EFECTO DE LA EXPRESION DE GANGLIOSIDOS SOBRE LA TRANSDUCCION DE SEÑALES MEDIADA POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas

Lic. en Bioquímica: **Zurita, Adolfo Ramón**

Director de tesis: **Daniotti, José Luis**

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba,
CIQUIBIC (UNC-CONICET)
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba

CORDOBA
DICIEMBRE DE 2002

Director de tesis:

Dr. José Luis Daniotti

Comisión de tesis:

Dra. Ana M. Cabanillas

Dra. Nelia Geréz de Burgos

Dr. Hugo J. F. Maccioni

Agradecimientos

Deseo brindar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr. José Daniotti (Pepe), por brindarme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis bajo su excelente dirección, por su paciencia y consejos.

Al Dr. Hugo Maccioni, por permitirme trabajar en su laboratorio y por sus valiosos aportes en el desarrollo de los trabajos publicados.

Al Dr. Hector Barra, quien en su condición de director del CIQUIBIC, me permitió desempeñar mis tares en esta institución.

A las Doctoras Ana M. Cabanillas y Nelia Geréz de Burgos, por las sugerencias y correcciones realizadas en este trabajo.

Al CONICET, por brindarme el apoyo económico brindado a través de su programa de becas.

A la Dra. Silvia Kivatinitz, por el asesoramiento técnico y teórico brindado en el ensayo de unión ligando-receptor.

Al Dr. Gustavo Nores (Gus), por compartir con nosotros su experiencia en el área de los glicoesfingolípidos, sus oportunos comentarios y sobre todo, por su inagotable buen humor.

A Gabriela y Susana, por su invaluable ayuda en el manejo de las líneas celulares empleadas en este trabajo.

A José “Pepito” Martina, por enseñarme que aunque es bueno ser importante, mas importante es ser bueno.

A Claudio, Karina, Víctor, Lina, Javier, Sergio, Pilar y Andrea, por los momentos compartidos.

A todos los miembros del CIQUIBIC.

A mis padres por el amor recibido y el esfuerzo invertido en hacer de mí una buena persona.

A Victoria

INDICE

Abreviaturas utilizadas 1

RESUMEN 2

INTRODUCCIÓN 5
Gangliósidos 6
Generalidades 6
Biosíntesis 6
Transporte 7
Degradación 9
Efecto de los gangliósidos sobre el crecimiento y diferenciación celular 9
Gangliósidos: rol como moduladores de la distribución de proteínas en dominios de membrana 11
Receptores con actividad tirosina-quinasa 13
Receptor para el factor de crecimiento epidermal 13
Interacción con el ligando y activación 14
Activación de ERK mediada por EGFr 16
Control de la actividad de EGFr y de las cascadas de transducción de señales asociadas. 18

OBJETIVOS 20

RESULTADOS 22
Capitulo I 23
Generación y caracterización de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos 23
A) Clones de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos 23
Desarrollo y caracterización del clon IST2A 24
B) Inhibición de la biosíntesis de gangliósidos 29
Capitulo II 31
Expresión y caracterización funcional de EGFr y ERK 31
Expresión heteróloga de EGFr humano en células CHO-K1 31
Expresión y caracterización funcional de ERK2-HA en células CHO-K1 34
Inmunoexpresión de ERK2-HA 34
Análisis de la actividad enzimática de ERK2-HA 35
Activación de ERK2 mediante estimulación con EGF 36
Capitulo III 39
Actividad de EGFr expresado en células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos 39
Determinación de la función de EGFr mediante la activación de ERK2-HA, postestimulación con EGF 39
Cinética de la activación de ERK-HA 39
Análisis de unión entre EGFr y EGF 41
Autofosforilación de EGFr post-estimulación con EGF 42
Actividad de ERK1/2 endógena post-estimulación con insulina 44
Capitulo IV 46
Análisis de la localización de EGFr humano en membrana plasmática de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos 46
Lisis de células CHO-K1 con detergente no iónico y centrifugación en gradiente continuo de sucrosa 46
Localización de proteínas marcadoras en la membrana plasmática de células con expresión diferencial de gangliósidos. 47

Localización de EGFr en la membrana plasmática de células con expresión diferencial de gangliósidos. 49
Solubilidad de EGFr por tratamiento con Tritón X-100 50
Análisis de la presencia de EGFr en dominios de la membrana plasmática. Ensayo de cross-linking 51
Distribución de gangliósidos en gradiente continuo de sucrosa 54
Análisis inmunocitoquímico de la localización de EGFr y ganglósido GD3 en clon ST18 55

DISCUSIÓN 57
Principales modelos experimentales utilizados para el estudio de la función de los gangliósidos 58
Regulación de la actividad de EGFr por gangliósidos endógenos en células CHO-K1 60
Distribución de EGFr en membrana plasmática 62
Conclusión 64

MATERIALES Y METODOS 67
Cultivo de células 68
Transfección de células CH0-K1 68
Generación de líneas estables 68
Caracterización de las líneas estables 69
Marcado metabólico y extracción de lípidos 69
Inhibición de la biosíntesis de glicolípidos 69
Inmunocitoquímica 70
Western blot 70
Inmunoprecipitación de ERK2-HA 71
Determinación de la actividad de ERK 71
Ensayo de actividad quinasa de ERK2-HA 72
Western blot de P-ERK1/2 72
Determinación de la actividad de EGFr 73
Análisis de unión EGF-EGFr 73
Purificación de proteínas de membrana 74
Lisis con detergente y gradiente de sucrosa 74
Cross-linking de proteínas de membrana 75
Purificación de proteínas (Tratamiento con metanol/cloroformo) 76

APENDICE 77
Soluciones 78
Anticuerpos 79
Anticuerpos primarios 79
Anticuerpos secundarios 79
Marcadores secundarios: 80
Plásmidos recombinantes 80

TRABAJOS PUBLICADOS 81

REFERENCIAS 84

Abreviaturas utilizadas

Nota: La mayoría de las abreviaturas presentadas en este trabajo corresponden a sus nombres completos en ingles, por ser esta la forma más frecuentemente utilizada en la literatura.

BS^3: Bis (Sulfosuccimidil) suberato.
BSA: Albúmina Serica Bovina.
cDNA: ADN copia.
EGF: Factor de crecimiento epidermal.
EGFr: Receptor del factor de crecimiento epidermal.
ERK: Quinasa regulada por señal extracelular.
FGFr: Receptor del factor de crecimiento fibroblastico.
GAPs: Proteínas activadoras de GTPasas.
GEFs: Factores de anclaje de nucleótido de guanina.
Ir: Receptor de insulina.
MBP: Proteína básica de mielina.
MEK: Quinasa de MAPK o ERK.
NRG: Neuregulina.
PDGFr: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
P-EGFr: Receptor del factor de crecimiento epidermal fosforilado.
P-ERK 1/2: Proteina ERK1/2 fosforilada.
PPPP: d,1-threo-1-hexadecanolamino-3-pirrolidinpropano-1-ol, HCl.
PTB: Dominio de unión a fosfotirosina.
RTKs: Receptores con actividad tirosin-quinasa.
SFB: Suero fetal Bovino.
SHC: Proteína relacionada al colágeno que contiene un dominio SH2.
TCA: Acido Tricloroacético.
TGFα: Factor de crecimiento transformante α.

RESUMEN

Tanto la expresión endógena de gangliósidos así como la administración exógena de los mismos han sido implicadas en la regulación de eventos relacionados al crecimiento, maduración y diferenciación celular. En el presente trabajo hemos estudiado el efecto de la expresión de diferentes gangliósidos sobre el comportamiento del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr).

Para encarar este objetivo hemos desarrollado en nuestro laboratorio un modelo experimental consistente en la generación de clones estables de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos. Los diferentes clones fueron generados mediante transfección estable con vectores de expresión que contienen los cDNAs que codifican para las glicosíltransferasas involucradas en la biosíntesis de los gangliósidos. Además, se utilizó una condición de depleción de gangliósidos totales consistente en la incubación de células CHO-K1 con un inhibidor específico de la enzima UDP-glucosa:ceramida-glucosiltransferasa, mediante el cual fue posible eliminar en un 90 % los gangliósidos totales expresados en la membrana plasmática de estas células.

Sobre la base de este modelo, se analizó el comportamiento del receptor para el factor de crecimiento epidermal de origen humano (EGFr), el cual fue expresado de manera heteróloga mediante la transfección transiente del cDNA que codifica para el mismo. Los estudios realizados sobre el comportamiento de EGFr expresado en los diferentes clones de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos y depleción de gangliósidos totales revelaron que en condiciones donde se expresa el disialo ganglósido GD3 (clones ST18 e IST2A), y luego de estimular los mismos con factor de crecimiento epidermal (EGF), existe una marcada disminución en los niveles de actividad de EGFr. No se encontraron diferencias significativas con respecto a células CHO-K1 salvajes (GM3+), células CHO-K1 con expresión reducida de gangliósidos, ni en condiciones donde se expresan gangliósidos complejos de la serie "a" tales como GM2, GM1 y GD1a (clon 7), indicando que el efecto sobre EGFr no era causado por la aparición de otros tipos de gangliósidos complejos, ni por la disminución en los niveles del ganglósido GM3 en su membrana plasmática. Estudios desarrollados en el clon ST18 e IST2A revelaron que la disminución en la actividad de EGFr no sería atribuida a alteraciones en la cinética de activación de EGFr, ni en la afinidad de este por su agonista. Ensayos posteriores revelaron ade-

más que el comportamiento del receptor de insulina no se ve afectado bajo las mismas condiciones de expresión de gangliósidos que afectan a EGFr.

Finalmente, analizamos la distribución de EGFr en membrana plasmática de células CHO-K1, así como su posible interacción con el ganglíosido GD3. Estos estudios, revelaron que a diferencia de lo encontrado en otros sistemas celulares, EGFr localiza en dominios de membrana solubles al tratamiento con el detergente no ionico Tritón X-100 a 4°C, en cada una de las condiciones de expresión diferencial de gangliósidos estudiadas, y que dicha localización no es afectada por la presencia de ganglíosido GD3 endógeno. Asimismo, no fue posible detectar la existencia de algún tipo de interacción estable entre EGFr y el ganglíosido GD3.

INTRODUCCION

Gangliósidos

Generalidades

Los gangliósidos son un grupo de moléculas pertenecientes a la familia de los glicoesfingolípidos. De naturaleza anfipática, los gangliósidos están compuestos por una porción hidrofóbica (ceramida) y una porción hidrofílica formada por una cadena de oligosacáridos de complejidad variable y que a diferencia de otros glicoesfingolípidos, posee una o más moléculas de ácido siálico.

Los gangliósidos son sintetizados en el complejo de Golgi y se localizan principalmente en la hemicapa externa de la membrana plasmática de las células de vertebrados, especialmente en aquellas que forman parte del sistema nervioso central (Maccioni y col., 1996).

Biosíntesis

La biosíntesis *de novo* de los gangliósidos, al igual que en todos los glicoesfingolípidos, es dependiente de la síntesis de ceramida. La síntesis de ceramida transcurre en la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplasmático por acción de la enzima ceramida sintasa que cataliza la formación de una unión amida entre una esfingosina y una molécula de ácido graso de cadena larga, generalmente ácido palmitico (C16:0) y ácido estearico (C18:0). Esta molécula de ceramida es luego transportada mediante transporte vesicular y la acción de proteínas solubles hacia la cara citoplasmática de la región *cis* del complejo de Golgi, donde será convertida a glucosil-ceramida mediante la incorporación de una molécula de glucosa (a partir de UDP-glucosa) por acción de la enzima UDP-glucosa:ceramida-glucosiltransferasa (Basu y col., 1968; Durieux y col., 1990; Riboni y col., 1993; Paul y col., 1996). La molécula de glucosil-ceramida así sintetizada, es translocada a la cara luminal del complejo de Golgi (Riboni y col., 1993) donde le es incorporada una molécula de galactosa para convertirla en lactosil-ceramida (Figura 1). Esta molécula de lactosil-ceramida es el precursor inmediato de los gangliósidos propiamente dichos y de la serie asialo.

La síntesis de gangliósidos en el lumen del complejo de Golgi es llevada a cabo mediante un complejo sistema de múltiples glicosiltransferasas. Estas enzimas co-

rresponden a proteínas de membrana tipo II, las cuales presentan un pequeño segmento N-terminal del lado citoplasmático de la membrana, un dominio transmembrana y un dominio C-terminal, responsable de la actividad catalítica, orientado hacia la cara luminal del complejo de Golgi (Caputto y col., 1974; Lannert y col 1998; Maccioni y col., 1999; 2002). El primer tipo de ganglióside en ser sintetizado es el ganglióside GM3, como resultado de la incorporación de una molécula de ácido siálico a la galactosa de la lactosil-ceramida por acción de la enzima Sial-T1 o GM3 Sintasa. Eventualmente, el ganglióside GM3 podrá ser luego tomado por otras glicosíltransferasas, las cuales que mediante glicosilación secuencial, irán amplificando la cadena de oligosacáridos generando gangliósidos más complejos a medida que los mismos se van desplazando hacia las regiones más *trans* del complejo de Golgi (Maccioni y col., 1996; 1999; 2002; Lannert y col., 1998; Rosales Fritz y col., 1996; Giraudo y col., 1999).

La Figura 1 ofrece una representación esquemática de la biosíntesis de los gangliósidos. En ella se muestra como, mediante una acción coordinada, el ganglióside GM3 puede ser convertido total o parcialmente a GD3 y GT3 por acción de las enzimas Sial-T2 (GD3 Sintasa) y/o Sial-T3 (GT3 Sintasa) (Nakayama y col., 1996). Cada uno de estos gangliósidos (GM3, GD3 y GT3) es punto de partida para las series a, b y c de biosíntesis, en las cuales participan las enzimas GalNAc-T (GM2/GD2/GT2 Sintasa), Gal-T2 (GM1/GD1b/GT1c Sintasa), Sial-T4 y Sial-T5.

Finalmente, estos gangliósidos recién sintetizados serán transportados hacia la membrana plasmática mediante transporte vesicular, donde sus cadenas de oligosacáridos quedaran orientadas hacia el espacio extracelular.

Transporte

Los gangliósidos recién sintetizados son transportados fuera del complejo de Golgi hacia la membrana plasmática, mediante la generación, en la región más distal del mismo (*trans Golgi-network*), de vesículas recubiertas con el complejo proteico clatrina y proteína adaptadora AP (Scales y col., 2000; Kirchhausen, 2002).

Si bien los gangliósidos son transportados como elementos que conforman la bicapa lipídica de las vesículas exocíticas, estos no estarían homogéneamente distribuidos en las mismas, ya que se han encontrado evidencias de que pueden

estar diferencialmente segregados a nivel de la formación de dichas vesículas de transporte, lo cual explicaría la asimétrica distribución de gangliósidos, y de otros esfingolípidos, encontrada en la membrana apical y basolateral de células polarizadas (Spiegel y col., 1988; Holthuis y col., 2001).

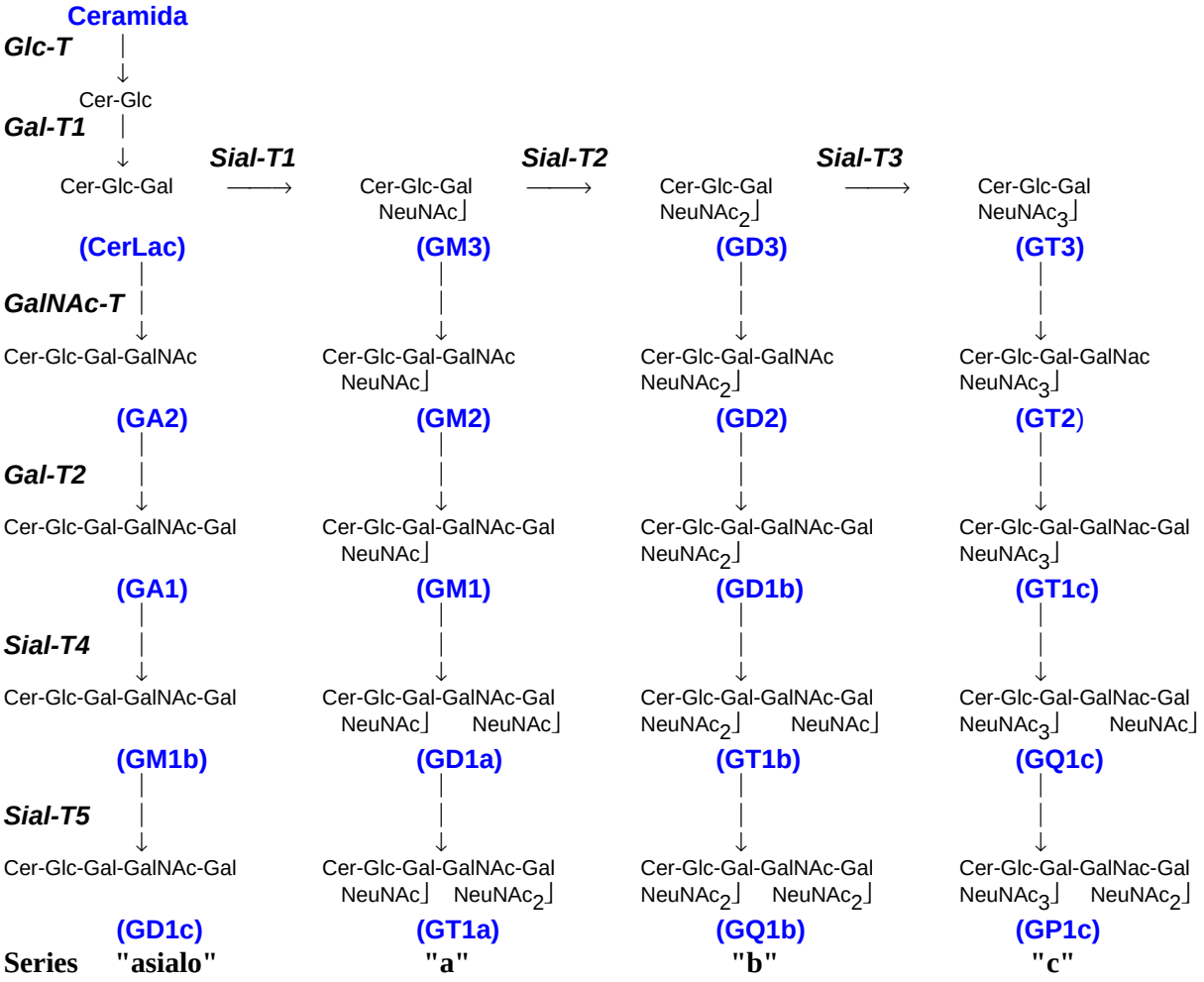

Figura 1: **Vías de biosíntesis de gangliósidos**
Los gangliósidos son nombrados de acuerdo a Svennerholm, (1963).

En un estudio realizado sobre células de melanoma (Sprong y col., 2001), se encontró que un clon mutante que carece de la expresión de glicoesfingolípidos es incapaz de sintetizar melanina. Este defecto se debe a que en estos clones la enzima tirosinasa, necesaria para la síntesis del precursor de melanina L-DOPA, no es transportada hacia los melanosomas donde es necesaria, sino que queda retenida en el complejo de Golgi. Este fenómeno, que fue revertido por la transfección de estas células con un vector de expresión del para la enzima glucosiltransferasa faltante, sugiere que los glicoesfingolípidos (entre ellos los gangliósidos) tendrían cierta

relevancia en el reclutamiento y segregación de proteínas que serán transportadas desde el complejo de Golgi hacia su destino final en la célula.

Degradación

Básicamente, el catatabolismo de los gangliósidos consiste en la remoción secuencial de los azucares de su cadena de oligosacáridos mediado por enzimas exoglicohidrolasas. Las moléculas de ceramida generadas son luego escindidas a esfingosina y el ácido graso que la componen (Sandhoff y Kolter, 1997). Este mecanismo de degradación utiliza la vía endocítica y fusión de los endosomas formados con los lisosomas.

Una vía alternativa de degradación encontrada en algunas bacterias y medusas consiste en romper directamente la unión β-glicosidica entre la glucosa y la ceramida, mediante la acción de la enzima endoglicoceramidasa (Ito y col., 1986; 1991; Horibata y col., 2000). Sin embargo, no existe información sobre la presencia de este mecanismo en células de vertebrados.

Muchos de los azúcares generados por la degradación de la cadena de oligosacáridos podrán ser utilizados por la célula, a través de una vía de reutilización, en la biosíntesis de nuevas moléculas de gangliósidos, no pudiéndose descartar la reutilización de moléculas de mayor tamaño como ceramida y/o glucosil-ceramida (Riboni y col., 1991; 1993).

