

Universidad de la República
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas
Área Biología

Tesis presentada para acceder a la
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Biología Celular y Molecular

“Asociación de S25p-MARCKS con microdominios de membrana e interacción con el citoesqueleto de actina en neuroblastos y neuronas del embrión de pollo”

Andrea Toledo

Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Sección Biología Celular
Departamento de Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Orientador:
Prof. Dra. Cristina Arruti

Tribunal:
Presidente: Dr. Omar Macadar
Vocales: Dra. Silvia Chifflet
Dra. Adriana Esteves

Montevideo – Uruguay
Diciembre de 2007

Indice:

- Abreviaturas	1
- Resumen	2
- Introducción	
1. MARCKS: algunas propiedades	4
2. Rol de MARCKS en la regulación de la dinámica del citoesqueleto cortical de actina	6
3. MARCKS y regiones singulares de la membrana: los microdominios de membrana	7
3a) Estructura de los microdominios	7
3b) Rol fisiológico	10
3c) Macrodominios de membrana: un nivel superior de compartimentalización	11
4. Importancia de MARCKS durante el desarrollo del sistema nervioso	11
5. S25p-MARCKS	13
- Hipótesis de trabajo	16
- Objetivos generales	16
- Objetivos específicos y estrategia experimental	16
- Materiales y Métodos	18
Materiales	
Animales	18
Anticuerpos	18
Reactivos	19
Métodos	
1. Fraccionamiento subcelular	
a) fraccionamiento subcelular simple	19
b) centrifugaciones isopícnicas	20
2. Aislamiento de DRM (detergent resistant microdomains)	20
3. Cuantificación de proteínas	21
4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	21
5. Western-blot	21
6. "Dot blots"	22
7. Cultivos primarios de células de la retina neural	23
8. Inmunodetección <i>in situ</i> sobre células	
a) microscopía de fluorescencia	23
b) microscopía electrónica de transmisión	24
9. Purificación de anticuerpo monoclonal 3C3	25
10. Acoplamiento de anticuerpo monoclonal 3C3 a sefarosa 4B	25
11. Inmunoprecipitación	26

12. Disgregación de retina neural	26
13. Medidas de densidad óptica de las bandas de Western-blot	26
- Resultados	
-S25p-MARCKS en fracciones de membrana de retina embrionaria de pollo	28
-Asociación de S25p-MARCKS a microdominios de membrana resistentes al Tritón X-100	29
-Emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS en neuroblastos de la retina neural cultivados <i>"in vitro"</i> . Relación entre su localización y la presencia de colesterol en la membrana celular	39
-Asociación de S25p-MARCKS a otras proteínas	45
-Relación entre la integridad del citoesqueleto de actina y la estabilidad de la fosforilación de MARCKS en la serina 25	48
-Relación entre la estabilidad de la fosforilación en la serina 25 y los contactos célula-célula	50
- Discusión	
-S25p-MARCKS y microdominios de membrana resistentes al Tritón-X100	59
a) Asociación de S25p-MARCKS a DRM	59
b) Relación entre el emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS y el colesterol de membrana	64
-La fosforilación en la serina 25 y la asociación de MARCKS con actina	68
-Asociación entre S25p-MARCKS y quinasas	69
-Fosforilación en la serina 25 y los contactos célula-célula	70
-Conclusiones	72
- Bibliografía	
	74

Agradecimientos:

Quisiera expresar mi gratitud a todos quienes directa o indirectamente colaboraron conmigo para la realización de este trabajo:

-A Cristina Arruti por abrirme las puertas del laboratorio, guiarme y acompañarme durante este trabajo.

-A Omar Macadar, Silivia Chifflet y Adriana Esteves por acceder a formar parte del tribunal de esta tesis.

-A Flavio Zolessi a quien recurro diariamente en busca de respuestas.

-A mis compañeros de Laboratorio: Daniel, Lucha y Lucy por soportarme diariamente, que no es poco.

-A mis compañeros de la Sección Biología Celular: Ali, Alvaro, Charly, Gaby, Grace, Laura, Nibia, Nicolás, Marice, Marieta, Miguel, Paola, Paula y Silvana. Gracias por apoyarme en todo momento.

-A Sole y Santi con quienes compartí algunas etapas de este trabajo.

-A Gabriela Casanova y Alvaro Olivera del Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Facultad de Ciencias, por su colaboración en la obtención de imágenes de MET.

-Al Laboratorio de Proteínas y Ácidos Nucleicos del IIBCE y especialmente a Carlos Escande por su colaboración en la realización de algunos experimentos de este trabajo.

-A la asociación avícola ALA por proveernos gentilmente con los huevos embrionados de gallina que utilizamos en este trabajo.

-A Gabriel Santoro, por su paciencia y tiempo para la impresión de algunas de las imágenes del trabajo.

-A mis AMIGOS y mi FAMILIA a quienes debo y deberé todos mis trabajos.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de PEDECIBA

Abreviaturas:

Acm 3C3: anticuerpo monoclonal 3C3 que reconoce la región aminoterminal de MARCKS cuando ésta se encuentra fosforilada en la serina 25
ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
BCA: ácido bicinconínico
BSA: seroalbúmina bovina
Ca⁺⁺CAM: calmodulina unida a calcio
CAP23: proteína asociada al citoesqueleto cortical
Cdk5: quinasa 5 dependiente de ciclina
CHO: línea celular derivada de ovario de hamster chino
CMFG: solución buffer salina con glucosa, sin calcio ni magnesio
CNBr: bromuro de cianógeno
COS: línea celular derivada de epitelio de riñón de mono
DE: dominio efector de MARCKS
DMEM: medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: dimetil sulfóxido
DO: densidad óptica
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
EGTA: ácido etilen-glicol-bis (â- aminoetil-eter) tetracético
ERM: familia de proteínas que comprende ezrina, radixina y moesina
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FRET: "Fluorescence Resonance Energy Transfer"
GAP43: proteína asociada a crecimiento
GM1: gangliósido M1
GPI: glucosilfosfatidilinositol
GTPasa: enzima capaz de hidrolizar guanosina trifosfato
IGF-1: factor de crecimiento similar a insulina
IgE: inmunoglobulina tipo E
IgG: inmunoglobulina tipo G
IP₃: inositol trifosfato
PI₃K: quinasa 3 de fosfatidil inositol
LPA: ácido lisofosfatídico
MALDI-TOF: "Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight"
MAP: proteína asociada a microtúbulos
MAPK: quinasa activada por mitógenos
MARCKS: proteína miristilada, rica en alanina, sustrato de PKC
MCD: metil-â-ciclodextrina
Mct: anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el extremo carboxiloterminal de MARCKS
MRP: proteína relacionada con MARCKS
NCAM: molécula de adhesión celular neuronal
PBS: solución salina isotónica con fosfato
PFA: paraformaldehído
PIP₂: fosfatidinositol (4,5) bisfosfato
PKC: proteína quinasa C
PLD: fosfolipasa D
PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro
PP: fosfatasa de proteínas
PrP: proteína priónica
SDS: dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB: suero fetal bovino
TCA: ácido tricloroacético
TCR: receptor de antígeno de la célula T
TGFâ: factor de crecimiento transformante â
TRITC: isotiocianato de tetrametil rodamina
WASP: proteína del síndrome Wiscott-Aldrich

RESUMEN:

MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) es una proteína implicada en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina en diversos procesos celulares, entre los que se encuentran la endocitosis, la fagocitosis, la exocitosis, la migración celular, el crecimiento neurítico, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica. A pesar de ser ubicua, los efectos de la delección del gen de MARCKS sólo son importantes a nivel del desarrollo del sistema nervioso, en particular hay fallas en la laminación de la corteza cerebral y la retina, así como una ausencia de comisuras interhemisféricas. En nuestro conocimiento, la única modificación postraduccional tejido-específica descrita hasta el momento, es una fosforilación en la serina 25 de MARCKS (S25p-MARCKS), que tiene lugar durante el proceso de diferenciación neuronal y se mantiene en algunas neuronas jóvenes del embrión de pollo.

En el presente trabajo exploramos la distribución subcelular de dicha isoforma de MARCKS en neuroblastos de la retina de embriones de pollo, encontrando que se localiza en parches de membrana distribuidos homogéneamente en el soma, las neuritas y el cono de crecimiento. Dichos parches colocalizan parcialmente con algunos marcadores de microdominios de tipo “balsas lipídicas” (lipid rafts), tales como GM1 y NCAM, sugiriendo que S25p-MARCKS se localiza sólo parcialmente en este tipo de microdominios, lo cual es sustentado, además, por los resultados surgidos a partir del análisis de fracciones, obtenidas por flotación en gradientes de sacarosa, de homogeneizados de retina neural de embriones de E12, preparados en presencia de Tritón X-100. Por otra parte, encontramos que su organización en la membrana parece ser, al menos parcialmente, dependiente de la presencia de colesterol en la misma.

Determinamos además que S25p-MARCKS es capaz de interactuar con actina, y que la estabilidad de la fosforilación en la serina 25 es dependiente de la integridad del citoesqueleto de actina. El desensamblaje del mismo en células en cultivo provoca la defosforilación de MARCKS principalmente en neuroblastos aislados, manteniéndose fosforilada en neuroblastos asociados en colonias. Esto sugirió la existencia de una posible relación entre la estabilidad de la fosforilación y la integridad de contactos célula-célula, lo cual fue confirmado en experimentos de disgregación celular.

En resumen, el conjunto de los resultados presentados aquí muestran una asociación parcial de S25p-MARCKS y MARCKS con microdominios de membrana en neuroblastos

y neuronas del embrión de pollo. Por otro lado, sugerimos la existencia de eventos resultantes de interacciones intramoleculares de rango amplio, entre el dominio de unión a la actina (DE) y la región donde reside la serina 25, en una proteína naturalmente desplegada como MARCKS.

INTRODUCCIÓN

1. MARCKS: algunas propiedades

MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) es una proteína perteneciente a una familia compuesta por dos miembros: MARCKS y MRP (MARCKS Related Protein). Originalmente se la identificó como el principal sustrato de la proteína quinasa C (PKC) (Albert et al., 1986) y desde entonces ha sido implicada en un gran número de procesos celulares. Entre ellos se destaca la regulación de la dinámica del citoesqueleto cortical de actina en eventos como el desarrollo del sistema nervioso, la migración celular y la adhesión, así como en los procesos de fagocitosis, endocitosis y exocitosis (revisión en Arbuzova et al., 2002). Si bien es una proteína ubicua, su expresión es elevada en el cerebro, donde constituye 0,2% de las proteínas totales. Su concentración también es alta en el bazo, pulmón, moderada en testículo, páncreas, glándula adrenal, riñón e hígado, y muy baja en corazón y músculo esquelético (Albert et al., 1987).

MARCKS posee tres regiones altamente conservadas: a) la región aminoterminal que posee la secuencia consenso para la miristilación, b) la región MH2 de función desconocida, posee el único sitio de splicing del ARNm, y c) el dominio efector (DE) que contiene las serinas fosforilables por PKC. En el pollo, la secuencia de MARCKS consta de 281 aminoácidos y tiene un peso molecular medido por espectrometría de masa MALDI-TOF de 27.8kDa (Graff et al., 1989a; Zolessi et al., 2004b), pero su alto contenido en aminoácidos con carga negativa y su estructura desplegada hacen que su migración en geles de SDS-poliacrilamida sea anómala y su tamaño aparente ronde los 60kDa (Blackshear, 1993).

```
MGAQFSKTAA KGEAAAEKPG EVAASPSKA NGQENGHVKV NGDASPAAAE
AGKEEVQANG SAPAEETGKE EAASSEPAE KEAAEAESTE PASPAEGEAS
PKTEEGATPS SSSETPK KRFSFKSFK LSGFSFKKKNK KEAGEGAESE
GGAAAAAEGG KEEAAAAAPE AAGGEEGKAA AEEASAAAAG SREAAKEEAG
DSQEAKSDEA APEKATGEEA PAAEEQQQQQ QQEKAEEEAG AAATSEAGSG
EQEAAPAEPP AAARQEAPSE SPEGPAEPA E
```

Figura I: Secuencia aminoacídica de MARCKS de pollo deducida a partir del ADNc (contiene la metionina en posición uno que se eliminará posteriormente). En azul se indica la secuencia del dominio efector y subrayadas las serinas fosforilables *in vivo* por PKC. Secuencia obtenida del banco de datos del National Center for Biotechnology Information (ncbi) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

MARCKS se encuentra asociada a la cara interna de la membrana plasmática mediante la inserción del grupo miristato aminoterminal en la bicapa lipídica, y mediante la interacción de los residuos básicos de lisina con los fosfolípidos de carga negativa, y los residuos de fenilalanina que establecen interacciones hidrofóbicas con los lípidos de membrana (George y Blackshear, 1992; Taniguchi y Manenti, 1993; Swierczynski y Blackshear, 1995). Ninguna de estas tres interacciones por sí sola es suficiente para anclar a MARCKS a la membrana (Arbuzova et al., 2002). Como mencionamos más arriba, MARCKS fue caracterizada originalmente como el principal sustrato de PKC; al menos 3 de las 4 serinas de su DE son fosforiladas *in vivo* por PKCs convencionales (S1, S2), noveles (S3, S4) y atípicas (S5, S6 y S7) (Taniguchi et al., 1994; Herget et al., 1995; Überall et al., 1997; Michaut et al., 2005). Sin embargo, entre 5 y 8 serinas dispersas en los dominios amino y carboxiloterminal de MARCKS son sustrato de quinasas dirigidas por prolina, tales como quinasas dependientes de ciclina (cdks), quinasas activadas por mitógenos (MAPKs); y también de PKGs, aunque su rol fisiológico aún no ha sido determinado (Yamamoto et al., 1995; Manenti et al., 1999; Matsubara et al., 2005; Tanabe et al., 2006). La fosforilación del DE por PKC media su separación de la membrana plasmática, mediante un fenómeno denominado “switch electrostático”, y la desfosforilación de estos residuos por PP1 o PP2A permite el retorno de MARCKS a la membrana (Wang et al., 1989; Arbuzova et al., 2002). Además, este mismo dominio puede interactuar con Ca⁺⁺CaM, produciendo también la separación de MARCKS de la membrana (Graff et al., 1989b). La interacción con Ca⁺⁺CaM inhibe la fosforilación por PKC, por lo que la relación temporal entre ambos fenómenos determinará el grado de fosforilación de MARCKS (Chakravarthy et al., 1995). Se han sugerido distintos escenarios para la convergencia de estas dos vías de señalización en MARCKS, por ejemplo, si PKC es activada primero, esto provocaría el retiro de MARCKS del conjunto de proteínas celulares que pueden unir Ca⁺⁺CAM, por lo que una posterior activación de Ca⁺⁺CAM tendría un efecto más fuerte sobre el resto de sus sustratos. De manera inversa, si CAM es activada antes que PKC, MARCKS actuaría como un elemento secuestrador de Ca⁺⁺CAM, modulando de esta manera sus efectos celulares (Arbuzova et al., 2002).

Los niveles de MARCKS en la célula se controlan básicamente a través del nivel de transcripción de su ARNm. Algunos factores como el TGF β o el LPA aumentan su concentración (Rosen et al., 1990). Además MARCKS puede ser clivada *in vivo*, por cisteína proteasas, catepsinas B/L y calpaína, lo cual puede regular su actividad postraduccionalmente (Spitzz y Blackshear, 1996; Graber et al., 2004).

Con respecto a la estructura de MARCKS, los datos de microscopía electrónica demostraron que esta proteína tiene forma de bastón de 4.5 nm X 36 nm. Por su parte, los estudios de dicroísmo circular y la resonancia magnética nuclear, indican que posee una conformación extendida y que el DE tiene una estructura naturalmente desplegada. Esto permite al DE actuar a modo de puente flexible entre los extremos amino y carboxilterminal de MARCKS. Las fosforilaciones de MARCKS no alteran la conformación desplegada de la proteína, aunque las fosforilaciones del DE promueven la adopción de una estructura plegada más compacta al neutralizar las cargas positivas de los extremos amino y carboxilterminal del DE. De manera similar, se determinó que cuando MARCKS se encuentra anclada a la membrana adopta una conformación extendida paralela a su superficie interna, con los residuos hidrofóbicos de fenilalanina interactuando con la membrana plasmática (Arbuzova et al., 2002).

2. Rol de MARCKS en la regulación de la dinámica del citoesqueleto cortical de actina

Se ha sugerido que MARCKS es un factor importante para el anclado del citoesqueleto de actina a la membrana plasmática. La disociación de MARCKS de la membrana determinaría, por lo tanto, la separación de los microfilamentos de la membrana. Las primeras evidencias indicaban que MARCKS era capaz de interactuar directamente con filamentos de actina, a través de su DE. Esta interacción puede entrecruzar filamentos de actina, pero es inhibida tanto por la fosforilación por PKC del DE, como por su interacción con $Ca^{++}CaM$, lo cual indica que MARCKS podría actuar como un integrador de estas dos cascadas de señalización intracelular (Hartwig et al., 1992). Además de entrecruzar filamentos de actina, MARCKS puede inducir la polimerización de G-actina, lo cual requiere la secuencia aminoterminal del DE que contiene pentalisinas (Arbuzova et al., 2002). Recientemente se ha señalado que la mayor parte de los estudios de interacción de MARCKS con distintos ligandos, entre ellos la actina, se han realizado utilizando únicamente péptidos correspondientes al DE, al considerar que, al ser MARCKS una proteína con una estructura secundaria naturalmente desplegada, no es importante el resto de su secuencia para este tipo de estudios. Sin embargo, los mismos estudios realizados con la proteína MARCKS completa, tuvieron resultados distintos, con valores de afinidad mucho menores a los obtenidos con el péptido correspondiente al DE. A su vez los valores de afinidad de la proteína no miristilada por ligandos tales como la actina o $Ca^{++}CaM$, son menores a los de la proteína miristilada. Esto podría sugerir que en la proteína intacta, el DE se encuentra de alguna manera inaccesible a distintos ligandos y

que tanto la miristilación, como modificaciones postraduccionales que ocurren fuera del DE tendrían algún efecto sobre la conformación de la proteína que permitiría la interacción de los ligandos con el DE (Tapp et al., 2005).

Por otra parte, algunos datos más recientes indican que MARCKS ejerce su efecto sobre los microfilamentos de manera indirecta al secuestrar al segundo mensajero lipídico PIP₂. La separación de MARCKS de la membrana determinaría un incremento en la disponibilidad de PIP₂ haciéndolo accesible a enzimas como la PLD, o iniciando la reorganización del citoesqueleto por el reclutamiento de proteínas promotoras de la polimerización, el “treadmilling”, el anclado a la membrana o el entrecruzamiento de actina (McLaughlin et al., 2002). Teniendo en cuenta la concentración de MARCKS en la célula (2 μ M en fibroblastos y 10 μ M en neuronas) y que cada molécula de MARCKS puede interactuar con 3 moléculas de PIP₂, ésta podría unirse a todo el PIP₂ presente en la membrana plasmática (Sheetz et al., 2006). Este mecanismo, común a MARCKS y a otras moléculas como GAP43 y CAP23, denominadas por esto “PIP-modulinas”, ocurriría principalmente en microdominios de membrana denominados balsas lipídicas o “lipid rafts” (Laux et al., 2000; Larson, 2005).

3. MARCKS y regiones singulares de la membrana: los microdominios de membrana

Recordemos que el modelo de mosaico fluido para la estructura de la membrana plasmática, postulado en 1972 por Singer y Nicholson, planteaba que los lípidos y proteínas que la componen poseen difusión y rotación libre dentro del plano de la bicapa lipídica, lo cual resulta en una distribución al azar de dichos componentes (Singer y Nicholson, 1972). Veinte años más tarde, algunos aspectos de este modelo han cambiado, ya que muchas evidencias indican la existencia de un ordenamiento lateral de los lípidos y proteínas de membrana que restringe su movimiento a la escala nanométrica, formando microdominios denominados “lipid rafts” (Simons e Ikoen, 1997; Brown, 2006).

3a) Estructura de los microdominios

Los microdominios de membrana denominados balsas lipídicas se diferencian del resto de la membrana en su composición, ya que están enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos saturados. Estos lípidos se encuentran en un estado líquido-ordenado, ya que las cadenas carbonadas de los ácidos grasos que los componen pueden empaquetarse firmemente con ayuda del colesterol. Esto limita enormemente la

difusión y los separa del resto de la membrana que se encontraría en un estado líquido-desordenado, al estar constituida, mayoritariamente, por glicerofosfolípidos insaturados (Brown y London, 1997). Las balsas lipídicas de membrana contienen además proteínas asociadas, tales como proteínas ancladas a GPI (en la cara externa de la membrana), proteínas aciladas (miristiladas, palmitiladas) y también proteínas transmembrana (Simons e Ikon, 1997). Respecto a los dos primeros grupos, no todas las proteínas ancladas a la membrana mediante ácidos grasos están asociadas a estos microdominios, de manera que algún determinante propio de la secuencia aminoacídica de la proteína tiene incidencia en su asociación a tales microdominios (Pike, 2004). Ejemplos de estas proteínas son las GTPasas triméricas, tirosina quinasas de la familia src, receptores de factores de crecimiento e integrinas (Tsui-Pierchala et al., 2002; Laude y Prior, 2004).

Bioquímicamente, las balsas lipídicas se caracterizaron por su insolubilidad en detergentes no iónicos a 4° C, tales como el Tritón X-100, Tritón X-114, CHAPS, etc., y en la dependencia al colesterol para su estabilidad. Luego de una extracción con exceso de Tritón X-100 los complejos de lípidos y proteínas, insolubles al detergente que forman parte de las balsas lipídicas, pueden ser separados del resto de los elementos celulares insolubles en detergente como el citoesqueleto, mediante flotación en gradientes de sacarosa, denominándose membranas resistentes a detergentes o DRM (Brown y London, 1997). Este procedimiento permitió formular una definición operacional de los microdominios lipídicos, ya que se los asocia con la fracción resistente a la solubilización con detergentes no iónicos que flota en la interfase de los dos escalones de menor densidad en un gradiente de sacarosa (típicamente interfase 5%-30%), luego de una ultracentrifugación. Algunos autores hacen la distinción entre los términos “balsas lipídicas” y DRM. Mientras que DRM se refiere a las estructuras obtenidas luego del procedimiento experimental que se menciona más arriba, que implica el uso de detergentes, el término “balsa lipídica” se refiere a estructuras subcelulares que se encuentran en la membrana (antes de que se introduzca algún elemento perturbador como el detergente) (Pike, 2007).

Los únicos microdominios de membrana que poseen alguna característica morfológica detectable al microscopio electrónico son las caveolas, pequeñas invaginaciones de membrana de un diámetro de entre 25-150 nm que pueden identificarse mediante microscopía electrónica (Pike, 2004). Estas estructuras son estabilizadas por la presencia de una proteína denominada caveolina. Están ausentes en algunos tipos celulares como neuronas y linfocitos, mientras que son abundantes en células endoteliales, musculares y

adiposas (Laude y Prior, 2004). De esta manera se distingue dentro de los microdominios de membrana a las caveolas y a las balsas lipídicas, estas últimas carentes de caveolina. Ambos pueden coexistir en un mismo tipo celular.

Es importante destacar que a pesar de que existen muchos estudios sobre la composición y función de los microdominios lipídicos, su naturaleza exacta aún se encuentra rodeada de controversia. En la actualidad, determinar parámetros tales como tamaño o vida media representa un desafío. La diversidad de resultados obtenidos mediante distintos abordajes torna difícil el arribar a un consenso. Por ejemplo, en cuanto a su tamaño es claro que son demasiado pequeños para ser resueltos por microscopía óptica sin un pretratamiento con agentes que entrecrucen sus componentes, tales como fijadores o anticuerpos (Simons y Ehehalt, 2002). En ensayos realizados con la técnica de “laser trap”, Simons y cols. estimaron que su tamaño en células de mamífero estaría en el orden de los 26 ± 13 nm, por lo cual contendrían aproximadamente 3500 moléculas de lípidos y un número variable de proteínas dependiendo del grado de empaquetamiento. De todas maneras, estos autores consideran que dentro de una célula existen microdominios de distintos tamaños, y que además el tamaño de cada uno de estos microdominios puede variar en el tiempo (Pralle et al., 1997). Algunos análisis de difusión lateral de proteínas ancladas a GPI sugirieron que estos dominios tienen entre 200 y 300 nm de diámetro, mientras que ensayos de despolarización de fluorescencia dieron tamaños menores a 70 nm (Pike, 2003). Por su parte, los ensayos de FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”) determinaron que algunas proteínas de membrana asociadas a DRM no se encuentran localizadas en grupos detectables, sugiriendo que las balsas lipídicas son entidades sumamente pequeñas o de muy corta vida media (Lagerholm et al., 2005). Es necesario entonces definir claramente qué complejos moleculares presentes en la membrana son considerados microdominios. Actualmente la simple pregunta de ¿qué es una balsa lipídica? recibe distintas respuestas. Algunos autores sostienen que deben ser consideradas balsas lipídicas aquellos microdominios que contienen al menos tres moléculas, y que al menos una de ellas posea un ácido graso saturado o una molécula de colesterol, los cuales juegan un rol muy importante en la creación del microdominio (Kusumi et al., 2005). Siendo éste el criterio que debe cumplir una agrupación de macromoléculas para ser considerada una balsa lipídica, es claro que deben existir simultáneamente en la célula un gran número de microdominios que cumplen con tales características, y que varían no sólo en su tamaño y composición, sino también en su fisiología (He y Meiri, 2002; Botto et al., 2004). En la gran mayoría de los trabajos se utiliza la definición operacional bioquímica que se

describe más arriba sobre la insolubilidad en detergentes no iónicos. Sin embargo, esta metodología presenta algunas desventajas y genera resultados que muestran variaciones importantes, por ejemplo dependiendo del tipo celular estudiado. Teniendo en cuenta la heterogeneidad de resultados, parecería ser que la mejor aproximación para elucidar la organización de los microdominios de membrana consiste en la comparación y contraste de resultados obtenidos mediante el uso de una amplia variedad de métodos, así como en la exploración de nuevas técnicas que se desarrollen (Lagerholm, et al., 2005).

