. Subcell Biochem. 37: 217-32.
- RIEDERER, B. y ROUTTENBERG, A. (1999) *Can GAP-43 interact with brain spectrin?* Mol Brain Res. 71: 345-348.
- RINIA, H.A.; SNEL, M.M.; VAN DER EERDEN, J.P. y de KRUIJFF, B. (2000) *Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy*. FEBS Lett. 501: 92-96.
- RIVAS, M.G. y GENNARO, A.M. (2003) *Detergent resistant domains in erythrocyte membranes survive after cell cholesterol depletion: an EPR spin label study*. Chem. Phys. Lipids 122: 165-169.
- ROBERTSON, J.D. (1959) *The ultrastructure of cell membranes and their derivatives*. Biochem. Soc. Symp. 16: 3-43.
- RODGERS, W. y GLASER, M. (1991) *Characterization of lipid domains in erythrocyte membranes*. Proc Natl Acad Sci USA. 88(4):1364-1368.

- ROSE, H.G. y OKLANDER, M. (1965) *Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes*. J. Lipid Res. 6: 428-431 .
- ROUSER, G.; FKEISCHER, S. y YAMAMOTO, A. (1970) *Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. Lipids 5: 494-496.
- SALZER, U. y PROHASKA, R. (2001) *Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts*. Blood 97: 1141-1143.
- SALZER, U.; HUNGER, U. y PROHASKA, R. (2007) *Insights in the Organization and Dynamics of Erythrocyte Lipid Rafts*, en: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Vol. 6. Elsevier Inc. Amsterdam. Paises bajos. pp 49-81.
- SAMUEL, B.U.; MOHANDAS, N., HARRISON, T.; MCMANUS, H.; ROSSE, W.; REID, M. y HALDAR, K. (2001) *The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection*. J Biol Chem 276: 29319-29329.
- SARGIACOMO, M.; SUDOL, M.; TANG, Z. y LISANTI, M.P. (1993) *Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells*. J Cell Biol. 122: 789-807.
- SASLOWSKY, D.E.; LAWRENCE, J.; REN, X.; BROWN D.A.; HENDERSON, R.M. y EDWARDSON, J.M. (2002) *Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers*. J. Biol. Chem. 277: 26.966–26.970.
- SAXTON, M.J. y JACOBSON, K. (1997) *Single particle tracking: applications to membrane dynamics*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 373-399.
- SCHORN, K. y MARSH, D. (1996) *Lipid chain dynamics and molecular location of diacylglycerol in hydrated binary mixtures with phosphatidylcholine: spin label ESR studies*. Biochemistry. 35: 831-836.
- SCHREIER, S.; POLNASZEK, C.F. y SMITH, I.C.P. (1978) *Spin labels in membranes. Problems in practice*. Biochim Biophys Acta. 515(4): 395-436.
- SCHROEDER, R.; LONDON, E. y BROWN, L.A. (1994). *Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12130-12134.
- SCHROEDER, R.J.; AHMED, S.N.; ZHU, Y.; LONDON, E. y BROWN, D.A. (1998) *Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains*. J Biol Chem 273: 1150-1157.