Finalmente, podemos concluir que la cantidad y composición de los gangliósidos que se expresan en la hemicapa externa de la membrana plasmática es el resultado de un delicado equilibrio existente entre las actividades de las enzimas involucradas en su biosíntesis, la cantidad y disposición de gangliósidos substratos requeridos y de los procesos de transporte y degradación de los mismos.

Efecto de los gangliósidos sobre el crecimiento y diferenciación celular

Aunque la función de los glicolípidos en general y gangliósidos en particular no ha sido aun dilucidada en detalle, numerosos autores observaron que alteraciones en la composición de gangliósidos coexisten con cambios a nivel de crecimiento y maduración celular (Ledeen, 1985; Daniotti y col., 1994; Maccioni y col., 1999). Me-

diante la generación de ratones *Knock out* para el gen que codifica la enzima ceramida-glucosiltransferasa (ver Figura 1), Yamashita y col. (1999) encontraron que los embriones de ratones homocigotas (carentes de la expresión de gangliósidos) son inviables y que su desarrollo termina abruptamente por un proceso apoptótico, indicando que la síntesis de gangliósidos sería esencial para un adecuado desarrollo embrionario y para la diferenciación de algunos tejidos. Más aún, Nakano y col. (1996, 1999) encontraron que una mutante de células de melanoma humano deficientes en GD3 presenta una morfología alterada con respecto a las células de melanoma originales (GD3+), un menor índice de crecimiento *in vitro* y una capacidad disminuida para formar tumores cuando estas células son inyectadas en ratones inmunodeficientes, además de una mayor habilidad para unirse a colágeno y laminina presentes en la matriz extracelular. Estos resultados indicarían que el ganglósido GD3 jugaría un importante rol en el crecimiento y proliferación de las células de melanoma y además confirman las observaciones de otros autores, los cuales también encuentran una relación entre cambios en la expresión de gangliósidos con la generación procesos oncogénicos (Hakomori, 1970; 1981).

En otro caso, Farooqui y col. (1997) encontraron que el agregado del ganglósido GM1 al medio de cultivo de células PC12 induce un incremento en la neuritogenesis de estas células, provocada por la interacción directa del ganglósido GM1 con el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFr), la cual induce a la activación del mismo. Estudios similares realizados sobre otros receptores como: factor de crecimiento fibroblastico (FGFr) (Slevin y col., 1999), factor de crecimiento epidermal (EGFr) (Rebbaa y col., 1996) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr) (Van Brocklyn y col., 1997) demostraron también un efecto de gangliósidos sobre el comportamiento de dichos receptores. Estos trabajos, claramente indican que la adición de gangliósidos exógenos al medio de cultivo de células eucariotas puede causar modificaciones en la respuesta de receptores para factores tróficos y diferenciantes.

Recientemente, Fukumoto y col. (2000) transfectaron células PC12 con un vector de expresión que codifica para la enzima Sial-T2, la cual induce un aumento en la expresión de los gangliósidos de la serie “b” GD1b y GT1b en estas células. Clones estables para esta glicosiltransferasa presentaron un aumento en la velocidad de división celular, a la vez que se generó una inhibición en la neuritogenesis inducida por el factor de crecimiento nervioso (NGF). Dicho efecto estaría dado por

un continuo estado de estimulación de NGFr, probablemente inducido por el nuevo *pool* de gangliósidos expresados en la membrana plasmática de la célula.

Todas estas observaciones sugerirían que variaciones en la composición de gangliósidos localizados en la membrana plasmática tendrían una participación sobre la regulación de procesos de desarrollo, crecimiento y diferenciación celular, mediante mecanismos aún no bien establecidos, pero que probablemente estén relacionados con la regulación directa o indirecta de proteínas de membrana involucradas en la transducción de señales o en interacciones célula-célula o célula-sustrato.

Gangliósidos: rol como moduladores de la distribución de proteínas en dominios de membrana

La distribución de gangliósidos como de otros lípidos a lo largo de una membrana biológica dista mucho de ser homogénea, ya que merced a diferencias en las propiedades físico-químicas de los lípidos que la componen, estos tienden a localizarse diferencialmente, generando organizaciones que conforman dominios de membranas enriquecidos en algunas especies particulares de lípidos con la exclusión de otros. Un tipo particular de microdominio son los llamados microdominios *rafts* dentro de los cuales se han encontrado enriquecidos de gangliósidos tales como GD3 y GM1 (Vyas y col., 2001; Kalka y col., 2001).

Los *rafts* son organizaciones laterales de lípidos ricas en colesterol y glicoesfingolípidos que aunque han sido descriptos también en endomembranas, estarían localizados principalmente en la membrana plasmática. Estos microdominios, debido a su composición, se encuentran en un estado de fase líquido ordenada adquiriendo por lo tanto la particularidad de ser resistente al tratamiento con detergentes no iónicos a bajas temperaturas (Simons y col., 1997; London y Brown, 2000), lo que permite aislar los mismos por técnicas de centrifugación en gradientes continuos o discontinuos (Waheed y col., 2001).

Numerosas proteínas de membrana pueden ser incluidas en estos microdominios (Song y col., 1996; Taylor y col., 2002), las cuales participarían en una variedad de procesos biológicos en la superficie celular tales como endocitosis (Subramaniam y Johnson, 2002; Stan, 2002; Nichols, 2002) o transducción de señales (Simons y

Toomre, 2000). Esto ultimo se evidencia por el enriquecimiento en dominios rafts de proteínas como: PDGFr, Ras, Raf-1, Giα, receptor de insulina y Src (Arreaza y col., 1994; Mineo y col., 1996; 1999; Galbiati y col., 1999; Waugh y col., 1999).

Es interesante destacar a modo de ejemplo, que en un estudio realizado sobre células Swiss 3T3 con elevados niveles de expresión de ganglióside GM1 (Mitsuda y col., 2002), obtenidos mediante transfección de las mismas con los cDNA que codifican para las enzimas GalNac-T y Gal-T2 (ver Figura 1), se encontró que dichas células exhiben una reducida proliferación luego del tratamiento con factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Esto coincidiendo, además, con una disminución de los niveles de activación de PDGFr. Estudios posteriores revelaron que, en las células que expresan GM1, PDGFr se encuentra fuera de microdominios ricos en glicoesfingolípidos. Por el contrario, en las células parentales (GM1-) se observó que la mayor parte PDGFr se encuentra presente en microdominios rafts. Otros estudios, basados en la alteración de la composición de gangliósidos por administración exógena (Simons y col., 1999) o tratamiento con la enzima endogliococeramidasa (Kasahara y col 2000), obtuvieron resultados de similar naturaleza, pudiendo por lo tanto existir una correlación entre la presencia de microdominios particulares en membrana plasmática y la regulación de la actividad de proteínas de membrana.

Receptores con actividad tirosina-quinasa

A medida que los organismos biológicos se tornan más y más complejos en lo que a número y variedad de células se refiere, es indispensable una adecuada comunicación intercelular a fin de poder regular satisfactoriamente procesos biológicos fundamentales como crecimiento, diferenciación, secreción y muerte (entre otros). Muchos de estos procesos son regulados a través de mensajeros químicos (hormonas) capaces de interaccionar con sus respectivos receptores presentes en la célula blanco e inducir una respuesta por parte de esta.

La clasificación de los receptores celulares puede estar basada en la respuesta biológica que desencadena, el tipo de ligando con el que interacciona o según su mecanismo de acción (Schlessinger, 2000). Muchas clases de receptores están localizados en el citoplasma de la célula blanco, a fin de interaccionar con hormonas capaces de atravesar la membrana plasmática (ej. hormonas esteroideas y tiroideas). De la misma manera, existen receptores localizados en la membrana plasmática, con el objeto de interaccionar con moléculas cuya naturaleza hidrofílica les impide atravesar la misma.

Los receptores de membrana forman parte de una gran familia de moléculas (generalmente de naturaleza proteica) con capacidad de interaccionar con un ligando específico en la célula blanco y generar una variedad de señales que, mediadas por intermediarios de distinta naturaleza (lípidos, carbohidratos, péptidos y proteínas), culminan en la generación de una respuesta celular.

Los receptores con capacidad de responder ante una señal externa mediante la fosforilación de residuos de tirosina (Hunter, 1998), pertenecen a la familia de los receptores tirosina-quinasa (RTKs). Dentro de esta familia podemos citar los receptores de insulina (Ir), FGFr, PDGFr y EGFr (Denhardt, 1996).

Receptor para el factor de crecimiento epidermal

El receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFr) consiste en una glicoproteína de membrana de aproximadamente 170 kDa (Sorking y Carpenter, 1991; Sasaoka y col., 1994) compuesta, como en casi todos los RTKs, por una cadena polipeptídica en la que un fragmento transmembrana separa dos dominios. Un domi-

nio extracelular N-terminal (donde reside el sitio de interacción con su agonista) formado por la cadena polipeptídica propiamente dicha y aproximadamente 40 kDa de oligosacáridos distribuidos en 12 sitios de N-glicosilación (Carpenter y Cohen, 1990); y un dominio citoplasmático (C-terminal) donde coexisten la región que le confiere su capacidad tirosina-quinasa, en conjunto con otras regiones que actúan como reguladoras (Murali y col., 1996; Denhadt, 1996; Schlessinger, 2000).

La familia de el EGFr de mamíferos esta representado actualmente por cuatro diferentes miembros: ErbB1 (EGFr propiamente dicho), ErbB2 (c-Neu), ErbB3 y ErbB4 (Tzahar y col., 1996; Moghal y Sternberg, 1999, Schlessinger, 2000) (Tabla 1).

Nombre del receptor	**Agonistas**	**Actividad tirosina quinasa**
ErbB1 (EGFr)	EGF, TGFα y amfiregulina	SI
ErbB2 (c-Neu)	no posee	SI
ErbB3	neuregulina	NO
ErbB4	neuregulina	SI

Tabla 1: **Miembros de la familia de EGFr**.

Interacción con el ligando y activación

Cada uno de los miembros de la familia de EGFr posee capacidad para interaccionar con diferentes tipos de ligandos. ErbB1 se une a EGF, el factor de crecimiento transformante α (TGFα) y amfiregulina. ErbB3 y ErbB4 son capaces de unirse a varias isoformas de neuregulina (NRG) mientras que ErbB2 carece de un ligando específico (Reise y Stern. 1998; Schaefer y col 1999).

Los diferentes miembros de la familia de EGFr (que pueden o no co-expresarse en la misma célula) tienen la facultad de formar homodímeros o heterodímeros entre ellos (Sorkin y Carpenter, 1991; Hackel y col., 1999; Schaefer y col., 1999; Moghal y Sternberg, 1999), los cuales se ven enormemente estabilizados por su unión con el ligando. Además de favorecer la formación de dímeros, la unión del ligando con su receptor facilita la adquisición de una conformación activa en la cadena citoplasmáti-

ca del receptor (Sorokin y col., 1994; Schlessinger, 2000). Esto trae en consecuencia la fosforilación cruzada en determinados residuos de tirosina presentes en esta misma región de la cadena (Figura 2) (Lemmon y col., 1997; Schlessinger, 2000). ErbB2, si bien no posee un ligando específico descubierto a la fecha, puede formar heterodímeros con el resto de los miembros de la familia de EGFr ligados a sus respectivos agonistas y mediar la fosforilación cruzada ya descripta (Schaefer y col., 1999).

La fosforilación de los residuos de tirosina en la cadena citoplasmática de EGFr genera sitios que pueden ser reconocidos por diversas proteínas efectoras a través de un dominio SH2 (*Src-homology* 2) o el dominio de unión a fosfotirosina [phosphotyrosine binding (PTB)] (Sasaoka, 1994; Klint y col., 1995; Denhardt, 1996). La unión de estas proteínas efectoras tales como Src, P85, PLCγ, GAP y GRB2 es el principio de muchas de las cascadas de transducción de señales desencadenadas por la activación de EGFr.

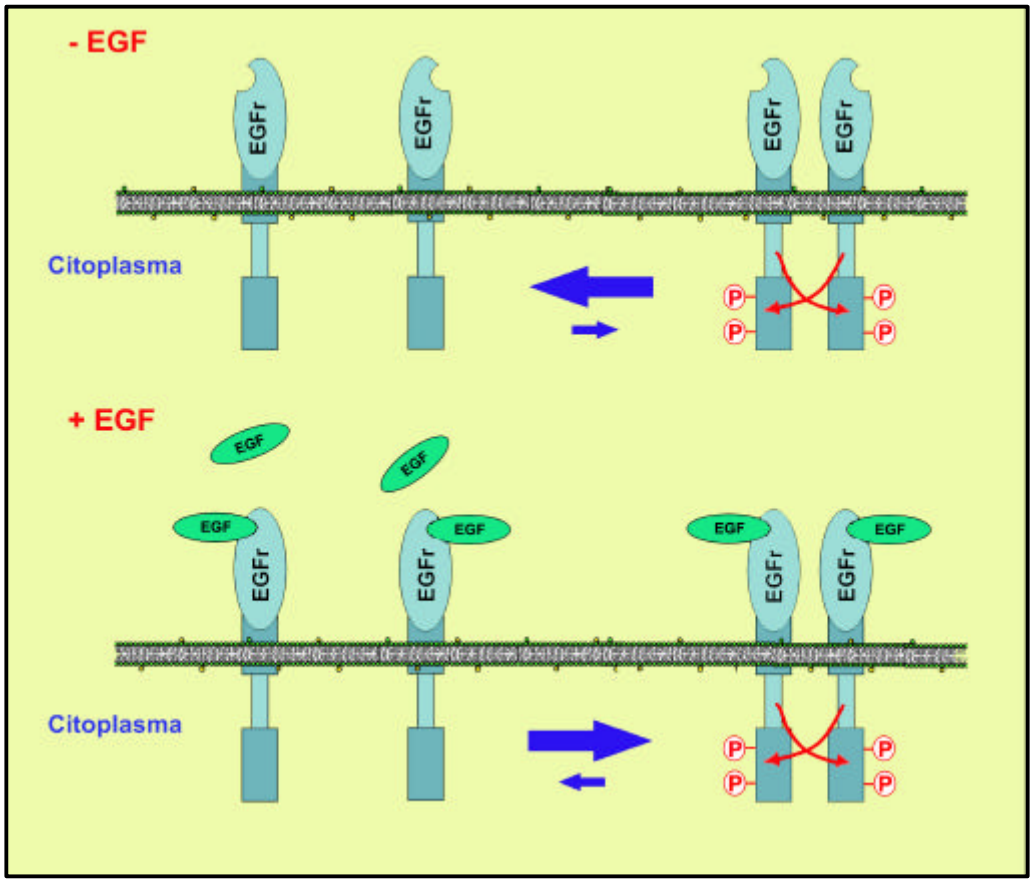

Figura 2: **Representación esquemática de la interacción de EGFr con su ligando agonista.** La unión de EGF a su receptor induce la formación de dímeros y autofosforilación en residuos de tirosina localizados en el dominio intracelular del mismo. La presencia de EGF desplaza el equilibrio hacia la formación de dímeros activos.

Activación de ERK mediada por EGFr

Una de las vías de transducción de señales más estudiadas capaces de ser activadas por EGFr, es la vía Ras→Raf→MEK→ERK (Fukuda y col., 1997; Fanger y col., 1997; Garrington y Johnson, 1999).

La aparición de ciertos residuos fosfotirosina en un adecuado contexto de aminoácidos en la cadena citoplasmática de EGFr activado permite ser directamente reconocido por el complejo GRB2-SOS gracias al dominio SH2 presente en la proteína GRB2 (Figura 3A) o mediante el dominio PTB de la proteína SHC (*SH2-domain-containing α 2-collagen-related*) (Figura 3B) la cual puede luego ser reconocida por GRB2 (Sasaoka y col., 1994; Denhardt. 1996; Vojtek y Der, 1998; Sakaguchi y col., 1998). Este complejo, una vez anclado al receptor fosforilado (P-EGFr), es capaz de activar por acción de la proteína SOS a la proteína de membrana con actividad GTPasa Ras, la cual intercambia GDP por GTP (Figura 3) (Anne y Channing, 1998).

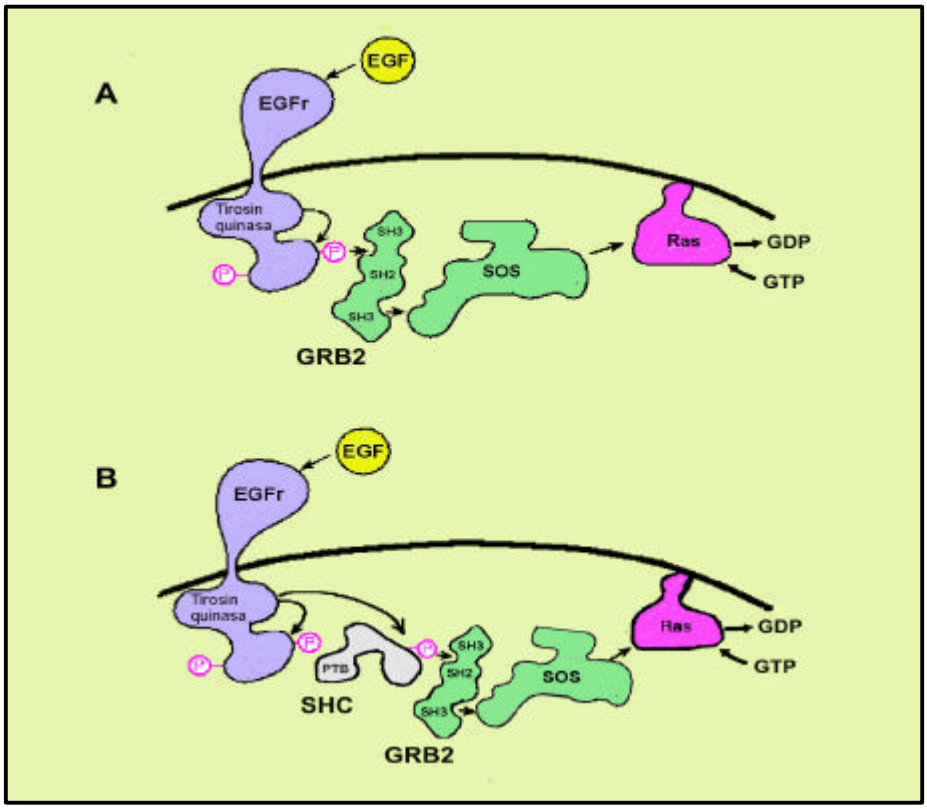

Figura 3: **Activación de la proteína Ras inducida por EGFr.**
EGFr fosforilado es capaz de activar la GTPasa Ras mediante la interacción directa con la proteína GRB2 vía un dominio SH2 (A) o mediante interacción con la proteína SHC vía un dominio PTB (B).

La proteína Ras es una proteína anclada en la hemicapa interna de la membrana plasmática perteneciente a una familia de proteínas G monoméricas con capacidad de unir e hidrolizar GTP (Denhadt, 1996; Vojtek y Der, 1998). La forma activa de esta proteína está dada por la incorporación de una molécula de GTP, condición en la que es capaz de activar la cascada de quinasas Raf→MEK→ERK por unión y activación de la serina/treonina quinasa Raf (Morrison y Cutler, 1997; Vojtek y Der, 1998), en un mecanismo en la que se encuentra involucrada la proteína quinasa C (PKC) (Benard y col., 2001) (Figura 4). Raf, mediante fosforilación en residuos de serina, es capaz de activar a la proteína quinasa dual MEK (*MAPK o ERK kinase)*, que a su vez (por fosforilación de un residuo de treonina 202 y otro de tirosina 204) activa a las quinasas ERK1 y 2 (*extracellular-signal-regulated-kinase*) las cuales finalmente serán translocadas al núcleo celular (Fukuda y col., 1997; Vojtek y Der, 1998), donde podrán activar factores de transcripción como Elk-1 y c-Myc e inducir la expresión de genes que finalmente ejercerán en la célula una respuesta acorde al estímulo inicial (Figura 4).