3b) Rol fisiológico

Los resultados de múltiples estudios señalan a las balsas lipídicas como un conjunto heterogéneo de microdominios que se distinguen por su composición lipídica y proteica. Tal diversidad probablemente esté relacionada con las distintas funciones que hasta el momento se les ha atribuido, como por ejemplo la regulación positiva y negativa de distintas vías de transducción de señales (Pike, 2003; 2004). Estos microdominios de membrana han sido identificados como sitios de ensamblaje de complejos de moléculas transductoras de señales. Su función general sería la concentración de receptores para la interacción con ligandos y efectores a ambos lados de la membrana, incrementando la velocidad de transducción de la señal y evitando entrecruzamientos indebidos entre distintas vías (Simons e Ikoen 1997; Pike, 2003). Son cruciales para la transducción de señales de los factores de crecimiento, en la adhesión celular, en el crecimiento axonal, así como en el tráfico vesicular, en la proteólisis asociada a la membrana. Además algunos grupos de patógenos como bacterias, virus y priones, utilizan las balsas lipídicas para distintas funciones en la célula (Tsui-Pierchala et al., 2002; Simons y Eehalt, 2002; Nakai et al., 2002; Niethammer et al., 2002). En células del sistema inmune son necesarias para las señales mediadas por el receptor de la inmunoglobulina E (IgE) y el receptor de antígeno de las células T (TCR). La unión de complejos multivalentes de la IgE a su receptor de membrana, provoca su agregación, reclutando de esta manera proteínas adaptadoras y efectoras de esta vía de señalización (Laude y Prior, 2004).

También se ha demostrado que son capaces de interactuar con la actina submembranosa, lo cual sugiere un rol en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de membrana (Caroni 2001; Hering et al., 2003). En particular, se los vincula con los procesos de migración celular, en el establecimiento de la polaridad celular, así como en la generación de protrusiones de membrana como microvilli y lamelipodios (Hering et al., 2003; Mañez y Martínez-A, 2004). Otros estudios indican que la activación de algunas vías de señalización asociadas a balsas lipídicas depende del citoesqueleto de actina, ya

que es necesaria la ocurrencia de rearrreglos en la distribución de dichos dominios para tal activación. Estos rearrreglos o formación de agregados dependen de la integridad del citoesqueleto de actina (Villalba et al., 2001).

3c) Macrodominios de membrana: un nivel superior de compartimentalización

Algunos estudios recientes han destacado la importancia del citoesqueleto de membrana compuesto por microfilamentos y proteínas de membrana de unión a la actina que actúan como un corral para las proteínas de membrana, formando macrodominios dentro de los cuales microdominios como los descritos más arriba, pueden moverse libremente (Ikoen, 2001; Laude y Prior, 2004). Estos macrodominios son llamados por algunos autores “zonas de confinamiento transitorio”, y son definidos como zonas en la membrana donde una proteína es confinada un tiempo más largo que el esperado por movimiento browniano. Su tamaño se encuentra en el orden de 100-300 nm y tienen una vida media de cientos de milisegundos (Lagerholm et al., 2005). Un ejemplo de proteínas que contribuirían a la formación de estos macrodominios de membrana son las pipmodulinas, entre ellas MARCKS, que al ser proteínas altamente hidrofílicas que contienen un dominio básico que une fosfolípidos acídicos como el PIP₂, actuarían como “postes” en una barrera que limita el movimiento de proteínas y lípidos de membrana. Cuando se unen a la cara interna de la membrana, estas proteínas parecen organizar los dominios de tipo balsas, de manera que se tornan visibles al microscopio. Estos sitios reclutan proteínas de tipo WASP y ERM que promueven la polimerización de actina y el ensamblado de microfilamentos, con lo que se estabiliza el macrodominio (Simons y Vaz, 2004).

4. Importancia de MARCKS durante el desarrollo del sistema nervioso

A pesar de ser MARCKS una proteína ampliamente distribuida en distintos tejidos, los efectos de la delección de su gen, sólo son apreciables a nivel del sistema nervioso (Stumpo et al., 1995). Todos los ratones homocigotos para dicha delección murieron antes, o algunas horas después del nacimiento. Un alto porcentaje de los mismos presentó exencefalia y onfalocele indicando defectos de la línea media dorsal. En aquellos ratones donde no existía exencefalia, se apreciaron defectos tales como la falla en la laminación de la corteza cerebral y la retina. Más precisamente, en la retina hay una ausencia en la formación de la capa transitoria de Chievitz, precursora de la plexiforme interna. Estos ratones presentan además agenesia del cuerpo caloso y otras comisuras del cerebro anterior. Algunos de estos defectos pueden ser explicados por anomalías en

la migración neuronal, ya sea como consecuencia de alteraciones en la interacción célula-célula o célula-matriz, funciones donde MARCKS podría jugar un rol importante. En estos ratones mutantes existen anomalías en la lámina basal que rodea el tubo neural y en otras moléculas de la matriz extracelular como los proteoglicanos, lo cual puede ocasionar defectos en la migración de los neuroblastos (Blackshear et al., 1997). Las alteraciones observadas en los ratones “knock out” son corregidas totalmente cuando se realiza la transgénesis con la forma humana de MARCKS (Swierczynski et al., 1996). Los ratones transgénicos que expresan una variante no miristilada de MARCKS o una variante no fosforilable en el DE, complementan todos los defectos neuroanatómicos de *Macs^{-/-}*, pero no tienen valores normales de sobrevivencia postnatal (Swierczynski et al., 1996; Scarlett et al., 2003). Estos resultados sugerirían que ni la miristilación ni la fosforilación por PKC son necesarios para la/s función/es que MARCKS media durante el desarrollo normal del sistema nervioso central, pero sí lo son para la sobrevivencia luego del nacimiento. Por otra parte, los ratones que expresan una forma de MARCKS no miristilada y pseudofosforilada (donde las serinas del DE fueron cambiadas por residuos de ácido aspártico para remedar el estado de máxima fosforilación de MARCKS) corrigen algunos defectos mientras que empeoran otros. En particular, hay un rescate de los defectos en la formación de las comisuras y la laminación de la corteza y la retina, pero aparece un fenómeno nuevo, la ectopia retiniana (Kim et al., 1998). Teniendo en cuenta que la retina en estos casos presenta características normales, se cree que MARCKS podría estar actuando en etapas tempranas del desarrollo y no en eventos posteriores de migración o diferenciación celular. En etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso, MARCKS se acumula en el borde apical del neuroepitelio, en la zona donde se encuentra el cinturón de actina responsable del cierre del tubo neural (Zolessi y Arruti, 2001a).

En diversos estudios se ha vinculado a MARCKS con procesos de crecimiento neurítico y guía axonal, regulando tanto el citoesqueleto de actina, como las adhesiones célula-sustrato. En neuronas del ganglio de la raíz dorsal, MARCKS es fosforilada por PKC como consecuencia de la activación de una vía mediada por ácido araquidónico. Esta activación desencadena el colapso de los conos de crecimiento (Mikule et al., 2003). Más recientemente se ha vinculado a MARCKS en algunas etapas de la neurogénesis en relación con el receptor IGF-1. Este receptor es una molécula relacionada con el crecimiento y diferenciación de varios órganos, y es capaz de promover un aumento del número y tamaño de neuritas en una línea de neuroblastoma humano. En esta situación, IGF-1 provoca un descenso en la cantidad de MARCKS fosforilada en una de las serinas de su DE, en relación con la vía PI_3K y con la inhibición de la vía RhoA-ROCK. Por otra

parte, la sobreexpresión de MARCKS salvaje y de una variante mutada en las serinas de su DE, de manera que no puede ser fosforilada, incrementan el crecimiento neurítico. Estos resultados en conjunto apuntan hacia la importancia de formas no fosforiladas por PKC en el DE de MARCKS, en eventos de crecimiento neurítico (Shiraishi et al., 2006).

En estadíos postnatales los niveles del mensajero de MARCKS descienden de manera progresiva y se mantienen únicamente en regiones específicas del cerebro adulto que se asocian a un alto grado de plasticidad, tales como las áreas de asociación de la neocorteza, el hipocampo y el cerebelo (McNamara y Lenox, 1997; Higo et al., 2002, 2003; 2004). Esto sugiere su participación en los procesos dinámicos de remodelación de las terminales pre- y post-sinápticas que tienen lugar en los eventos vinculados a la plasticidad sináptica. En cultivos de neuronas del hipocampo, el silenciamiento de MARCKS provoca un descenso muy importante en la densidad, el largo y el ancho de las espinas dendríticas, mientras que la sobreexpresión de formas mutantes de MARCKS altera la morfología de las mismas, resaltando la importancia que MARCKS puede tener en los fenómenos de plasticidad sináptica (Calabrese y Halpain, 2005).

5. S25p-MARCKS

El interés de nuestro grupo de investigación en esta proteína surgió a partir de la búsqueda de marcadores de diferenciación neuronal en la retina, mediante la generación de anticuerpos monoclonales producidos por inmunización de ratones con retina embrionaria de pollo (Zolessi et al., 1999). Históricamente la retina ha sido de enorme importancia para el estudio del desarrollo del sistema nervioso en vertebrados. A pesar de que diversos estudios destacan la existencia de diferencias en el desarrollo de la retina de diferentes especies, la de pollo, en particular, ha demostrado ser extremadamente versátil debido a su accesibilidad, a la ausencia de vascularización y a la facilidad de disociar sus células y cultivarlas "*in vitro*" (Snow y Robson, 1994; Adler 2000). Uno de los anticuerpos producidos con este fin en nuestro laboratorio, el Acm 3C3, reconoce una secuencia de MARCKS que contiene a la serina 25 localizada fuera del DE de la proteína. Para ser reconocida por el anticuerpo dicha secuencia debe tener la serina 25 fosforilada, y tal modificación sólo ha sido detectada durante la diferenciación de células del sistema nervioso, lo cual constituye la primera evidencia de una modificación tejida específica de MARCKS (Zolessi et al., 1999; Zolessi et al., 2004b). En la retina neural de embrión de pollo, la fosforilación de la serina 25 comienza a ser evidente aproximadamente a tres días de desarrollo, cuando se inicia la diferenciación de las

neuronas ganglionares en la región central. Antes, las únicas células marcadas son las mitóticas, independientemente de su tipo celular (Zolessi y Arruti, 2001b). Todas las células de la retina neural derivan de un neuroepitelio seudoestratificado que se encuentra en activa proliferación. A medida que las células neuroepiteliales abandonan el ciclo celular, comienzan su diferenciación. Las primeras en hacerlo son las células localizadas en el centro de la retina y luego el proceso se extiende hacia las regiones más periféricas de la misma. Las neuronas que ocuparán las capas más internas de la retina, las neuronas ganglionares y las amacrinas, son las primeras en iniciar el proceso de neurogénesis. Luego aparecen células de las capas más externas como los fotorreceptores y las horizontales, y las últimas son las de regiones intermedias como bipolares y glia de Müller (Adler, 2000). En el pollo no existe ningún estadio del desarrollo que se caracterice por la generación de un tipo neuronal particular (Repka y Adler, 1992). Los procesos de proliferación, nacimiento, migración y diferenciación celular ocurren de manera simultánea durante varios días. Por ejemplo, aproximadamente a los 3 días de desarrollo (E3) comienza el nacimiento de las neuronas ganglionares en la región central de la retina y más tarde en zonas más periféricas. Este proceso culmina aproximadamente en E8, y en E15 la retina ya muestra el patrón de estratificación propio de la retina adulta de acuerdo a la disposición de somas y prolongaciones (Snow y Robson, 1994). A los 12 días de desarrollo, por ejemplo, la variante de MARCKS fosforilada en la serina 25 (de aquí en más nos referiremos a ella como S25p-MARCKS) se localiza en todas las capas, tanto en aquellas que contienen somas como en las que contienen únicamente prolongaciones neuronales, y es especialmente abundante en la capa de fotorreceptores (Zolessi et al., 1999). En la retina de pollos postnatales, a pesar de que la proteína total aún está presente en todas las capas, la fosforilación ha desaparecido de las capas más externas, conservándose únicamente en la capa plexiforme interna y en la capa de fibras del nervio óptico (Zolessi y Arruti, 2004a).

La serina 25 está localizada en una secuencia altamente conservada, secuencia consenso de fosforilación de quinasas dirigidas por prolina (S/T-P-X-K/H/R), de las cuales Cdk5 es la quinasa activa en células postmitóticas como neuroblastos y neuronas. Algunos resultados preliminares del laboratorio apuntan hacia esta quinasa como la candidata para realizar esta fosforilación *in vivo* (figura II).

Cdk5 es una serín-treonín quinasa dirigida por prolina, ubicada en los tejidos de mamífero, pero que presenta un alto nivel de expresión en neuroblastos postmitóticos, donde cumple funciones únicas a través de la regulación de la fosforilación de proteínas del

citoesqueleto como microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermedios, MAPs, tau, â-
 catenina, Nudel, entre otras (Paglini y Cáceres, 2001; Smith et al., 2001). La expresión de
 dominantes negativos de Cdk5 en cultivos neuronales, inhibe el crecimiento neurítico
 (Nikolic et al., 1996). Ratones “knock out” para Cdk5 presentan mortalidad perinatal y
 defectos en la laminación de la corteza cerebral y cerebelosa (Ohoshima et al., 1993).

```

MARCKS pollo      MGAQFSKTAAKGEAA-AEKPGEAVAA-SPSKANGQENGHVKNVDASPAAAEAG-KEEVQ
MARCKS bovino     MGAQFSKTAAKGEAT-AERPGEAAVAS-SPSKANGQENGHVKNVDASPAAAEPGAKEELQ
MARCKS ratón      MGAQFSKTAAKGEAT-AERPGEAAVAS-SPSKANGQENGHVKNVDASPAAAEPGAKEELQ
MARCKS humano     MGAQFSKTAAKGEAA-AERPGEAAVAS-SPSKANGQENGHVKNVDASPAAAESGAKEELQ
MARCKS rata       MGAQFSKTAAKGEAA-AERPGEAAVAS-SPSKANGQENGHVKNVDASPAAAEPGAKEELQ
MARCKS Xen.t.     MGAQFSKTAAKGESATAEKPGEAVAA-SPSKANGQENGHVKNVDASPAAAEAG-KEEVQ
MARCKS Xen.l.     MGAQFSKTAAKGEATAEKPGEAVPA-SPSKANGQENGHVKNVDASPAAAEAG-KEEVQ
MRP pollo         MGSQGSK-AAKAEGS--DPPGGNAAVTEPSKANGQENGHVRLNGDMPKAGGDP----TP
MRP Xen.l.        MGSVESK-----CKSVDISSNKQADQQENGHVKTNGDAPTNGDVG----AP
MRP humano        MGSQSSK-APRG----DVTAEAAAGA-SPAKANGQENGHVKSNGDLSPKGEGES----PP
MRP ratón         MGSQSSK-APRG----DVTAEAAAGA-SPAKANGQENGHVRSNGDLTPKGEGES----PP
MRP rata         MGSQSSK-APRG----DVTAEAAAGA-SPAKANGQENGHVKSNGDLTPKGEGES----PP
** : **          . : : ***** : ** : ..
  
```

Figura II: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de MARCKS y MRP, deducidas a partir del ADNc. Las secuencias corresponden a los primeros 60 aminoácidos de las secuencias de MARCKS y MRP obtenidas en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (ncbi) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL W 1.7 de Pole Bio-Informatique Lyonnais, Francia (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl). Xen. t.: *Xenopus tropicalis*, Xen. l.: *Xenopus laevis*, Código de aminoácidos: (*) mismo aminoácido, (:) aminoácido muy parecido, (.) aminoácidos poco parecidos. El recuadro azul indica la región de reconocimiento de quinasas dirigidas por prolina y en rojo se identifican las serinas asociadas a prolina.

Para ser activa esta quinasas debe asociarse a activadores tales como p35 o p39, los cuales presentan un patrón de expresión espacio-temporal complementario (Humbert et al., 2000). Estas subunidades reguladoras se encuentran ancladas a la membrana plasmática mediante un residuo de ácido mirístico. Los ratones “knock out” para p35 muestran prácticamente los mismos defectos en la laminación cortical observada en los ratones Cdk5 *-/-*. Estos resultados sugieren que el complejo Cdk5/p35 está relacionado con la migración y diferenciación neuronal durante la histogénesis del cerebro así como también en el desarrollo neurítico (Humbert et al., 2000).

Si bien aún nos encontramos realizando experimentos tendientes a determinar si Cdk5 fosforila a MARCKS en la serina 25, las evidencias existentes hasta el momento parecen indicar que Cdk5 es la responsable de tal fosforilación. Desconocemos, sin embargo, qué tipo de señales desencadenan esta fosforilación en MARCKS, o qué efectos tiene sobre la proteína. Esta modificación podría afectar distintos aspectos como su asociación a ligandos o su localización subcelular, entre otros. Dado que algunas de las funciones de MARCKS parecen estar reguladas por modificaciones postraduccionales entre las que se encuentran las fosforilaciones dentro y fuera del ED, resulta de gran importancia estudiar estas modificaciones en más detalle para comprender la fisiología de la proteína.

Hipótesis de trabajo:

Durante el desarrollo del sistema nervioso, MARCKS y S25p-MARCKS se localizan en la membrana plasmática principalmente asociadas a balsas lipídicas. En estos microdominios S25p-MARCKS interactúa con actina y con proteínas reguladoras de actina, modulando de esta manera la dinámica de los microfilamentos.

Para el análisis experimental de esta hipótesis establecimos algunos objetivos generales y específicos:

Objetivos generales:

Considerando el conjunto de antecedentes expuestos más arriba, planteamos como objetivo general determinar si existe S25p-MARCKS en microdominios de membrana (evaluados como DRM) y si esta fosforilación en S25 es compatible con la interacción de MARCKS y actina, en neuroblastos y neuronas de la retina del embrión de pollo.

Objetivos específicos y estrategia experimental:

a) Analizar el emplazamiento subcelular de MARCKS y de S25p-MARCKS en neuroblastos y neuronas jóvenes de embriones de pollo, poniendo especial énfasis en la retina neural. Estudiar si ambas proteínas se localizan en microdominios particulares de la membrana plasmática como las balsas lipídicas (evaluadas como DRM) y si la fosforilación en S25 afecta de alguna manera esta la asociación. Se utilizarán para esto distintos protocolos de aislamiento de dominios de membrana resistentes a detergente, basados en la flotación en gradientes discontinuos de sacarosa de homogeneizados realizados en presencia de Tritón X-100. También estudiaremos la relación entre el emplazamiento subcelular de MARCKS y S25p-MARCKS y la presencia de colesterol en la membrana plasmática, mediante tratamientos de cultivos celulares con un agente secuestrador de colesterol.

b) Analizar las interacciones moleculares de S25p-MARCKS con proteínas capaces de regular el citoesqueleto de actina y cuya asociación a las balsas lipídicas es conocida, tales como las NCAM. Utilizaremos ensayos de inmunoprecipitación de S25p-MARCKS para detectar co-inmunoprecipitación de otras proteínas.

c) Estudiar la relación de S25p-MARCKS con la actina. Emplearemos para esto inmunoprecipitaciones y experimentos de disrupción del citoesqueleto de actina en células de la retina neural en cultivo, para analizar mediante inmunofluorescencia los

efectos en la distribución de S25p-MARCKS. También realizaremos experimentos de disgregación celular para analizar si la disrupción de los contactos célula-célula tiene efectos sobre la localización o fosforilación de MARCKS en la serina 25.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

1) Animales

Utilizamos huevos embrionados de gallina, donados por la avícola ALA, y mantenidos en incubadora a 37° C en atmósfera húmeda hasta el momento de uso. El estadio de desarrollo fue determinado de acuerdo a la tabla de estadios normales de desarrollo del pollo de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1951).

2) Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

-Acm 3C3: anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce una región aminoterminal conteniendo la fosfo-serina 25 de MARCKS; (Zolessi, 1998). Sobrenadante de hibridoma. Dilución 1/20 para detección *in situ* y 1/5 para inmunoblot.

-MCt: anticuerpo policlonal de conejo, reconoce extremo carboxilo terminal de MARCKS de pollo (12 aminoácidos Ct) (Aigner y Caroni, 1993). Dilución 1/2000 para detección *in situ* y 1/5000 para inmunoblot.

-anti-NCAM: anticuerpo policlonal de conejo, reconoce las tres isoformas de NCAM; (Dr. Thierry). Dilución 1/200 para detección *in situ* y 1/5000 para inmunoblot.

-anti-espectrina: anticuerpo policlonal de conejo (Sigma, St. Louis, MO, USA) dilución 1/100 para detección *in situ* y 1/400 para inmunoblot.

-anti-tubulina humana: anticuerpo monoclonal humano, reconoce α y β tubulina (Avrameas et al., 1981). Dilución 1/300 para detección *in situ* y 1/200 para inmunoblot.

-anti-Cdk5: (C-8) anticuerpo policlonal de conejo, dirigido contra la región carboxilo-terminal de Cdk5 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) dilución 1/15 para detección *in situ* y 1/400 para inmunoblot.

-anti-actina: anticuerpo policlonal de conejo. (Sigma, St. Louis, MO, USA) dilución 1/2000 para detección *in situ* y 1/2000 para inmunoblot.

-anti-visinina: (GS-14) anticuerpo policlonal de conejo que reconoce visinina de pollo (Polans et al; 1993). Dilución 1/6000 para detección *in situ*.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

-anti IgG de ratón conjugada a FITC (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA). Dilución 1/200.

-anti IgG de ratón conjugada a TRITC (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dilución 1/200.

-anti IgG de ratón conjugada a Alexa 546 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Dilución 1/2000.

-anti IgG de conejo conjugada a Alexa 488 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Dilución 1/2000.

-anti IgG de conejo conjugada a Alexa 546 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Dilución 1/2000.

-anti IgG de ratón conjugada a peroxidasa del rábano (Pierce, Rockford, IL, USA). Dilución 1/1500.

-anti IgG de conejo conjugada a peroxidasa del rábano (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dilución 1/10.000.

-anti IgG de humano conjugada a peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dilución 1/5000.

-anti IgG de ratón conjugada a esferas de oro coloidal de 5 nm (Sigma, St Louis, MO, USA). Dilución 1/50.

3) Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Medio de cultivo de Dulbecco (Dulbecco modified Eagle's Medium, DMEM), suero fetal bovino (SFB) (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA); poli-L-lisina, poli-L-ornitina, metil- α -ciclodextrina, citocalasina D, BCA (ácido bicinconínico), faloidina conjugada a TRITC, toxina colérica-FITC, CNBr, sefarosa 4B (Sigma, St. Louis, MO, USA); nitrocelulosa, kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA); Hoechst 33342, Slow Fade Gold (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA); Aclar Embedding Film (TED PELLA, Inc., Redding, CA, USA); araldita (Durcupan: Fluka Chemika, Switzerland); "Liquid release agent" (Electrón Microscope Science, Washington, Pennsylvania, USA); Immobilon-P (Millipore, Bedford MA, USA); sefarosa-proteína G (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia).