- SCHUTZ, G.; KADA, G.; PASTUSHENKO, V. P. y SCHINDLER, H. (2000) *Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy*. EMBO J. 19: 892-901.
- SHEN, B.W.; JOSEPHS, R. y STECK, T.L. (1986) *Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane*. J. Cell Biol. 102: 997–1006.
- SILVIUS, J.R. (2003) *Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems*. Biochim.Biophys. Acta 1610: 174-183.
- SIMONS, K. e IKONEN, E. (1997). *Functional rafts in cells membranes*. Nature 387, 569-572.
- SIMONS, K. y TOOMRE, D. (2000). *Lipid rafts and signal transduction*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 31-41.
- SIMONS, K. y VAZ, W.L.C. (2004) *Model systems, lipid rafts, and cell membranes*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33: 269–295.
- SINGER, S.J. (1975) *Architecture and topography of biologic membranes*, en: *Cell Membranes. Biochemistry, Cell Biology and Pathology* (Weissmann, G. y Claiborne, R. eds.) HP Publishing, New York, pp. 35-44.
- SINGER, S.J. y NICOLSON, G.L. (1972) *The fluid mosaic model of the structure of cell membrane*. Science 175: 720-731.
- SKENE, J.H.P. y VIRAG, I. (1989) *Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43*. J Cell Biol. 108: 613-624.
- SMART, E.; YING ,Y-S.; CONRAD, P.A. y ANDERSON, R.G.W. (1994) *Caveolin moves from caveolae to Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation*. J. Cell Biol. 127: 1185-1197.
- SMITH, C.L.; AFROZ, R.; BASSELL, G.J.; FURNEAUX, H.M.; PERRONE-BIZZOZERO, N.I. y BURRY, R.W. (2004) *GAP-43 mRNA in growth cones is associated with HuD and ribosomes*. J Neurobiol. 61: 222-235.
- SONG, K.S.; LI, S.; OKAMOTO, T.; QUILLIAM, L.A.; SARGIACOMO, M. y LISANTI, M.P. (1996) *Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains*. J. Biol. Chem. 271: 9690-9697
- SOT, J.; COLLADO, J.L.; ARRONDO, R.; ALONSO, A. y GOÑI, F.M. (2002) *Triton X-100-resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon*. Langmuir 18: 2828-2835.
- STEIM, J.M.; TOURTELLOTTE, M.E.; REINERT, J.C.; MCELHANEY, R.N. y RADER, R.L. (1969) *Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63: 104-09.
- STEKETEE, M. y TOSNEY, K.W. (2002) *Three functionally distinct adhesions in filopodia: shaft adhesions control lamellar extension*. J Neurosci. 22: 8071-8083.
- STOSCHECK, C.M. (1990a) *Quantitation of protein*. Methods Enzymol. 182: 50-68.

- STOSCHECK, C.M. (1990b) *Increased uniformity in the response of the coomassie blue G protein assay to different proteins*. *Anal Biochem*. 184: 111-116.
- STRITTMATTER, S.M.; VALENZUELA, D. y FISHMAN, M.C. (1994) *An amino-terminal domain of the growth-associated protein GAP-43 mediates its effects on filopodial formation and cell spreading*. *J Cell Sci*. 107: 195-204.
- STULNIG, T.M.; BERGER, M.; SIGMUND, T.; RAEDERSTOFF, D.; STOCKINGER, H. y WALDHAUS, W. (1998) *Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains*. *J. Cell Biol*. 143: 637-644.
- SUBCZYNSKI, W.K. y KUSUMI, A. (2003) *Dynamics of rafts molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy*. *Biochim. Biophys. Acta* 1610: 231-243.
- SVOBODA, K.; SCHMIDT, C.F.; BRANTON, D. y BLOCK, S.M. (1992) *Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton*. *Biophys. J*. 63: 784-793.
- TAKEUCHI, M.; MIYAMOTO, H.; SAKO, Y.; KOMIZU, H. y KUSUMI, A. (1998) *Structure of erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy*. *Biophys. J*. 74: 2184-2190.
- TANIGUCHI, H. y MANENTI, S. (1993) *Interaction of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS) with membrane phospholipids*. *J Biol Chem*. 268(14): 9960-9963.
- TAYLOR, C.M.; COETZEE, T. y PFEIFFER, S.E. (2002) *Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane*. *J. Neurochem*. 81: 993-1004
- TEJERO-DIEZ, P.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, P. y DÍEZ-GUERRA, F. J. (1999) *Microscale purification of proteins exhibiting anomalous electrophoretic migration: application to the analysis of GAP-43 phosphorylation*. *Anal. Biochem*. 274(2): 278-282.
- TONG, J.; NGUYEN, L; VIDAL, A.; SIMON, S.A.; SKENE, J.H. y MCINTOSH, T.J. (2008) *Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to Raft bilayers*.
- TSUJI, A. y OHNISHI, S. (1986) *Restriction of the lateral motion of band 3 in the erythrocyte membrane by the cytoskeletal network: Dependence on spectrin association state*. *Biochemistry* 25: 6133-6139.
- TSUTSUMI, R.; FUKATA, Y. y FUKATA, M. (2008) *Discovery of protein-palmitoylating enzymes*. *Pflugers Arch*. 456:1199-206.
- VEATCH, S.L. y KELLER, S.L. (2005) *Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes*. *Biochim Biophys Acta*. 1746: 172-85.
- VEIGA, M.P.; ARRONDO, J.L.; GOÑI, F.M.; ALONSO, A. y MARSH, D. (2001) *Interaction of cholesterol with sphingomyelin in mixed membranes containing phosphatidylcholine,*