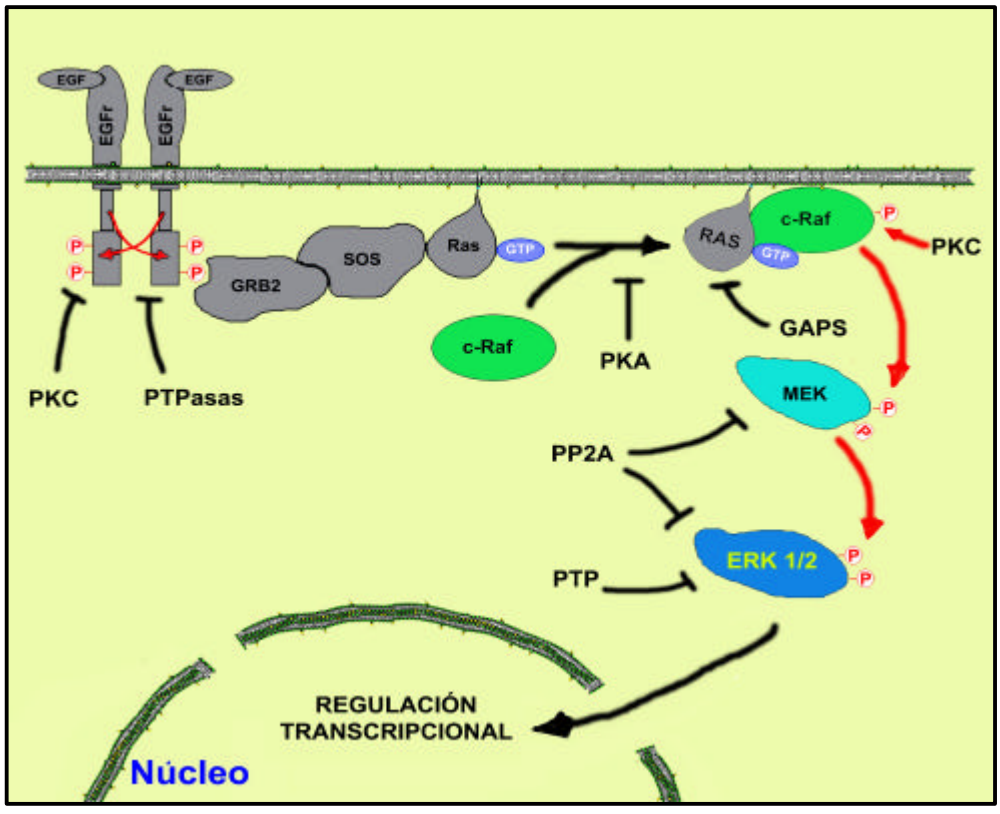

Figura 4: **Cascada de transducción Ras→Raf→MEK→ERK inducida por la activación de la proteína GTPasa Ras.** Luego de ser activadas por MEK, las quinasas ERK 1 y 2 son translocadas al núcleo de la célula donde podrá actuar en la regulación de numerosos factores de transcripción (↑ estimulación, ⊥ inhibición, ⇢ translocación).

Se ha demostrado que la formación de homo o heterodímeros entre las diferentes cadenas de EGFr, induce vías de transducción de señales con diferente grado de actividad (Decker, 1993; Tzahar y col., 1996; 1997; Waterman y col., 1998; Moghal y Sternberg, 1999). De esta manera, la naturaleza de la señal desencadenada estaría dada por el tipo de ligando así como del tipo de cadenas de EGFr involucradas.

Finalmente, es importante destacar que EGFr no sólo tiene la capacidad de iniciar una respuesta por interacción directa con su agonista, sino que también puede actuar como una proteína intermediaria acoplando la activación de esta con estimulaciones generadas en otros tipos de receptores como por ejemplo aquellos receptores acoplados a proteína G heterotrimérica. Este fenómeno que se reconoce con el nombre de *"Crosstalk"* (Daub y col., 1996; 1997; Schwartz y Baron, 1999; Luttrel y col., 1999; Hackel, 1999) indica que EGFr seria también un crítico mediador de múltiples mecanismos de transducción de señales inducidas por otros receptores.

Control de la actividad de EGFr y de las cascadas de transducción de señales asociadas.

A la vez que en una célula existen mecanismos que tienden a aumentar la actividad de una serie de enzimas en respuesta a un estímulo como la interacción de EGFr con su agonista, existen mecanismos de regulación que impiden una respuesta exacerbada por parte de la célula y que podría inducirla a un comportamiento anormal, como sería por ejemplo el caso de ciertas transformaciones oncogénicas.

Los mecanismos de atenuación descriptos para EGFr incluyen la endocitosis y degradación del mismo (Ceresa y Schmid, 2000; Burke y col., 2001), la acción de fosfatasas sobre residuos fosfo-tirosina (PTPasas), las cuales juegan un importante rol en el control de la actividad de RTKs (Suares Pestana y col., 1997; Hackel y col., 1999; Schlessinger, 2000) y la activación de la proteína quinasa C (PKC) la cual es capaz de fosforilar residuos reguladores de serina y treonina localizados en el dominio citoplasmático de EGFr con la consiguiente inhibición de la actividad tirosina-quinasa y de la interacción con su ligando (Morrison y col., 1996; Bao y col., 2000) (Figura 4).

Los eventos inducidos por la activación de EGFr pueden ser regulados a diferentes niveles. La acción de las fosfatasas PP2A, PTP, MKP-1 y/o PAC-1 inhiben la actividad de ERK1/2 (Wera y Hemmings, 1995). La fosforilación dependiente de MEK, de la proteína SOS, rompe el complejo formado con Grb2 con la consiguiente perdida de la habilidad para activar Ras (Waters y col., 1995; Chen y col., 1996). La interacción entre las proteínas Raf y Ras (Cook y McCormick, 1993; Hordijk y col., 1994; Dhillon y col., 2002) puede ser inhibida por la hidrólisis de la molécula de GTP de la proteína Ras, desencadenada por interacción de esta con proteínas que inducen su actividad GTPasa (GAPs) (Vojtek y Der, 1998) o la inactivación de Raf por acción de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Schramm y col., 1994; Dhillon y col., 2002).

Estos y otros mecanismos de regulación de la actividad de EGFr y de las cascadas de transducción de señales asociadas, tienden a mantener un adecuado balance entre los estímulos y las respuestas que la célula genera.

Un mecanismo de regulación de la actividad de receptores de membrana no mencionado hasta ahora, y que es particularmente estudiado en RTKs, es la regulación directa o indirecta mediada por lípidos de la membrana plasmática. Este aspecto será discutido durante el desarrollo del presente trabajo de tesis.

OBJETIVOS

En el presente trabajo de tesis nos propusimos abordar los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Desarrollo y caracterización de clones de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos, el cual se desarrollo por medio de dos procedimientos: a) Desarrollo de clones de células CHO-K1 obtenidos mediante transfección estable con vectores de expresión que codifican para diferentes gangliósido-glicosíltransferasas; b) Inhibición de la síntesis de gangliósidos totales por tratamiento de células CHO-K1 con el inhibidor de la UDP-glucosa:ceramida-glucosil-transferasa,1-threo-1-hexadecanolamino-3-pirrolidinpropano-1-ol, HCl (PPPP).

Objetivo 2: Caracterización de la expresión, localización y funcionalidad en células CHO-K1 de las proteínas ERK2 (*extracellular-signal-regulated-kinase*) y EGFr (receptor para el factor de crecimiento epidermal humano), expresados de manera transiente mediante transfección con los vectores de expresión que codifican para las mismas.

Objetivo 3: Analizar el comportamiento del receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFr) cuando se modifica el tipo de ganglióside que se expresa en la célula.

Objetivo 4: Investigar el efecto de cambios en la composición de gangliósidos, sobre la localización de EGFr en microdominios de membrana de células CHO-K1.

RESULTADOS

Capitulo I

Generación y caracterización de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos

Los estudios realizados en este trabajo se llevaron a cabo mediante el empleo de células epiteliales provenientes de ovario de hámster chino (CHO-K1, American Type Culture Collection, # CCL-61, U.S.A.). Estas células sólo expresan el ganglósido simple GM3 en su membrana plasmática (Rosales Fritz y col., 1997) debido a que carecen de las enzimas que lo utilizan como sustrato: Sial-T2 (GD3 sintasa) y GalNAc-T (GM2/GD2 sintasa) (Figura 1). Dos estrategias experimentales se utilizaron para generar diferentes variantes de células CHO-K1 que expresen gangliósidos de manera diferencial.

A) *Clones de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos*

Mediante la utilización de técnicas de biología molecular, que incluyen el clonado de cDNA, la transfección de los mismos en vectores de expresión y la selección por antibióticos, se han generado en nuestro laboratorio clones de células CHO-K1 que expresan de manera estable diversas gangliósido-glicosiltransferasas.

Estos clones de células CHO-K1 tienen la facultad de sintetizar gangliósidos más complejos y consecuentemente generar una modificación en la composición de gangliósidos que expresan en sus membranas.

Dos de los clones utilizados en este trabajo fueron desarrollados con anterioridad en otras líneas de trabajo de nuestro laboratorio, por lo tanto sólo se realizará una breve mención de sus características:

Clon ST18: Corresponde a una variante de células CHO-K1 que expresan constitutivamente la enzima Sial-T2 (Figura 1). Células CHO-K1 se transfectaron de manera estable con un vector de expresión que contiene el cDNA que codifica para la citada enzima, la cual está fusionada en su extremo carboxilo terminal a un nanopéptido derivado de la secuencia de la hemoaglutinina del virus influenza (HA), utilizado como epitope para anticuerpos específicos (Daniotti y

col., 1997; 2000). Esta enzima tiene la capacidad de utilizar la totalidad del ganglíosido GM3 y convertirlo a ganglíosido GD3 (Figura 10). Por lo tanto estas células expresan mayoritariamente el ganglíosido GD3 y en menor cantidad el ganglíosido GT3 debido posiblemente a que la enzima puede utilizar GD3 para convertirlo a GT3 (Nakayama y col., 1996) o a una actividad endógena de una enzima GT3-sintasa (Sial-T3).

Clon 7: Corresponde a una variante de células CHO-K1 que expresan constitutivamente la enzima GalNAc-T, mediante la transfección estable con un vector de expresión que contiene el cDNA que codifica para la enzima GalNAc-T fusionada en la región 3` a un oligonucleótido que codifica para diez aminoácidos de la proteína c-myc. Esta enzima tiene la capacidad de utilizar el ganglíosido GM3 de la célula y convertirlo a ganglíosido GM2 el cual es luego utilizado en parte para generar los ganglíosidos GM1 y GD1a (Figura 10). Esto último debido a que la célula posee actividad endógena de las enzimas Gal-T2 y Sial-T4 (ver figura 1) (Rosales Fritz y col., 1997; Giraudo y col., 1999).

Desarrollo y caracterización del clon IST2A

El Clon IST2A (Figura 10) corresponde a células CHO-K1 que expresan en forma estable pero regulada la enzima Sial-T2-HA (presente también en el clon ST18) por acción de un promotor inducible (p- -HSP) por la hormona esteroidea ecdisona o análogos de la misma (Daniotti y col., 2000). Este sistema requiere la presencia en conjunto del vector pIND (INVITROGEN), el cual transporta el cDNA de interés cuya transcripción es controlada por el promotor inducible, y el vector pVgRXR, que expresa de manera constitutiva el receptor para la hormona (Figura 5).

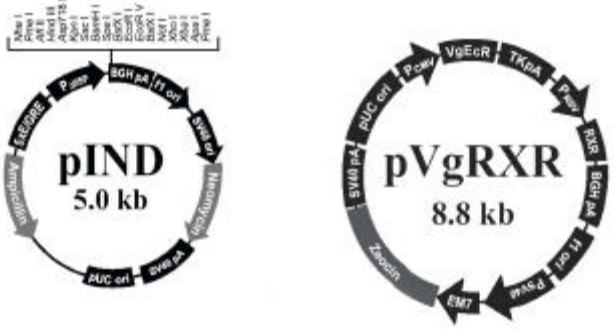

Figura 5: **Vectores pIND y pVgRXR**

El vector pIND posee un promotor (p- -HSP) que responde a ecdisona, un caja de clonage y el marcador de selección para el antibiótico neomicina. El vector pVgRXR posee el cDNA que codifica para el receptor de ecdisona, además del marcador de selección para el antibiótico zeocina.

Adaptado de catálogos de INVITROGEN.

El clon IST2A fue desarrollado mediante una doble transfección estable en células CHO-K1, con los vectores pIND-Sial-T2-HA (generado por la inserción a pIND del cDNA que codifica para Sial-T2-HA) y pVgRXR. Esto permitió disponer de un sistema, donde los niveles de expresión de Sial-T2-HA son dependientes de la interacción entre el promotor p- -HSP (del vector pIND) con el complejo formado entre la hormona ecdisona y su receptor (codificado por el vector pVgRXR) (Figura 6).

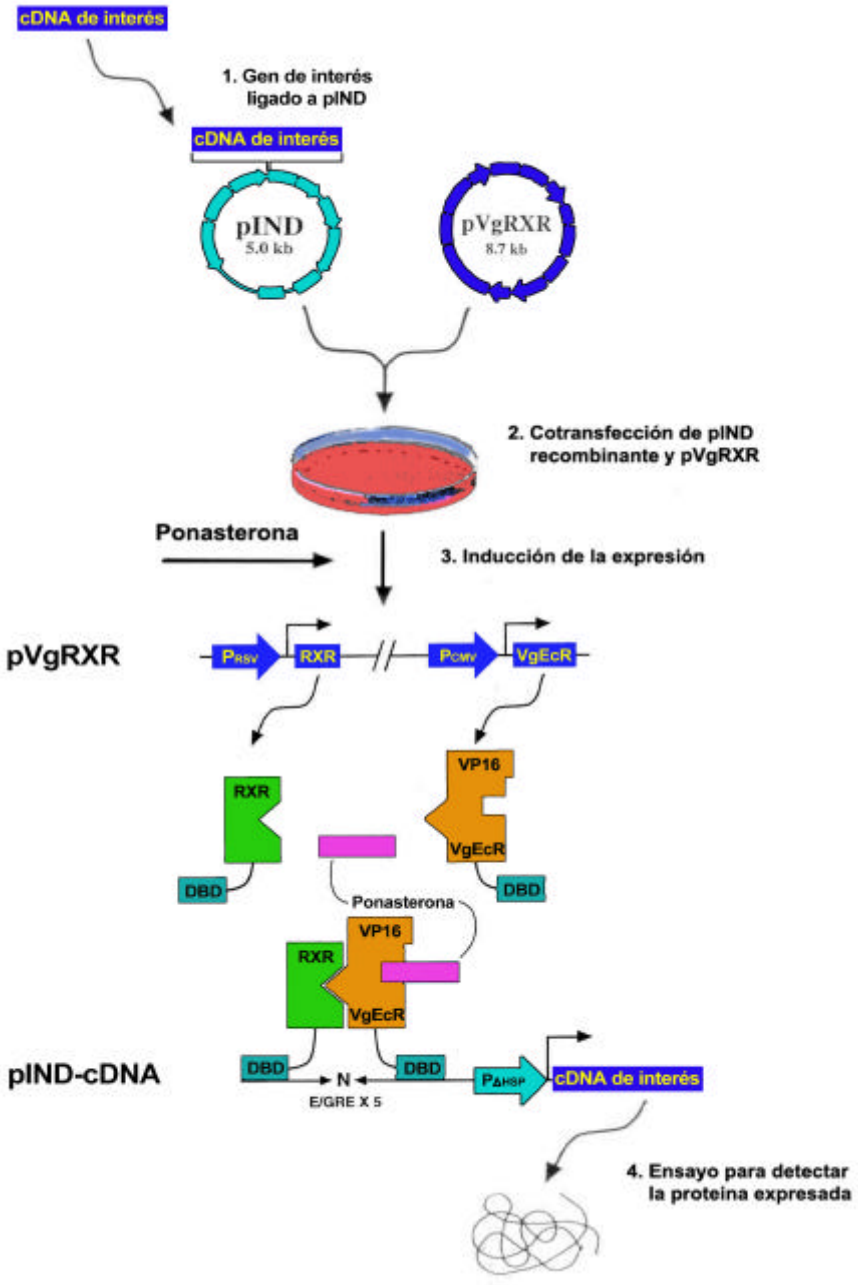

Figura 6: Esquema de la inducción de la expresión de proteínas por acción de la hormona ponasterona en el sistema pIND-pVgRXR. Adaptado de un catalogo de INVITROGEN.

En primera instancia se procedió al desarrollo de un clon estable de células CHO-K1 que exprese de manera constitutiva el receptor para ecdisona. Esto se logró mediante la transfección del vector pVgRXR a través del empleo de lipofectamina (liposoma catiónico). Luego de 48 hs. de incubación en medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino (SFB), se agregó el antibiótico zeocina (300 μg/μL), el cual actuó como marcador de selección. Luego de semanas de incubación en presencia de zeocina, se aislaron 7 clones resistentes al antibiótico, los cuales posteriormente debieron ser sometidos a un segundo estudio con el objeto de identificar aquellos clones que expresaron adecuadamente el receptor de ecdisona. A tal fin se analizó la capacidad adquirida en estos clones de promover un incremento en la expresión de la enzima Sial-T2-HA, luego de transfectar de manera transiente con el vector pIND-Sial-T2-HA e incubar las células en presencia y ausencia de ponasterona (2 μM) (análogo de ecdisona) durante 24 hs. De esta última selección se obtuvo un único clon positivo para la expresión del receptor de ecdisona (clon pvg7), ya que en este clon se observó un aumento en los niveles de expresión de Sial-T2-HA luego de incubar con ponasterona (Figura 7) con respecto a los niveles basales (síntesis de escape).

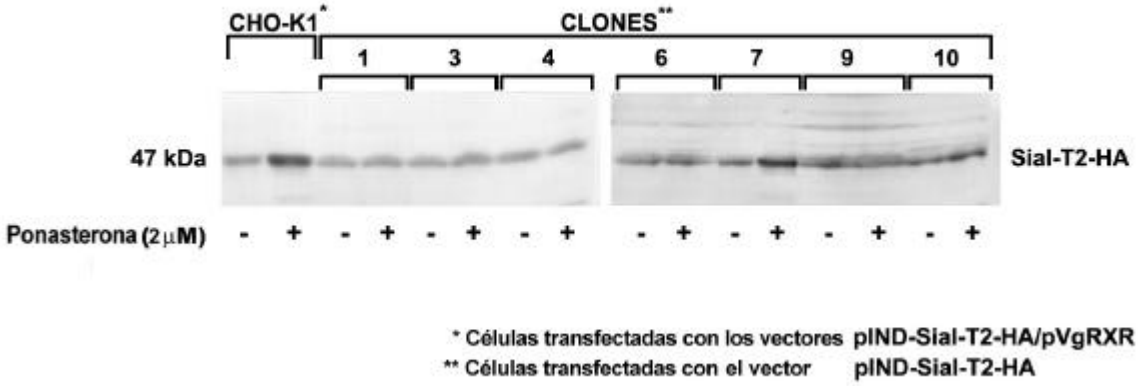

Figura 7: **Identificación de clones estables para el receptor de ecdisona.**
Western blot, revelado con anticuerpo anti-HA, de clones de células CHO-K1/pVgRXR, transfectados con pIND-Sial-T2-HA e incubados en presencia y ausencia de 2 μM ponasterona durante 24 hs. Se observa en el carril correspondiente al clon 7, un aumento de la expresión de Sial-T2-HA luego de estimular con Ponasterona. Este aumento en la expresión de la enzima Sial-T2-HA es comparable al encontrado en control positivo (CHO-K1*).

El siguiente paso en la generación del clon IST2A fue la transfección estable del clon pvg7 con el vector pIND-Sial-T2-HA, donde además de zeocina, se agregó

el antibiótico neomicina (1 mg/mL) como segundo marcador de selección. En este caso, se obtuvieron 7 clones resistentes a ambos antibióticos, los cuales fueron posteriormente incubados en presencia y ausencia de ponasterona 2 μM, con el fin de identificar, mediante inmunocitoquímica contra el epitope HA, aquellos clones que expresan la proteína Sial-T2-HA.

El resultado de este análisis, reveló que sólo tres de los 7 clones resistentes (clones 2, 4 y 5) expresan la enzima Sial-T2-HA (dato no mostrado) y que esta posee una ubicación perinuclear la cual colocaliza con la proteína residente de Golgi manosidasa II (Velasco y col., 1993) (Figura 8).