Métodos

1. Fraccionamiento subcelular

a) fraccionamiento subcelular simple

Para analizar la fracción de MARCKS y S25p-MARCKS asociadas a las fracciones, citosólica, de membranas e insoluble, homogeneizamos retinas de E12 días en buffer de lisis (Tris 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, aprotinina 0,001 mg/ml, benzamidina 0,16 mg/ml, iodoacetamida 0,02 mg/ml, PMSF 1 mM, NaF 1 mM), manteniendo una relación de 1:10 w/v tejido: buffer. La homogeneización se realizó a 0° C en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 15 incursiones del émbolo. Luego sonicamos el homogeneizado haciendo 3 pulsos de 5 segundos cada uno, potencia 50

(Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole Parmer). El material resultante se centrifugó 10 minutos a 800g y el sobrenadante de esta centrifugación se centrifugó durante 1 hora a 100.000g (rotor SW 50.1 Ti, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). El sobrenadante se reservó como fracción citosólica. El sedimento fue resuspendido mediante pipeteo suave en buffer de lisis conteniendo Tritón X-100 al 0.5% y fue centrifugado durante 20 minutos a 15.000g a 4° C. El sobrenadante se reservó como fracción asociada a membranas solubles en Tritón X-100, y el material insoluble presente en el sedimento se resuspendió en buffer de muestra de electroforesis.

b) centrifugaciones isopícnicas

Para las centrifugaciones isopícnicas, homogeneizamos retinas utilizando el mismo buffer de lisis descrito más arriba, con y sin Tritón X-100 al 1%. La homogeneización se realizó a 0° C en homogeneizador Potter-Elvehjem con 15 incursiones del émbolo. El homogeneizado se incubó durante 30 minutos a 0° C y se colocó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa al 5%, 30% y 40%. La centrifugación se realizó durante 22 horas a 70.000g (rotor SW 50.1 Ti) a 4° C. Luego de la centrifugación se recuperaron 10 fracciones de 500 μ l desde la parte superior del tubo.

2. Aislamiento de DRM (detergent resistant microdomains)

Para aislar los dominios de membrana resistentes al detergente (DRM), realizamos experimentos de flotación en gradientes de sacarosa, tomando como referencia los protocolos adaptados de Maekawa et al., (1999) y Palestini et al. (2002). Para el primero de dichos protocolos, hicimos la homogeneización con el mismo buffer y de la misma manera que para las centrifugaciones isopícnicas, en presencia de Tritón X-100 al 1%. El homogeneizado se mezcló con una solución de sacarosa 2,4 M en buffer de homogeneización sin Tritón X-100, de manera que la concentración final de la misma fuera 0,8 M. Se colocaron 1,5 ml de dicha mezcla en un tubo de 5 ml, sobre la cual se pusieron 2,5 ml de sacarosa 0,7 M y 1 ml de buffer de homogeneización. Se realizó una ultracentrifugación durante 6 horas a 70.000g (rotor SW 50.1 Ti), a 4° C. En el segundo protocolo, realizamos la homogeneización de manera similar y el homogeneizado fue mezclado con un volumen igual de sacarosa 80%. Se colocó entonces la mezcla en el fondo de un tubo de 5 ml, sobre el cual se depositaron distintos volúmenes de sacarosa 30% y de sacarosa 5%. La centrifugación se realizó durante 6 o 22 horas (según se indica en la figura), a 70.000g (rotor SW 50.1 Ti) a 4° C. En ambos protocolos se recuperaron 10 fracciones de 500 μ l desde la parte superior del tubo, sin recuperar el sedimento en ninguno de los casos.

3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas fue realizada utilizando ácido bicinonínico (BCA) (Smith et al., 1985) o el método de Bradford (Bradford, 1976). En las cuantificaciones empleando BCA incubamos 10 μ l de la muestra con 1 ml de una solución preparada a partir de 50 ml de BCA y 1 ml de sulfato de cobre. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37° C antes de medir la absorbancia a 562 nm (UV Visible Recording Spectrophotometer UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japan). Utilizando el método de Bradford incubamos 20 μ l de la muestra con 1 ml del reactivo de Bradford (Bradford, 1976) y medimos la absorbancia a 595 nm). Como estándares en ambos procedimientos, se utilizaron soluciones de BSA 0 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml.

En las fracciones que contenían muy baja concentración de proteínas éstas fueron precipitadas agregando un volumen de ácido tricloroacético al 20% igual al de la muestra. Luego de agitar en vortex los tubos se incubaron a 0° C durante 15 minutos y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado del sedimento con 100 μ l de acetona a 0° C. Después se realizó otra centrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se dejaron secar los sedimentos a temperatura ambiente y se resuspendió en buffer de muestra de electroforesis.

4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli et al., 1970)

Las muestras para electroforesis fueron diluidas en buffer de muestra 4X (8% SDS, 50% glicerol, Tris 0,25 M pH 8,8, β -mercaptoetanol al 20% y cristales de bromofenol) y se calentaron a 100° C durante 2 minutos antes de cargarse en el gel. Utilizamos geles discontinuos de poliacrilamida (gel de concentración 3% y gel de separación 10%), de 0,75 o 1 mm de espesor y buffer de electroforesis conteniendo Tris 50 mM pH 8,6, glicina 380 mM, SDS 0,1%. Realizamos una precorrida de 15 minutos a 80 V, la corrida de concentración durante 30 minutos a 100 V y la de separación a 120 V durante 2 a 3 horas.

5. Western-blot (Towbin et al., 1979)

Al término de la corrida electroforética incubamos el gel en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, etanol 20%) durante 15 minutos. Armamos un sandwich con dos rejillas de plástico, dos esponjas, dos hojas de papel de filtro (Whatmann 3M) y una membrana de nitrocelulosa previamente incubada en el mismo buffer por 10 minutos. El sandwich fue colocado en una cuba de transferencia, cubriéndolo completamente con buffer. La transferencia se realizó durante 16 horas a 100 mA o durante 2 horas a 200

mA. La membrana fue teñida 10 minutos con Rojo Ponceau S al 0,2% en ácido acético al 3%, y posteriormente decolorada con varios lavados con PBS, en agitación. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó mediante una incubación con leche descremada (Conaprole, Uruguay) al 5% en PBS, durante 1 hora, a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario diluido en leche al 1% en PBS se realizó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Lavamos 10 minutos con leche al 1% en PBS con Tween 20 al 0,1%, y a continuación realizamos dos lavados de 5 minutos cada uno con leche al 1% en PBS. Incubamos con el anticuerpo secundario diluido en leche al 1% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Para retirar el exceso de anticuerpo secundario se realizó un lavado de 10 minutos en agitación con leche al 1% con Tween 20 al 0,1%, seguido de dos lavados de 5 minutos cada uno con leche al 1% en PBS y dos lavados de 5 minutos con PBS.

Para el revelado de la peroxidasa empleamos el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate y placas radiográficas (Kónica, Japón; AGFA o Agfa-Gevaert, Argentina).

Para realizar la inmunodetección de otros antígenos sobre la misma membrana de nitrocelulosa, bloqueamos la señal de la peroxidasa utilizada en la primera inmunodetección mediante una incubación en una solución de azida de sodio al 0,1% en PBS durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente o a 4^o C toda la noche. Luego se realizó la inmunodetección con los nuevos anticuerpos primario y secundario, sin necesidad de bloquear nuevamente los sitios inespecíficos.

6. "Dot blots"

Los dot blots fueron utilizados para determinar la localización del gangliósido M1 en las distintas fracciones de los gradientes de sacarosa. Para ello usamos membranas de immobilon-P que remojaamos en metanol 100% durante 3 minutos, luego sumergimos en agua destilada durante 3 minutos y en PBS durante 5 minutos. Cargamos 15 μ l de cada fracción en la membrana con ayuda de un sistema montado en un matraz de Kitasato conectado a una bomba de vacío. Bloqueamos los sitios inespecíficos mediante una incubación en BSA al 5% en PBS durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente incubamos con una solución de toxina colérica-FITC 12 μ g/ml en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Realizamos 3 lavados de 5 minutos en PBS y observamos los resultados colocando la membrana en un portaobjetos que colocamos en un microscopio de epifluorescencia utilizando el sistema de filtros para luz UV.

7. Cultivos primarios de células de la retina neural

Realizamos cultivos de retina neural de embriones de 8 días, para lo cual extrajimos el embrión en forma aséptica, retiramos los tejidos circundantes al ojo, extrajimos el ojo y lo colocamos en una solución buffer glucosado sin calcio ni magnesio (CMFG). Allí efectuamos su disección cortando con una tijera alrededor de la córnea para extraerla junto con el cristalino y cuerpo vítreo. Posteriormente separamos la retina neural de la pigmentaria en el sector opuesto a la fisura coroidea, y a partir de ese sector desgarramos la retina pigmentaria, coroides y esclerótica de manera de separar dichas estructuras de la retina neural. Separamos la retina neural a nivel de la fisura coroidea, utilizando una pinza recta y la incubamos en una solución de tripsina 0,05%, EDTA 0,002% en CMFG, en agitación orbital (80 rpm) durante 15 minutos. A continuación inhibimos la actividad de la enzima agregando DMEM, suplementado con SFB al 10%. Las retinas fueron disgregadas mediante pipeteo suave con pipeta Pasteur con la punta redondeada a la llama, fueron colocadas en un tubo con 8 ml de DMEM con SFB 10% y se dejaron decantar durante 10 minutos de manera que los trozos de retina más grandes sedimentaran. Sembramos las células de la parte superior del tubo en placas de petri de 35 o 60 mm conteniendo laminillas de vidrio previamente incubadas durante 24 horas con poli-lisina o poli-L-ornitina 0,01%. Las células se cultivaron en estufa a 37° C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Los tratamientos con MCD se hicieron en DMEM sin suero, para lo cual retiramos el medio de cultivo de las células y realizamos un lavado con medio sin suero antes de agregar la droga. Los tratamientos con citocalasina D se realizaron en DMEM con 10% SFB y fueron mantenidos intervalos de tiempo variables según se indica en “Resultados”.

8. Inmunodetección *in situ* sobre células

a) microscopía de fluorescencia

La inmunodetección se realizó sobre cultivos de células de la retina neural de embriones de 8 días de desarrollo, 4 y 6 días *in vitro*. Luego de sacar el medio de cultivo se realizó un lavado con PBS y se fijaron con una solución al 4% de paraformadehído (PFA) durante de 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se permeabilizaron las células mediante una incubación de 3 minutos en una solución de Tritón X-100 al 0,05% a 0° C. Posteriormente, las laminillas fueron transferidas a vidrios de reloj donde se realizó el resto del procedimiento. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con BSA al 1% y suero de cabra al 10% en PBS, o únicamente con BSA al 5%, durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó la incubación con el anticuerpo primario diluido en BSA al 1% en PBS, durante

1 hora a 37° C, en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a 37° C, en cámara húmeda. Los filamentos de actina se marcaron con falodina-TRITC y el gangliósido M1 con toxina colérica-FITC, mediante una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente después de los lavados del anticuerpo secundario. Luego de realizarse 3 lavados de PBS de 5 minutos cada uno se incubó con una solución de Hoechst 33342 0,1 ì g/ml en PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se realizaron 3 lavados de PBS de 5 minutos cada uno, se sumergió la laminilla en un vaso de bohemia con agua bidestilada y se montó sobre un portaobjeto utilizando glicerol al 50% en PBS o Slow Fade Gold y se conservaron a -20° C.

La observación de los preparados se realizó en un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot FXA y fueron fotografiados con película blanco y negro AGFA o ILFORD HP5, de 400 asa, o con una cámara digital Nikon D70. Los negativos fueron revelados con revelador Ilford Microphen, luego las imágenes fueron digitalizadas a partir de los negativos y procesadas con el programa Adobe Photoshop 7.0.

b) microscopía electrónica de transmisión

Realizamos inmunodetecciones sobre cultivos de células de la retina neural hechos sobre laminillas de Aclar incubadas previamente con poli-L-ornitina. Las células fueron fijadas durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando PFA 4%-glutaraldehído 0,25%. La inmunodetección se realizó con el mismo procedimiento detallado en la sección anterior, utilizando el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a esferas de oro coloidal. Posteriormente se post fijaron las células en una solución de OsO₄ al 2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizamos un lavado corto en agua destilada y la deshidratación mediante pasajes de 5 minutos cada uno en soluciones de etanol al 50%, 70%, 90%, 96%, 100%. Luego se realizaron dos lavados con acetona, de 5 minutos cada uno y se incubaron en soluciones de araldita al 25%, al 50%, al 75% y al 100% en acetona durante 15 minutos, 2 horas, 45 minutos y toda la noche, respectivamente. Para armar los bloques colocamos las laminillas, con las células hacia arriba, sobre un portaobjetos previamente incubado en "Liquid release agent" y cubrimos las laminillas con un trozo de aclar incubado también en "Liquid release agent". Este dispositivo fue incubado durante 48 horas en estufa a 60° C. Finalmente se retiró el trozo de aclar que cubría las laminillas y recortamos un sector de interés en la araldita en el cual se encontraban incluidas las células, y lo pegamos al extremo de un bloque nuevo de araldita para realizar los cortes. Los cortes semifinos de 300 nm se realizaron en un ultramicrotomo RMC MTX, y se tiñeron con azul de metileno al 1%. Los cortes ultrafinos

de 60-75 nm fueron contrastados primero con una solución acuosa saturada de acetato de uranilo y luego con citrato de plomo al 2%. La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010, y la captura de imágenes mediante una cámara digital Hamamatsu C 4742-95-10 MR. El registro se realizó en el programa AMT-Advantage y el procesamiento en el programa Photo Impact 4.2.

10. Purificación de anticuerpo monoclonal 3C3

El Acm 3C3 se purificó mediante una columna de afinidad de sefarosa-proteína G. Para ello realizamos un lavado del lecho de la columna (5 ml) con 20 ml de PBS filtrado con filtro de 0,22 μ m. Luego lavamos con 15 ml de una solución glicina-HCl 0,1 M pH 2,7, y posteriormente realizamos otro lavado con PBS hasta que el pH de salida estuviese entre 7,2 y 7,4. A continuación realizamos el pasaje del sobrenadante de hibridoma tamponado con Tris-HCl 50 mM pH 8,0, conteniendo NaN_3 al 0,02%, previamente filtrado en filtro Millipore de 0,22 μ m, manteniendo un flujo aproximado de 0,75 ml/min, a 4 ° C. Posteriormente lavamos la columna con PBS hasta que la DO_{280} del PBS de salida fuese menor a 0,05 unidades de absorbancia. En dicho momento se realizó la elución del anticuerpo pasando 20 ml de glicina-HCl 0,1 M pH 2,7, recogiendo fracciones de 1 ml en tubos conteniendo 50 μ l de Tris-HCl 2 M pH 11. La concentración de proteínas en cada fracción se midió por DO_{280} y se reunieron aquellas que superaban el valor de 0.1 unidades de absorbancia. Las fracciones reunidas fueron luego dializadas contra PBS durante 24 horas realizando varios cambios del buffer, a 4° C. La solución se conservó a 4° C con NaN_3 al 0,02%.

11. Acoplamiento del anticuerpo monoclonal 3C3 a sefarosa 4B

El Acm 3C3 fue acoplado a sefarosa 4B activada con CNBr (Sigma, St. Louis, MO, USA). Para ello, reconstituimos una cantidad adecuada de sefarosa 4B mediante varios lavados en una solución de HCl 1 mM (manteniendo una relación 200 ml HCl/g de gel). Posteriormente el gel se lavó con buffer de acoplamiento (NaHCO_3 0,1 M pH 8,3, NaCl 0,5 M) y se incubó con el anticuerpo (5-10 mg/ml) en el mismo buffer de acoplamiento, durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Luego se bloquearon los sitios reactivos remanentes mediante una incubación de dos horas a temperatura ambiente, en una solución de glicina-NaOH 0,2 M pH 8. Por último, se lavó el exceso de proteína adsorbida mediante un lavado con buffer de acoplamiento, seguido de varios lavados en acetato de sodio 0,1 M pH 4, NaCl 0,5 M y nuevamente con solución de acoplamiento y PBS. La sefarosa-Acm 3C3 se almacenó a 4° C en PBS con NaN_3 al 0,02%.

12. Inmunoprecipitación

Homogeneizamos retinas o cerebros de embriones de 12 días de desarrollo en buffer de lisis (NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 0,2%, NaF 5 mM, Na_3VO_4 5 mM, aprotinina 0,001 mg/ml, benzamidina 0,16 mg/ml, PMSF 1 mM) en una relación tejido:buffer de 1:10 w/v, a 0° C, en homogenizador Potter-Elvehjem. Luego de incubar el homogeneizado 15 minutos en hielo, realizamos una centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Un ml del sobrenadante fue incubado con 10 μ l de sefarosa 4B inactiva, en agitación durante 45 minutos a 4° C. Posteriormente lo incubamos con 40 μ l sefarosa-3C3, resuspendida previamente en 100 μ l de buffer de lisis sin Tritón X-100 durante 3 horas, a 4° C en agitación. Luego de cuatro lavados en buffer de lisis el sedimento fue resuspendido finalmente en buffer de muestra de electroforesis.

13. Disgregación de retina neural

Las retinas embrionarias de 8 días se aislaron mediante el procedimiento que se describe en la sección de cultivo de células de la retina. Incubamos dichas retinas en CMFG durante 10 minutos o durante 10 minutos en DMEM y luego en tripsina 0,05%, EDTA 0,002% en CMFG, en agitación orbital durante 20 minutos. Posteriormente eliminamos la solución de tripsina e inhibimos la tripsina remanente mediante una incubación en medio de cultivo DMEM conteniendo SFB al 10%. Realizamos la disgregación mecánica mediante pipeteo durante 10 minutos con pipeta Pasteur con punta redondeada a la llama.

Como control en estos experimentos se utilizaron retinas que fueron extraídas y posteriormente incubadas en medio de cultivo DMEM, SFB 10% durante 40 minutos.

Las células disgregadas o las retinas enteras fueron centrifugadas a 14.000 rpm durante 3 minutos y solubilizadas en buffer Tris 10 mM pH 7,4, SDS al 1%. El ADN de estas muestras fue fragmentado mediante repetidos pasajes por agujas 21G y por jeringas de insulina con agujas 29G.

14. Medidas de densidad óptica de las bandas de Western-blot

Para cuantificar el grado de fosforilación de la serina 25 de MARCKS en los experimentos de disgregación celular, realizamos Western-blots secuenciales con el Acm 3C3 y MCt. Medimos las DO de las bandas correspondientes a S25p-MARCKS y MARCKS con el programa Image J. Con la herramienta selección rectangular marcamos un rectángulo que cubriese la banda de mayor tamaño obtenida en la inmunodetección con Acm 3C3 y MCt. Localizando el rectángulo encima de cada banda realizamos la medida de la DO

promedio de dicho rectángulo (Analyze/Gels). Repetimos el procedimiento tres veces para cada banda y promediamos los valores obtenidos. Normalizamos los valores de S25p-MARCKS utilizando un factor normalizante obtenido a partir de los resultados de DO de MARCKS. Para esto, dimos un valor de 1 a la DO de la banda del control detectado con MCt, y el valor correspondiente a las bandas obtenidas en las situaciones experimentales. Luego de multiplicar los resultados de los promedios de DO para Acm 3C3 por el factor normalizante, adjudicamos un valor del 100% a la banda control detectada con Acm 3C3 y calculamos los porcentajes correspondientes para las demás bandas.

RESULTADOS

S25p-MARCKS en fracciones de membrana de retina embrionaria de pollo

Con el objetivo de determinar la distribución subcelular de S25p-MARCKS en neuronas de la retina neural de embriones de pollo realizamos, en primer lugar, fraccionamientos subcelulares simples, de homogeneizados de retina neural (E12) que analizamos por Western-blot, realizando inmunodetecciones secuenciales de S25p-MARCKS y MARCKS. En estos experimentos encontramos tanto a MARCKS como a S25p-MARCKS en las fracciones citosólica, de membranas e insoluble (Figura 1A). Ambas proteínas presentaron, además, un enriquecimiento específico en la fracción de membranas, lo cual indica que la fosforilación en la serina 25 no impide la asociación de MARCKS con membranas.

Para profundizar el análisis de la distribución de esta proteína, realizamos separaciones isopícnicas, en gradientes discontinuos de sacarosa de tres escalones, sobre los que colocamos homogeneizados de retina de E12, obtenidos en presencia o ausencia de detergente no iónico. Luego de la ultracentrifugación, si bien no pudimos determinar el límite entre los escalones de sacarosa de distinta densidad, retiramos 10 fracciones de igual volumen desde la parte superior del tubo. Dichas fracciones fueron analizadas utilizando Western-blot. En los fraccionamientos subcelulares de homogeneizados sin detergente, encontramos que S25p-MARCKS se localizaba principalmente en fracciones de baja densidad (fracciones soluble y asociada a membranas), aunque una pequeña cantidad también estaba presente en fracciones de mayor densidad, indicando su asociación a elementos insolubles de la célula (citoesqueleto principalmente). Por su parte MARCKS total y actina presentaron una distribución bastante extensa a lo largo del gradiente (Figura 1B). La solubilización en presencia de Tritón X-100 al 1%, provocó tanto que MARCKS como S25p-MARCKS se localizaran únicamente en fracciones de baja densidad, en tanto que no hubo cambios apreciables en cuanto a la distribución de actina en las fracciones más densas (Figura 1C).

Mediante estos experimentos determinamos que MARCKS se localiza en fracciones asociadas a membranas celulares, y que la fosforilación en serina 25 no altera tal distribución.

La asociación de S25p-MARCKS a la membrana también pudo observarse mediante microscopía de fluorescencia, a través de inmunodetecciones realizadas sobre cultivos de células aisladas de retina embrionaria. En la serie de fotografías de la Figura 1D, correspondientes a diferentes planos del mismo neuroblasto (desde la región adherida al sustrato hasta la superficie), se observa que S25p-MARCKS se localiza principalmente en la periferia celular formando parches, mientras que hay muy poca señal que pueda ser inequívocamente atribuible a regiones del citoplasma. S25p-MARCKS aparece concentrada en parches de distintos tamaños. Utilizando inmunodetecciones reveladas con conjugados a oro coloidal, para su observación en el microscopio electrónico de transmisión, obtuvimos el mismo patrón de distribución (Figura 1E). De la misma manera que con la microscopía de fluorescencia, observamos que S25p-MARCKS estaba asociada a la membrana, existiendo muy poca proteína citosólica y claramente está excluida del núcleo. La proteína se distribuía en acúmulos que poseían un diámetro aproximado de 200 nm.

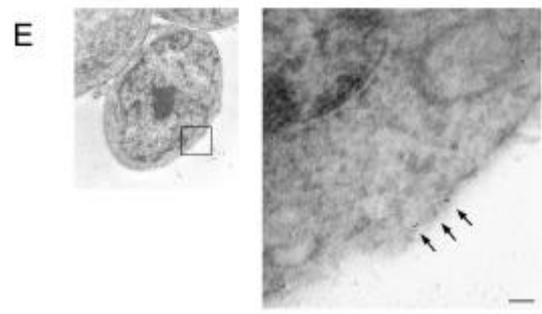
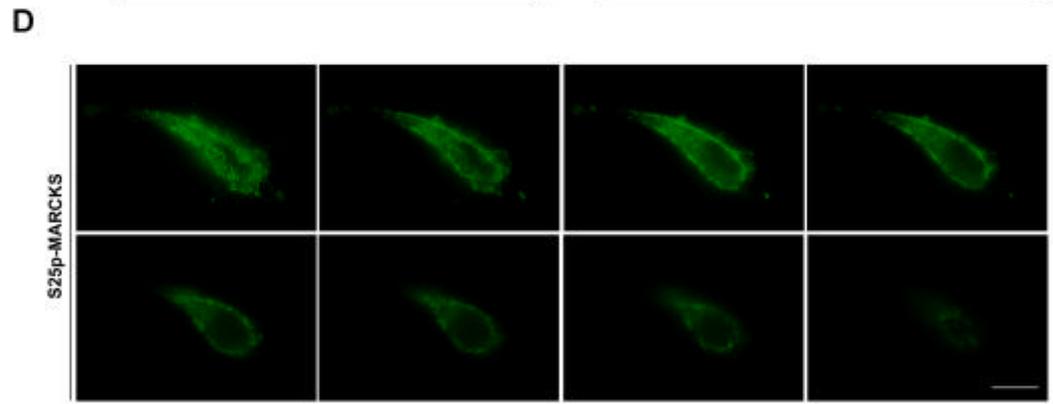
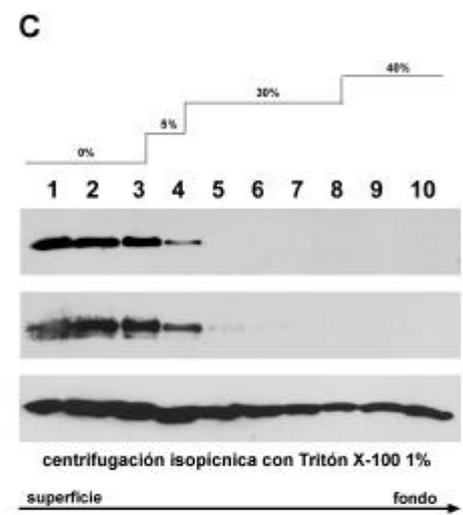
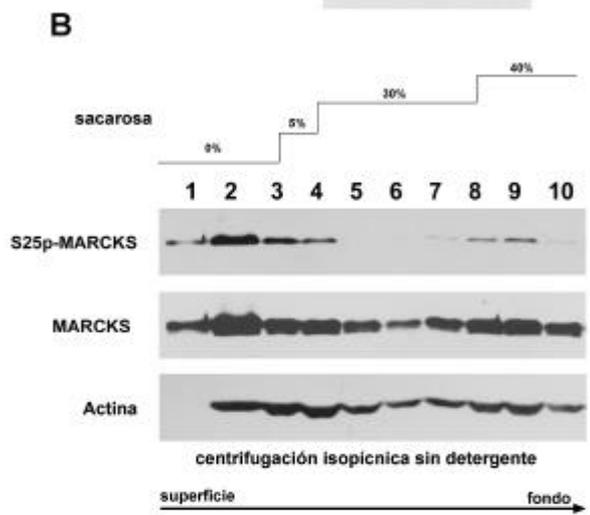
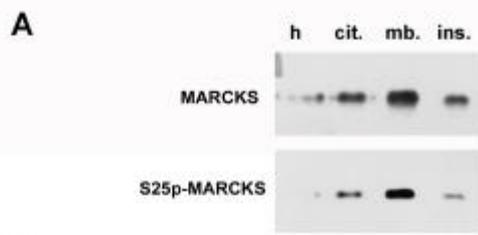
En suma, utilizando distintas aproximaciones experimentales, determinamos que S25p-MARCKS se encuentra asociada a la membrana plasmática formando pequeños parches en neuroblastos y neuronas de la retina neural de embriones de pollo.