- studied by spin-label ESR and IR spectroscopies. A possible stabilization of gel-phase sphingolipid domains by cholesterol.* *Biochemistry* 40: 2614–2622.
- VENEMA, R.C.; SAYEGH, H.S.; ARNAL, J.F. y HARRISON, D.G. (1995) *Role of the enzyme calmodulin-binding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase.* *J Biol Chem.* 270(24): 14705-14711.
- VEREB, G.; MATKÓ, J.; VAMOSI, G.; IBRAHIM, S.M.; MAGYAR, E.; VARGA, S.; et al. (2000) *Cholesterol-dependent clustering of IL-2R α and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6013-6018.
- VOET, D. y VOET, J.G. (1995) *Biochemistry* (John Wiley & Sons, Inc.) New York, EE.UU.
- VUCETIC, S.; XIE, H.; IAKOUCHEVA, L.M.; OLDFIELD, C.J.; DUNKER, A.K.; OBRADOVIC, Z. y UVERSKY, V.N. (2007) *Functional anthology of intrinsic disorder. 2. Cellular components, domains, technical terms, developmental processes, and coding sequence diversities correlated with long disordered regions.* *J Proteome Res.* 6:1899-916.
- WANG, J.; GAMBHIR, A.; McLAUGHLIN, S. y MURRAY, D. (2004) *A computational model for the electrostatic sequestration of PI (4,5) P2 by membrane-adsorbed basic peptides.* *Biophys J.* 86: 1969-1986.
- WERTZ, S.L.; SAVINO, Y. y CAFISO, D.S. (1996) *Solution and membrane bound structure of a peptide derived from the protein kinase C substrate domain of neuromodulin.* *Biochemistry.* 35(34): 11104-11112.
- XAVIER, R.; BRENNAN, T.; LI, Q.; McCORMACK, C.; y SEED, B. (1998) *Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation.* *Immunity* 8: 723-732.
- XU, X. y LONDON, E. (2000) *The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation.* *Biochemistry* 39: 843-849.
- YANCEY, P.G.; RODRIGUEZA, W.V.; KILSDONK, E.P.C.; STOUT, G.W.; JOHNSON, W.J.; PHILLIPS, M.C. y ROTHBLAT, G.H. (1996) *Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins.* *J. Biol.Chem.* 271: 16026-16034.
- YAWATA, Y. (2003) *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model.* Wiley-VCH. Alemania
- YU, J.; FISCHMAN, D.A. y STECK, T.L. (1973) *Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents.* *J. Supramol. Struct.* 1: 233–248.
- ZAKHAROV, V.V. y MOSEVITSKY, M.I. (2007) *M-calpain-mediated cleavage of GAP-43 near Ser41 is negatively regulated by protein kinase C, calmodulin and calpain-inhibiting fragment GAP-43-3.* *J Neurochem.* 101(6): 1539-1551.
- ZHENG, J.Q.; KELLY, T.K.; CHANG, B.; RYAZANTSEV, S.; RAJASEKARAN, A.K.; MARTIN, K.C. y TWISS, J.L. (2001) *A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons.* *J Neurosci.* 21: 9291-9303.

- ZIDOVETZKI, R. y LEVITAN, I. (2007) *Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies*. Biochim Biophys Acta. 1768:1311-1324.
- ZUBER, M.X.; STRITTMATTER, S.M. y FISHMAN, M.C. (1989) *A membrane-targeting signal in the amino terminus of the neuronal protein GAP-43*. Nature. 341: 345-348.