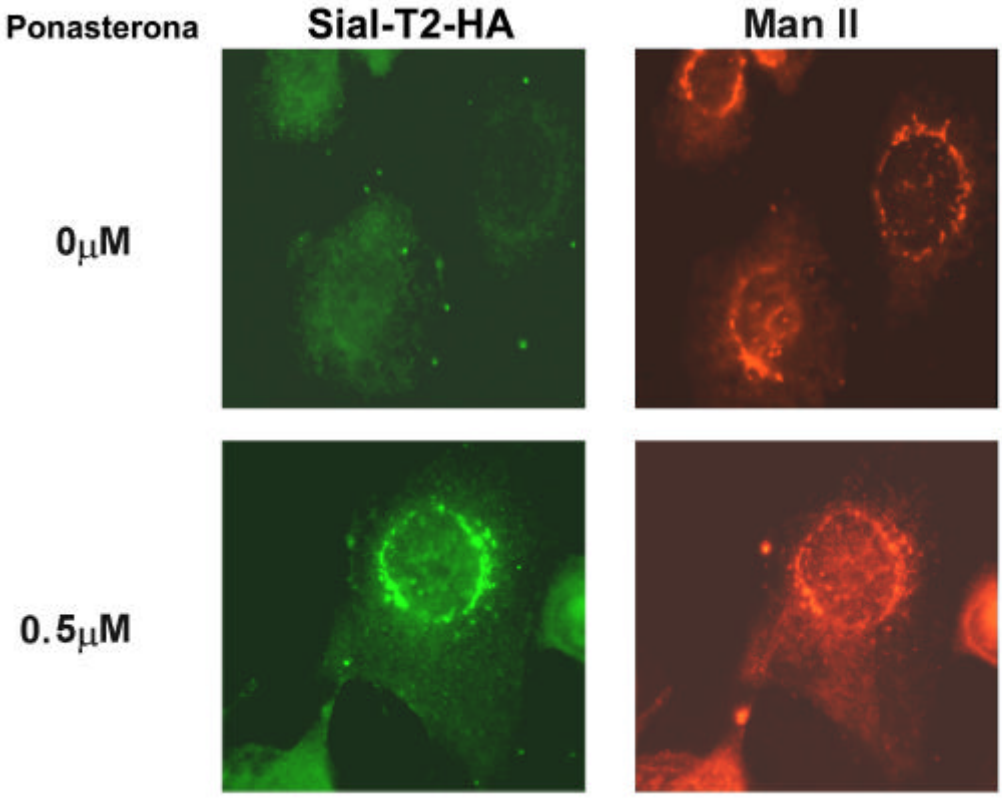

Figura 8: Análisis inmunocitoquímico de la expresión y localización subcelular de las proteinas Sial-T2-HA y Manosidasa II expresadas en el clon 2. La enzima Sial-T2-HA es detectada luego de la estimulación con ponasterona y posee una ubicación perinuclear que colocalisa con la proteína residente de Golgi manosidasa II.

De los tres clones que expresan en forma estable y regulada la proteína Sial-T2-HA, se eligió para seguir los estudios aquel que demostró poseer el mejor balance entre los niveles basales (sin inductor) y máximos de expresión logrados (Figura 9A). Esto se realizó por estudios de western blot que revelo que el clon 2 (llamado de ahora en más clon IST2A) presentaba mejor inducción por ponasterona. La Figu-

ra 9B muestra una curva de inducción en Sial-T2-HA a diferentes concentraciones de ponasterona.

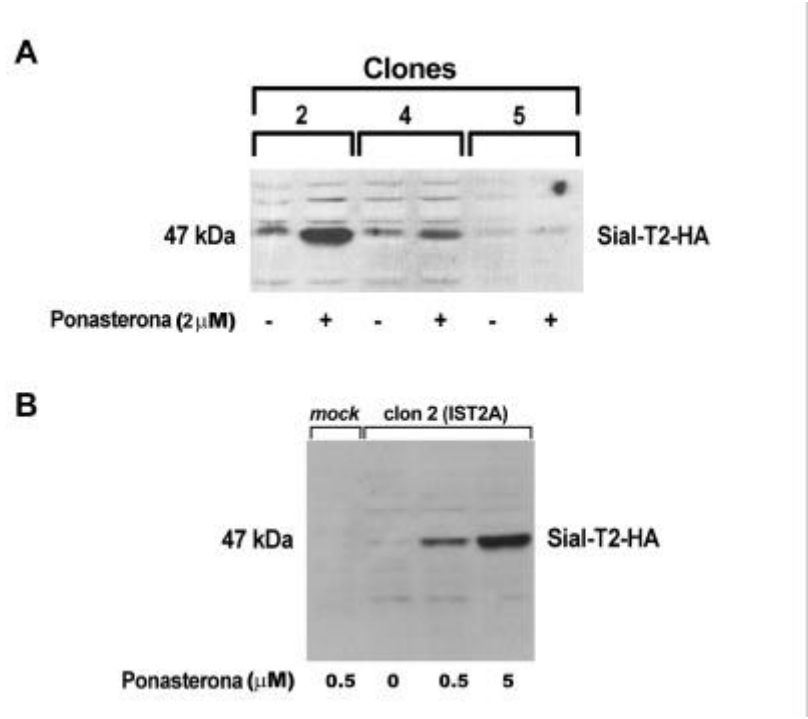

Figura 9: **Inducción de la expresión de Sial-T2-HA**.
Western blot revelado con anticuerpo anti-HA.
A) Células de los clones 2, 4 y 5 fueron incubadas en presencia o ausencia de 2 μM de ponasterona durante 24 hs y la expresion de Sial-T2-HA.
B) Inducción de la expresión de Sial-T2-HA en el clon 2 (IST2A) a diferentes concentraciones de ponasterona.

Originalmente, el clon IST2A fue desarrollado con el objeto de obtener un modelo donde la síntesis y expresión de gangliósidos pudiera ser regulada de una manera controlada, acorde a los niveles del inductor. Sin embargo, y aunque los niveles de actividad enzimáticas de Sial-T2-HA en presencia de inductor están en el orden de las actividades endógenas detectadas en cerebro y retina de pollo (Daniotti y col., 1997), los niveles de expresión existentes incluso en ausencia de inductor (síntesis de escape) poseen una actividad enzimática suficiente como para convertir aproximadamente el 50% del ganglíosido GM3 de la célula a ganglíosido GD3 (Figura 10). Esto último, aunque nos limitó la disponibilidad de regular de manera controlada la expresión de los gangliósidos sintetizados por la enzima Sial-T2-HA, nos permitió disponer de este clon como un modelo intermedio entre las células CHO-K1 originales que expresa sólo GM3 y el clon ST18, el cual expresa sólo GD3 y GT3.

Posteriormente, estos clones demostraron ser de gran utilidad en el desarrollo de otras líneas de investigación de nuestro laboratorio. El clon IST2A fue utilizado, gracias a sus niveles de expresión regulada, en el análisis de localización sub-Golgi de la proteína Sial-T2-HA en células CHO-K1 (Daniotti y col., 2000), mientras que el clon pvg7 fue empleado en el desarrollo de otro clon de células CHO-K1 que, en este caso, expresa de manera inducible la enzima Gal-T2-HA (clon IGT2) (Giraudo y col., 2001).

La caracterización de los glicolípidos expresados en las líneas celulares utilizadas se llevo a cabo mediante experimentos de marcación metabólica con [^{3}H]galactosa, según se describe en Materiales y Métodos. La Figura 10 muestra el resultado de una cromatografía en HPTLC de gangliósidos extraídos de células CHO-K1 salvajes, clon ST18, clon IST2A y clon 7, previamente marcados con 50 μCi de [^{3}H]galactosa durante un periodo de 12 hs.

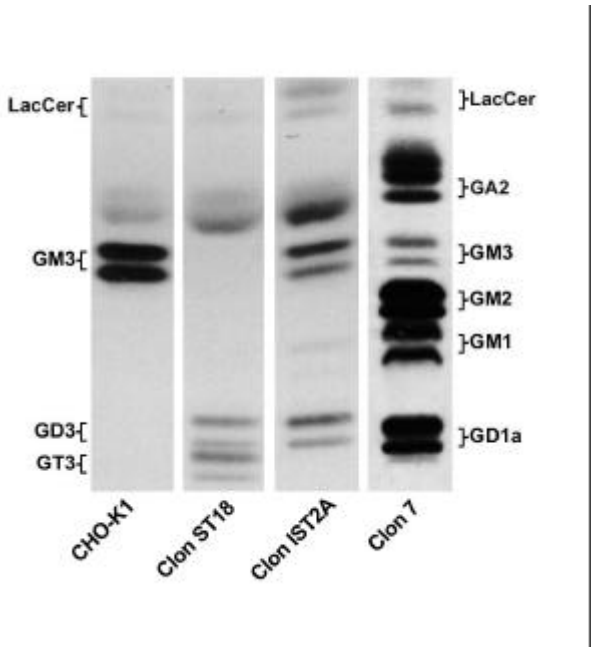

Figura 10: Radio-autografía proveniente de un marcado metabólico de glicolípidos en células CHO-K1 y clones establemente transfectados con los vectores de expresión que codifican para las enzimas ganglósido-glicosíltransferasas involucrada en la biosíntesis de los mismos. Estas células fueron incubadas en presencia de [^{3}H]galactosa durante un periodo de 12 hs., se extrajeron sus lípidos con solventes orgánicos y se separaron los mismos por cromatografía en HPTLC.

B) *Inhibición de la biosíntesis de gangliósidos*

Otro modelo utilizado para modificar la composición de gangliósidos consistió en la depleción de gangliósidos totales de la célula, mediante el empleo de un inhibi-

dor de la biosíntesis de los mismos. A tal fin, células CHO-K1 salvajes fueron cultivadas durante un período de 5 días en presencia de 2 μM del análogo de la ceramida d,1-threo-1-hexadecanolamino-3-pirrolidinpropano-1-ol, HCl (PPPP) el cual actúa como un inhibidor competitivo de la enzima UDP-glucosa:ceramida-glucosiltransferasa.

En la Figura 11 se aprecia el resultado de una cromatografía en HPTLC, revelada con orcinol, de un extracto de gangliósidos totales extraído de células CHO-K1 (tratadas y no tratadas con 2 μM de PPPP) con igual cantidad de proteínas. Los niveles de GM3 fueron cuantificados utilizando el programa *Scion Image* (Scion corp.). La cantidad de GM3 de la muestra control (CHO-K1, sin tratar con PPPP) fue tomada como el 100%. Mediante el uso del inhibidor se logró una reducción en los niveles de GM3 de aproximadamente un 95%. Los niveles de lactosilceramida fueron también drásticamente reducidos debido a que el inhibidor actúa directamente sobre la síntesis de su precursor inmediato glucosil-ceramida.

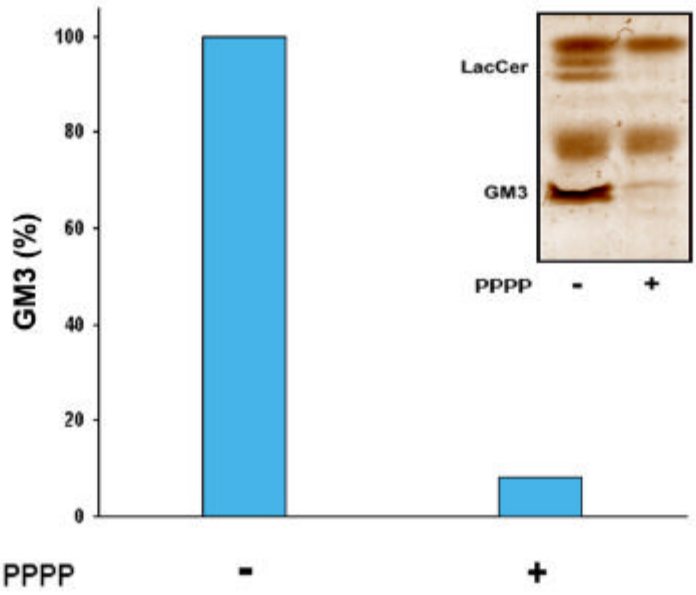

Figura 11: **Inhibición de la biosíntesis de gangliósidos en células CHO-K1.**
Los glicolípidos provenientes de células CHO-K1 (600 μg de proteínas) cultivadas durante 5 días en presencia y ausencia del inhibidor PPPP fueron analizados mediante cromatografía en HPTLC. Los glicolípidos fueron revelados con orcinol y las bandas fueron cuantificadas con el programa *Scion Image*.

Capitulo II

Expresión y caracterización funcional de EGFr y ERK

Expresión heteróloga de EGFr humano en células CHO-K1

Debido a que las células CHO-K1 carecen de la expresión endógena de EGFr (Ishii K y col., 1994), todos los experimentos en este trabajo fueron realizados en células transfectadas de manera transiente con un vector de expresión para EGFr de origen humano, a los fines de estudiar el comportamiento del mismo en las condiciones de expresión diferencial de gangliósidos detalladas anteriormente.

La mitad izquierda de la Figura 12, muestra los resultados obtenidos mediante análisis por *western blot* (revelado con anticuerpo anti-EGFr) de tres extractos celulares provenientes de igual número de cápsulas con células CHO-K1, cultivadas durante 24 hs. a 37ºC en medio sin suero fetal bovino (SFB). Dos de estas cápsulas fueron previamente transfectadas con el plásmido pLCNX-EGFr, en presencia o no de 30 nM de EGF humano (EGF) por un período de 5 minutos a 37ºC (según se describe en Materiales y Métodos). Solo las células CHO-K1 transfectadas mostraron una doble banda con un peso molecular aproximado de 160 kDa y 170 kDa, siendo este último correspondiente al peso molecular esperado para el EGFr (Carpenter y Cohen, 1990).

Con el objeto de analizar la funcionalidad de EGFr expresado, se lavó la membrana de nitrocelulosa con NaOH 1N para despegar los anticuerpos y proteína A peroxidasa del experimento anterior y se realizó un segundo *western blot* incubando con anticuerpo anti-fosfotirosina (PY-20) (Figura 12, derecha), el cual es capaz de unirse a los residuos fosforilados de tirosina de las proteínas en general y de EGFr en su estado activado en particular. El experimento reveló la presencia de una banda de 170 kDa localizada en el carril correspondiente al extracto de células CHO-K1 que expresan EGFr y que fueron estimuladas con EGF.

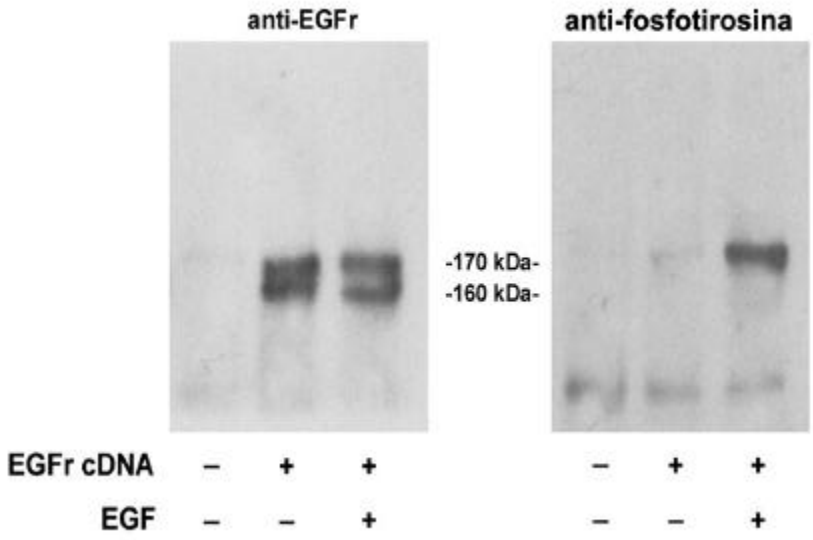

Figura 12: **Expresión y caracterización funcional de EGFr humano expresado en células CHO-K1.**
Western blot de extractos de células CHO-K1 salvajes y células CHO-K1 expresando EGFr humano (CHO-K1/EGFr), previamente incubados en presencia o ausencia de EGF. La misma membrana fue revelada primero con anticuerpo anti-EGFr (izquierda) y luego con anticuerpo anti-fosfotirosina (derecha).

Estos resultados nos permiten afirmar que la transfección de células CHO-K1 con el plásmido pLCNX-EGFr induce la expresión de una proteína de 170 kDa, revelada con anticuerpo anti-EGFr en análisis de inmunoblot, y que dicha proteína presenta fosforilación en residuos de tirosina postestimulación con EGF, a diferencia de la banda de 160 kDa la cual no presenta fosforilación en sus residuos de tirosina. Esto ultimo posiblemente se deba a que la cadena de EGFr de 160 kDa no esta disponible para interaccionar con su agonista. Para corroborar esta hipótesis, se tomaron cápsulas con células CHO-K1 que han expresado el receptor durante 24 hs. y se procedió a purificar las proteínas de membrana plasmática mediante el uso del reactivo EZ-link. Este reactivo impermeable posee en uno de sus extremos un grupo reactivo sulfo-NHS que le confiere la propiedad de unirse covalentemente a grupos amino libres presentes en las proteínas de la superficie celular, mientras que en el otro extremo posee un residuo de biotina el cual permite la purificación de la proteína por interacción con avidina unida a un soporte sólido. La Figura 13 muestra cómo el tratamiento con EZ-link de las células CHO-K1 que expresan EGFr es capaz de purificar sólo la banda de 170 kDa de EGFr.

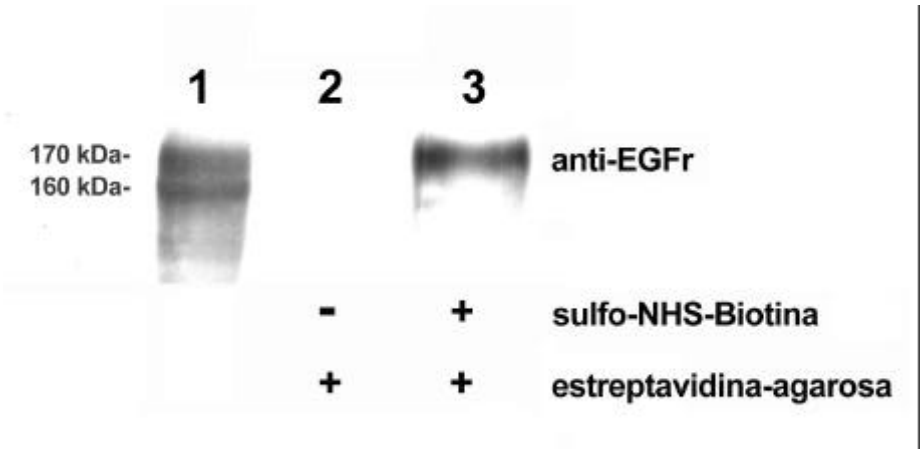

Figura 13: **Purificación de proteínas de membrana con EZ-link.**
Western blot proveniente de extracto total de células CHO-K1/EGFr (1) y dos extractos de células CHO-K1/EGFr incubadas en presencia de estreptavidina-agarosa, previamente tratados con (3) y sin (2) el reactivo EZ-link, la presencia de EGFr fue revelado con anticuerpo anti-EGFr.

Por otro lado, la Figura 14 muestra el efecto de la remoción los oligosacáridos unidos en residuos asparragina de la proteína sobre un extracto proveniente de células CHO-K1 que expresan EGFr por la enzima glicopeptidasa F. El tratamiento produce un cambio en el peso molecular de la banda de 170 kDa, a una por debajo de 160 kDa. Estos dos últimos resultados (Figuras 13 y 14) nos permiten afirmar que la proteína de 160 kDa corresponde a un EGFr parcialmente glicosilado (Carpenter y Cohen. 1990) que no tiene acceso a la membrana plasmática y por lo tanto no puede interaccionar con su agonista.

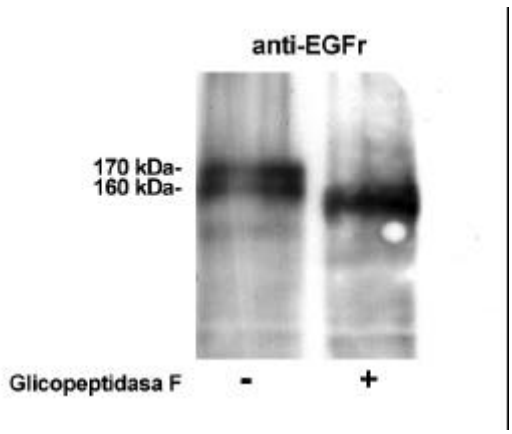

Figura 14: **Tratamiento con glicopeptidasa F.**
Extractos de células CHO-K1 que expresan EGFr fueron tratados o no con la enzima glicopeptidasa F, la presencia de EGFr fue analizada mediante Western blot con un anticuerpo anti-EGFr.

Expresión y caracterización funcional de ERK2-HA en células CHO-K1

Una de las vías utilizadas para evaluar la función de EGFr en células CHO-K1 es mediante el análisis de la actividad de algunos de los componentes de la cascada de transducción desencadenada por el receptor, como lo es la enzima ERK2 (ver Introducción).

Debido a que los niveles de expresión endógena de la enzima ERK2 en células CHO-K1 están al limite de la sensibilidad de los protocolos que disponíamos, decidimos sobreexpresar ERK2 heteróloga a partir de la transfección de células CHO-K1 con el plásmido pCDNAIII-MAPK-HA que contiene el cDNA que codifica para la proteína ERK2 fusionada al oligonucleótido HA (ERK2-HA) (Coso y col., 1995). El nucleótido HA fue utilizado para la expresión de un epitope para anticuerpos específicos.

La expresión de la enzima ERK2-HA fue evaluada mediante análisis de *western blot* en un extracto de células CHO-K1 transfectadas, en tanto que su caracterización funcional se concretó por medición de la actividad enzimática de ERK2-HA inmunoprecipitada, en presencia de [γ-^{32}P]ATP y proteína básica de mielina como sustrato exógeno.