Asociación de S25p-MARCKS a microdominios de membrana resistentes al Tritón X-100

Considerando algunas comunicaciones previas acerca de la localización de MARCKS en regiones de membrana resistentes a detergentes no iónicos (Laux et al., 2000), nos formulamos la siguiente pregunta, ¿la asociación de S25p-MARCKS con membranas celulares ocurre en algún microdominio específico de la misma? En particular, nos interesaba determinar si la fosforilación de MARCKS en la serina 25 altera de alguna manera su distribución subcelular ya sea dirigiéndola o excluyéndola de microdominios lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos, o balsas lipídicas de membrana.

Como se menciona en la introducción existe una enorme diversidad de procedimientos e incluso de criterios para considerar la asociación de una molécula a las balsas lipídicas. En nuestro trabajo asumiremos la definición operacional que considera que una proteína se encuentra asociada a balsas lipídicas si se asocia a DRM. Esto significa que luego de una ultracentrifugación de un homogeneizado preparado en presencia de Tritón X-100, la proteína es recuperada en la interfase de las dos fracciones de sacarosa de menor densidad (5%-30%). Este constituye uno de los métodos clásicos para determinar la

Figura 1: Emplazamiento subcelular de MARCKS y S25p-MARCKS en células de la retina neural de embriones de pollo. **(A)** Inmunodetección secuencial (Western-blot) de S25p-MARCKS y MARCKS. Homogeneizado total (h), fracciones citosólica (cit.), de membrana (mb.) e insoluble (ins.) obtenidas a partir de retinas de E12. **(B)** Western-blot de fracciones obtenidas a partir de la centrifugación isopícnica de un homogeneizado de retina neural de E12, realizado en ausencia de detergente. Se muestran inmunodetecciones secuenciales de S25p-MARCKS, MARCKS y actina. Arriba se indica la concentración aproximada de sacarosa en cada fracción del gradiente al inicio de la ultracentrifugación. **(C)** Fracciones obtenidas de la misma manera que se detalla en B, pero a partir de homogeneizados realizados con Tritón X-100 al 1%. Las flechas con las inscripciones "superficie" y "fondo" se refieren a la posición relativa en el tubo. **(D)** Localización de S25p-MARCKS en neuroblastos de la retina neural en cultivo. Inmunodetección indirecta utilizando el Acm 3C3. Imágenes correspondientes a distintos planos del mismo neuroblasto. La primer imagen arriba a la izquierda corresponde a la región de la célula adherida al sustrato. Barra: 10 μ m. **(E)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de cultivos de células de la retina neural con inmunodetección utilizando Acm 3C3 y anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal de 5nm. La foto izquierda es una imagen a bajo aumento de un neuroblasto, con un recuadro indicando la zona que se observa a mayor aumento en la foto de la derecha. N: núcleo, C: citoplasma, Mb: membrana plasmática. Las flechas señalan las esferas de oro cercanas a la membrana plasmática de la célula. Barra 100 nm.



asociación de una proteína a microdominios lipídicos. En él se separan los elementos insolubles de la membrana de los elementos de membrana que son solubles en detergente, y otros elementos insolubles de la célula como el citoesqueleto. Mientras que estos últimos se localizan en el sedimento, las regiones de membrana ricas en lípidos insolubles al Tritón X-100 flotan en una zona de baja densidad del gradiente (Brown y Rose, 1992; Brown y London 1997). Teniendo en cuenta la singularidad del procedimiento para el aislamiento de DRM y la variabilidad de resultados obtenidos con dicha técnica en estudios previos, decidimos abordar la problemática utilizando dos protocolos diferentes como referencia, introduciendo algunas modificaciones (Maekawa et al., 1999 y Palestini et al., 2002). Las condiciones de centrifugación en estos protocolos varían desde 70.000g a 200.000g, durante períodos prolongados (entre 6 y 22 horas). Al realizar esas centrifugaciones colocamos el homogeneizado de cerebro o retina neural de embriones de pollo de 12 días de desarrollo, con sacarosa en el fondo del tubo. Sobre este material se colocó un gradiente discontinuo de sacarosa de dos escalones. Debido a algunas limitaciones técnicas realizamos ultracentrifugaciones más prolongadas pero de menor velocidad a la establecida por los protocolos de referencia. Una vez finalizada la ultracentrifugación, se observó un material blancuzco separando aproximadamente las dos fracciones de menor densidad, que se ha descrito como los DRM (Brown y London, 1997). En estos fraccionamientos tampoco pudimos visualizar el límite entre los distintos escalones una vez concluida la ultracentrifugación, de manera que las concentraciones de sacarosa indicadas en cada figura son aproximadas. Encontramos que la mayor parte de las proteínas se localizaban en las fracciones más densas, mientras que las fracciones livianas (1 a 5) solo contenían un porcentaje que sumado no alcanzaba el 5% de las proteínas totales. Por este motivo fue necesario precipitar las proteínas contenidas en las fracciones livianas utilizando ácido tricloroacético. En los análisis por Western-blot, cargamos la totalidad de las proteínas presentes en las fracciones livianas (1 a 5), previamente precipitadas, mientras que sólo cargamos aproximadamente 60 µg de las proteínas presentes en las fracciones más pesadas (6 a 10).

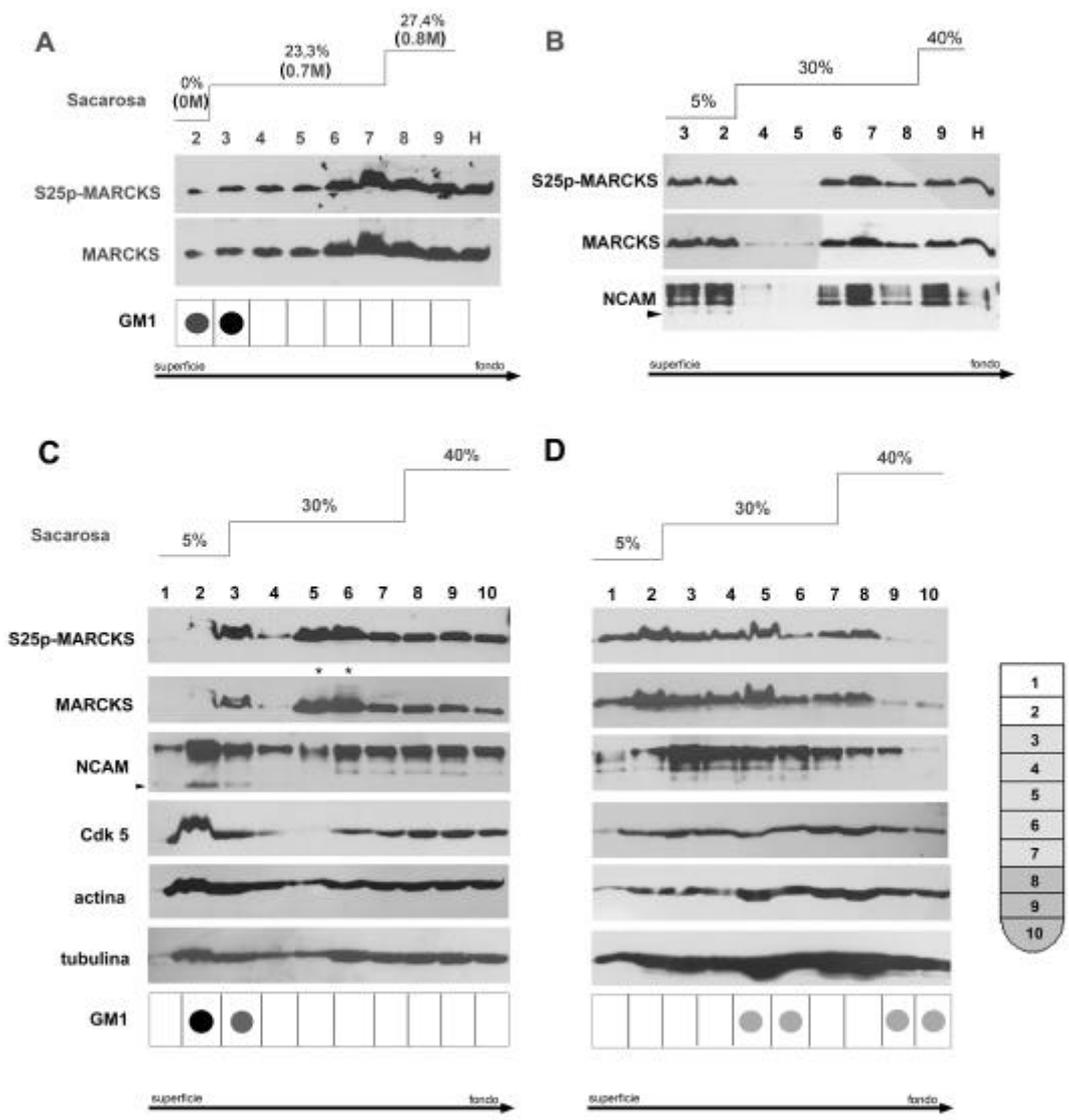
El análisis por Western-blot de las fracciones obtenidas mediante el protocolo de Maekawa et al. 1996 [sacarosa 0M/0.7M/0.8M (0%/23.9%/27.4%), centrifugación 6 horas a 70.000g], mostró que había S25p-MARCKS en fracciones de baja densidad, tal como había sido descrito anteriormente (Laux et al., 1999; Zolessi, 2003). Sin embargo, encontramos que la mayor parte de la proteína estaba en fracciones de mayor densidad (Figura 2A). Las fracciones de baja densidad (2 y 3) contenían además un marcador clásico de balsas lipídicas: el gangliósido M1 (GM1). Estos resultados indicaban que, si bien habría S25p-MARCKS en microdominios livianos, la mayor cantidad estaría

asociada a elementos que se equilibran a mayores densidades de sacarosa. No encontramos diferencias en la distribución entre S25p-MARCKS y MARCKS total a lo largo de los gradientes, lo que sugirió que el fosfato en la serina 25 no alteraría la asociación de MARCKS con regiones específicas de la membrana.

En los gradientes realizados con el protocolo de Palestini et al., 2002, que aumenta las diferencias de concentración de sacarosa en los escalones más densos del gradiente (sacarosa 5%/30%/40%, centrifugación de 6 a 22 horas a 70.000g), haciendo centrifugaciones de 6 horas (Figuras 2B, C y D) obtuvimos resultados similares a los expuestos más arriba: una distribución de S25p-MARCKS a lo largo de todo el gradiente, tanto en la retina neural (Figura 2B) como en el cerebro (Figura 2C). Por su parte, los marcadores de DRM como las isoformas livianas de NCAM, aparecieron en las fracciones de baja densidad, especialmente 2 y 3 (Figuras 2B y C, cabezas de flecha). En las fracciones 5 y 6 de los homogeneizados de cerebro realizados en presencia de Tritón X-100, encontramos un enriquecimiento de S25p-MARCKS y MARCKS respecto al resto de las fracciones (Figura 2C, asteriscos). Este enriquecimiento no se observó en las otras fracciones obtenidas del escalón de sacarosa de igual densidad (fracciones 3, 4 y 7). Las proteínas del citoesqueleto actina y tubulina, mostraron una distribución relativamente homogénea en las distintas fracciones. Cdk5, quinasa susceptible de fosforilar a MARCKS en la serina 25, apareció distribuida de manera extensa, similar a la actina y la tubulina. En fracciones densidad intermedia (4 y 5) los niveles de Cdk5 fueron menores a los encontrados en el resto de las fracciones.

Dado que en algunos estudios se sugirió que el Tritón X-100 puede arrojar resultados artefactuales en cuanto a la asociación de proteínas a DRM (Munro 2003; Heerklotz et al., 2003), decidimos hacer los mismos gradientes pero utilizando en este caso homogeneizados realizados en el mismo buffer de lisis, en ausencia de detergente. Como se observa en la Figura 2D, no observamos cambios importantes en la distribución de S25p-MARCKS o MARCKS respecto a los gradientes realizados en presencia de Tritón X-100. No obstante, se puede constatar que parece encontrarse más cantidad de ambas proteínas en las fracciones 1 a 5. Observamos además una deslocalización de los marcadores de balsas GM1 e isoformas de bajo peso molecular de NCAM, que se detectaron en fracciones de mayor densidad (3 a 6 NCAM, 5-6 y 9-10 GM1) y no en las fracciones livianas.

Figura 2: Análisis de la asociación de S25p-MARCKS con DRM. Western-blot secuenciales para S25p-MARCKS, MARCKS, GM1, NCAM, Cdk5, actina y tubulina. En todos los casos en los carriles correspondientes a las fracciones 1 a 5 se cargaron la totalidad de las proteínas precipitadas de cada fracción y en los carriles 6 a 10 se cargaron 60 μ g de proteínas. **(A)** Separación utilizando el protocolo modificado de Maekawa et al. 1999, para la obtención de fracciones de membrana resistentes al Tritón X-100 a partir de retinas de embriones de pollo de E12 (6 horas de ultracentrifugación). **(B-D)** Separación de acuerdo al protocolo modificado de Palestini et al. 2002, para la obtención de fracciones de membrana resistentes al Tritón X-100 (6 horas de ultracentrifugación). **(B)** Fracciones obtenidas a partir de retina neural de embriones de E12, en presencia de Tritón X-100 al 1%. **(C y D)** Protocolo realizado utilizando cerebros de embriones de pollo de E12, en presencia (C) o en ausencia (D) de Tritón X-100 al 1%. Los asteriscos marcan las fracciones 5 y 6, enriquecidas en S25p-MARCKS. Las cabezas de flecha indican las isoformas de NCAM de bajo peso molecular, enriquecidas en fracciones de baja densidad. La concentración aproximada de sacarosa en cada fracción al inicio de la ultracentrifugación se indica en la parte superior de cada figura. A la derecha se esquematiza un tubo con la disposición de las fracciones que se analizaron mediante Western-blot. 1-10 fracciones de los gradientes; H homogeneizado de retina. Las flechas con las inscripciones “superficie” y “fondo” se refieren a la posición relativa en el tubo.

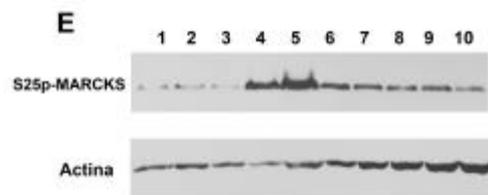
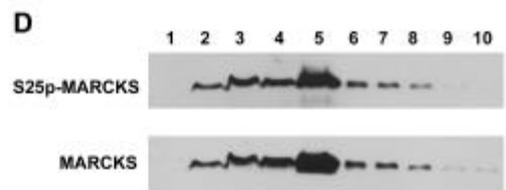
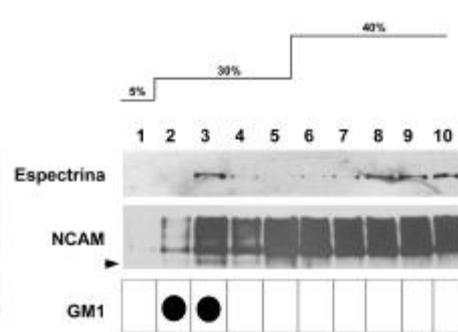
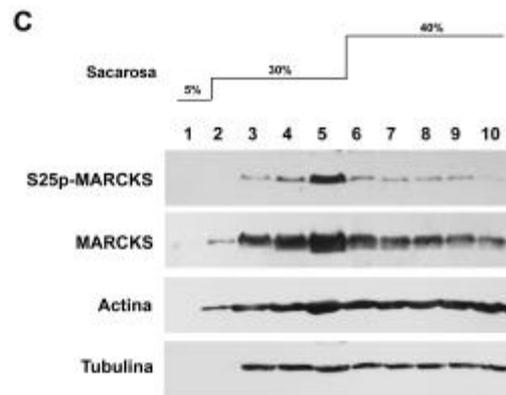
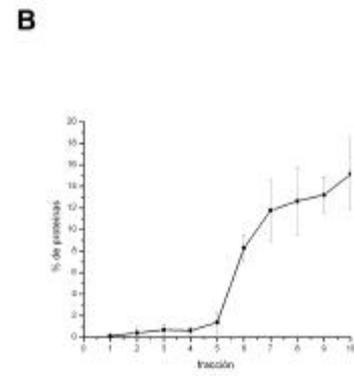
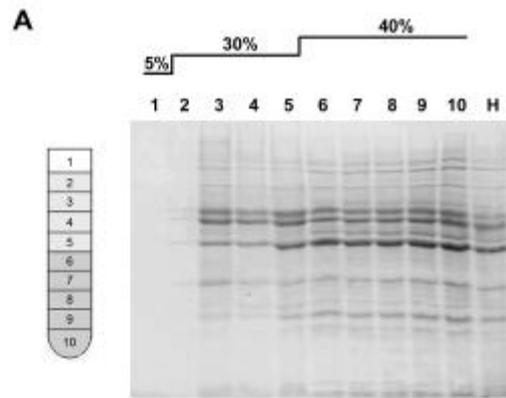


A fin de amplificar la resolución de la separación, realizamos el protocolo modificado de Palestini et al., incrementando el tiempo de centrifugación a 22 horas (Figura 3). Este procedimiento debería permitir que se equilibren aquellas fracciones que no lograron hacerlo en las centrifugaciones de menor duración. La tinción con rojo Ponceau de las proteínas electrotransferidas mostró que los polipéptidos mayoritarios estaban presentes en todas las fracciones (Figura 3A). Las cuantificaciones de las bandas en cada carril puso en evidencia que la mayor parte de las proteínas celulares, al igual que en las separaciones hechas en 6 horas, estaban en las fracciones más densas: desde la fracción 6 hacia el fondo del tubo (Figura 3B). En estos ensayos observamos un enriquecimiento importante de MARCKS y también de su isoforma fosforilada en la serina 25, en fracciones de densidad intermedia (fracción 5), como fuera observado en las centrifugaciones de menor duración (Figura 2C). No se observó este enriquecimiento en proteínas como actina, tubulina, espectrina, o las isoformas pesadas de la NCAM, que permanecen en cantidades constantes en prácticamente todos los escalones de sacarosa (Figura 3C). En las fracciones de baja densidad, como las fracciones 2 y 3, encontramos los marcadores clásicos de balsas lipídicas GM1 y las isoformas livianas de NCAM. En las mismas fracciones de baja densidad también se encontró una pequeña cantidad de MARCKS. Resultados similares en cuanto a la localización de MARCKS y S25p-MARCKS también fueron obtenidos utilizando muestras de cerebro de E12 (Figura 3D).

Si la presencia de S25p-MARCKS en fracciones de baja densidad es debida a su asociación con microdominios lipídicos de membrana, entonces la incubación del homogeneizado durante 30 minutos a 37° C desensamblaría dichos microdominios al aumentar la fluidez de los mismos y facilitar el acceso del Tritón X-100 para su solubilización, como fuera descrito previamente (Brown y Rose, 1992). Al realizar estos ensayos constatamos que la pequeña fracción de S25p-MARCKS que se localiza en los DRM no desaparece de los mismos, indicando que tal vez los microdominios lipídicos en los cuales se localiza S25p-MARCKS son de alguna manera resistentes a este tratamiento (Figura 3E). GM1 apareció en estos gradientes también en fracciones livianas (2 y 3) aunque en mucha menor concentración, indicando que al menos parte de las balsas lipídicas fueron solubilizadas por la incubación a 37° C (datos no mostrados).

Las evidencias obtenidas a partir de estos tres protocolos experimentales parecen indicar entonces que habría S25p-MARCKS y MARCKS en regiones de la membrana resistentes al detergente, que flotan en regiones de baja densidad del gradiente de sacarosa (interfase 5%-30%); aunque la mayor parte de ambas proteínas se localizaría en

Figura 3: Asociación de S25p-MARCKS a DRM. **(A)** Perfil proteico de fracciones obtenidas por flotación en un gradiente discontinuo de sacarosa a partir de retina neural de E12, homogeneizadas en presencia de Tritón X-100 al 1%, ultracentrifugadas durante 22 horas a 70.000g. En los carriles correspondientes a las fracciones 1 a 5 se cargaron la totalidad de las proteínas presentes en la fracción, y en los carriles de las fracciones 6 a 10 se cargaron 60 µg de proteínas. A la izquierda se esquematiza un tubo con las distintas fracciones. **(B)** Cuantificación de la cantidad proteínas totales en cada una de las fracciones de gradientes como en A. Los porcentajes de proteínas en cada fracción se expresan en relación al homogeneizado total cargado en el gradiente. **(C)** Localización de S25p-MARCKS, MARCKS, actina, tubulina, espectrina, NCAM y GM1 en gradientes como los de A. La cabeza de flecha indica la isoforma liviana de NCAM presente en las fracciones 2, 3, 4 y 5. **(D)** Localización de S25p-MARCKS y MARCKS en fracciones obtenidas de gradientes como los de A, utilizando cerebros de E12. **(E)** Fraccionamientos realizados con homogeneizados de retina neural, incubados durante 30 minutos a 37° C. Inmunodetección de S25p-MARCKS y actina. 1-10 fracciones de los gradientes; H homogeneizado de retina.



fracciones de mayor densidad (~ 30%), tanto cuando se extraen de retina neural como de cerebros de embriones de pollo. La fosforilación en la serina 25 de MARCKS no altera entonces, su distribución subcelular.

Emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS en neuroblastos de la retina neural cultivados “*in vitro*”. Relación entre su localización y la presencia de colesterol en la membrana celular

Con el objetivo de profundizar en el análisis del emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS y determinar si ésta se localiza en la membrana plasmática de alguna región de los neuroblastos como el soma, las neuritas, o el cono de crecimiento, realizamos inmunodetecciones sobre cultivos celulares. Empleamos para esto cultivos de células de la retina neural de embriones de pollo de 8 días de desarrollo, los cuales se realizaron a baja densidad celular y sobre sustrato altamente adhesivo, de manera que predominasen las neuroblastos en relación a las células de Müller. En estas condiciones observamos tanto células aisladas, como colonias de diversos tamaños. Constatamos además que la población de células aisladas en este tipo de cultivos estaba constituida en su mayor parte por fotorreceptores, distinguibles por su morfología, aunque también encontramos los otros tipos neuronales de la retina denominados en su conjunto “neuronas multipolares” (este grupo incluiría neuroblastos y/o neuronas de tipo amacrinas, bipolares, horizontales y ganglionares) (Adler, 2000).

En las neuronas multipolares S25p-MARCKS se encontró localizada en parches de membrana, ubicados en el soma, en las neuritas y el cono de crecimiento de células aisladas (Figuras 4A-I). En efecto, se observó una disposición análoga en las células localizadas en colonias, tal como había sido descrito anteriormente (Zolessi et al., 2001b). Los controles negativos, realizados en ausencia de anticuerpo primario, indican que la señal observada en las figuras 4A-I, no corresponde a señal inespecífica del anticuerpo secundario (datos no mostrados). Los parches de S25p-MARCKS colocalizaban con los parches de la proteína total, y en estas células la mayor parte de los acúmulos de MARCKS resultaron positivos para S25p-MARCKS. En los fotorreceptores la señal de S25p-MARCKS siempre fue muy baja, casi inexistente, mientras que en la glía se encontró totalmente ausente. Este mismo tipo de distribución subcelular en parches de S25p-MARCKS lo encontramos en células de la corteza cerebral en cultivo (Figuras 4J-M).

En dobles marcados utilizando sondas para el marcador de balsas lipídicas GM1 apreciamos un grado variable de colocalización. Como se muestra en la Figura 5(A-C),

hay una colocalización casi total en algunos casos, mientras que en otros (Figuras 5D-F), la colocalización es mucho menor. Observamos parches GM1 positivos que carecían de S25p-MARCKS y viceversa. Esto indicaría, entonces, que existe colocalización a nivel de ciertos microdominios de membrana y en otros no, similar a lo mencionado más arriba en los ensayos *in tubo* (Figuras 2 y 3).

Al realizar la inmunodetección de NCAM también encontramos un cierto grado de colocalización de los parches de membrana de ambas proteínas. Aparentemente los parches de NCAM tendrían menor tamaño que los de S25p-MARCKS (Figuras 5G-I).

Al comparar la distribución de señal de S25p-MARCKS o MARCKS con las de espectrina y G-actina, no encontramos ninguna singularidad. En efecto ambas proteínas citoesqueléticas mostraron un patrón de marcado homogéneo, sin presentar parches en ninguna región celular (Figuras 5J-O).

Se ha postulado que el componente lipídico de las balsas lipídicas de membrana, en particular el colesterol, es responsable en gran medida de la estabilidad de estos dominios (Brown y London, 1997). Para estudiar la posible participación del colesterol en el emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS, decidimos removerlo de forma aguda mediante tratamientos con metil- α -ciclodextrina (MCD) 5mM, durante 30 minutos. Es importante tener en cuenta que estos tratamientos tienen efectos evidentes sobre la morfología neuronal. Los cuerpos celulares aparecen mucho más redondeados, tal como se observa en microscopía de contraste de fases, lo cual indicaría desprendimiento del sustrato (Figuras 6A-B). El número total de células en los cultivos control y en los tratados fue distinto, probablemente como consecuencia de su pérdida, provocada por la disminución de la adhesión al sustrato. La alteración de las uniones célula-célula y célula-sustrato se observa, también, a nivel de la desorganización de las colonias de neuroblastos (Figura 6B). En las neuritas se observaron dilataciones con morfología de varicosidades, formándose estructuras similares a rosarios (Figuras 6B y D, cabezas de flecha, inserto de la figura). Otra alteración importante fue la retracción de los conos de crecimiento (datos no mostrados).

En cuanto a la organización de S25p-MARCKS en la membrana plasmática de los neuroblastos en cultivo tratados con MCD, constatamos la ocurrencia de dos fenómenos claramente distinguibles. Por un lado, en algunos casos se observó un aumento en el tamaño de los parches de membrana de S25p-MARCKS especialmente en los somas de los neuroblastos (Figuras 6E, J, ampliado en inserto de figura J). Esta modificación también se observó en los parches de GM1 (Figura 6F) y de NCAM (datos no mostrados). Por otro lado, en algunos casos observamos la desaparición de parches de

Figura 4: Localización de S25p-MARCKS y MARCKS en cultivos primarios de células de la retina neural (A-I) y de corteza cerebral (J-M) de embriones de pollo de E8 cultivadas 4-6 días *in vitro*. **(A-C)** Localización de S25p-MARCKS y MARCKS en un neuroblasto con múltiples prolongaciones cortas. Se aprecia la colocalización de ambas señales y el escaso número de parches de MARCKS que no presentan señal positiva de S25p-MARCKS. **(D-F)** Distribución de parches de S25p-MARCKS y MARCKS a nivel de una neurita. Se observan parches de diverso diámetro. **(G-I)** Parches de S25p-MARCKS y MARCKS a nivel de un cono de crecimiento de gran tamaño. Como en D-F, nótese la distribución de parches de mayor diámetro principalmente hacia el centro del cono, y de menor tamaño hacia la periferia del mismo. **(J-M)** Localización de S25p-MARCKS en células de la corteza cerebral. Barras: 10µm.

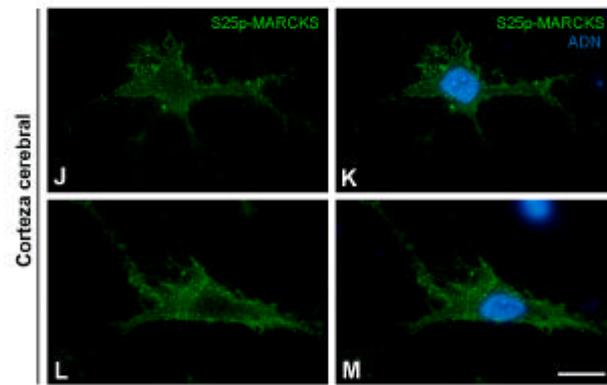
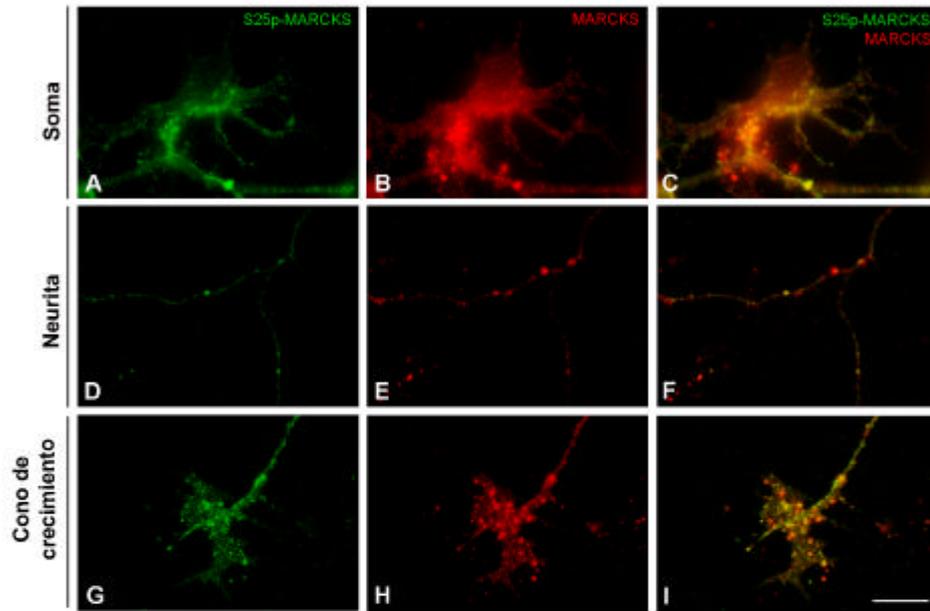
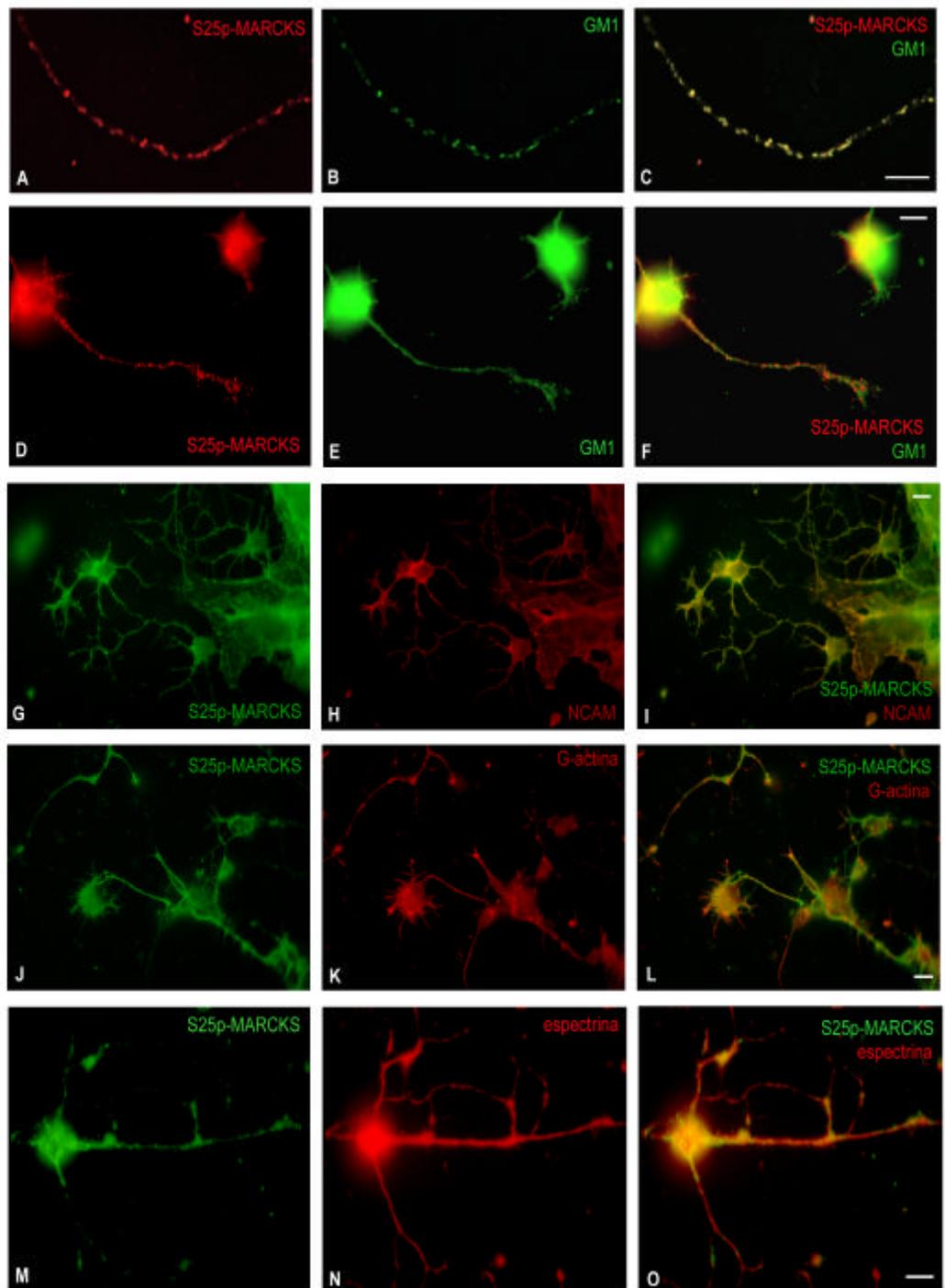


Figura 5: Comparación de la distribución de S25p-MARCKS con la de GM1, NCAM, G-actina y espectrina en neuroblastos de retina. Imágenes de dobles marcados como se indican en cada figura, sobre cultivos primarios de retina neural de E8, con 4-6 días *in vitro*. **(A-C)** Organización en parches de S25p-MARCKS y GM1 en una neurita. Nótese el alto nivel de colocalización entre ambas señales. **(D-F)** Distribución de los parches de membrana de S25p-MARCKS a nivel de la neurita y cono de crecimiento de un neuroblasto. En estas regiones GM1 no se organiza en parches de membrana como los observados en B. **(G-I)** Distribución de S25p-MARCKS y NCAM. **(J-L)** Distribución de S25p-MARCKS y G-actina (detección mediante anticuerpo) en neuroblastos aislados y asociados en colonias. **(M-O)** Neuroblasto donde se observan los parches de membrana de S25p-MARCKS tanto en el soma como en las neuritas, y la distribución homogénea de la espectrina en las mismas regiones. Barras: 10 μ m.



membrana de S25p-MARCKS, apreciándose una señal difusa tanto en la membrana como en el citosol de la célula a nivel del soma y de las neuritas (Figura 6H). S25p-MARCKS apareció acumulada tanto en las dilataciones de las neuritas (Figura 6D), como en la región de colapso del cono de crecimiento (datos no mostrados). En algunos casos incluso encontramos que la señal de S25p-MARCKS era muy débil en neuritas con dilataciones, principalmente en neuronas aisladas con neuritas de pequeño diámetro (datos no mostrados). Por su parte, la espectrina, que no posee una distribución discontinua o en parches de membrana en condiciones control, no apareció alterada en los cultivos tratados con MCD, y manteniéndose distribuida homogéneamente en distintas regiones de la célula, como soma y neuritas (incluyendo sus dilataciones) (Figura 6I).

Los resultados expuestos en esta parte del trabajo sugieren que S25p-MARCKS se localiza en parches de membrana en neuroblastos en cultivo, sin presentar una restricción particular en cuanto a la región celular. Esta organización se altera de distintas maneras por la extracción del colesterol celular mediante tratamientos con MCD, produciéndose la coalescencia o el aparente desensamblado de los parches de membrana.

Asociación de S25p-MARCKS a otras proteínas

¿S25p-MARCKS interactuaría de manera directa con alguna de las proteínas presentes en los DRM? Para determinar la posible asociación entre S25p-MARCKS con otras proteínas como espectrina, NCAM, tubulina o actina, realizamos ensayos de inmunoprecipitación. Utilizamos homogeneizados de retina neural de embriones de pollo de 12 días, a los cuales incubamos con sefaroza 4B acoplada al Acm 3C3. Realizamos la inmunodetección de las muestras inmunoprecipitadas electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa para identificar S25p-MARCKS y las proteínas antes mencionadas. En los inmunoprecipitados S25p-MARCKS no se encontró asociada a espectrina, NCAM ni tubulina, pero sí a actina (Figura 7A). Los experimentos de inmunoprecipitación recíprocos, utilizando un anticuerpo anti-actina mostraron coinmunoprecipitación de una pequeña fracción de S25p-MARCKS (Figura 7B). La asociación S25p-MARCKS-actina fue resistente a tratamientos con Tritón X-100 hasta concentraciones del orden del 1% (v/v) (Figura 7C).

Buscamos también la posible asociación de S25p-MARCKS con algunas de las quinasas que se conocen como capaces de fosforilar a MARCKS. Mientras que no pudimos registrar coinmunoprecipitación de PKC α 1 o PKC α 2 encontramos que sí era capaz de

Figura 6: Efectos de la extracción del colesterol de membrana sobre la distribución de S25p-MARCKS en neuroblastos de la retina neural en cultivo. Tratamientos con metil- α -ciclodextrina (MCD) 5mM durante 30 minutos. **(A-B)** Imágenes de microscopía de contraste de fase de un cultivo control y uno tratado con MCD. Se observa el cambio de morfología celular, redondeamiento del soma y aparición dilataciones (tipo varicosidades) en las neuritas (cabezas de flecha). **(C-D)** Distribución de S25p-MARCKS en neuroblastos en una situación control y en los tratados con MCD. Se observa la acumulación de S25p-MARCKS en las dilataciones de las neuritas (cabezas de flecha). En el inserto de la figura D se muestra una imagen aumentada de una neurita con dilataciones. **(E-G)** Reorganización en parches de mayor tamaño de S25p-MARCKS y GM1 tras el tratamiento con MCD. Detección de GM1 mediante la toxina colérica acoplada a FITC. Se aprecia cierto grado de colocalización a nivel de algunos parches del soma neuronal. **(H)** Inmunodetección de S25p-MARCKS en una colonia de neuroblastos tratados con MCD. La señal de S25p-MARCKS no tiene la organización normal en parches, sino que es más difusa. **(I)** Organización de la espectrina en un neuroblasto aislado. No se observan alteraciones en la distribución de esta proteína respecto a los controles, aunque sí se observan alteraciones en la morfología del neuroblasto (ver figura 5). **(J-L)** Organización de S25p-MARCKS y G-actina en un neuroblasto tratado con MCD. Se observa la aparición de acúmulos de gran tamaño de S25p-MARCKS, que colocalizan con los acúmulos de actina. En el inserto de la figura J se muestra una región del soma a mayor aumento y se marcan los parches de S25p-MARCKS con cabezas de flecha. Barras: (A-D) 20 μ m, (E-L) 10 μ m.

coimmunoprecipitar Cdk5 (Figura 7D).

Concluimos entonces que S25p-MARCKS interactúa con una sola de las moléculas analizadas presentes en los DRM, la actina. No podemos descartar sin embargo con estos experimentos que dicha interacción ocurra fuera de los DRM, ya que tanto S25p-MARCKS como actina se localizan dentro y fuera de ellos.

Relación entre la integridad del citoesqueleto de actina y la estabilidad de la fosforilación de MARCKS en la serina 25

Para estudiar en mayor detalle algunas características de la interacción entre los filamentos de actina y S25p-MARCKS, tratamos cultivos de neuroblastos de retina con citocalasina D para desensamblar los microfilamentos. Con este tratamiento intentábamos determinar, por ejemplo, la posible ocurrencia de modificaciones en la distribución de membrana o en la organización de los parches de membrana de S25p-MARCKS.

En estos experimentos encontramos que no solamente habían grandes modificaciones en la distribución de dicha proteína, sino también una desaparición de la fosforilación, tanto en neuroblastos que se encontraban en colonias como en células aisladas (Figuras 8A-I, 9A-F). Las incubaciones de 10 minutos con citocalasina D $2 \mu\text{M}$ fueron suficientes para desensamblar los filamentos de actina de los neuroblastos y buena parte de las fibras de estrés de la glía de Müller, como se puede observar en las imágenes de F-actina marcada (Figuras 8J, K, M y N). Al mismo tiempo, se produjo una desaparición de S25p-MARCKS en las células aisladas, aunque había persistencia en las colonias de neuroblastos. Tanto en las células completamente aisladas como en aquellas agrupadas en colonias, se apreció un descenso mayor de S25p-MARCKS en las neuritas que en el soma (Figuras 8F e I, flechas). El marcado con visinina demostró que no todas las células que poseían baja señal de S25p-MARCKS eran visinina positivas, es decir fotorreceptores, ya que como fue descrito anteriormente, los fotorreceptores son prácticamente Acm 3c3 negativos (Figuras 9J-O) (Zolessi et al., 2001b).

Este fenómeno mostró además ser dependiente de la concentración, ya que en concentraciones de $6 \mu\text{M}$ la desfosforilación fue más pronunciada a tiempos cortos que lo observado para $2 \mu\text{M}$ (datos no mostrados).

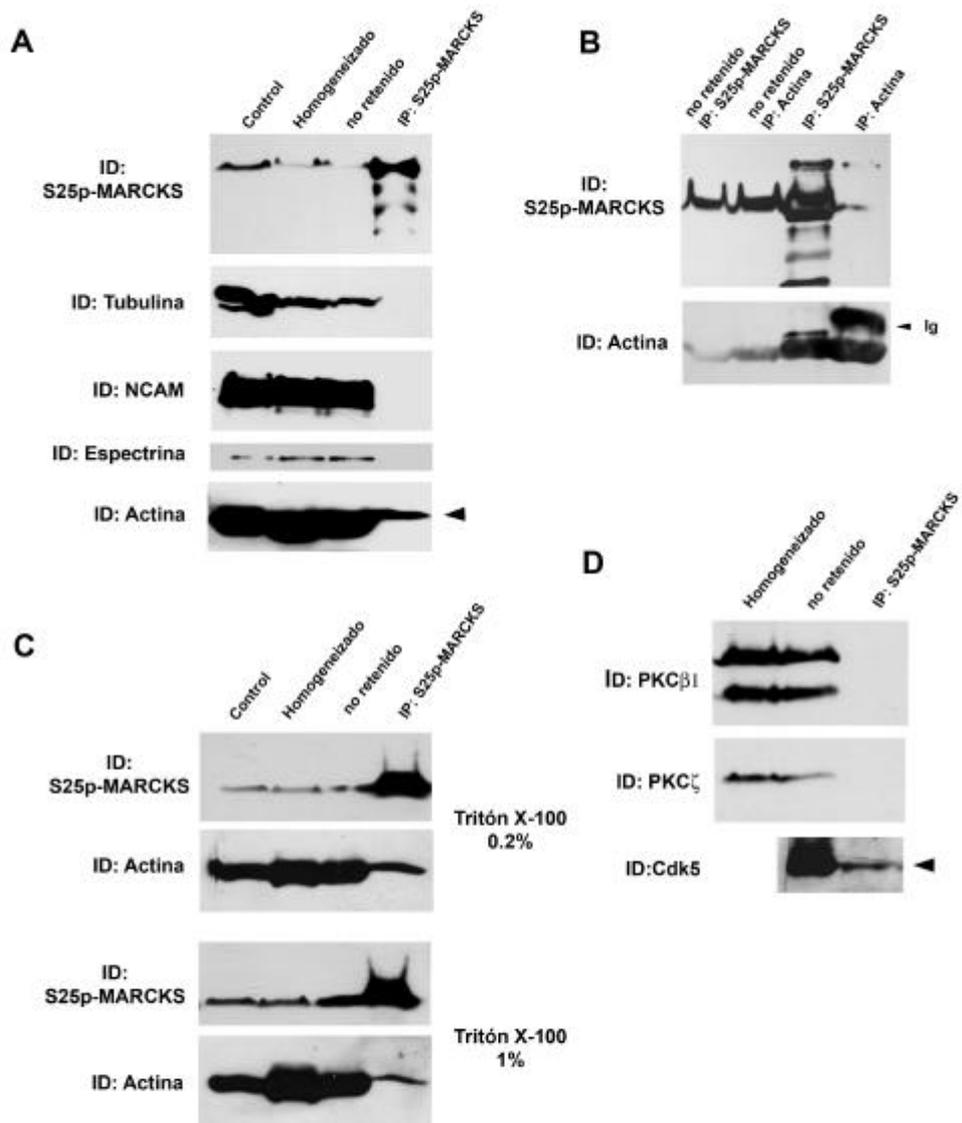


Figura 7: Asociación de S25p-MARCKS con elementos del citoesqueleto, proteínas de membrana y quinasas. (A) Inmunoprecipitación con el Acm 3C3 e inmunodetección para S25p-MARCKS, tubulina, NCAM, espectrina y actina. En el carril control se cargó una muestra del homogeneizado de retina utilizado para la inmunoprecipitación. Se observa la coimmunoprecipitación de S25p-MARCKS y actina (cabeza de flecha). (B) Inmunoprecipitaciones utilizando el Acm 3C3 y un anticuerpo anti-actina, e inmunodetección de S25p-MARCKS y actina. (C) Inmunoprecipitación con el Acm 3C3 en dos concentraciones diferentes de Tritón X-100 al 0.2% (condición estándar) y al 1%. Inmunodetección de S25p-MARCKS y de actina. (D) Inmunoprecipitación con el Acm 3C3 e inmunodetección de PKC β 1, PKC ζ y Cdk5. Sólo se observa coimmunoprecipitación de Cdk5 (cabeza de flecha).

Otras modificaciones observadas consistieron en la reorganización de los parches de S25p-MARCKS en parches de mayor tamaño que se reorientaban y localizaban únicamente en un polo celular, lo cual podría ser causado por la retracción neurítica producida en algunas células (Figuras 9A-F). En algunas oportunidades observamos que el desensamblaje de la actina filamentosa provocaba la aparición de acúmulos de actina en la célula, y que dichos acúmulos coincidían con pequeños parches de S25p-MARCKS (Figuras 9G-I).

El descenso en la señal de S25p-MARCKS que observamos en estos experimentos podría deberse a la desaparición de la proteína total o a la desfosforilación selectiva de la serina 25. Para discernir entre estas dos alternativas, observamos qué ocurría con la proteína total, y encontramos que si bien en la mayoría de los casos ésta no conservaba su organización, no había desaparición de MARCKS (Figuras 8L y O). En algunos casos observamos una redistribución de los parches de MARCKS hacia un polo celular y un aumento de tamaño de los mismos.

En esta serie de experimentos de desensamblaje del citoesqueleto de actina pudimos evidenciar que existe una relación directa entre la integridad del citoesqueleto de actina y la fosforilación en la serina 25. El desensamblaje del citoesqueleto desencadena la desfosforilación de la serina 25, aunque apreciamos cierta resistencia en aquellos neuroblastos asociados formando colonias.

Relación entre la estabilidad de la fosforilación en la serina 25 y los contactos célula-célula

La resistencia a la desfosforilación de la serina 25 en neuroblastos asociados en colonias frente a tratamientos de despolimerización de la actina, sugirieron la posible ocurrencia de fenómenos de estabilización de dicha fosforilación mediante contactos célula-célula. Para estudiar esta hipótesis decidimos disgregar retinas de embriones de pollo de 8 días, mediante incubaciones durante 20 minutos en tripsina, con o sin incubaciones previas en medio libre de calcio y magnesio (CMFG), tendientes a desestabilizar los contactos celulares dependientes de dichos iones. Luego de esta incubación las retinas fueron disgregadas mecánicamente mediante pipeteo suave durante 10 minutos. Posteriormente analizamos el estado de fosforilación de MARCKS mediante Western-blot, comparándola con una situación control en la cual la retina fue incubada inmediatamente después de su extracción en medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10% (Figura 10A). Estos análisis demostraron una caída en el nivel de fosforilación de MARCKS en la serina 25,

Figura 8: Efecto del desensamblaje del citoesqueleto de actina sobre la fosforilación en la serina 25 de MARCKS. Tratamiento de cultivos de células de la retina neural de E8 con citocalasina D 2 ì M. **(A-I)** Inmunomarcado de S25p-MARCKS y Hoechst 33342. Células tratadas con citocalasina D durante diferentes períodos (se indican en el margen izquierdo de cada fila de fotos). Se aprecia el descenso global en el nivel de fosforilación de S25p-MARCKS en células aisladas principalmente y una desorganización de la distribución de S25p-MARCKS remanente, que ya no se organiza en parches pequeños bien definidos. Las flechas en F e I indican la presencia de neuritas negativas para S25p-MARCKS. **(J-K)** Organización de S25p-MARCKS y de los filamentos de actina en un neuroblasto y en células de Müller. Se aprecian las células de Müller, S25p-MARCKS negativa. **(M-N)** Localización de S25p-MARCKS y F-actina (detectada con faloidina). Se observa la ausencia de S25p-MARCKS en un neuroblasto que presenta la actina fragmentada. **(L-O)** Inmunolocalización de MARCKS total en un neuroblasto control (L) y en uno tratado durante 20 minutos con citocalasina D 2 ì M (O). Se observa la alteración en la organización de parches de membrana de MARCKS, apareciendo parches de mayor tamaño. Comparar con Figura 4. Barras: (A, D, G) 40 ì m, (B, E, H) 20 ì m, (C, F, I, J-O) 10 ì m.