Inmunoexpresión de ERK2-HA

ERK2-HA proveniente de células CHO-K1 transfectadas con pCDNAIII-MAPK-HA y cultivadas durante 24 hs. fue inmunoprecipitada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA (según se describe en Materiales y Métodos). El inmunocomplejo se separó por SDS/PAGE y posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para su posterior análisis mediante western blot.

La Figura 15A muestra cómo las células transfectadas con pCDNAIII-MAPK-HA expresaron una proteína de aproximadamente 42 kDa revelada con un anticuerpo anti-HA y que corresponde al peso molecular esperado para ERK2-HA.

La serina/treonina quinasa ERK2, en su estado inactivo se encuentra localizada en el citoplasma de la célula. La activación de esta quinasa causada por la fosforilación de treonina y tirosina en la secuencia treonina-glutámico-tirosina por acción de la quinasa dual MEK (ver Introducción), induce el desplazamiento de ERK hacia el núcleo de la célula, donde ejercerá su acción contribuyendo en la regulación de fac-

tores de transcripción involucrados en eventos como mitogénesis, diferenciación, supervivencia y migración (Denhardt, 1996; Fukuda y col., 1997; Garrington y Johnson, 1999). La Figura 15B muestra la localización intracelular de la proteína ERK2-HA en células CHO-K1 luego de haber sido transfectadas en medio libre de SFB y posteriormente estimuladas con 10 % de SFB durante 0 y 30 minutos. Se puede apreciar, cómo el estímulo con suero indujo la relocalización de la proteína ERK2-HA hacia el interior del núcleo de la célula.

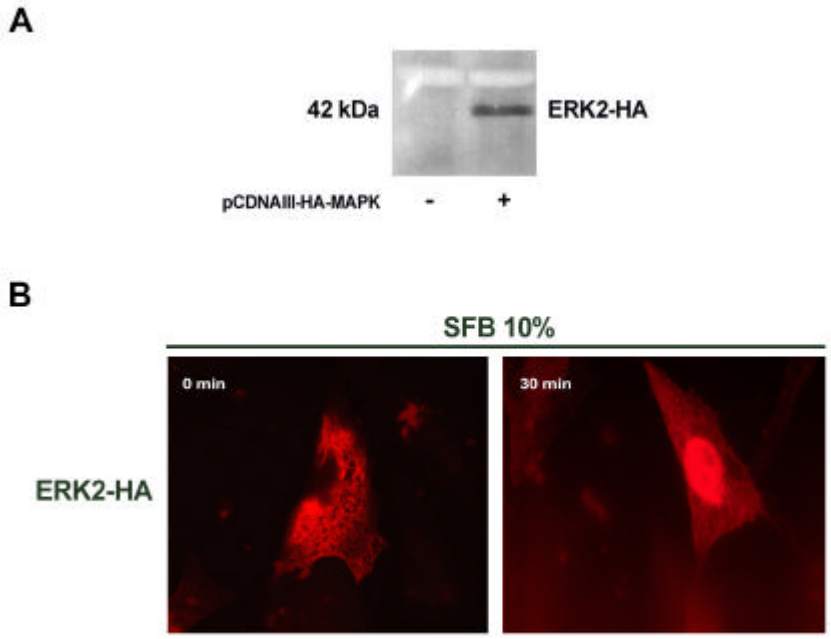

Figura 15: **Expresión y localización intracelular de la enzima ERK2-HA en células CHO-K1.** Extractos de células CHO-K1, transfectadas o no con el vector pCDNAIII-MAPK-HA, fueron resueltos en gel de poliacrilamida y ERK2-HA revelado por western blot con anticuerpo anti-HA (A). Células CHO-K1 transfectadas con el vector pCDNAIII-MAPK-HA, fueron cultivadas durante 12 hs. en medio libre de SFB antes de su estimulación con 10% de SFB durante 0 y 30 minutos. La localización subcelular de ERK2-HA fue analizada mediante inmunofluorescencia con anticuerpo anti-HA como anticuerpo primario y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado al fluoroforo rodamina como anticuerpo secundario (B).

Análisis de la actividad enzimática de ERK2-HA

La Figura 16 muestra el aumento de la actividad quinasa de la enzima ERK2-HA inmunoprecipitada de células CHO-K1, transfectadas y cultivadas en medio sin SFB durante 24 hs. El aumento fue significativo con respecto al nivel basal luego de estimular con 10 % de SFB a diferentes tiempos. La figura muestra claramente la cinética de activación de ERK2-HA, con un máximo a los 5 minutos.

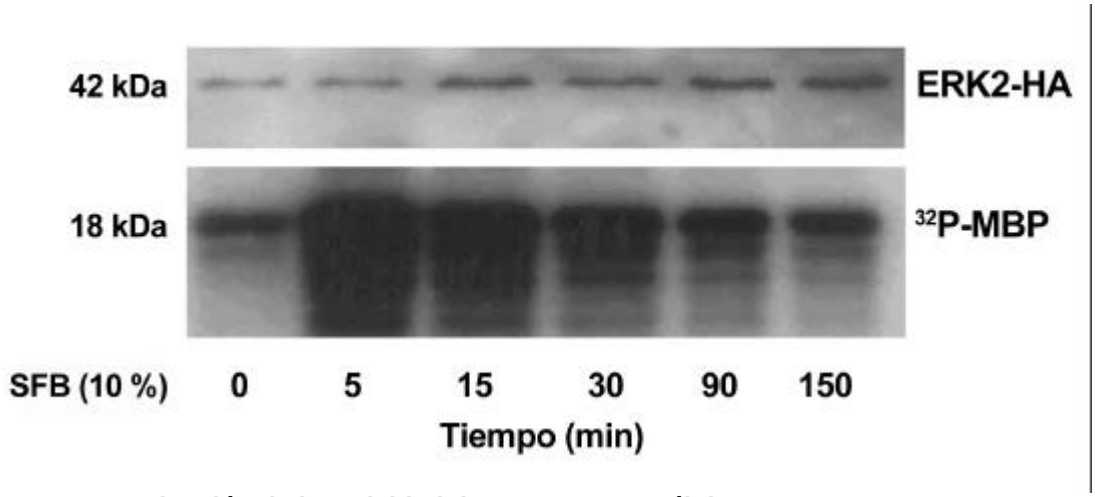

Figura 16: **Determinación de la actividad de ERK2-HA en células CHO-K1.**
Western blot (revelado con anticuerpo anti-HA) de diferentes extractos de células CHO-K1/ERK2-HA previamente estimuladas con 10 % de SFB a diferentes tiempos (parte superior). Radio-autografía de la proteína básica de mielina (sustrato de ERK2-HA) marcada con ^{32}P (parte inferior).

Los resultados obtenidos tanto en el experimento de inmunolocalización como en el de análisis de su actividad enzimática, nos permiten afirmar que la proteína ERK2-HA expresada en células CHO-K1 es funcional.

Activación de ERK2 mediante estimulación con EGF

Se procedió a realizar un experimento control donde se evaluó el aumento de la actividad relativa de la enzima ERK2-HA en función de la estimulación con EGF en células CHO-K1, con el objeto de poder utilizar la enzima ERK2-HA como un "sensor" de la actividad mediada por EGFr.

La Figura 17 muestra el resultado final de un análisis de actividad de ERK2-HA, en el cual células CHO-K1 que expresan ERK2-HA y/o EGFr, cultivadas en ausencia de SFB durante un periodo de 24 hs., fueron estimuladas con 30 nM de EGF o 10 % de SFB durante un periodo de 10 minutos. Tal como se puede apreciar en la figura, se observó un claro aumento de la actividad de la enzima ERK2-HA cuando las células que expresan EGFr y ERK2-HA fueron estimuladas con el agonista EGF.

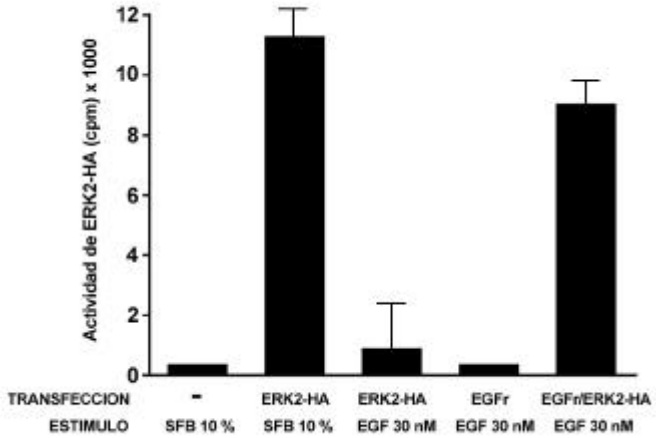

Figura 17: **Análisis de la activación de ERK2-HA postestimulación con EGF en células CHO-K1.**

Células CHO-K1 fueron transfectadas o no con los vectores de expresión para ERK2-HA y EGFr, se cultivaron 12 hs. en ausencia de SFB, y posteriormente fueron estimuladas con 10% de SFB o 30 nM de EGFr.

Fueron utilizados cantidades equivalentes de proteínas provenientes de los diferentes extractos celulares. En cada caso, la actividad de la enzima ERK2-HA se determinó por la incorporación de ^{32}P a la proteína básica de mielina.

En la Figura 18 se puede apreciar el resultado de un experimento dosis respuesta, donde se observó un aumento de la actividad de ERK2-HA, dependiente de la cantidad de EGF administrada.

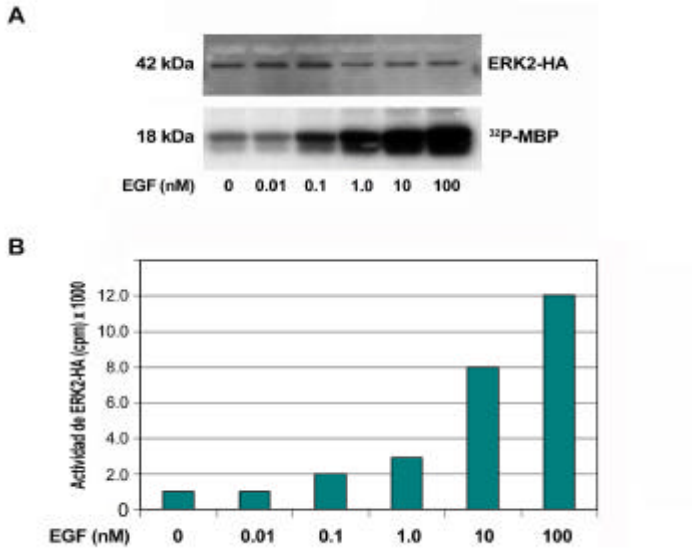

Figura 18: **Curva dosis respuesta de la activación de ERK2-HA inducida por EGF.**

Western blot (revelado con anticuerpo anti-HA) y Radio-autografía de la proteína básica de mielina de diferentes extractos de células CHO-K1/ERK2-HA, previamente estimuladas con dosis crecientes de EGF (A). La actividad de la ERK2-HA se determino según las cuentas por minuto (cpm) de ^{32}P incorporadas a la proteína básica de mielina (B).

De esta manera podemos afirmar que la enzima ERK2-HA, expresada en células CHO-K1, es activa y está acoplada a la cascada de transducción de señales desencadenada por la interacción de EGFr con su ligando agonista. En forma similar, EGFr humano expresado en células CHO-K1, sería capaz de interaccionar con los componentes endógenos presentes en células CHO-K1 y activar la vía Ras→Raf→MEK→ERK de transducción de señales.

Capitulo III

Actividad de EGFr expresado en células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos

Determinación de la función de EGFr mediante la activación de ERK2-HA, postestimulación con EGF

El estudio se realizó en células CHO-K1 salvajes, clon ST18, clon IST2A, clon 7 y células con bajos niveles de expresión de gangliósidos (CHO-K1 PPPP), las cuales expresaban de manera heteróloga las proteínas EGFr y ERK2-HA. Todas las células fueron cultivadas durante un periodo de 24 hs. en medio de cultivo con ausencia de SFB. Posteriormente, las células se estimularon con 1 nM de EGF durante 5 minutos, determinándose luego, la actividad de la enzima ERK2-HA en cada una de las condiciones estudiadas.

La Figura 19 muestra como la enzima ERK2-HA (postestimulación con EGF), presenta una significativa reducción de su actividad enzimática en aquellos clones que expresan en común el ganglósido GD3 (clon IST2A y clon ST18), comparados con la actividad de ERK2-HA en células CHO-K1 salvajes.

De la misma manera, se observó que la actividad enzimática de ERK2-HA, posterior al estímulo con EGF, no presentó cambios significativos cuando EGFr es expresado en presencia de los gangliósidos de la serie “a”: GM3, GM2, GM1 y GD1a (clon 7). Tampoco se encontraron cambios significativos en la activación de ERK2-HA luego de inhibir en un 95% la expresión del ganglósido GM3 y LacCer en células CHO-K1 salvajes (CHO-K1/PPPP).

Cinética de la activación de ERK-HA

Una posible causa de la disminución en la actividad de ERK2-HA en los clones ST18 y IST2A sería que merced al cambio en la composición de gangliósidos, se afecte de alguna manera la cinética de activación de ERK2-HA luego de estimular con EGF (Ji y col., 1995).

Con el objeto de corroborar esta hipótesis, se procedió a determinar la actividad de la enzima ERK2-HA en extractos de células CHO-K1 salvajes, clon ST18 y clon IST2A (todas expresando EGFr y ERK2-HA) estimuladas con EGF a diferentes periodos de tiempo.

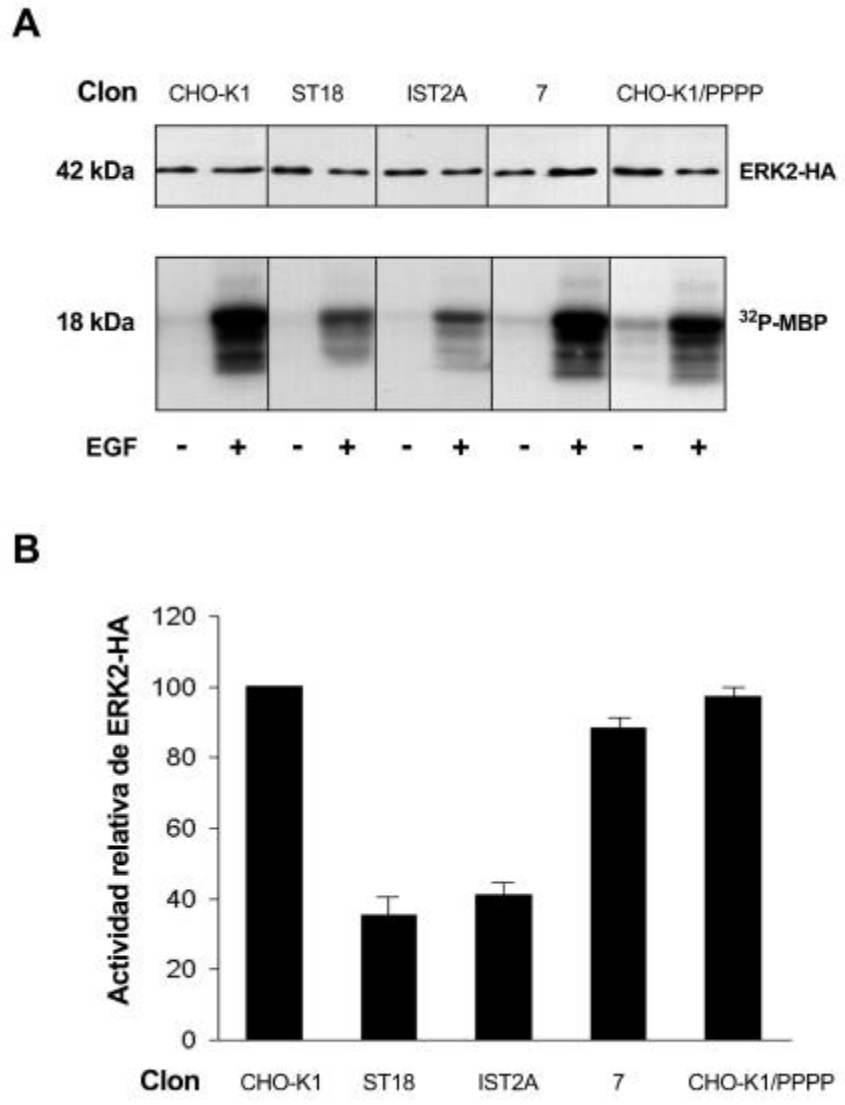

Figura 19: **Determinación de la actividad relativa de ERK2-HA postestimulación con EGF en células CHO-K1.**

Células CHO-K1, clon ST18, clon IST2A, clon 7 y células CHO-K1/PPPP (todas expresando EGFr y ERK2-HA), cultivadas durante 12 hs. en medio sin SFB, fueron estimuladas con EGF 1 nM durante un periodo de 10 minutos. ERK2-HA fue inmunoprecipitada y su actividad evaluada por la incorporación de ^{32}P a la proteína básica de mielina (A). La actividad de ERK2-HA en cada condición se determinó cuantificando la relación entre incorporación de ^{32}P a la proteína básica de mielina y los niveles de ERK2-HA expresada (B). La actividad relativa de ERK2-HA en células CHO-K1 salvajes fue arbitrariamente considerada como el 100%.

En la Figura 20 se puede ver como a pesar de las diferencias en los niveles de actividad, la cinética de activación de ERK2-HA fue semejante en todas las condiciones estudiadas.

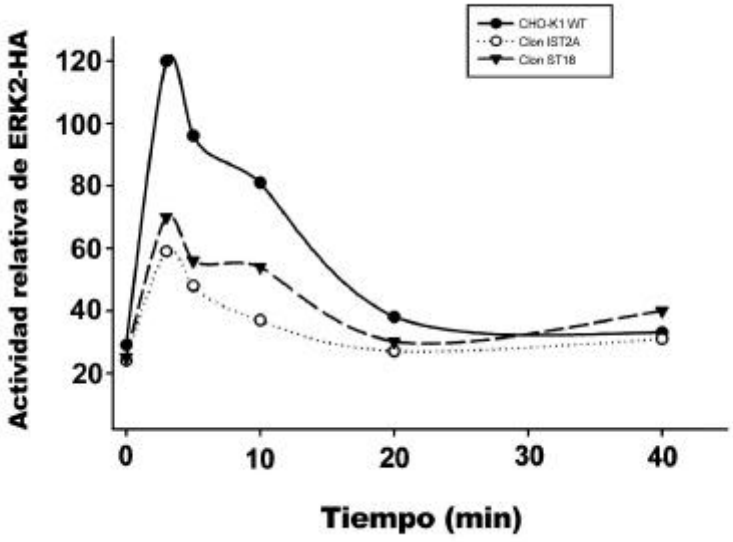

Figura 20: **Cinética de activación de ERK2-HA en células CHO-K1, clon ST18 y clon IST2A.** Se determinó la actividad de la enzima ERK2-HA en extractos de células CHO-K1 salvajes, clon ST18 y clon IST2A (todas expresando EGFr y ERK2-HA) previamente cultivadas 12 hs. en ausencia de SFB y estimuladas con EGF a diferentes periodos de tiempo.

Análisis de unión entre EGFr y EGF

Otra posible vía por la cual la actividad de ERK2-HA pueda verse reducida en los clones ST18 y IST2A sería consecuencia de una disminución de la afinidad existente entre EGFr y EGF, lo que llevaría a una reducción de la fracción de EGFr que está interaccionando con su ligando y por ende una reducción en la actividad del mismo. En la Figura 21 se ve el resultado de un análisis de unión agonista-receptor realizado en células CHO-K1 salvajes y clon ST18 que expresan EGFr, las cuales fueron cultivadas en presencia de [^{125}I]EGF. Se observa que el porcentaje de [^{125}I]EGF unido a EGFr en función de la concentración de [^{125}I]EGF libre es prácticamente la misma en ambas condiciones. La figura también presenta los valores de constante de disociación (kd) calculados para cada condición, donde no se observa una diferencia significativa entre los mismos.