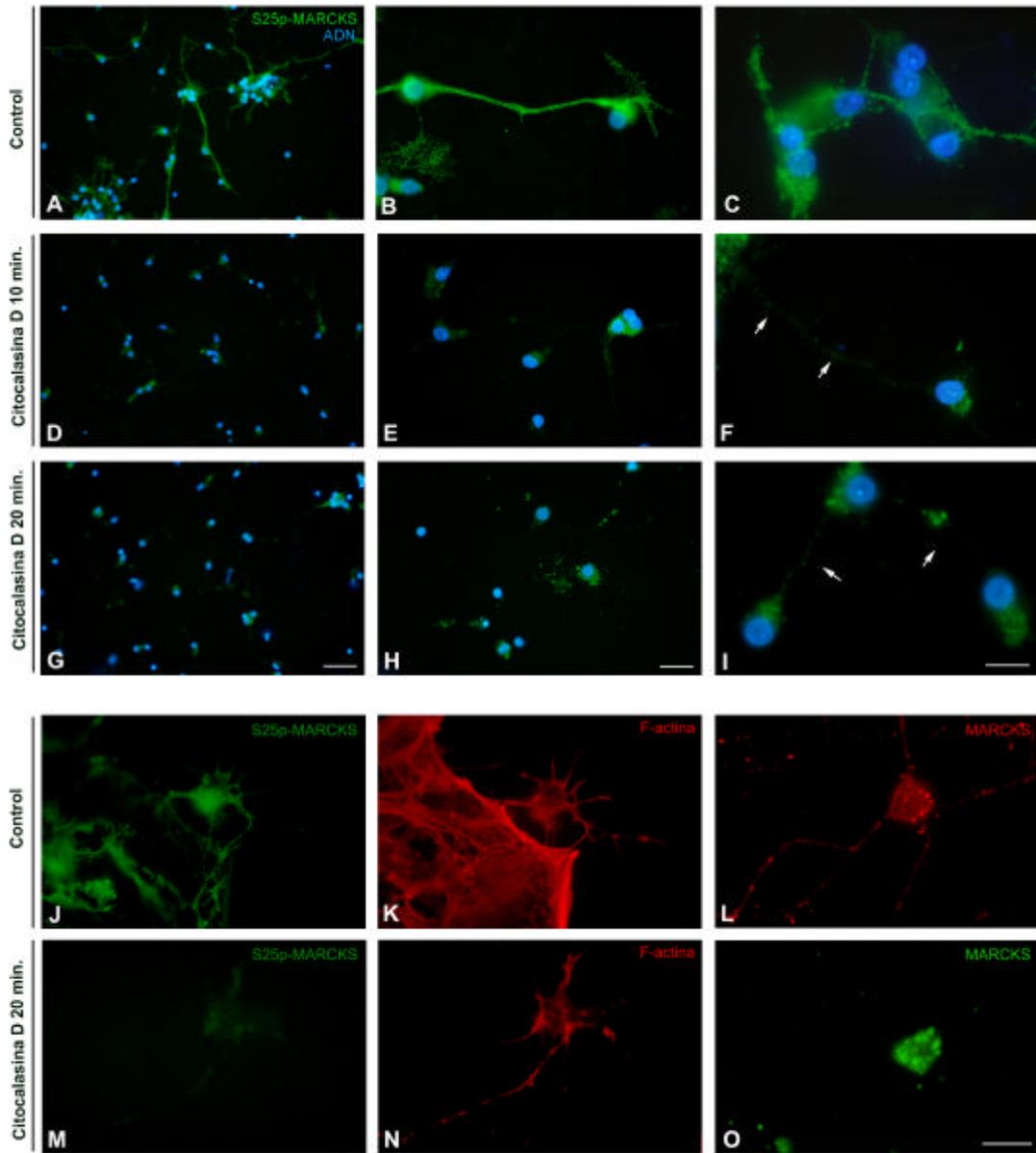
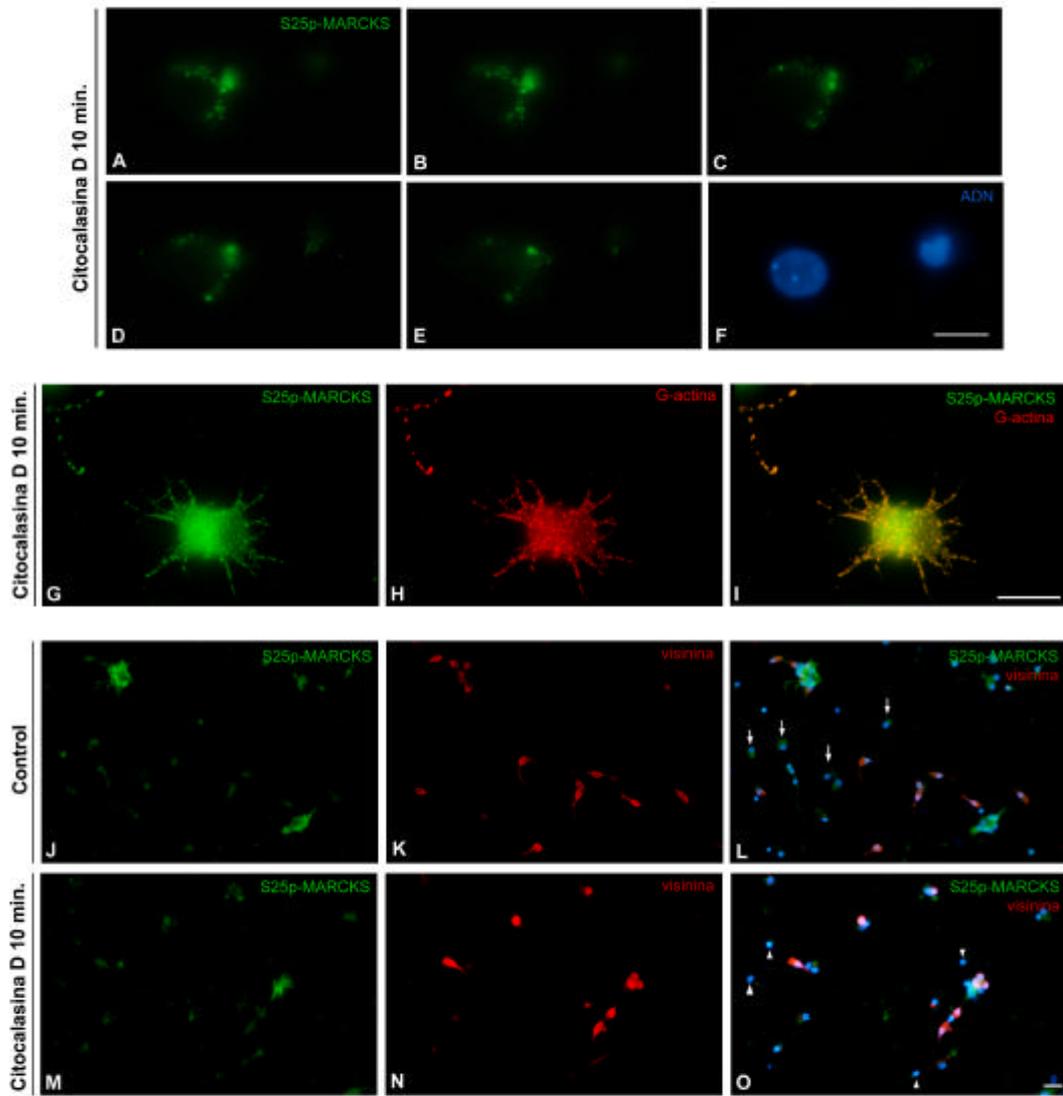


Figura 9: Efecto del desensamblaje del citoesqueleto de actina en neuroblastos en cultivos primarios de células de la retina neural de embriones de pollo de E8. **(A-E)** Distribución de la señal de S25p-MARCKS en un neuroblasto sometido a un tratamiento de 10 minutos con citocalasina D 2 ì M. Las imágenes corresponden a distintos planos de la misma célula. Comparar con Figura 1D. **(F)** Núcleo de la misma célula, Hoechst 33342. Nótese la pérdida de S25p-MARCKS en la mayor parte de la célula, permaneciendo solamente en algunas regiones donde se localiza en parches de mayor tamaño. **(G-I)** Persistencia de S25p-MARCKS en una célula tratada con citocalasina D durante 10 minutos. Asociación de S25p-MARCKS a la actina fragmentada. Se observa la colocalización de los sitios donde se concentra la G-actina con parches de S25p-MARCKS, tanto en el soma como en la neurita del neuroblasto. **(J-O)** Pérdida de S25p-MARCKS frente a tratamientos con citocalasina D, en células visinina-negativas. Inmunomarcación de S25p-MARCKS, visinina y detección del ADN con Hoechst 33342. En L se señalan con flechas las células visinina negativas que presentan S25p-MARCKS. En O se señalan con cabezas de flecha las células visinina y S25p-MARCKS-negativas. Barras: (A-I) 10ì m, (J-O) 30ì m.



tanto en las retinas incubadas en tripsina únicamente, como en aquellas que tuvieron una incubación previa en CMFG (Figura 10B).

Por otro lado, aplicamos el mismo procedimiento de disgregación de las células para estudiar cómo varía la fosforilación de la serina 25 a medida que las células se adhieren a un sustrato de poli-L-ornitina. Para esto tomamos muestras a diferentes tiempos luego de la siembra y las procesamos para inmunofluorescencia (Figura 11). Mediante este procedimiento constatamos que en etapas iniciales del cultivo (1-9 horas) la cantidad de S25p-MARCKS es baja. En particular, aquellas células que durante la disgregación quedaron aisladas o formando parte de agregados pequeños, presentan un bajo nivel de S25p-MARCKS, mientras que las células asociadas en colonias presentan niveles de fosforilación casi normales. Entre las 9 y 24 horas ya aparecen niveles elevados de señal Acm 3C3 positiva en células aisladas, las cuales ya presentan crecimiento neurítico, y en aquellas asociadas en colonias (Figuras 11P-V).

Considerando que la cantidad de MARCKS total o de espectrina en estos cultivos no mostró variaciones importantes en relación con el tiempo de cultivo, podemos pensar entonces que existe una relación entre los niveles de fosforilación en la serina 25 y el establecimiento de los contactos célula-célula o célula-sustrato, tal vez a nivel de la organización del citoesqueleto en estos lugares.

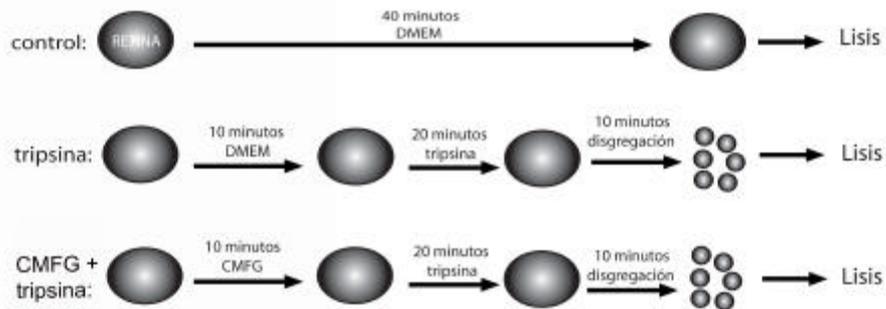
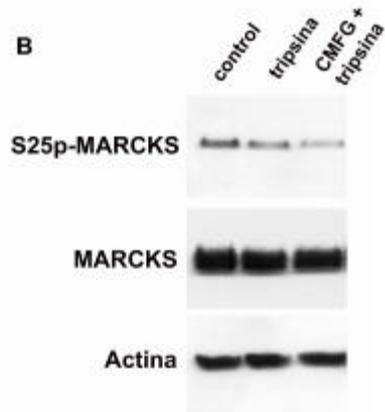
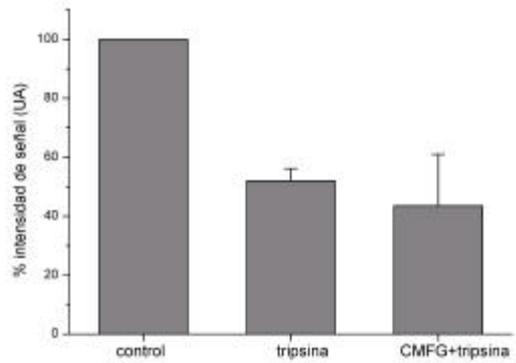
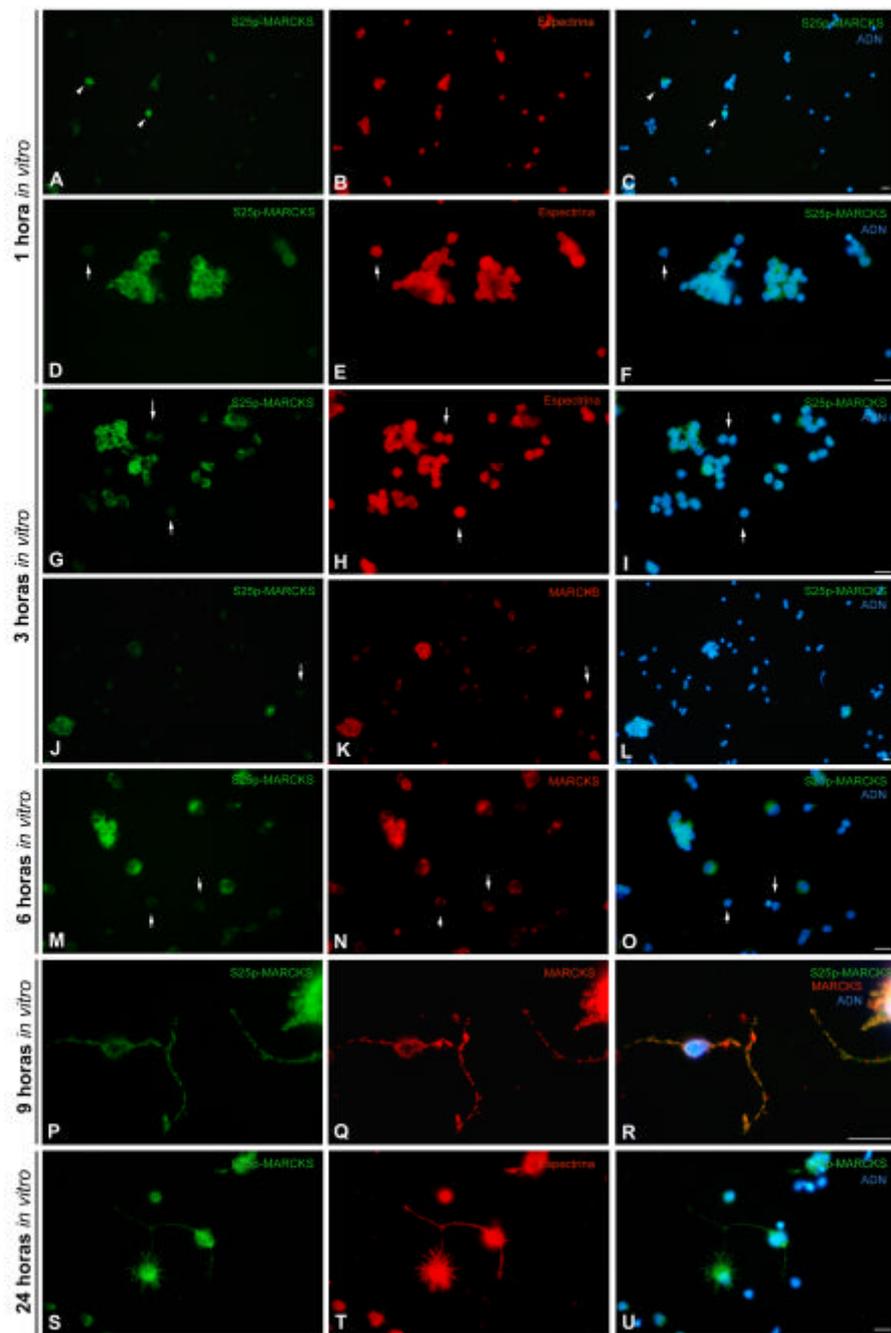
A**B****C**

Figura 10: Análisis de la relación entre la fosforilación de la serina 25 de MARCKS y los contactos célula célula. **(A)** Esquema del diseño experimental. **(B)** Western-blot secuenciales para S25p-MARCKS, MARCKS y actina en las tres situaciones experimentales detalladas en A. **(C)** Representación gráfica del nivel de fosforilación de S25p-MARCKS medido a partir de la DO de las bandas de S25p-MARCKS normalizadas utilizando la DO de las bandas de MARCKS (ver materiales y métodos), las barras indican el error estándar. n=3 para tratamiento con trypsin y n=2 para CMFG+trypsin.

Figura 11: Cambios en la fosforilación de S25p-MARCKS como consecuencia de la disgregación de retinas de E8 y su posterior adhesión a un sustrato de poli-L-ornitina. Inmunodetección de S25p-MARCKS, MARCKS, espectrina, y marcado del ADN con Hoechst 33342. **(A-F)** Células con 1 hora de cultivo. Nótese la escasa señal de S25p-MARCKS en células aisladas principalmente, mientras que las células asociadas en colonias presentan niveles más elevados de fluorescencia. La señal de espectrina es similar en las células aisladas y en los grupos de células. **(G-L)** Células cultivadas durante 3 horas. **(M-O)** Células cultivadas durante 6 horas. Se aprecia un aumento de la señal de S25p-MARCKS principalmente en las células aisladas. Los niveles de la proteína total son similares en células aisladas y en las asociadas en colonias. **(P-R)** Células cultivadas durante 9 horas. La señal de S25p-MARCKS es alta en la célula de la imagen donde se observa crecimiento neurítico. **(S-U)** Células cultivadas durante 24 horas. La intensidad de fluorescencia alcanza los niveles observados en células en cultivo durante mayor número de días *in vitro* (imágenes de figuras previas). Las cabezas de flecha indican células mitóticas y las flechas indican células con muy baja señal para S25p-MARCKS. Barras: 20 μm .



DISCUSIÓN

S25p-MARCKS y microdominios de membrana resistentes al Tritón X-100

En el presente trabajo intentamos determinar el emplazamiento subcelular de MARCKS y S25p-MARCKS en retinas de embriones de pollo. Elegimos analizar la retina porque, como mencionamos en la introducción, constituye un modelo de estudio del desarrollo del sistema nervioso ya que reúne una serie de características como su accesibilidad, ausencia de vascularización, facilidad de disociación y cultivo de sus células *in vitro*, que la colocan en una posición de privilegio frente a otros modelos. Para comenzar nuestra exploración analizamos mediante fraccionamientos subcelulares simples la asociación de dichas proteínas a las membranas celulares. Constatamos que ambas se encuentran asociadas a la fracción de membranas, por lo que nos preguntamos si la fosforilación en la serina 25 de MARCKS alteraba de alguna manera su asociación con distintas regiones de la misma, en particular con microdominios de membrana de tipo balsas lipídicas. Si bien frecuentemente se emplean diversas técnicas para la visualización directa de las balsas lipídicas, también es ampliamente aceptada la definición operacional según la cual se las considera regiones de membrana resistentes a la solubilización con detergentes no iónicos a 4° C, que flotan en la interfase de las dos fracciones de menor densidad (5%-30%), en un gradiente discontinuo de sacarosa. Sin embargo, es tema de discusión si estos microdominios son una representación real de la organización de las balsas lipídicas que existen *in vivo* o si constituyen un artefacto experimental. Por tal motivo decidimos analizar la asociación de S25p-MARCKS a balsas lipídicas utilizando distintas aproximaciones experimentales.

a) Asociación de S25p-MARCKS con DRM

La primera aproximación utilizada fue justamente el análisis de la insolubilidad al Tritón X-100 a 4° C (asociación a DRM), utilizando para esto dos protocolos modificados (Maekawa et al., 1999 y Palestini et al., 2002). En estos ensayos pudimos determinar que si bien una pequeña fracción de MARCKS se localiza en DRM, la mayor parte de esta proteína se localiza en dominios de membrana resistentes al detergente pero de mayor densidad. El mismo perfil fue obtenido para la proteína fosforilada en la serina 25, lo cual indicaría que esta modificación postraducciona no altera la asociación de esta proteína a tales microdominios. Encontramos un pico de concentración de MARCKS y S25p-MARCKS en las fracciones intermedias del escalón de sacarosa de densidad intermedia.

La heterogeneidad en la concentración de estas proteínas encontrada dentro de cada escalón de sacarosa puede ser explicada al menos de tres formas: 1) El pico de concentración en fracciones intermedias y no en la región correspondiente a la interfase visible al inicio de la ultracentrifugación puede deberse a que el tiempo o velocidad de centrifugación no fue suficiente para que dichos elementos flotantes alcanzasen la interfase de los dos escalones de sacarosa de menor densidad. Estos elementos pueden contener por ejemplo partículas celulares asociadas que actúen como lastre impidiendo su flotación (se discute más adelante). 2) Las fracciones pueden estar contaminadas por ejemplo con elementos solubles que deberían encontrarse en el fondo del tubo. Para eliminar dicha contaminación podría introducirse un paso de lavado de cada una de las fracciones, es decir resuspender cada fracción en buffer de lisis y someterlo a una nueva ultracentrifugación. Mediante este procedimiento esperamos separar el material insoluble (en el sedimento) y el soluble contaminante (en el sobrenadante). 3) Alguna distorsión de la concentración de sacarosa en la interfase de los escalones puede explicar esta anomalía. Dado lo prolongado de las centrifugaciones puede ocurrir una pérdida de discontinuidad en los gradientes, es decir que existe una mezcla parcial de las sacarosas de distinta concentración a nivel de la interfase. Como se menciona en los resultados, no pudimos distinguir los límites entre dichos escalones al finalizar la ultracentrifugación, por lo cual no podemos descartar la posible existencia de este artefacto. La utilización de algunos marcadores de distintas fracciones celulares podría contribuir a la validación de estos resultados. Por ejemplo, en nuestros experimentos utilizamos el gangliósido M1 o las isoformas livianas de NCAM como marcadores de balsas lipídicas. Durante la redacción de este trabajo obtuvimos un anticuerpo monoclonal que reconoce a PrP (gentileza del Dr. Fernando Goñi) y con el mismo pudimos determinar que esta proteína se localiza aproximadamente en las mismas fracciones que los otros marcadores de balsas lipídicas utilizados. No obstante, sería interesante analizar la distribución de marcadores del retículo endoplásmico (ej: calnexina), del aparato de golgi (ej: α COP) o de regiones solubles de la membrana (ej: receptor de transferrina o la Na^+/K^+ ATPasa), para descartar contaminación de estos últimos en fracciones livianas.

Mientras que otros autores declaran que MARCKS se acumulaba en DRM en células de la línea COS (Laux et al., 2000), nuestros resultados indican claramente que este no es el caso en neuronas de embriones de pollo. Nuestros hallazgos se asemejan sin embargo, a algunos resultados obtenidos en estudios *in vitro* en neuronas granulares del cerebelo (Palestini et al., 2002). Estos estudios indicaron que existe un conjunto de moléculas relacionadas con la diferenciación neuronal que siempre se encuentran en microdominios

de membrana ricos en colesterol, mientras que otras se localizan en dichos microdominios de forma dependiente del estado de diferenciación de estas neuronas. Precisamente una de estas proteínas es MARCKS, cuya concentración aumenta en los microdominios de baja densidad en estados tardíos de diferenciación, si bien la mayor parte de la misma continúa localizándose fuera de las balsas lipídicas (Palestini et al., 2002). Además, al menos la fosforilación de MARCKS por PKC no depende de su presencia en balsas lipídicas ya que la disrupción de las mismas por extracción del colesterol de membrana, no altera los niveles de fosforilación de MARCKS, pero sí los de otro sustrato importante de PKC como GAP43 (Botto et al., 2007). Si bien en nuestros experimentos no se realizó un estudio detallado de la variación en la asociación de MARCKS a DRM a lo largo del proceso de diferenciación neuronal, es evidente que esta proteína no está presente únicamente en DRM, al menos no durante la etapa del desarrollo estudiada. La presencia de proteínas tanto dentro como fuera de este tipo de microdominios de membrana ya ha sido analizada en detalle para algunos receptores del tipo tirosina quinasa. Estos receptores podrían desempeñar diversas funciones dependiendo del sector de la membrana o el tipo de microdominio en el cual se localicen, ya que tendrían acceso a distintos elementos pertenecientes a vías de transducción de señales en función de su localización (Pike, 2003). Un mecanismo similar podría funcionar para MARCKS, que podría tener distintas funciones en los diferentes tipos de balsas lipídicas y fuera de ellas. Es conocido que MARCKS es blanco de múltiples modificaciones postraduccionales, fosforilaciones en su mayoría, y por lo tanto podría ocurrir que el “pool” de MARCKS localizado dentro de las balsas lipídicas en un momento dado sea distinto en términos del grado de fosforilación del “pool” de MARCKS localizado fuera de tales microdominios. Por lo tanto sería interesante analizar específicamente si existen variantes localizadas en alguna fracción en particular, utilizando por ejemplo anticuerpos que reconozcan dichas variantes o analizando mediante isoelectroenfoque las distintas fracciones de manera de discriminar variantes de MARCKS con distinto *pI*, que pudiesen evidenciar formas con distinto grado de fosforilación. Por otro lado, dado que no se conoce con claridad la vía “downstream” de MARCKS, más allá de su interacción directa con la actina o la Ca⁺⁺CAM, no podemos determinar en cuál de estos dominios se localizan las formas potencialmente activas de la misma.

Es importante tener en cuenta que se ha observado que los dominios de membrana resistentes a detergentes preparados a partir de distintos tipos celulares y empleando diversos detergentes, muestran diferencias cualitativas y cuantitativas importantes en el contenido lipídico y proteico, lo cual puede deberse, en parte, a diferencias en el

contenido total de especies lipídicas y proteicas que existen en diversos tipos celulares (Harder et al., 1998). Estas evidencias podrían explicar las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos en células COS y neuronas del hipocampo. Esto ha hecho que los resultados sean difíciles de interpretar y comparar. Las afinidades de distintas proteínas a las balsas lipídicas serían difíciles de caracterizar, e incluso asociaciones muy débiles de proteínas a las balsas lipídicas serían difíciles de detectar mediante el aislamiento de DRM. En algunos casos, proteínas que están asociadas a balsas lipídicas, no lo están a DRM, es decir que son solubilizadas por detergentes; por lo que la ausencia de una proteína en los dominios resistentes al detergente no es una prueba concluyente sobre su no asociación a balsas lipídicas *in vivo* (Chamberlain, 2004; Schuck et al., 2003).

Al analizar los resultados de solubilización y flotación en gradientes de sacarosa es necesario proceder con cautela ya que se ha reportado la ocurrencia de artefactos en esta aproximación técnica. Algunos estudios sugieren que las extracciones con Tritón X-100, incluso a muy bajas concentraciones, inducen la formación de microdominios de membrana (Munro, 2003; van Rheenen et al., 2005). Los tratamientos con detergentes pueden determinar la coalescencia de dominios de membrana resistentes al detergente ricos en esfingolípidos y colesterol, generando agregados (Schuck et al., 2003). La extracción a 4° C también puede provocar la coalescencia de microdominios de membrana, de manera que se forman agregados de mayor tamaño, que incluso son capaces de activar vías de señalización intracelular por su simple agregación. Considerando el pequeño tamaño de las balsas lipídicas, es posible que los DRM estén constituidos por agregados de microdominios que se reordenan como consecuencia de la extracción a 4° C (Munro, 2003; Magee et al., 2005). Por otro lado, la extracción de DRM a temperaturas fisiológicas ha arrojado resultados variables. Inicialmente se argumentó que a 37° C los DRM se desensamblarían ya que a esa temperatura la fluidez de la membrana aumenta, permitiendo el ingreso de las moléculas de detergente entre los lípidos que componen las balsas lipídicas (Brown y Rose, 1992; Chamberlain, 2004). Este resultado indicaría que la insolubilidad al detergente de las proteínas localizadas en los DRM se debe a la naturaleza lipídica de dicho microdominio y no a otro tipo de interacción como por ejemplo con el citoesqueleto celular. Sin embargo, estudios en los que se emplearon varios detergentes han demostrado la resistencia a la solubilización de varias proteínas presentes en los DRM, lo que permite formular la siguiente pregunta: ¿es únicamente el componente lipídico del microdominio lo que determina su insolubilidad en detergentes, o existen otros componentes celulares que contribuyen a esto? En nuestros

experimentos la incubación durante 30 minutos a 37° C no afectó la localización de S25p-MARCKS en regiones de baja densidad del gradiente, aunque sí se vio afectado el GM1. Esto puede indicar o bien que el tiempo de incubación a 37° C fue insuficiente para desensamblar las balsas lipídicas en las que se localiza S25p-MARCKS pero no las de GM1, o bien que S25p-MARCKS se localiza en microdominios de membrana que son resistentes a tales tratamientos. En otros sistemas algunos autores llaman a estos dominios resistentes al detergente frente a una incubación a 37° C “superrafts” (Braccia et al., 2003; Gil et al., 2006; Madore et al., 1999).

Recientemente, se ha propuesto un escenario más complejo para las balsas lipídicas, en el cual se intenta explicar las diferencias cuantitativas y cualitativas obtenidas para la estructura y propiedades de las balsas lipídicas de un tipo celular dado, acudiendo para esto a las interacciones entre la membrana y el citoesqueleto cortical. En este modelo se plantea que existen diversos tipos de DRM dependiendo de las condiciones utilizadas para la extracción. En ciertas condiciones no es posible aislar DRM por el solo uso de detergentes, ya que no se separan de complejos de membrana de mayor densidad y por lo tanto no se localizan en la interfase 5%-30% de gradientes de sacarosa. Aumentando el pH se desestabilizan interacciones de tipo electrostáticas entre ambos dominios, lo cual determinaría una migración progresiva de más elementos insolubles hacia zonas de menor densidad en el gradiente. Los complejos de membrana de mayor densidad que actúan como lastre de los DRM están constituidos por elementos del citoesqueleto de membrana como actina y espectrina. Al liberar a la membrana de estos elementos, los DRM flotan en las fracciones de menor densidad del gradiente (Ciana et al., 2005). Sería interesante entonces realizar gradientes en las condiciones establecidas en este trabajo para determinar si el enriquecimiento de S25p-MARCKS que observamos en fracciones de densidad intermedia, se debe a la interacción con el citoesqueleto. Además del trabajo de Ciana y cols., en nuestro conocimiento, existen en la actualidad muy pocos estudios que relacionen a los DRM con el citoesqueleto celular, incluso la mayor parte de los ensayos de aislamiento de DRM por ultracentrifugación no analizan la presencia de actina o proteínas que interaccionen con actina en dichos microdominios (Lilliemeier et al., 2006). En otros ensayos la actina se encuentra únicamente en las fracciones de mayor densidad y no en los DRM (Sadra et al., 2004; Vaca et al., 2004). En nuestro trabajo encontramos tanto a la actina como a la espectrina, ambas proteínas que forman parte del citoesqueleto cortical de la célula, en fracciones de baja y alta densidad, si bien la mayor parte de ambas se localizaba en las fracciones de mayor densidad, con el resto de las proteínas celulares. Esto podría indicar que alguna proteína presente en los DRM

es capaz de interactuar con actina de manera de actuar como nexo entre las balsas lipídicas y el citoesqueleto cortical y por tal motivo es posible recuperar actina en las fracciones menos densas. Esta interacción puede ser directa entre la proteína presente en las balsas lipídicas y la actina, como es el caso de MARCKS, o de manera indirecta a través de una proteína adaptadora como podría ser la espectrina la cual puede interactuar con otra proteína o lípido de los DRM. Como analizamos en este trabajo, la interacción de S25p-MARCKS y actina resiste, al menos parcialmente, tratamientos con Tritón X-100 al 1%, lo cual indica que S25p-MARCKS puede ser una de las proteínas responsables de “arrastrar” a la actina hacia fracciones de menor densidad. No debemos descartar, sin embargo, la posibilidad de que la presencia de actina en las fracciones de baja densidad no se deba a su interacción con una proteína presente en los DRM, sino a la simple captura de actina soluble por parte de las vesículas de membrana que se forman como consecuencia de la solubilización con detergente. Estudios de microscopía electrónica de transmisión pueden contribuir a esclarecer este punto.

b) Relación entre el emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS y el colesterol de membrana

En una segunda aproximación al estudio de la asociación de S25p-MARCKS a balsas lipídicas realizamos inmunodetecciones sobre cultivos de células de la retina neural y analizamos también la dependencia entre el emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS y la presencia de colesterol en la membrana plasmática. La organización de S25p-MARCKS en parches de membrana observada en inmunofluorescencia o en inmunomarcado con oro coloidal, luego de la fijación con PFA, sugiere su presencia en microdominios de membrana. La distribución en parches de S25p-MARCKS se ha visto alterada cuando se emplean otros fijadores como fuera reportado previamente (Zolessi, 1998). Por ejemplo, al emplear PFA al 4% y glutaraldehído al 0.25% se observa una disminución en el tamaño de los parches de membrana, y cuando se emplea únicamente glutaraldehído al 2.5% como fijador hay una pérdida de este patrón de parches. Este fenómeno ya había sido reportado para otras proteínas, asociadas a microdominios de membrana (Laux et al., 2000). Estas diferencias entre los resultados obtenidos con distintos procedimientos de fijación plantea la pregunta sobre si los fijadores o los anticuerpos permiten la formación de parches donde ya existía un arreglo de este tipo, o si inducen la formación de agregados de proteínas que se distribuyen aleatoriamente en la membrana (Kusumi y Suzuki, 2005).

Los parches de S25p-MARCKS colocalizaron, como era esperado, con los parches de la proteína total y muy pocos agregados de MARCKS contenían proteína no fosforilada en la serina 25. Los parches de S25p-MARCKS colocalizaron, parcialmente en algunos casos y totalmente en otros, con el marcador de balsas lipídicas GM1, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en los gradientes, ya que sólo encontramos GM1 localizado en las fracciones livianas, mientras que S25p-MARCKS se extendía en todo el gradiente, sugiriendo una colocalización parcial *in vivo*. En diversos trabajos se ha determinado la ocurrencia de un bajo nivel de colocalización entre dos proteínas presentes en microdominios, e incluso bajos niveles de reproducibilidad en dichos ensayos. Esto se debe a que la colocalización es sensible a pequeñas diferencias en el protocolo experimental, ya sea porque las balsas lipídicas son entidades sumamente pequeñas, transitorias o diversas (Kusumi y Suzuki, 2005). Los niveles de colocalización calculados a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia para dos proteínas ancladas a GPI se encontraron entre el 35-55%, aunque niveles más altos de colocalización eran aparentes en la observación microscópica (Mayor et al., 1994). En otros estudios se ha encontrado que proteínas como PrP, Thy-1 y lípidos como GM1, todos ellos marcadores de balsas lipídicas, no poseen una colocalización total, lo cual indicaría la existencia de una gran población de microdominios de membrana dentro de una misma célula que se correlacionan con los DRM (Lagerholm et al., 2002; Pike, 2003). Además, se debe tener en cuenta que la toxina colérica que se utiliza para detectar a GM1 es pentamérica y por lo tanto es capaz de formar pequeños agregados de GM1 y arrastrar consigo otras proteínas. GM1 no puede ser fijado o inmovilizado eficientemente en la membrana por los fijadores convencionales como PFA o glutaraldehído, y por lo tanto la única forma de restringir de cierta manera la movilidad de GM1 es indirectamente, ya sea por generación de puentes cruzados con proteínas transmembrana que contacten con el citoesqueleto cortical o por formación de agregados de proteínas de membrana independientemente del citoesqueleto (Kusumi y Suzuki, 2005). Dada la colocalización parcial entre los parches de S25p-MARCKS y GM1, podemos sugerir que ambos se localizan en parches distintos en la mayoría de los casos, pero que ante ciertas circunstancias como la activación de determinada vía de señalización intracelular, ambos coalescen. En condiciones normales, los experimentos se realizaron sobre cultivos de células de la retina neural en medio DMEM suplementado con SFB, de manera que estaban presentes en el medio una serie de factores que pueden activar distintas cascadas de señalización, las que, por ejemplo, podrían alterar la organización de los parches de proteínas de membrana como ocurre con el complejo formado por NCAM-espectrina-PKC α_2 , que ante

su activación se redistribuye en dominios resistentes al Tritón X-100 ricos en GM1 (Leshchynska et al., 2003).

En el análisis de la dependencia de la organización de esta proteína en la membrana y la presencia del colesterol en la misma, consideramos que, dado que el colesterol está enriquecido entre 3 y 5 veces en las balsas lipídicas, sería esperable que una extracción aguda del mismo provocase alteraciones en la distribución de las proteínas asociadas a las balsas lipídicas, principalmente (Brown y London, 1997). En nuestros experimentos observamos la ocurrencia de alteraciones en la morfología neuronal como el redondeamiento del soma o la aparición de dilataciones en las neuritas. El colesterol es un regulador de las propiedades físicas de la membrana, pero además tiene incidencia sobre el citoesqueleto de membrana, por lo cual su extracción tiene profundos efectos en la morfología celular, en particular un descenso en el contenido de colesterol de la membrana incrementa la rigidez de la misma (Sun et al., 2007). El fenómeno de formación de dilataciones en las prolongaciones neuronales ha sido descrito en diversos tipos celulares, entre ellos las neuronas de hipocampo en cultivo (Hering et al., 2003). Estas alteraciones han sido asociadas a la desorganización del citoesqueleto de actina en las prolongaciones neuronales. No podemos descartar que en nuestro sistema la aparición de estas dilataciones también se deba a la desorganización del citoesqueleto de actina ya que el mismo tipo de alteraciones también fueron provocadas por la citocalasina D en las células; o a la pérdida de contactos entre el citoesqueleto cortical de actina y la membrana plasmática.

Tradicionalmente se ha caracterizado la importancia del colesterol en los microdominios de membrana a través del estudio de la activación de diversas cascadas de señalización asociadas a ellos, principalmente en células pertenecientes al sistema inmune, pero en lo que sabemos no se han estudiado en profundidad el rol del colesterol en la organización de tales proteínas en la membrana plasmática. Existen algunas evidencias de que la extracción del colesterol de membrana resulta en una dispersión de los microdominios de membrana de tipo balsas lipídicas (Parmryd et al., 2003). En nuestros experimentos encontramos una desorganización de los parches de membrana de S25p-MARCKS ya sea para distribuirse de manera aparentemente homogénea en la membrana, o para formar parches de mayor tamaño al normal. Estos resultados sugieren que la presencia de colesterol es importante para la organización de S25p-MARCKS en la membrana plasmática. De manera similar a lo que nosotros observamos, en una serie de experimentos donde se removía el colesterol de membrana en distintas líneas celulares

derivadas de la línea CHO en cultivo, se encontró la formación de dominios de membrana del orden de micrómetros de tamaño. Si bien no se realizaron estudios para determinar la causa de este fenómeno, los autores proponen que el colesterol estabiliza los límites entre microdominios de membrana de diversas características, de manera que su remoción desencadena la coalescencia de los microdominios (Hao et al., 2001).

En nuestros experimentos no podemos descartar, sin embargo, que los efectos de la falta de colesterol en la membrana se extiendan a dominios por fuera de las balsas lipídicas, donde se encuentra la mayor parte de S25p-MARCKS. Esto se debe a que es importante considerar además, que el tratamiento con MCD no solo extrae el colesterol y algunos esfingolípidos de las balsas lipídicas, sino también del resto de la membrana lo cual puede tener efectos metabólicos sobre la célula que pueden ser confundidos con efectos de la desorganización de las balsas lipídicas (Tsui-Pierchala et al., 2002). Es así que pueden verse afectados diversos fenómenos celulares entre los que se encuentran la endocitosis y la exocitosis mediadas por clatrina y SNAREs, respectivamente (Laude y Prior, 2003). Por otra parte, es conocido que los tratamientos con MCD para extraer el colesterol también pueden arrojar resultados variables, ya que algunas células son capaces de reorganizar el colesterol remanente para mantener la organización de la membrana en microdominios (Ottico et al., 2003). Incluso el colesterol puede ser dispensable para la formación de dominios de membrana resistentes al detergente y ser compensado en parte por una alta proporción de esfingolípidos en la membrana (Schuck et al. 2003; Pike 2004). Algunos ensayos de depleción crónica y aguda de colesterol demostraron que se altera la movilidad de las proteínas de membrana como consecuencia de la disrupción de las interacciones entre el PIP₂ y las moléculas que controlan la organización del citoesqueleto de actina de la membrana plasmática, lo cual puede tener una serie de efectos secundarios que pueden ser entendidos, erróneamente, como consecuencia de la desorganización de las balsas lipídicas de membrana (Kwik et al., 2003).

La serie de experimentos realizados tendientes a determinar el emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS, en su conjunto sugieren la asociación de una fracción muy pequeña del pool celular de S25p-MARCKS a los microdominios lipídicos denominados balsas lipídicas (determinado por su asociación a DRM). Además, la organización en parches de membrana de MARCKS depende, al menos en parte, de la presencia de colesterol en la misma. Resta determinar aún, por ejemplo, si las funciones de MARCKS son distintas en las balsas lipídicas y el resto de la membrana y cuán dinámico es el proceso de asociación y disociación de S25p-MARCKS a estos microdominios.

La fosforilación en la serina 25 y la asociación de MARCKS con actina

La interacción de MARCKS con la actina, tanto en cuanto a su capacidad de nucleación de monómeros de actina como a la formación de puentes cruzados de microfilamentos es conocida, pero algunos resultados recientes demostraron que el producto génico directo de MARCKS no era capaz de cumplir con dichas funciones (Tapp et al., 2005). En efecto, la proteína recombinante no miristilada no es capaz de interactuar con una serie de ligandos, entre ellos la actina, con la afinidad con que había sido descrita anteriormente. Estos resultados permitieron formular un modelo en el cual el DE de MARCKS está de alguna manera impedido de interactuar con Ca^{++} CAM, actina o fosfolípidos de membrana ya sea por interacciones de tipo inter o intramoleculares. Estos autores sostienen que el DE, que posee cargas positivas por su elevado contenido en lisinas, podría interactuar con los extremos amino o carboxilo terminal de MARCKS de manera que se inhibiría la interacción con otros ligandos. Las modificaciones postraduccionales como miristilaciones, fosforilaciones, glicosilaciones, e incluso el clivaje proteolítico, podrían inducir cambios conformacionales en la proteína que modifican las interacciones intramoleculares en MARCKS, liberando el DE (Tapp et al., 2005).

Mediante ensayos de inmunoprecipitación demostramos que la variante de MARCKS fosforilada en la serina 25 está asociada a actina. Podemos suponer entonces que dicha fosforilación no impide la interacción de MARCKS con la actina, o incluso ésta podría constituir una de las modificaciones postraduccionales que permiten la interacción entre el DE y la actina. No podemos descartar, sin embargo, que S25p-MARCKS posea otros residuos aminoacídicos fosforilados y que sean estas modificaciones postraduccionales quienes modulan la interacción de MARCKS con distintos ligandos. Ya se ha demostrado anteriormente que existen varias isoformas de MARCKS que se diferencian únicamente en su punto isoeléctrico y que son reconocidas por el Acm 3C3. Estas isoformas podrían constituir variantes con distintas fosforilaciones de MARCKS (Zolessi y Arruti 2001b). Sería importante entonces, analizar mediante técnicas como el isoelectroenfoco las variantes de S25p-MARCKS que son capaces de interactuar con actina, de manera de dilucidar si es alguna de estas variantes en particular la que es capaz de interactuar con actina y si algunas isoformas son excluidas de tal interacción.

Para analizar en mayor profundidad la relación entre S25p-MARCKS y actina, nos preguntamos si por ejemplo esta interacción tiene incidencia en la localización de S25p-MARCKS en la membrana plasmática. Muchas veces se ha utilizado la disrupción del

citoesqueleto de microtúbulos o microfilamentos y una posterior extracción con Tritón X-100 para demostrar la asociación de una proteína a microdominios de membrana de características particulares (Leshchynska et al., 2003). En nuestro caso la sola disrupción del citoesqueleto de actina provoca la desaparición de S25p-MARCKS, sin que haya desaparición de MARCKS. La desfosforilación observada frente a la disrupción de los microfilamentos podría indicar que la actina filamentosa es importante tanto para la organización en microdominios como para la estabilidad de la fosforilación.

La asociación entre microdominios de membrana y el citoesqueleto cortical de actina no ha sido del todo aceptada en estudios previos. En células COS la disrupción del citoesqueleto de actina mediante tratamientos con citocalasina D, no tiene efecto sobre la organización en parches de membrana de MARCKS total y esto fue considerado como una evidencia a favor de la localización de MARCKS en balsas lipídicas de membrana (Laux et al., 2000). Más recientemente han surgido evidencias que sugieren que la mayor parte de las proteínas de membrana se agrupan en islas de dos tipos, unas que contienen marcadores “clásicos” de balsas lipídicas y otras que no. En estas últimas el colesterol sería abundante aunque no jugaría un rol en la localización de las proteínas de membrana en islas, ya que su extracción no altera esta organización, pero no se descarta su importancia en las propiedades funcionales de estos agrupamientos proteicos. Ambos tipos de islas son ricas en proteínas entre las que se encuentra la actina, la cual estaría prácticamente excluida del resto de la membrana, sugiriendo una relación directa de estas islas proteicas con el citoesqueleto cortical de actina de la célula (Lillemeier et al., 2006). En nuestros ensayos, la mayoría de las proteínas de membrana analizadas presentó un patrón de distribución en parches exceptuando la espectrina. Estos resultados, entonces, están de acuerdo con lo propuesto en este artículo acerca de la localización de las proteínas de membrana en islas. No obstante, en nuestros experimentos la extracción aguda del colesterol provocó la desorganización de dichos parches de membrana, ya sea provocando su disolución o su agrupamiento en parches más grandes, lo cual indicaría que además de la integridad del citoesqueleto de actina, es necesaria la presencia del colesterol de membrana para mantener el emplazamiento subcelular de MARCKS y S25p-MARCKS.

Asociación entre S25p-MARCKS y quinasas

En los análisis mediante inmunoprecipitación de la asociación de S25p-MARCKS con quinasas que se conocen son capaces de fosforilar a MARCKS *in vitro* e *in vivo*,

encontramos que S25p-MARCKS es capaz de asociarse con Cdk5, mientras que no encontramos asociación con PKC β 1 o PKC ζ . En estudios *in vitro* se demostró que MARCKS puede ser fosforilada fuera de su DE por quinasas dirigidas por prolina como las cdk5, entre ellas Cdk5 (Taniguchi et al., 1994; Yamamoto et al., 1995; Yamauchi et al., 1998; Manenti et al., 1999). Como mencionamos en la introducción la serina 25 de MARCKS se localiza en una secuencia consenso de fosforilación de cdk5, por lo cual la coimmunoprecipitación de ambas proteínas constituye una evidencia a favor de la fosforilación de la serina 25 por Cdk5, única cdk activa en neuronas postmitóticas. Durante la redacción de este trabajo, realizamos una serie de experimentos en los cuales tratamos cultivos de células de la retina neural con roscovitina, un inhibidor específico de cdk5, y observamos una disminución de la fosforilación en serina 25. Si bien estos resultados apoyan nuestra hipótesis, debemos hacer otros experimentos, por ejemplo, incorporar otras drogas inhibitoras de cdk5 como olomucina y analizar la fosforilación de la serina 25.

Por su parte, el hecho de que no hayamos encontrado asociación entre S25p-MARCKS y las dos PKCs analizadas no es extraño en la medida en que la interacción entre la enzima y el sustrato, o su producto, no son asociaciones estables o de larga duración. Por el contrario, es esperable que ambas moléculas, enzima y sustrato, solo estén interactuando por períodos sumamente cortos. Existen evidencias de la asociación de MARCKS a PKC α , PKC δ , pero no con otras PKC que son capaces de fosforilar a MARCKS (Fujise et al., 1994; Poussard et al., 2001). Ya ha sido descrita la capacidad de PKC β 1 y PKC ζ de fosforilar a MARCKS (Taniguchi et al., 1994; Herget et al., 1995; Überall et al., 1994; Michaut et al., 2005), aunque no podemos descartar que no sean capaces de fosforilar a MARCKS cuando ésta se encuentra fosforilada en la serina 25, por ejemplo, debido a cambios conformacionales producto de esta fosforilación que enmascaren u oculten las serinas fosforilables por estas PKCs.