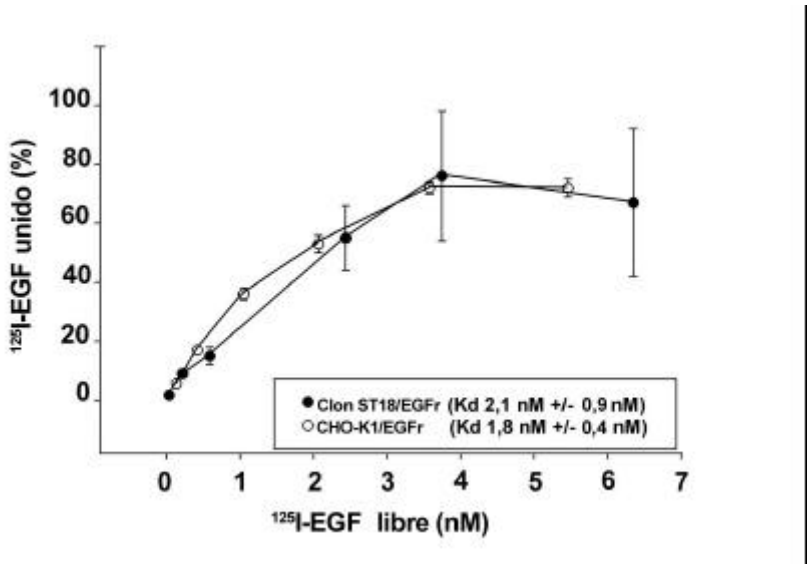

Figura 21: **Análisis de unión entre EGFr y EGF.**
Células CHO-K1 y clon ST18, expresando EGFr, fueron incubados con dosis crecientes de [^{125}I]EGF. Se determino la concentración de ligando libre con respecto al porcentaje de ligando unido al EGFr presente en la membrana plasmática y se calcularon las constantes de disociación de la unión EGFr-[^{125}I]EGF.

Autofosforilación de EGFr post-estimulación con EGF

Una disminución en actividad de ERK2-HA puede ser el resultado de una disminución en la actividad de EGFr o la de algunos de los componentes de la cascada de transducción de señales localizados entre ellos (Sasaoka y col., 1994; Fanger y col., 1997).

A fin de determinar esto, se tomaron células CHO-K1 salvajes, clon ST18 y clon IST2A que expresan EGFr, cultivadas durante 24 hs. en ausencia de SFB y posteriormente estimuladas con 100 nM de EGF durante 5, 10 y 20 minutos.

El grado de autofosforilación de EGFr, luego de ser estimulado con EGF se determino por *western blot* con anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20). La Figura 22 muestra como la intensidad de la banda correspondiente a la fracción de EGFr fosforilado en residuos de tirosina es significativamente inferior en los clones que expresan en común el ganglíosido GD3, con respecto a los niveles de EGFr fosforilado (P-EGFr) encontrados en células CHO-K1 salvajes y a cada uno de los tiempos estudiados. En cada caso se tomaron como referencia los niveles EGFr total, revelando en la misma membrana con anticuerpo anti-EGFr.

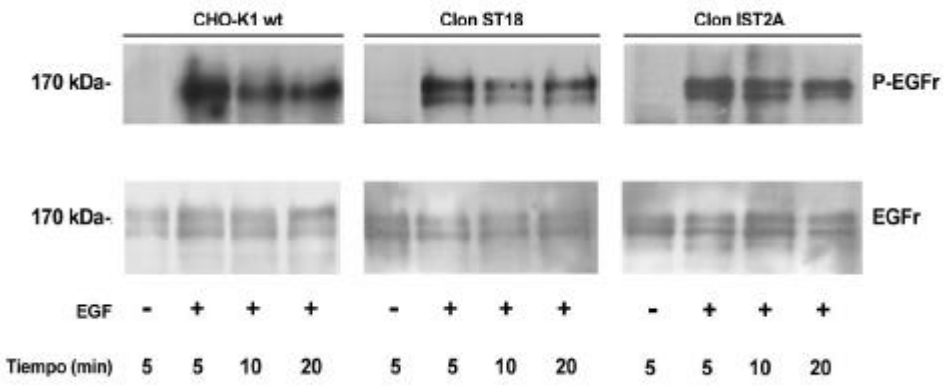

Figura 22: **Autofosforilación de EGFr pos estimulación con EGF.**
Células CHO-K1, clon ST18, clon IST2A (todas expresando EGFr y ERK2-HA), cultivadas en medio sin SFB durante 24 hs, fueron estimuladas con 100 nM EGF durante 5, 10 y 20 minutos. EGFr total se determinó por *western blot* con anticuerpo anti-EGFr (parte inferior), mientras que el EGFr fosforilado se determinó por western blot con anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20) (parte superior).

Podemos afirmar entonces que los clones provenientes de células CHO-K1 que tienen como punto en común la expresión del ganglíosido GD3 en su membrana plasmática (ST18 e IST2A), presentan una actividad disminuida de la enzima ERK2-HA en respuesta a la estimulación con EGF como consecuencia de una disminución en la actividad del propio receptor de EGF y, que merced a estudios realizados anteriormente, estas diferencias no pudieron ser atribuidas a cambios en la cinética de respuesta de ERK2-HA post-estimulación con EGF ni a una disminución de la afinidad de EGFr por su agonista.

Otra posibilidad que podría haber sido tomada en cuenta, considerando los resultados obtenidos en los clones ST18 e IST2A, es aquella relacionada con la disminución (presente en ambos clones) en el contenido del ganglíosido GM3. Sin embargo, las mediciones de activación de ERK2-HA obtenidos tanto en clon 7 como en células CHO-K1/PPPP indican que la disminución en el contenido del ganglíosido GM3 no es condición suficiente para lograr un efecto significativo en el sistema estudiado.

Actividad de ERK1/2 endógena post-estimulación con insulina

Un aspecto que merece ser considerado es el referido a la especificidad de la regulación de la actividad de EGFr ligada a la expresión del ganglíosido GD3. Dicho punto puede ser evaluado mediante el estudio del comportamiento de otros receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa. De esta manera si la disminución en la activación de EGFr asociada a la aparición del ganglíosido GD3 en los clones ST18 e IST2A es específico para este receptor, otros receptores de membrana perteneciente a la familia de los receptores membrana con actividad tirosina-quinasa no debería verse afectado de la misma manera ante las mismas circunstancias.

A los fines de corroborar esta hipótesis, se procedió a analizar el comportamiento del receptor de insulina (Ir), el cual es expresado de manera endógena en células CHO-K1 (Mamounas y col., 1991). Este receptor, al igual que EGFr, pertenece a la familia de receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa. Ir consiste en un hetero-tetrámero formado por dos subunidades α (de aproximadamente 135 kDa) unidas por puentes disulfuro a un dominio N-terminal de dos subunidades β (de aproximadamente 95 kDa). Las subunidades α son las responsables de la interacción con el ligando insulina, mientras que las subunidades β son responsables, gracias a un dominio transmembrana, de su localización en la membrana plasmática, a la vez que un dominio citoplasmático C-terminal le confiere, de manera similar que a EGFr, su actividad tirosina-quinasa (Perz y Torlifska, 2001).

La Figura 23 muestra dos *western blots* resultantes de un experimento en el que se midió las actividades de las enzimas ERK1/2 endógenas en células CHO-K1 salvajes y clon ST18, luego de estimular con dos diferentes dosis de insulina.

Si consideramos la actividad relativa de las enzimas ERK1/2 como la relación entre la cantidad de la enzima ERK1/2 fosforilada (reveladas con anticuerpo anti-P-ERK) y la cantidad de enzima total revelada con anticuerpo anti-ERK 1/2 (K 280), vemos que no existen diferencias apreciables en el grado de activación de ERK1/2 de CHO-K1 salvaje con respecto al clon ST18 luego de estimular con insulina.

Este último resultado sugiere que, al menos en esta particular condición de expresión de gangliósidos en células CHO-K1, no se afecta el comportamiento del receptor de insulina, confirmando la hipótesis de que el efecto encontrado para EGFr

no seria producto de un acontecimiento generalizado que podría afectar por igual a otros receptores tirosina-quinasa localizados en la membrana plasmática.

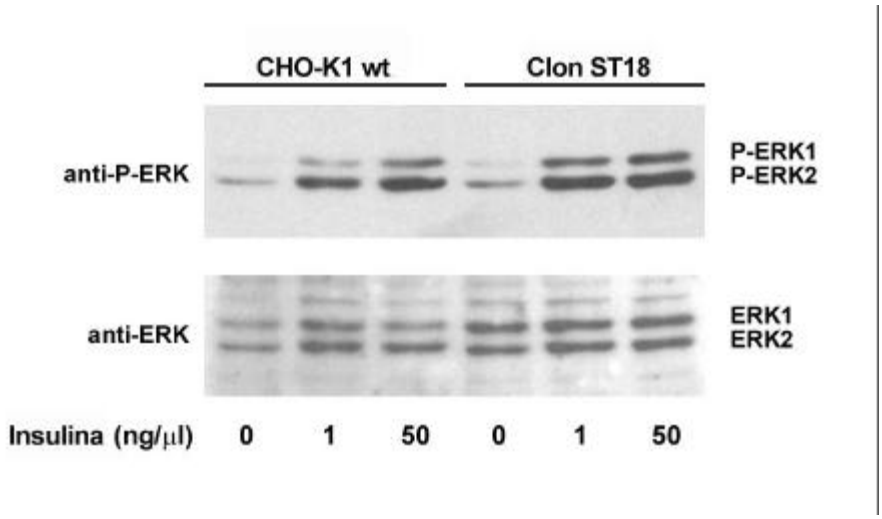

Figura 23: **Determinación de la actividad de ERK 1/2 endógenas en células CHO-K1 y clon ST18 postestimulación con insulina.**

Células CHO-K1 y clon ST18, fueron cultivadas 12hs. en ausencia de SFB y posteriormente estimuladas con diferentes dosis de insulina. La aparición de P-ERK 1/2 se determino por *western blot* con anticuerpo anti-P-ERK (parte superior), mientras que ERK2 1/2 total se determinó, sobre la misma membrana, con anticuerpo anti-ERK (K280) (parte inferior).

Capitulo IV

Análisis de la localización de EGFr humano en membrana plasmática de células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos

Lisis de células CHO-K1 con detergente no iónico y centrifugación en gradiente continuo de sucrosa

Células CHO-K1 cultivadas durante 24 hs. fueron sometidas a un tratamiento de lisis con el detergente no iónico Tritón X-100 al 1 % (p/v) a 4ºC y durante 60 minutos. Seguidamente, el extracto fue colocado en la superficie de un gradiente de sucrosa (5-30% p/v) para luego ser centrifugado durante 12 hs. a 125.000 g, según se describe en Materiales y Métodos

La Figura 24A muestra la distribución de proteínas totales provenientes de un extracto de células CHO-K1 a lo largo de 12 fracciones obtenidas en un gradiente continuo de sucrosa luego de centrifugar a 125.000 g. Mientras que la Figura 24B muestra la concentración de sucrosa promedio de cada fracción recolectada.

Estos experimentos de control fueron realizados numerosas veces a fin de garantizar la reproducibilidad de los mismos.

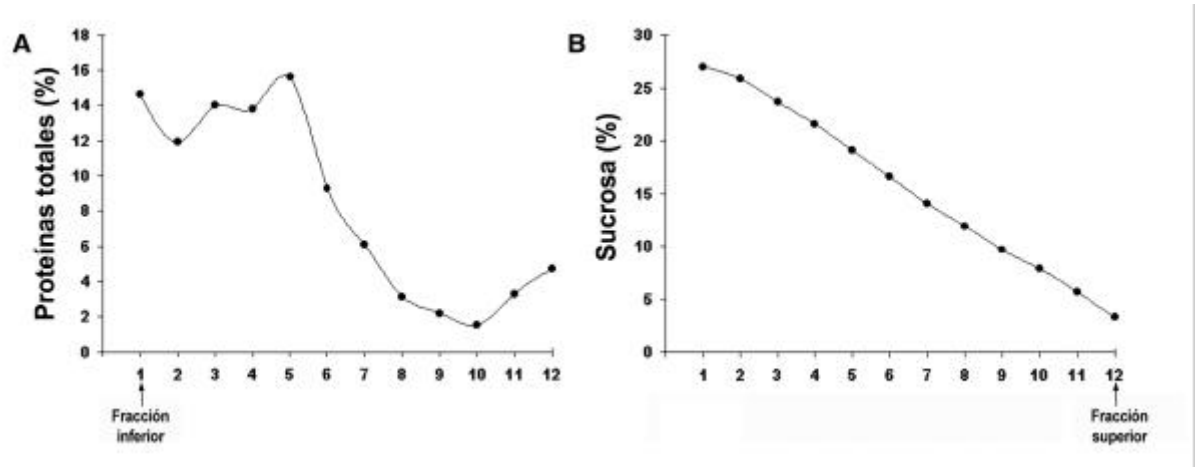

Figura 24: **Gradiente continuo de sucrosa**.

Un extracto de células CHO-K1 generado por la incubación de las mismas en presencia de Tritón X-100 a 4ºC, fue centrifugado a 125.000g en un gradiente continuo de sucrosa y se colectaron 12 fracciones. Las proteínas de cada fracción se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirieron electroforeticamente a una membrana de nitrocelulosa y se cuantificaron por tinción con el colorante Ponceau S (A). La concentración de sucrosa de cada fracción se determino según el índice de refracción de cada muestra (B).

Localización de proteínas marcadoras en la membrana plasmática de células con expresión diferencial de gangliósidos.

Cuando las proteínas de membrana se encuentran localizadas en una región o dominio insoluble a detergentes no iónicos, como Tritón-X-100, estas proteínas quedan asociadas a las vesículas provenientes de su entorno lipídico, las cuales debido a su baja densidad tienen la facultad de flotar en un gradiente de sucrosa. Por el contrario, aquellas proteínas que son excluídas de estos microdominios son solubilizadas completamente luego del tratamiento con el detergente y tienden a distribuirse en las regiones más densas de un gradiente de sucrosa, dependiendo de su coeficiente de sedimentación. En el presente trabajo, dispusimos de vectores de expresión que codifican para las proteínas GAP-43, GPI-YFP y VSVG-YFP. La proteína GAP-43 localizada principalmente en los conos de crecimiento axonal de neuronas en desarrollo o en regeneración. GAP-43 corresponde a una proteína que, si bien es sintetiza en el citoplasma de la célula, mediante la incorporación de dos residuos de palmitato en las cisteínas 3 y 4 de la misma adquiere la propiedad de anclarse a membrana, preferentemente en microdominios resistentes al tratamiento con detergentes no iónicos (*rafts*) (Arni y col., 1998). Por otro lado, la proteína GPI-YFP corresponde a una quimera desarrollada por la fusión entre el segmento que confiere unión a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI), una secuencia consenso de N-glicosilación y la secuencia que codifica para la proteína fluorescente amarilla (YFP) (Keller y col., 2001). Esta proteína de membrana, sintetizada en el retículo endoplasmático y transportada vía complejo de Golgi hacia la membrana plasmática, adquiere la propiedad de anclarse a las mismas mediante la incorporación de una molécula de GPI en su carboxilo terminal (Amthauer y col., 1993). Tal como se describió con otras proteínas ancladas a membrana vía GPI (Brown y Rose, 1992; Schroeder y col., 1998; Kasahara y col., 2000), GPI-YFP se encuentra enriquecida en microdominios *rafts*. Finalmente, la proteína VSVG-YFP corresponde a una proteína transmembrana quimérica formada por las secuencias que codifica para la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSVG) y la proteína fluorescente amarilla (YFP) (Keller y col., 2001). Esta proteína ha sido descripta fuera de microdominios *rafts* y por lo tanto fue empleada como un marcador negativo de los mismos.

De esta manera, la disponibilidad de proteínas cuya inclusión o exclusión en microdominios *rafts* es conocida, resulta de gran utilidad en el estudio del comporta-

miento de estas y de otras proteínas de membrana ante circunstancias que puedan alterar la naturaleza del microdominio en cuestión como, por ejemplo, alteraciones en la composición de gangliósidos (ver Introducción).

En el siguiente experimento, se procedió a caracterizar la localización, en gradiente continuo de sucrosa, de las proteínas marcadoras descriptas. La Figura 25 muestra la distribución por gradiente de sucrosa de las proteínas de membrana: GAP-43, GPI-YFP y VSVG-YFP, expresadas en células CHO-K1. Tal como ha sido descrito, tanto GAP-43 como GPI-YFP, proveniente de células CHO-K1 transfectadas con el plásmido pCR3.1-GAP-43 y pEYFP-GPI-YFP respectivamente, se distribuyen en la mitad superior del gradiente, lo que correlaciona con la localización de estas proteínas en la fracción de membrana insoluble en detergente o microdominios *rafts* (Arni y col., 1998; McCabe y Berthiaume, 2001). Por el contrario, la proteína VSVG-YFP se encuentra distribuida en las fracciones más densas del gradiente, correspondiente al comportamiento de una proteína soluble al tratamiento con detergente (Keller y col., 2001). Recientemente hemos demostrado que el cambio en la composición de gangliósidos no altera la distribución de GAP-43, VSVG-YFP y GPY-YFP, analizadas en gradiente continuo de sucrosa (Crespo y col., 2002).

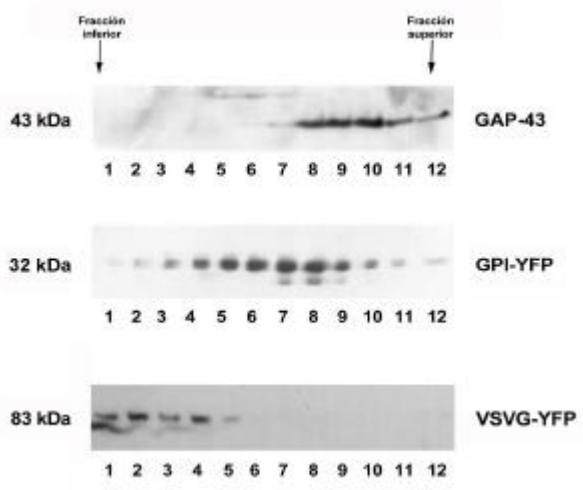

Figura 25: **Distribución en gradiente continuo de sucrosa de las proteínas marcadora GAP-43, GPI-YFP y VSVG-YFP.**
Células CHO-K1 expresando GAP-43, GPI-YFP y VSVG-YFP respectivamente, fueron incubadas con Tritón X-100 a 4ºC y centrifugadas un gradiente continuo de sucrosa. La distribución de las proteínas en las fracciones colectadas se detectó mediante *western blot* con anticuerpos específicos.

Localización de EGFr en la membrana plasmática de células con expresión diferencial de gangliósidos.

Decidimos analizar si el cambio en la composición de gangliósidos endógenos en células CHO-K1 altera la distribución de EGFr en membrana plasmática, analizado mediante centrifugación en gradiente continuo de sucrosa. Para tal fin, células CHO-K1 salvajes, clon ST18, clon IST2A, clon 7 y células CHO-K1 tratadas con PPPP (todas ellas expresando EGFr), fueron cultivadas durante un periodo de 24 hs. para ser luego tratadas con Tritón X-100 a 4ºC y posteriormente los extractos resultantes fueron centrifugados en un gradiente continuo de sucrosa (5-30% p/v).

La Figura 26 muestra la distribución de EGFr, analizado por *western blot,* en 12 fracciones provenientes del gradiente continuo de sucrosa correspondiente a cada condición. Como se puede observar, EGFr tiene una distribución correspondiente a una proteína soluble al tratamiento con detergente en todas las condiciones estudiadas, similar a lo encontrado la proteína VSVG-YFP y claramente diferente al patrón obtenido para GAP-43 y GPY-YFP (ver Figura 25).

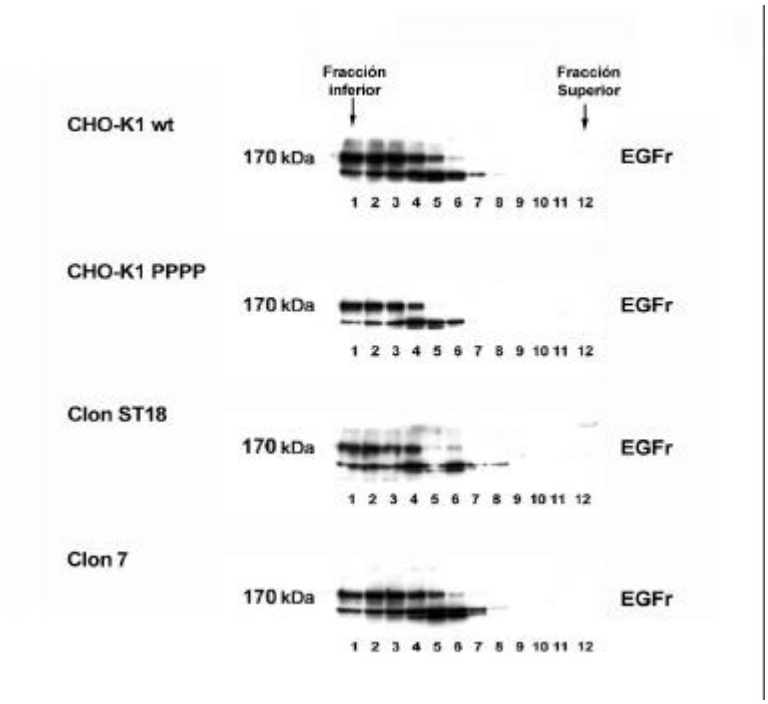

Figura 26: **Distribución de EGFr en gradiente continuo de sucrosa**
Análisis de la distribución de EGFr, en gradiente de sucrosa, expresado en células CHO-K1, clones con expresión diferencial de gangliósidos y células CHO-K1/PPPP. La presencia de EGFr se detectó mediante *western blot* con anticuerpo anti-EGFr. La señal de menor peso molecular corrsponde a una marcación inespecífica.

Con el objeto de corroborar estos resultados, utilizamos otros dos criterios para el análisis de proteína perteneciente a microdominios *rafts*: 1) Solubilidad a tratamiento con Tritón X-100; 2) análisis de dominios de proteínas localizadas en la membrana plasmática mediante *cross-linking*.

Solubilidad de EGFr por tratamiento con Tritón X-100

La Figura 27 A y B muestra los resultados de dos *western blots* correspondientes a la fracción soluble e insoluble de dos extractos provenientes de células CHO-K1 que expresan las proteínas GPI-YFP y VSVG-YFP, previamente tratadas con Tritón X-100 y centrifugadas a 100.000 g según se describe en Materiales y Métodos. En este experimento, a diferencia de la centrifugación en gradiente de sucrosa, la fracción de membrana insoluble al detergente tiende a formar un precipitado junto con las proteínas integrantes de la misma.

Como podemos observar, la proteína GPI-YFP, presenta un porcentaje significativo de la misma en el precipitado del extracto centrifugado, indicando un comportamiento típico de proteínas presentes en microdominios *rafts* (Figura 27A). Mientras que bajo las mismas condiciones, la proteína VSVG-YFP la cual como fue descrito corresponde a una proteína soluble al tratamiento con detergentes, muestra una casi total localización en la fracción soluble del extracto centrifugado (Figura 27B). La Figura 27C muestra el resultado de un *western blot* de las fracciones soluble e insoluble correspondientes a un extracto de células CHO-K1 salvajes que expresan EGFr, encontrándose que este, al igual que VSVG-YFP, se localiza principalmente en la fracción soluble.

La presencia de EGFr en la fracción soluble del extracto centrifugado luego de tratar la célula con Tritón X-100, indica que este se encontraba localizado en una fracción de membrana de células CHO-K1 la cual no pertenece a dominios *rafts*. Esto último concuerda con el resultado obtenido en el experimento de gradiente continuo de sucrosa.

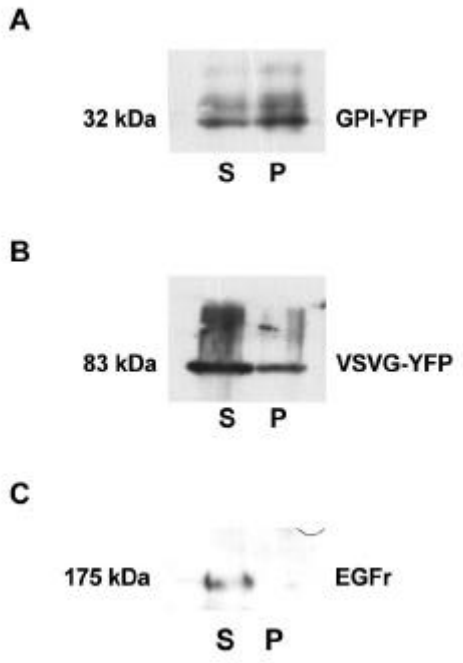

Figura 27: **Solubilidad al tratamiento con Tritón X-100.**

Análisis mediante *western blot* de la expresión de GPI-YFP, VSVG-YFP y EGFr en los sobrenadantes (S) y precipitados (P). Extractos de células CHO-K1/GPI-YFP (A), CHO-K1/VSVG-YFP (B) y CHO-K1/EGFr (C) fueron sometidos a tratamiento con 1% de Tritón X-100 durante a 4ºC y posteriormente centrifugados 1 h a 100.000 g.

Análisis de la presencia de EGFr en dominios de la membrana plasmática. Ensayo de cross-linking

Un ensayo de *cross-linking* pretende estimar el grado de proximidad lateral que existen entre dos proteínas, que en este caso, se encontrarían localizadas en la membrana plasmática. Suponiendo que dos proteínas de membrana se encuentran en promedio más próximas unas de otras cuando están confinadas en un microdominio (debido a una restricción del espacio disponible para desplazarse libremente), que cuando están distribuidas homogéneamente a lo largo de toda la membrana plasmática, el porcentaje de *cross-linking* de una proteína nos da una idea de la distribución de la misma a lo largo de la membrana plasmática (Friedrichson y Kurzchalia, 1998).

Para este fin, se dispuso del reactivo bifuncional BS^3, el cual es capaz de enlazar dos proteínas que se encuentran en promedio a una distancia no mayor a 11,4Å. Este reactivo es incapaz de atravesar la membrana plasmática, por lo tanto solo reaccionará con proteínas de membranas que posean dominios extracelulares.

El análisis de *cross-linking s*e realizó en células CHO-K1 salvajes cultivadas durante 48 hs. expresando EGFr, VSVG-YFP y GPI-YFP. La Figura 28 muestra los resultados de tres *western blots* provenientes de las tres condiciones mencionadas y tratados previamente en presencia y ausencia de BS^3. Como se puede observar en la Figura 28A, la reacción de la proteína GPI-YFP expresada en células CHO-K1, con el reactivo BS^3 se manifiesta con la aparición de dos bandas de alto peso molecular en el *western blot*. Estas bandas corresponden a la formación de dímeros (75 kDa) y oligomeros (400 kDa) de proteínas GPI-YFP, las cuales en suma representan aproximadamente el 50% de la GPI-YFP total expresada en la célula (Tabla 2), indicando que este porcentaje de proteínas GPI-YFP se encuentra a una distancia menor o igual a 11,4 Å. Por otro lado, la Figura 28B muestra el resultado del análisis de *cross-linking* realizado sobre células CHO-K1 que expresan la proteína VSVG-YFP, donde se puede ver que sólo una fracción de aproximadamente el 10% de la proteína fue capaz de formar dímeros (170 kDa) consigo misma, mientras que la presencia de bandas de mayor peso molecular fue inexistente, indicando que aproximadamente el 90% de la proteína VSVG-YFP se encuentra a una distancia promedio mayor o igual a 11,4 Å,. Finalmente, de manera similar al resultado obtenido para VSVG-YFP, el *western blot* correspondiente al análisis de *cross-linking* de EGFr expresado en células CHO-K1 indica también que solo una pequeña fracción de EGFr es capaz de formar dímeros (≅ 340 kDa).

Del análisis de estos resultados surge que EGFr expresado en células CHO-K1, al igual que la proteína VSVG-YFP, poseen una distribución más homogénea a lo largo de la membrana plasmática de células CHO-K1 que la proteína GPI-YFP, indicando la ausencia de restricciones de espacio esperadas para una proteína localizada en un microdominio de membrana. Recientemente un experimento realizado sobre células CHO-K1 que expresan la proteína GPI-YFP, demostró que el porcentaje de proteínas que tienden a formar dímeros u oligómeros no es afectado por diferencias en los niveles de expresión de la misma (Crespo y col., 2002).

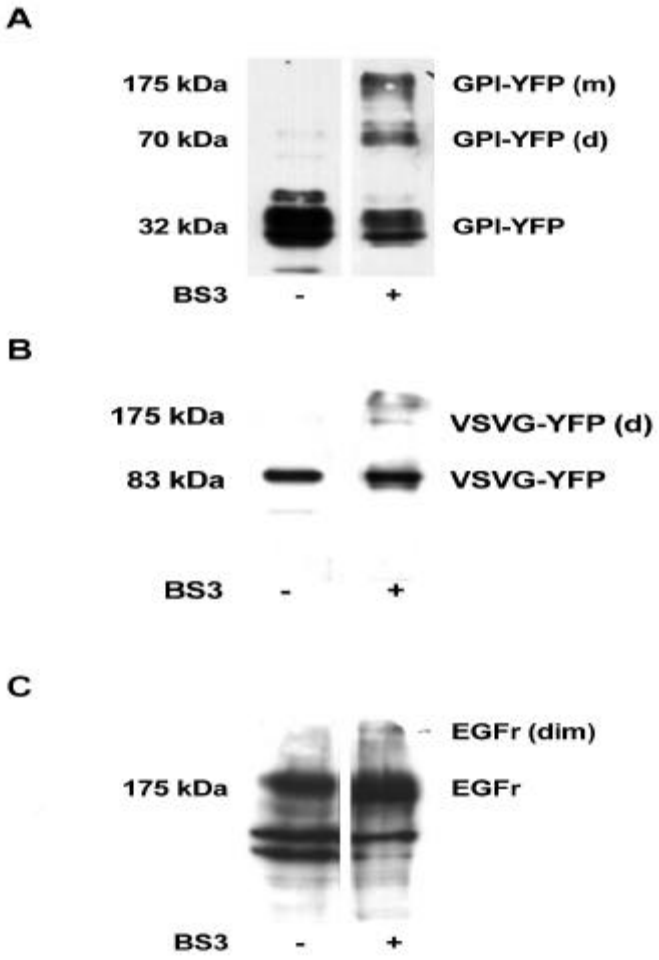

Figura 28: **Análisis de *cross-linking* de EGFr expresado en células CHO-K1**
Células CHO-K1 que expresan GPI-YFP (A), VSVG-YFP (B) y EGFr (C) fueron sometidas a tratamiento de cross-linking con el reactivo BS^3. La detección de los dímeros (dim) y oligomeros (olig) de proteínas formados se realizó mediante *western blot* utilizando anticuerpos específicos para cada proteína.

Proteína	Monomero (%)	Dímeros (%)	Oligomeros (%)	Eficiencia (%)
GPI-YFP	**53**	**26**	**21**	**47**
VSVG-YFP	**90**	**10**	**n/d**	**10**
EGFr	**95**	**5**	**n/d**	**5**

Tabla 2: Cuantificación mediante análisis densitométrico del porcentaje de *cross-linking* de las proteínas GPI-YFP, VSVG-YFP y EGFR expresadas en células CHO-K1. n/d=no detectado.

El análisis en conjunto de los resultados obtenidos en este Capítulo avala la hipótesis de que EGFr expresado en células CHO-K1 está localizado fuera de la fracción de membrana insoluble en detergente, lo cual corresponde a microdominios lipídicos *rafts*.

Distribución de gangliósidos en gradiente continuo de sucrosa

Con el objeto de poder encontrar algún indicio que nos permita deducir la naturaleza de los resultados obtenidos en el capitulo III, decidimos evaluar la posible existencia de algún tipo de asociación entre el ganglíosido GD3 y EGFr expresados en clon ST18.

Para tal fin, se tomaron células CHO-K1 y clon ST18 cultivadas en presencia de [^{3}H]galactosa durante 24 hs. para ser luego tratadas con 1% de Tritón X-100 a 4ºC, centrifugando el extracto resultante en un gradiente continuo de sucrosa 5-30% (p/v) durante 10 hs según se describe en Materiales y Métodos.

La Figura 29 muestra dos radio-autografías, cada una proveniente de una cromatografía de HPTLC de los gangliósidos purificados de 12 fracciones colectadas del gradiente continuo de sucrosa de las células CHO-K1 (arriba) y del clon ST18 (abajo)*. En cada caso, las especies de gangliósidos presentes en el gradiente fueron cotejadas con testigos procedentes de un marcado metabólico de células CHO-K1 y clon ST18, corridos en forma paralela en la misma placa de HPTLC.

Como se puede observar en la parte superior de la Figura 29, más del 90% del ganglíosido GM3 procedentes de las células CHO-K1 fue encontrado en las fracciones de menor densidad (principalmente en la fracción 10), mientras que el 10% restante se redistribuye de manera más o menos homogénea a lo largo de las fracciones más densas del gradiente. De manera similar a GM3, y a excepción de un 13 % localizado en la fracción 5, más del 68% del los gangliósidos GD3 y GT3 provenientes del clon 18 se localizan principalmente en las fracciones menos densas del gradiente (10,11 y 12).

Claramente estos resultados muestran que la distribución de los gangliósidos provenientes tanto de células CHO-K1 como de clon ST18 es diferente a la de EGFr expresado en las mismas células (ver Figura 26). Además, sugiere que ambas especies se encontrarían localizadas en dominios diferentes de la membrana plasmática y por ende existen pocas probabilidades de interacción entre ellas. Esto último expli-

* Realizado con la valiosa colaboración de la **Bióloga Pilar María Crespo**

caría, además, los intentos fallidos de co-inmunoprecipitar EGFr con el ganglósido GD3, realizados con anterioridad sobre células de clon ST18 expresando EGFr. Para ello se emplearon tanto el anticuerpo anti-GD3 (R-24) con el objeto de intentar arrastrar EGFr, o de manera inversa, mediante el uso de anticuerpo anti-EGFr en células de clon ST18, incubadas primeramente con [^{3}H]galactosa para marcar GD3 (datos no mostrados).

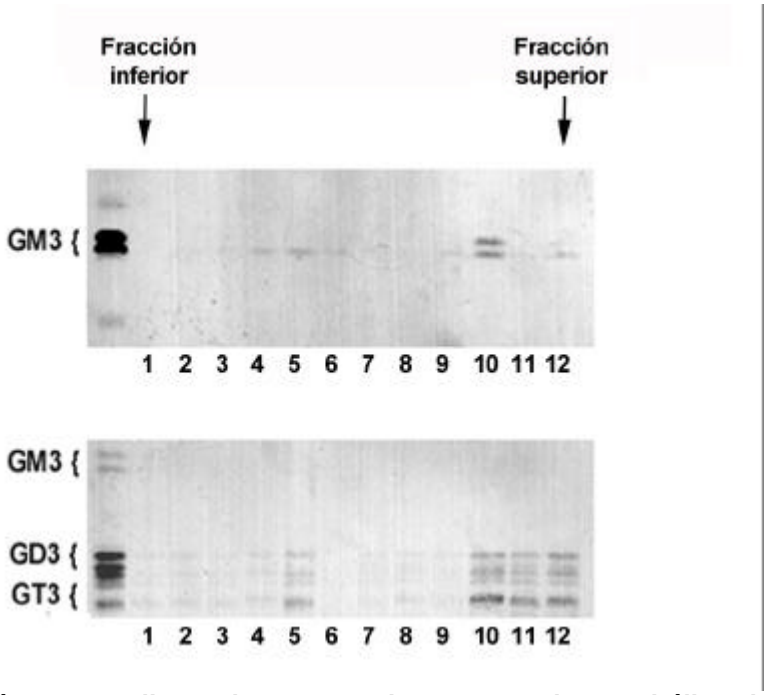

Figura 29: **Centrifugación por gradiente de sucrosa de un marcado metabólico de células CHO-K1 y clon ST18.**
Radio-autografías provenientes de dos cromatografía de HPTLC. Los gangliósidos fueron purificados de 12 fracciones colectadas de un gradiente continuo de sucrosa, realizado sobre células CHO-K1 (arriba) y clon ST18 (abajo).

Análisis inmunocitoquímico de la localización de EGFr y ganglósido GD3 en clon ST18

Con el objeto de estudiar la distribución aproximada que el ganglósido GD3 y EGFr poseen en la membrana plasmática de células del Clon ST18, se realizaron estudios inmunocitoquímicos sobre las mismas. Estos estudios, debido a problemas de reacción cruzada entre los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, debieron realizarse separadamente y no mediante un experimento de "doble marca", el cual seria el más apropiado.

La Figura 30 muestra la localización por inmunocitoquímica del ganglósido GD3 (izquierda), revelado con el anticuerpo R-24 y de EGFr (derecha), revelado con anti-EGFr. Como se puede apreciar en ambos experimentos, el ganglósido GD3 se manifiesta formando dominios en la superficie de la membrana plasmática, sugiriendo su localización en microdominios de la misma. Al mismo tiempo, se observa que la distribución de EGFr a lo largo de la membrana del clon ST18 resulta más homogénea, lo cual concuerda con los resultados expuestos en el análisis de *cross-linking* del receptor reforzando, además, la hipótesis de que el ganglósido GD3 y EGFr coexisten en dominios separados de la membrana plasmática.

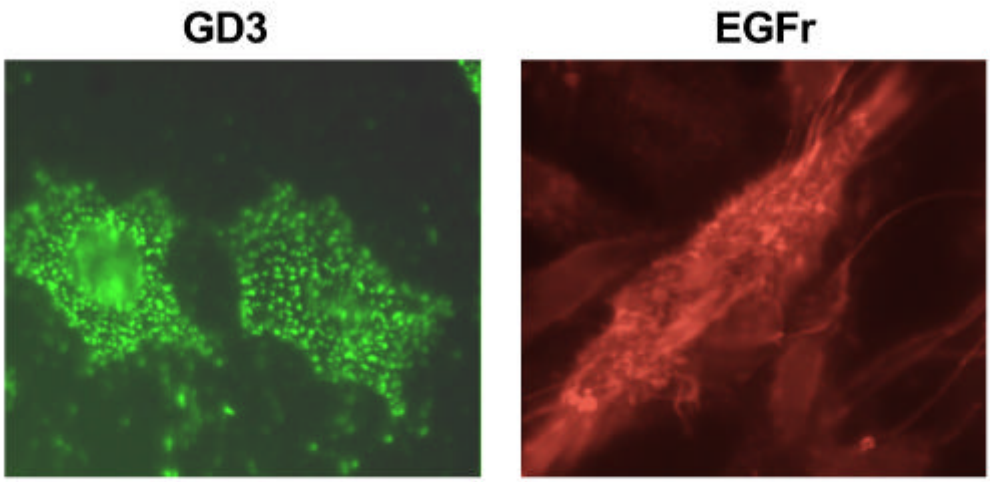

Figura 30: Análisis de la distribución del ganglósido GD3 y de EGFr expresados en clon ST18. La presencia de GD3 y EGFr fue revelada con anticuerpo primarios específicos y anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína y rodamina respectivamente.

Estas observaciones sugieren que si bien la actividad de EGFr se ve alterada tras la aparición del ganglósido GD3 en células CHO-K1, y si tal efecto es asignado al ganglósido GD3, este último aparentemente estaría afectando el comportamiento de EGFr de una manera que no implique algún tipo de interacción estable entre ellos.

Los resultados obtenidos mediante estudios de la distribución de gangliósidos y EGFr en gradientes continuos de sucrosa, *cross-linking* con BS^3 e inmunodetección, sugieren que GD3 y EGFr se encuentran en dominios diferentes de la membrana plasmática.

DISCUSION

Principales modelos experimentales utilizados para el estudio de la función de los gangliósidos

Como ya fuera mencionado en la Introducción de este trabajo de tesis, el principio general en el estudio del efecto de los gangliósidos sobre el comportamiento celular consiste en generar un sistema donde la composición de gangliósidos presentes en la célula pueda ser modificada, en lo posible sin afectar la composición de otros componentes de la misma.

La mayoría de las evidencias experimentales encontradas en este campo se obtuvieron en sistemas donde gangliósidos exógenos son agregados a la célula en cultivo (Zhou y col., 1994; Van Brocklyn y col., 1997; Farooqui y col., 1997; Simons y col., 1999; Slevin y col., 1999). Otros modelos experimentales utilizados son: el uso de anticuerpos contra gangliósidos específicos (Kasahara y col., 1997), tratamiento de las células con enzimas sialidasa o endoglicoceramidasa que degradan la cadena de oligosacáridos de los gangliósidos expresados en membrana plasmática (Ji y col., 1995; Meuillet y col., 1999), utilización de inhibidores de la biosíntesis de gangliósidos (Li y col., 1998; Mutoh y col., 1998). Cada uno de los modelos experimentales citados asume la existencia de un rol por parte de los gangliósidos frente a los cambios que se manifiestan en el sistema. Sin embargo, la falta de estandarización como de un conocimiento acabado de los eventos puestos en juego interfieren en la adecuada comparación de los resultados obtenidos por diversos autores e incluso a resultados contradictorios (Ji y col., 1995 vs. Meuillet y col., 1999 o Li y col., 1998 vs. Mutoh y col., 1998).

En el caso del agregado de gangliósidos exógenos, por lo general, se utilizan grandes dosis de los mismos. Los gangliósidos agregados de manera exógena pueden interaccionar con la membrana plasmática de diferentes maneras, ya sea como monómeros insertados en la hemicapa externa de la misma, monómeros y/o micelas unidos a proteínas y micelas adheridas a membranas (Saqr y col., 1993). Además, se ha descripto que la concentración final de estos gangliósidos unidos a la membrana plasmática es mayor que la de los rangos fisiológicos conocidos (Yates y col., 1995). Sin embargo, estas consideraciones no aluden a que estos modelos experimentales o los resultados generados por los mismos deban ser ignorados, debido a

que podrían estar asentando los principios de mecanismos como la interacción de gangliósidos con proteínas de membrana (que podría tener cierta relevancia en la regulación de la interacción célula-célula) (Yamashita y col., 1999); la liberación de gangliósidos al espacio intersticial (Ladisch y col., 1987; Fish, 1996; Li y Ladisch, 1991) o, en su defecto, en mecanismos de acción de tipo farmacológico sobre las células blanco. Esto último ha propiciado la utilización de anticuerpos anti-gangliósidos en la generación de tratamientos antitumorales (Chu y col., 2000; Bitton y col., 2002) o gangliósidos como el GM1 en tratamientos de pacientes que sufrieron una lesión espinal (Geisler y col., 1992; 1998; 2001).