Fosforilación en la serina 25 y los contactos célula-célula

La resistencia a la desfosforilación de MARCKS frente a tratamientos con citocalasina D, que observamos en las colonias de neuroblastos, nos sugirió la existencia de algún mecanismo de estabilización mediado por los contactos célula-célula. Existen varias evidencias que apuntan hacia la relación entre MARCKS y los contactos célula-matriz, pero muy pocos relacionan a MARCKS con los contactos intercelulares. Por ejemplo, se observó que en una línea celular epitelial la sobreexpresión de MARCKS inhibe la adhesión a fibronectina, pero este fenómeno no ocurre cuando se sobreexpresa una

variante no miristilada de la proteína, indicando la importancia de la asociación a la membrana o la interacción con otro ligando, para esta función (Spizz y Blackshear, 2001). En *Xenopus*, en cambio, MARCKS es necesaria para la adhesión y migración sobre fibronectina de células de la región marginal dorsal durante la gastrulación (Ilioka et al., 2004). Por otro lado, MARCKS se dispone en puntos de contacto de los conos de crecimiento de neuronas de ganglios de la raíz dorsal, donde colocaliza con integrinas. La sobreexpresión de MARCKS genera conos de crecimiento de mayor tamaño, mientras que su silenciamiento provoca la ausencia de conos de crecimiento. Además la expresión de un mutante de MARCKS no fosforilable por PKC inhibe las respuestas de repulsión ante estímulos como la semaforina 3A, lo cual indicaría que la translocación de MARCKS de la membrana es necesaria para el colapso del cono de crecimiento y su separación del sustrato (Gatlin et al., 2006).

Nuestros resultados acerca del nivel de fosforilación de MARCKS en la serina 25 en células disociadas sugirieron que además de ser sensible a la integridad del citoesqueleto de actina, esta fosforilación dependería de los contactos célula-célula. La disrupción de estos contactos puede tener efectos, de manera indirecta, sobre la organización del citoesqueleto de actina, provocando su despolimerización (Oh et al., 2007). Tanto la disrupción de los microfilamentos mediante el uso de citocalasina D, como la disociación de las células de la retina, podrían desencadenar la activación de fosfatasa que desfosforilen la serina 25. También este fenómeno puede ser explicado por la ocurrencia de cambios conformacionales en la proteína que dejen expuesto el sitio ocupado por el fosfato, tornándolo accesible a alguna fosfatasa celular. Tales modificaciones conformacionales deben implicar interacciones a larga distancia entre el dominio de unión a actina (DE) y la secuencia aminoterminal que contiene a la serina 25. Este tipo de interacciones, poco comunes en proteínas naturalmente desplegadas como MARCKS, han sido propuestos previamente como posibles mecanismos para explicar la inaccesibilidad del DE para interactuar con distintos ligandos (Tapp et al., 2005). *In vitro* MARCKS puede ser desfosforilada por PP1 o PP2A (Wang et al., 1989; Arbuzova et al., 2002). Sería interesante analizar mediante el uso de inhibidores de dichas fosfatasas, tales como el ácido okadaico o la ciclosporina, cuál de estas fosfatasas está actuando en este proceso.

Por otro lado, los experimentos demuestran que existe un incremento de la fosforilación de la serina 25 en relación con la adhesión al sustrato, en nuestro caso poli-L-ornitina. La cantidad de S25p-MARCKS experimenta un ascenso desde el momento de la disgregación hasta las 24 horas de cultivo, momento en que se alcanza una meseta. Esto

sugiere entonces, que la fosforilación es o bien activada o estabilizada por los contactos célula-matriz, ya sea directa o indirectamente a través de cambios en el citoesqueleto cortical de actina. Sería importante explorar si este fenómeno varía dependiendo del tipo de sustrato, ya que es conocida la ocurrencia de distintas respuestas celulares según la naturaleza química del sustrato. El cultivo de células sobre laminina desencadena la activación de Cdk5 y su co-activador p35, posibles responsables de la fosforilación de MARCKS en la serina 25 (Pigino et al., 1997, Paglini et al., 1998).

Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo plantean un posible escenario en el cual MARCKS, y en especial su variante fosforilada en la serina 25, se localizan sólo en muy bajos niveles en microdominios de membrana ricos en colesterol. Había sido sugerido que MARCKS se encontraría enmascarando al segundo mensajero lipídico PIP₂ en microdominios de membrana de tipo balsas lipídicas, y sería éste el mecanismo principal a través del cual ejercería su función de regulador del citoesqueleto de actina. Si, en cambio, MARCKS se localiza tanto dentro como fuera de las balsas lipídicas, como lo sugieren nuestros resultados, entonces podría llegar a ser un regulador del citoesqueleto de actina mediante dos o más mecanismos: uno directo a través de la formación de puentes cruzados de actina, lo cual podría tener lugar fuera de las balsas lipídicas, y otro a través del secuestro de PIP₂, cuando MARCKS se localiza dentro de las balsas lipídicas. De esta manera, esta situación incluye los dos mecanismos propuestos para la función de MARCKS en la célula, sin excluir ni privilegiar, al menos por ahora, uno de ellos. Tal vez el subconjunto de moléculas de MARCKS que se encuentra en una de estas regiones de membrana sea distinto del que se encuentra en la otra, por ejemplo en cuanto al grado de fosforilación, de manera que estén respondiendo a cascadas de señalización distintas. En la medida en que no conocemos con claridad todos los elementos de señalización intracelular que están por encima y por debajo de la vía en que participa MARCKS, no podemos conjeturar al respecto.

Por otra parte, los resultados presentados en este trabajo apoyan la idea de que tienen lugar en esta molécula una serie de procesos que implican interacciones de rango amplio entre distintos dominios de la proteína. La falta de estructura secundaria regular de MARCKS podría conferirle ciertas ventajas como la posibilidad de unirse a diferentes ligandos o la capacidad de sufrir distintas modificaciones postraduccionales que fácilmente induzcan o inhiban su interacción con distintos blancos, como es el caso con la interacción con Ca⁺⁺CAM o con la fosforilación por PKC. Además de estos dos fenómenos conocidos que han sido estudiados con profundidad en los últimos años, sería

importante analizar con más detalle el efecto de otras modificaciones, de manera de ir conformando una visión más clara y completa de el o los roles que MARCKS cumple en la célula.

BIBLIOGRAFÍA:

- Adler R. (2000). A model of retinal cell differentiation in the chick embryo. *Prog. Ret. Eye Res.* 19, 529-557.
- Aigner L., Caroni P. (1993). Depletion of 43 kDa growth-associated protein in primary sensory neurons leads to a diminished formation and spreading of growth cones. *J. Cell Biol.* 123, 417-429.
- Albert K. A., Walaas S. I., Wang J. K. T., Greengard P. (1986). Widespread occurrence of « 87 kDa », a major specific substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2822-2826.
- Albert K. A., Nairn A.C., Greengard P. (1987). The 87 kDa protein, a major specific substrate for protein kinase C: purification from bovine brain and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7046-7050.
- Arbuzova A., Schmitz A. A. P., Vergères G. (2002). Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem. J.* 362, 1-12.
- Avrameas S., Guilbert B., Dighiero G. (1981). Natural antibodies against tubulin, actin, myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal sera, and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia may express similar antibody specificities. *Annales d'immunologie (Paris)*. 132, 231-236.
- Blackshear P. J. (1993). The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.* 268, 1501-1504.
- Blackshear P. J., Silver J., Nairn A. C., Sulik K. K., Squier M. V., Stumpo D. J., Tuttle J. S. (1997). Widespread neuronal ectopia associated with secondary defects in cerebrocortical chondroitin sulfate proteoglycans and basal lamina in MARCKS-deficient mice. *Exp. Neurol.* 145, 46-61.
- Botto L., Masserini M., Cassetti A., Palestini P. (2004). Immunoseparation of prion protein-enriched domains from other detergent-resistant membrane fractions, isolated from neuronal cells. *FEBS letters.* 557, 143-147.
- Botto L., Masserini M., Palestini P. (2007). Changes in the composition of detergent-resistant membrane domains of cultured neurons following protein kinase C activation. *J. Neurosci. Res.* 85, 443-450.
- Braccia A., Villani M., Immerdal S., Niels-Christiansen L. L., Niström B., Hansen G. H., Danielsen E. M. (2003). Microvillar membrane microdomains exist at physiological temperature. *J. Biol. Chem.* 271, 15679-15684.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown D. A. (2006). Lipid rafts, detergent resistant membranes, and rafts targeting signals. *Phys.* 21, 430-439.

- Brown D. A., 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.
- Brown D. A., London E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 1-7.
- Caroni P. (2001). Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P2 rafts. *EMBO J.* 20, 4332-4336.
- Calabrese B., Halpain S. (2005). Essential role of the PKC target MARCKS in maintaining dendritic spine morphology. *Neuron* 48, 77-90.
- Chakavarthy B. R., Isaacs R. J., Morley P., Whitfield J. F. (1995). Ca^{2+} Calmodulin prevents Myristoylated Alanine-rich Kinase C Substrate protein phosphorylation by protein kinase Cs in C6 rat glioma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 24911-24916.
- Chamberlain L. H. (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Letters* 559, 1-5.
- Ciana A., Balduini C., Minetti G. (2005). Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton. *J. Biosci.* 30, 317-328.
- Fujise A., Mizuno K., Ueda Y., Osada S., Hirai S., Takayanagi A., Shimizu N., Owada M. K., Nakajima H., Ohno S. (1994). Specificity of the high affinity interaction of protein kinase C with physiological substrate, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate. *J. Biol. Chem.* 269, 31642-31648.
- Gatlin J. C., Estrada-Bernal A., Sanford S. D., Pfenninger H. (2006). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation regulates growth cone adhesion and pathfinding. *Mol. Biol. Cell* 17, 5115-5130.
- George D. J., Blackshear P. J. (1992). Membrane association of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein appears to involve myristate-dependent binding in the absence of myristoyl protein receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 24879-24885.
- Gil C., Cubí R., Blasi J., Aguilera J. (2006). Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1334-1342.
- Graber S., Maiti S., Halpain S. (2004). Cathepsin B-like proteolysis and MARCKS degradation in sub-lethal NMDA-induced collapse of dendritic spines. *Neuropharmacology* 47, 706-713.
- Graff J. M., Stumpo D. J., Blackshear P. J. (1989a). Molecular cloning, sequence and expression of a cDNA encoding the chicken Myrystoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate (MARCKS). *Mol. Endo.* 3, 1903-1906.
- Graff J. M., Young T. N., Johnson J. D., Blackshear P. J. (1989b). Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate of PKC. *J. Biol. Chem.* 264, 21818-21823.

- Hamburger V., Hamilton H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88, 49-92.
- Hao M., Mukherjee S., Maxfield F. R. (2001). Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 13072-13077.
- Harder T., Scheiffele P., Verkade P., Simons K. (1998). Lipid domain structure of plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* 141, 929-942.
- Hartwig J. H., Thelen M., Rosen A., Janmey P. A., Nairn A. C., Aderem A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356, 618-622.
- He Q., Meiri K. F. (2002). Isolation and characterization of detergent-resistant microdomains responsive to NCAM-mediated signaling from growth cones. *Mol. Cell. Neurosci.* 19, 18-31.
- Heerklotz H., Szadkowska H., Anderson T., Seelig J. (2003). The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of Triton- J. *Mol. Biol.* 329, 793-799.
- Herget T., Oehrlin S. A., Pappin D. J., Rozengurt E., Parker P. J. (1995). The myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) is sequentially phosphorylated by conventional, novel and atypical isoforms of protein kinase C. *Eur. J. Biochem.* 233, 448-457.
- Hering H., Lin C. C., Sheng M. (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* 23, 3262-3271.
- Higo N., Oishi T., Yamashita A., Matsuda K., Hayashi M. (2002). Northern blot and *in situ* hybridization analyses of MARCKS mRNA expression in the cerebral cortex of macaque monkey. *Cereb. Cortex* 12, 552-564.
- Higo N., Oishi T., Yamashita A., Matsuda K., Hayashi M. (2003). Cell type- and region- specific expression of protein kinase C-substrate mRNAs in the cerebellum of the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 467, 135-149.
- Higo N., Oishi T., Yamashita A., Murata Y., Matsuda K., Hayashi M. (2004). Northern blot and *in situ* hybridization analyses of the development of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate mRNA in the monkey cerebral cortex. *Neurosci.* 129, 167-177.
- Humbert S., Dhavan R., Tsai L. (2000). P39 activates Cdk5 in neurons, and is associated with actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 113, 975-983.
- Iio H., Ueno N., Kinoshita N. (2004). Essential role of MARCKS in cortical actin dynamics during gastrulation movements. *J. Cell Biol.* 164, 169-174.
- Iko E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 470-477.

- Kim H. S., Swierczynski S. L., Tuttle J. S., Lai W. S., Blackshear P. J. (1998). Transgenic complementation of MARCKS deficiency with a nonmyristoylatable, pseudophosphorylated form of MARCKS: evidence for simultaneous positive and dominant-negative effects on the central nervous system development. *Dev. Biol.* 200, 146-157.
- Kusumi A., Suzuki K. (2005). Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochem. Biophys. Acta.* 1746, 234-251.
- Kwik J., Boyle J., Fooksman D., Margolis L., Sheetz M. P., Edidin M. (2003). Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 13964-13969.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-688.
- Lagerholm B. C., Weinreb G. E., Jacobson K., Thjompson N. L. (2005). Detecting microdomains in intact cell membranes. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 56, 309-336.
- Larson C. (2006). Protein kinase C and the regulation of actin cytoskeleton. *Cellular Signaling* 18, 276-284.
- Laude A. J., Prior I. A. (2004). Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol. Memb. Biol.* 00, 1-13.
- Laux T., Fukami K., Thelen M., Golub T., Frey D., Caroni P. (2000). GAP43, MARCKS and CAP23 modulate PI(4,5)P₂ plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell. Biol.* 149, 1455-1471.
- Leshchyn's'ka I., Sytnyk V., Morrow J. S., Schachner M. (2003). Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC α 2 via β 1 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 161, 625-639.
- Lillemeier B. F., Pfeiffer J R., Surviladze Z., Wilson B. S., Davis M. M. (2006). Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18992-18997.
- Madore N., Smith K. L., Graham C. H., Jen A., Brady K., Hall S., Morris R. (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neural surface. *EMBO J.* 18, 6917-6926.
- Maekawa S., Sato C., Kitajima K., Funatsu N., Kumanogoh H., Sokawa Y. (1999). Cholesterol-dependent localization of NAP-22 on a neuronal membrane microdomain (raft). *J. Biol. Chem.* 274, 21369-21374.
- Magee A. I., Adler J., Parmryd I. (2005). Cold-induced coalescence of T-cell plasma membrane microdomains activates signaling pathways. *J. Cell Sci.* 118, 3141-3151.

- Manenti S., Yamauchi E., Sorokine O., Knibiehlers M., Van Doresselaer A., Taniguchi H., Ducommun B., Darbon J. M. (1999). Phosphorylation of the myristoylated protein kinase C substrate MARCKS by the cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 complex *in vitro*. *Biochem. J.* 340, 775-782.
- Mañez S., Martínez-A. C. (2003). Cholesterol domains regulate the actin cytoskeleton at the leading edge of moving cells. *Trends Cell Biol.* 14, 275-278.
- Matsubara T., Okumura N., Okumura A., Nogai K. (2005). cGMP-dependent phosphorylation and degradation of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 735-743.
- Mayor S., Rothberg K. G., Maxfield F. R. (1994). Sequestration of GPI anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* 264, 1948-1951.
- McLaughling S., Wang J., Gaublur A., Murray D. (2002). PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 151-175.
- McNamara R. K., Lenox R. H. (1997). Comparative distribution of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and F1/GAP-43 gene expression in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 379, 48-71.
- Michaut M. A., Williams C. J., Schultz R. M. (2005). Phosphorylated MARCKS: a novel centrosome component that also defines a peripheral subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev. Biol.* 280, 26-37.
- Mikule K., Sunpaweravong S., Gatlin J. C., Pfenninger K. H. (2003). Eicosanoid activation of protein kinase C α . *J. Biol. Chem.* 278, 21168-21177.
- Munro S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive?. *Cell* 115, 377-388.
- Nakai Y., Kamiguchi H. (2002). Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *J. Cell Biol.* 159, 1097-1108.
- Nikolic M., Buek H., Kwon Y., Hamos Y. R. M., Tsai L. H. (1996). The Cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neural differentiation. *Genes Dev.* 7, 816-825.
- Niethammer P., Delling M., Sytnyk V., Dityatev A., Fukami K., Schachner M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritegenesis. *J. Cell Biol.* 157, 521-532.
- Oh M. A., Kang E. S., Lee S. A., Lee E. O., Kim Y. B., Kim S. H., Lee J. W. (2007). PKC δ and cofilin activation affects peripheral actin reorganization and cell-cell contact in cells expressing integrin α 5 but not its tailless mutant. *J. Cell Sci.* 120, 2717-2730.
- Ohshima T., Ward J. M., Huh C., Longenecker G., Veeranna, Pant H. C., Brady R. O., Martin L. J., Kulkarni A. B. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 11173-11178.

- Ottico E., Prinetti A., Prioni S., Giannotta C., Basso L., Chigorno V., Sonnino S. (2003). Dynamics of membrane lipid domains in neuronal cells differentiated in culture. *J. Lipid Res.* 44, 2142-2151.
- Paglini G., Pigino G., Kunda P., Morfini G., Maccioni R., Quiroga S., Ferreira A., Cáceres A. (1998). Evidence for the participation of the neuron-specific Cdk5 activator p35 during laminin-enhanced axonal growth. *J. Neurosci.* 18, 9858-9869.
- Paglini G., Cáceres A. (2001). The role of the Cdk5-p35 kinase in neuronal development. *Eur. J. Biochem.* 268, 1528-1533.
- Palestini P., Botto P., Guzzi F., Calvi C., Ravasi D., Masserini M., Pitto M. (2002). Developmental changes in the protein composition of sphingolipid- and cholesterol-enriched membrane domains of rat cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 67, 729-738.
- Parmryd I., Adler J., Patel R., Magee A. I. (2003). Imaging metabolism of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in T-cell GM1-enriched domains containing Ras proteins. *Exp. Cell Res.* 285, 23-38.
- Pigino G., Paglini G., Ulloa L., Avila J., Cáceres A. (1997). Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J. Cell Sci.* 110, 257-270.
- Pike L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655-667.
- Pike L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* 378, 281-292.
- Pike L.J. (2007). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 47,1597-8.
- Polans A. S., Burton M. D., Haley T. L., Crabb J. W., Palczewski K. (1993). Recoverin but not visinin, is an autoantigen in the human retina identified with cancer-associated retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 81-90.
- Poussard S., Dulong S., Aragon B., Brustis J. J., Veschambre P., Ducastaing A., Cottin P. (2001). Evidence for a MARCKS-PKC α complex in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 711-721.
- Pralle A., S  ller P., Florin E. L., Simons K., H  ber J. H. K. (1997). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272, 997-1007.
- Repka A., Adler R. (1992). Differentiation of retinal precursor cells born *in vitro*. *Dev. Biol.* 153, 242-249.
- Rosen A., Keenan K. F., Thelen M., Nairn A. C., Aderem A. (1990). Activation of protein kinase C results in the displacement of its Myristoylated, Alanine-rich Substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *J. Exp. Med.* 172, 1211-1215.
- Sadra A., Cinek T., Imboden J. B. (2004). Translocation of CD28 to lipid rafts and costimulation of IL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 11422-11427.

- Scarlett C. O., Blackshear J. P. (2003). Neuroanatomical development in the absence of PKC phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein. *Dev. Brain Res.* 144, 25-42.
- Schuck S., Honsho M., Ekroos K., Schevchenko A., Simons K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 5795-5800.
- Sheetz M. P., Sable J. E., Döbereiner H. G. (2006). Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 417-434.
- Shiraishi M., Tanabe A., Saito N., Sasaki Y. (2006). Unphosphorylated MARCKS is involved in neurite elongation induced by insulin-like growth factor-1 in SH-SY5Y cells. *J. Cell Physiol.* 209, 1029-1038.
- Simons K., Ehehalt R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597-603.
- Simons K., Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons K., Vaz W. L. C. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 269-295.
- Singer S. J., Nicholson G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes. *Science.* 175, 720-731.
- Smith D. S., Greer P. L., Tsai L. (2001). Cdk5 in the brain. *Cell Growth and Differentiation* 12, 277-283.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Snow R. L., Robson J. A. (1994). Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neurosci.* 58, 399-409.
- Spizz G., Blackshear P. J. (1996). Protein kinase C-mediated phosphorylation of the Myristoylated Alanine-rich C kinase Substrate protects it from specific proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* 271, 553-562.
- Spizz G., Blackshear P. J. (2001). Overexpression of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. *J. Biol. Chem.* 276, 32264-32273.
- Stumpo D. J., Bock C. B., Tuttle J. S., Blackshear P. J. (1995). MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 944-948.
- Sun M., Northup N., Marga F., Huber T., Byfield F. J., Levitan I., Forgacs G. (2007). The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J. Cell Sci.* 120, 2223-2231.

- Swierczynski S. I., Blackshear P. J. (1995). Membrane association of the Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS) protein. *J. Biol. Chem.* 270, 13436-13445.
- Swierczynski S. I., Siddhanti S. R., Tuttle J. S., Blackshear P. J. (1996). Nonmyristoylated MARCKS complements some but not all of the developmental defects associated with MARCKS deficiency in mice. *Dev. Biol.* 179, 135-147.
- Tanabe A., Kimisuki Y., Hidaka H., Suzuki M., Negishi M., Takawa Y. (2006). PKC phosphorylates MARCKS Ser 159 not only directly but also through RhoA/ROCK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 156-161.
- Taniguchi H., Manenti S. (1993). Interaction of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS) with membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 268, 9960-9963.
- Taniguchi H., Manenti S., Suzuki M., Titani K. (1994). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a major protein kinase C substrate, is an in vivo substrate of proline-directed protein kinase(s). A mass spectroscopic analysis of the post-translational modifications. *J. Biol. Chem.* 269, 18299-18302.
- Tapp H., Al-Naggar I. M., Yarmola E. G., Harrison A., Shaw G., Edison A. S., Bubb M. R. (2005). MARCKS is a natively unfolded protein with an inaccessible actin-binding site. *J. Biol. Chem.* 280, 9946-9956.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
- Tsui-Pierchala B. A., Encinas M., Milbrandt J., Jonson E. M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *TRENDS Neurosci.* 25, 412-417.
- Überall F., Giselbretch S., Hellbert K., Fresser F., Bauer B., Gschwendt M., Grunicke H. H., Baier G. (1997). Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon, and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 4072-4078.
- Vacca F., Amadio S., Sancesario G., Bernarde G., Volonte C. (2004). P2X₃ receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells. *J. Neurosci. Res.* 76, 653-661.
- van Rheenen J., Achame E. M., Janssen H., Calafat J., Jalink K. (2005). PIP₂ signaling in lipid domains: a critical re-evaluation. *EMBO J.* 24, 1664-1673.
- Villalba M., Bi K., Rodriguez F., Tanaka Y., Schoenberg S., Altman A. (2001). Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J. Cell Biol.* 155, 331-338.
- Wang J. K. T., Walaas S. I., Sihra T. S., Aderem A., Greengard P. (1989). Phosphorylation and associated translocation of the 87kDa protein, a major protein kinase C substrate, in isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2253-2256.

Yamamoto H., Arakane F., Ono T., Tashima K., Okumura E., Yamada K., Hisanaga S., Fukunaga K., Kishimoto T., Miyamoto E. (1995). Phosphorylation of myristoylated alanine rich C kinase substrate (MARCKS) by proline-directed protein kinases and its dephosphorylation. *J. Neurochem.* 65, 802-809.

Yamauchi E., Kiyonami R., Kanai M., Taniguchi H. (1998). The C-terminal conserved domain of MARCKS is phosphorylated in vivo by proline-directed protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 4367-4371.

Zolessi F. R. (1998). Marcadores moleculares en la histogénesis de la retina: aproximación utilizando anticuerpos monoclonales. Tesis de Maestría, PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay.

Zolessi F. R., Hellman U., Baz A., Arruti C. (1999). Characterization of MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) identified by monoclonal antibody generated against chick embryo neural retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 480-487.

Zolessi F. R., Arruti C. (2001a). Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in chick embryo. *BMC Dev. Biol.* 1, 7.

Zolessi F. R., Arruti C. (2001b). Sustained phosphorylation of MARCKS in differentiating neurogenic regions during chick embryo development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 130, 257-267.

Zolessi F. R. (2003). Transducción intracelular de señales durante el desarrollo del sistema nervioso: rol de la proteína MARCKS. Tesis de Doctorado, PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay.

Zolessi F. R. y Arruti C. (2004a). MARCKS in advanced stages of neural retina histogenesis. *Dev. Neurosci.* 26, 371-379.

Zolessi F. R., Durán R., Engström U., Cerveñansky C., Hellman U., Arruti C. (2004b). Identification of the chicken MARCKS phosphorylation site specific for differentiating neurons as ser 25 using a monoclonal antibody and mass spectrometry. *J. Proteom Res.* 1, 84-90.