Merecen una consideración especial, aquellos modelos basados en la selección de mutantes de líneas celulares con alteraciones en la síntesis de gangliósidos (Weis y Davis., 1990) o en la generación de ratones *knock out* para la expresión de gangliósido-glicosíltransferasas (Yamashita y col., 1999; Kawai y col., 2001). Estos modelos proponen el estudio de los gangliósidos en situaciones más fisiológicas, como por ejemplo a las relacionadas con la inserción de los mismos en las membranas celulares, comparado con el agregado de gangliósidos exógenos al medio de cultivo, y/o la generación de productos secundarios con alguna actividad biológica, como ceramida, la cual ha sido implicada en la generación y desarrollo de apoptosis (Kolesnick y Krönke, 1998; Perry, 2000; Blazquez y col., 2000; Maurer y col., 2000), y que es posible encontrarla incrementada luego de tratamientos con endoglicoceramidasas o con ciertos inhibidores de la síntesis de gangliósidos. Sin embargo, la dificultad de encontrar mutantes naturales de una línea celular que abarque un amplio perfil de gangliósidos expresados en la membrana plasmática y/o los inconvenientes de interpretar resultados puntuales en un sistema altamente complejo, como el de organismos multicelulares, hacen poco práctico la implementación de los mismos.

En el presente trabajo, utilizamos un nuevo modelo experimental consistente en la transfección estable en células CHO-K1 (GM3+) con cDNAs que codifican para las enzimas gangliósido-glicosiltransferasas faltantes en las células CHO-K1 originales (Figura 1). De esta manera, pudimos generar una colección de clones estables de células CHO-K1 que expresan diferentes tipos de gangliósidos sintetizados de manera endógena (Figura 10). Cabe aclarar que este modelo, si bien es limitado en la regulación individual de la síntesis y expresión de cada gangliósido, permite analizar el sistema en un contexto más fisiológico.

Además, utilizamos la inhibición de la biosíntesis de gangliósidos de células CHO-K1 salvajes con el objeto de simular una situación carente de gangliósidos totales. Para tal fin, se utilizo el inhibidor de la UDP-glucosa:ceramida-glucosiltransferasa, PPPP, el cual a diferencia de su análogo PDMP (d,l-*threo*-1-phenyl-2-hexadecanoylamino-3-morpholino-1-propanol-HCl), demostró no generar aumentos en los niveles de ceramida durante el tratamiento (Abe y col., 1995).

Regulación de la actividad de EGFr por gangliósidos endógenos en células CHO-K1

Principalmente a lo largo de los últimos años, numerosos autores han descrito como eventos de crecimiento, desarrollo y diferenciación/indiferenciación celular, evolucionan acompañados con modificaciones en la composición de gangliósidos totales de las células o tejidos estudiados (Hakomori, 1970; 1981; Ledeen, 1985; Daniotti y col., 1994; Maccioni y col., 1999; Sugiyama y Saito, 1999). Estas observaciones indujeron a pensar si estos cambios en la composición de los gangliósidos totales eran simplemente una consecuencia de los eventos descriptos o si, por el contrario, poseían algún efecto regulador sobre los mismos.

Con la esperanza de dilucidar estas cuestiones, observaciones basadas en el estudio de mutantes provenientes de células de melanoma humano (Nakano y col., 1996; 1999) y la generación de ratones *Knock out* (Yamashita y col., 1999), sugirieron una participación importante de la expresión de gangliósidos sobre la evolución y desarrollo de procesos oncogénicos, así como a un adecuado desarrollo embrionario y diferenciación de tejidos. A su vez, se ha señalado en numerosos estudios que los gangliósidos pueden modular tanto *in vivo* como *in vitro* los efectos biológicos de algunos factores tróficos y/o diferenciantes, como por ejemplo, FGFr (Slevin y col., 1999), NGFr (Farooqui y col., 1997), EGFr (Rebbaa y col., 1996) y PDGFr (Van Brocklyn y col., 1997), lo cual nos hace pensar que esta sería una importante vía (no la única) por la cual los gangliósidos ejercerían la regulación de los eventos anteriormente descriptos.

En el presente trabajo, y a fin de contribuir con el conocimiento sobre la función de los gangliósidos, estudiamos el comportamiento de EGFr de origen humano en

condiciones de expresión diferencial de gangliósidos, mediante el uso de células CHO-K1 que expresan diferentes composiciones de gangliósidos de la serie "a" de biosíntesis (CHO-K1 salvajes y clon 7), la serie "b" (clon ST18 y Clon IST2A) y células CHO-K1 depletadas de gangliósidos por tratamiento con el inhibidor de la glucosil-transferasa, PPPP. Particularmente en nuestro caso, descubrimos que cuando EGFr se encuentra presente en los clones que tienen en común la expresión del disialo ganglósido GD3 (clon ST18 y clon IST2A), la respuesta del mismo ante un estimulo con el agonista EGF se vio sensiblemente disminuida con respecto a las demás condiciones. Esta disminución se vio también reflejada sobre la inducción de la actividad quinasa de la enzima ERK2-HA, un componente de la cascada de transducción de señales de EGFr.

En contraste, no se encontraron alteraciones significativas en la activación de EGFr, como de ERK2-HA, posterior al estimulo con EGF cuando las células CHO-K1 expresaban gangliósidos de la serie “a” (clon7) o eran depletadas de GM3 por tratamiento con el inhibidor PPPP. Posteriormente, y debido a la presencia de antecedentes que relacionan alteraciones en la cinética de respuesta de EGFr a EGF (Ji y col, 1995) con cambios en la composición de gangliósidos, realizamos en primera instancia, un estudio cinético sobre la inducción de la actividad de EGFr como de ERK2-HA. Encontramos, que a pesar de la inhibición de EGFr presente en los clones ST18 y IST2A, estas no se deben a alteraciones en la cinética de respuesta de EGFr o de ERK2-HA tras el estimulo con EGF (Figura 20 y 22, respectivamente). De igual manera, la posibilidad de una alteración sobre la interacción entre EGFr y su agonista (Roepstorff y col., 2002) fue descartada mediante un análisis de unión EGFr-EGF, en células CHO-K1 salvajes (GD3-) y clon ST18 (GD3+). No se detectaron diferencias en el grado de afinidad de EGFr por su agonista (ver Figura 21). Finalmente, y con el objeto de determinar el grado de especificidad que la aparente aparición del ganglósido GD3 posee sobre el comportamiento de EGFr, determinamos el grado de fosforilación de las enzimas endógenas ERK 1/2 tras estimular con insulina, tanto en células CHO-K1 como en clon ST18. Los resultados nos indicaron que no hay diferencias significativas entre ambas células, por lo que podríamos afirmar que el o los mecanismos que afectan la actividad de EGFr y que están asociados a la aparición del ganglósido GD3, no tienen un efecto generalizado, y que por ende no afectan de igual manera a otros receptores con actividad tirosina-quinasa localizados en la membrana plasmática, como el receptor de insulina.

Es interesante destacar, a modo informativo, algunos resultados preliminares obtenidos por el Dr. José Luis Daniotti en el laboratorio del Dr. Richard Proia (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A), trabajando en ratones *Knock out* para gangliósido-glicosíltransferasas (Figura1) (Tifft y Proia, 2000). En aquellos ratones *Knock out* para la enzima Sial-T2 se encontró un significativo incremento en los niveles de autofosforilación de EGFr proveniente de piel (comparados con ratones normales, GalNAc-T -/- y GalNAc-T -/+), y luego de que estos fueran inyectados con EGF de manera subcutánea. Estos resultados sugieren una correlación con los resultados de nuestro trabajo en células CHO-K1, referidos al contenido de gangliósidos de la serie “b” (Figura 1) y la actividad de EGFr.

Los resultados obtenidos con relación a los efectos de la expresión de GD3 sobre EGFr en células CHO-K1, contrastan con la literatura, donde se postula que el ganglósido GM3 es responsable de un efecto inhibitorio sobre EGFr, siendo esto observado en diferentes líneas celulares con el agregado de gangliósidos exógenos (Bremer y col., 1986; Rebbaa y col., 1996; Suarez Pestana y col., 1997; Wang y col., 2001a; 2001b; Miljan y col., 2002) e inhibición de su biosíntesis (Weis y Davis, 1990; Meuillet y col., 2000). Sin embargo, en nuestro caso la conversión total de GM3 a gangliósidos de la serie "a" o "b" y su casi completa depleción utilizando inhibidores no afectó de manera significativa la actividad de EGFr o ERK2-HA, alertando de alguna manera de los riesgos de generalizar sobre los efectos y/o mecanismos que poseen determinados gangliósidos sobre la regulación de la actividad de EGFr y de otros componentes de la membrana plasmática.

Distribución de EGFr en membrana plasmática

La formación de compartimentos aislados es de vital importancia para la función de una célula. Múltiples tareas son llevadas a cabo en organelas subcelulares (retículo endoplasmático, complejo de Golgi, lisosomas, mitocondrias, etc.) creando barreras físicas que impiden o restringen el contacto directo entre componentes de un compartimento con los de otro. Un ejemplo de compartimentalización presentes en las membranas celulares corresponde a los dominios de membrana, representados principalmente por los llamados microdominios *rafts*. Estos microdominios corresponden a asociaciones laterales de lípidos ricos en colesterol y glicoesfingolípi-

dos (entre ellos gangliósidos) presentes en un estado de fase liquido ordenado (ver Introducción).

Como ya fuera mencionado, numerosos autores han encontrado que la depleción en el contenido de colesterol induce la redistribución de proteínas localizadas en la membrana plasmática (Ostermeyer y col., 1999; Waheed y col., 2001), así como una alteración en el comportamiento de receptores de membrana como EGFr (Furuchi y Anderson 1998; Roepstorff y col., 2002; Ringerike y col., 2002). Un efecto similar se observó mediante la alteración de la composición de gangliósidos de la célula por agregado de gangliósidos exógenos o por tratamiento con enzimas que degradan la cadena de oligosacáridos de los mismos (Simons y col., 1999; Kasahara y col., 2000; Mitsuda y col., 2002; Crespo y col., 2002). Estos estudios abren un muy interesante terreno para la investigación de la participación de los lípidos de membrana, entre ellos gangliósidos, como reguladores de la actividad y localización de proteínas de membrana, y por ende, de las respuestas originadas por ellos.

Con el objetivo de determinar si los cambios en la composición de gangliósidos endógenos de células CHO-K1 modifica la localización de EGFr a lo largo de dominios de membrana, y con la posibilidad de encontrar algún efecto que nos pueda orientar a una posible explicación de los resultados obtenidos sobre la actividad de este receptor en células GD3+, se determinó, la distribución en membrana plasmática de EGFr expresado en células CHO-K1 con expresión diferencial de gangliósidos. Para el análisis, extractos de células provenientes de los diferentes clones fueron tratadas con Tritón X-100 y resuelto en gradiente continuo de sucrosa (Iwabuchi y col., 1998; Gkantiragas y col., 2001; Kasahara y col., 1997; 2000). Los resultados mostraron que la distribución de EGFr fue prácticamente idéntica en cada una de las condiciones estudiadas. Llamativamente, se observó que EGFr se encuentra fuera de las fracciones correspondientes a proteínas localizadas en dominios de membranas resistentes al tratamiento con el detergente (*rafts*). Esto se determinó tomando como criterio la distribución en el gradiente continuo de sucrosa tanto de proteínas marcadoras de dominios *rafts* (GPI-YFPy GAP-43) como no marcadoras (VSVG-YFP) (Arni y col., 1998; Keller y col., 2001), todas ellas expresadas en células CHO-K1. Posteriormente, la localización de EGFr fuera de microdominios *rafts* en células CHO-K1 fue confirmada mediante estudios de solubilidad luego de tratar con Tritón X-100 y análisis de dominios de EGFr mediante ensayos de *cross-linking* de proteínas localizadas en la membrana plasmática.

Finalmente analizamos la distribución de GM3, GD3 y GT3 en gradiente continuo de sucrosa, realizados en conjunto con la Bióloga Pilar María Crespo. Demostramos que el ganglósido GD3 se localiza principalmente, a diferencia de EGFr, en las regiones menos densas del gradiente. Esto nos permite afirmar que tanto EGFr como GD3 se encontrarían formando parte de dominios separados en las membranas del clon ST18. Además, este último experimento de alguna manera explica los resultados negativos en el intento de co-inmunoprecipitar GD3 y EGFr, mediante el empleo de anticuerpo anti-GD3 (R-24) o anticuerpo anti-EGFr, en células de clon ST18 que expresan EGFr.

Conclusión

Si bien el o los mecanismos de acción que explique el efecto de los gangliósidos sobre el comportamiento de receptores tirosina-quinasa de membrana no han sido adecuadamente establecidos, se han propuesto algunos posibles mecanismos como ser: la perturbación de la matriz lipídica en el microdominio del receptor; la asociación directa a proteínas de la membrana plasmática (Riggott y Matthew, 1997; Matsubara y col., 1999) que modifique la afinidad del receptor por su agonista (Wang y col., 2001a) o que regule la actividad tirosina-quinasa del mismo (Mutoh y col.,1995); la generación de mensajeros secundarios (catabolitos) como esfingosina o ceramida; la regulación directa de proteínas quinasas (Yates y col., 1989) y/o fosfatasa (Suarez Pestana y col., 1997; 1999) y localización de proteínas en la membrana plasmática (Kasahara y col., 2000; Mitsuda y col., 2002). Es posible que el efecto regulador que poseen los gangliósidos sobre los receptores tirosina-quinasa de membrana este dado por todos lo mecanismos aquí mencionados, con mayor o menor participación de cada uno según el set de gangliósidos expresados en la superficie celular, el receptor y/o el tipo celular involucrado.

Recientemente, Miljan y col. (2002) demostraron en experimentos *in vitro*, que tanto el ganglósido GM3 y en menor grado el ganglósido GD3, pueden interaccionar con el dominio extracelular de EGFr, sin embargo GD3 carece de un efecto inhibitorio sobre la actividad de EGFr cuando es agregado de manera exógena en preparados de membranas provenientes de células A431, altamente expresoras de EGFr. Probablemente el efecto inhibitorio del ganglósido GM3 sobre la actividad de EGFr es posible sólo cuando este es agregado de manera exógena, a fin de poder

interaccionar con el dominio extracelular del receptor, mientras que el ganglósido GM3 generado de manera endógena se ve obstaculizado de utilizar esta vía.

En un modelo experimental de similares características al nuestro, Wang y col. (2002) demostraron recientemente que modificaciones en los niveles de expresión del ganglósido GM3 en células de keratinocitos humanas (de la línea SCC12), no afecta la distribución de EGFr en su membrana plasmática, el cual, al igual que lo observado por nosotros, se encuentra localizado en dominios de membrana solubles al tratamiento con Tritón X-100. Sin embargo, la sobre expresión de GM3 en estas células induce la redistribución de la proteína caveolina-1 (una proteína de membrana constituyente de un subtipo específico de *rafts* llamado caveola) hacia microdominios insolubles al tratamiento con Tritón X-100, favoreciendo de esta manera la interacción de esta con EGFr, seguida de una inhibición en la actividad tirosina-quinasa de este último.

Este ultimo trabajo refuerza la interpretación de que la ausencia en nuestro sistema de una regulación en la localización de EGFr en microdominios de membrana mediada por gangliósidos endógenos, sumado a la falta de interacción entre el ganglósido GD3 endógeno y EGFr, podrían estar indicando que los efectos sobre el comportamiento de EGFr encontrado en clones GD3+ (clones ST18 y IST2A) no estaría dada por una acción directa de GD3 sobre el receptor, sino que por el contrario GD3 estaría actuando de manera indirecta, regulando la actividad o localización de algún/nos componente/s de membrana (probablemente de naturaleza proteica) que finalmente ejerza el efecto encontrado sobre el comportamiento del receptor de EGF.

Finalmente y ante lo expuesto en este trabajo de tesis, es evidente que aun quedan cuestiones por resolver, tales como:

- La búsqueda de algún compuesto con capacidad de afectar la actividad de EGFr, sensible a la aparición del ganglósido GD3, a fin de dilucidar mecanismos de regulación mediados por gangliósidos endógenos.
- El efecto de la modificación de gangliósidos endógenos sobre otros receptores de membrana, o el comportamiento de un mismo receptor expresado en una línea celular diferente.

- La correlación de los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental, con cultivos primarios provenientes de tejidos de ratones *Knock out* para glicosíltransferasas.
- El efecto que tendría una alteración en la actividad del sistema de transducción de señales sobre la síntesis endógena de gangliósidos. Esto último, seria con el objeto de evaluar la existencia de mecanismos que conecten la expresión de gangliósidos y la actividad de receptores de membrana.

El esclarecimiento de estas y otras cuestiones que irán surgiendo a medida que avance la investigación en este campo, serán los objetivos a seguir a fin de cooperar en el desarrollo y consolidación de un renovado interés sobre la participación de los glicolípidos en la regulación de eventos celulares.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de células

Las células CHO-K1 se cultivaron en cápsulas conteniendo medio DMEM (Dulbecco´s modifed Eagle´s medium) suplementado con 10 % (v/v) de SFB (Gibco BRL, Gaitherburg, MD, U.S.A) y antibióticos (penicilina 200000 U/mL, estreptomicina 100000 μg/mL), por el tiempo requerido a 37ºC en una atmósfera con 5% de CO_2.

Transfección de células CH0-K1

Para la transfección de células CHO-K1 se utilizaron liposomas catiónicos del tipo lipofectamina (Gibco BRL).

Células cultivadas a 37ºC en cápsulas de 35 mm y a una densidad de 80 %, fueron lavadas con medio de cultivo libre de SFB y antibióticos y posteriormente expuestas a una mezcla de lipofectamina (6 μL) y 1 μg del plásmido conteniendo el cDNA de interés (purificado en columnas Wizard Midiprep; Promega) durante un período de 5 hs. a 37ºC, en un volumen final de 1 mL de medio DMEM libre de SFB y antibióticos. Posteriormente, se agregó medio suplementado con antibióticos para un volumen final de 2 mL, con o sin el agregado de 10 % de SFB (dependiendo del estudio a realizar) e incubado durante 24 hs. antes de reemplazar el medio de cultivo. El tiempo de incubación (postransfección) de las células varió según los objetivos.

Generación de líneas estables

Células CHO-K1 cultivadas en cápsulas de 10 cm fueron transfectadas con el plásmido de interés mediante el uso de lipofectamina. La selección de las células transfectadas se realizó por el agregado de un nuevo antibiótico (antibiótico de selección) al medio de cultivo, ante el cual sólo las células que incorporaron el plásmido de interés poseen resistencia. Esto es debido a que el gen que confiere dicha resistencia esta presente en el plásmido transfectado, o en su defecto, en otro plásmido llamado plásmido de selección el cual es cotransfectado con el plásmido de interés.

Al cabo de sucesivos repiques en presencia del antibiótico de selección se logró obtener células resistentes al mismo aisladas en numerosas colonias, cada una provenientes de una célula (clones). Estas colonias o clones fueron repicados y crecidos en cápsulas individuales para su posterior caracterización.

Caracterización de las líneas estables

Marcado metabólico y extracción de lípidos

Células de 1 día en cultivo a una densidad del 50 al 60 %, fueron marcadas con 50 μCi de [^{3}H]galactosa durante 12 hs. Posteriormente, estas células fueron lavadas 3 veces con PBS frío, cosechadas con 2 mL de PBS y centrifugadas 5 minutos a 5000 r.p.m.

Luego de eliminar el sobrenadante se extrajeron los lípidos del precipitado con el agregado de 2 mL de Cloroformo/Metanol (2/1, v/v) y los contaminantes hidrosolubles del extracto de lípidos fueron eliminados por el pasaje del mismo a través de una columna conteniendo 0,5 g de Sephadex G-25. La radioactividad total incorporada fue cuantificada mediante el uso de un contador de centelleo liquido.

Entre 15000 y 20000 cuentas por minuto (c.p.m) fueron tomadas del extracto de lípidos, suplementados con 10 nmoles de gangliósidos estándar no radiactivos y cromatografiados en una placa de HPTLC (Merck, Darmstadt, Germany) con Cloroformo/Metanol/0,25 % $CaCl_2$ (60:36:8, volúmenes) como fase móvil.

Los gangliósidos fríos fueron revelados por exposición de la placa a vapores de I_2, mientras que los gangliósidos marcados radiactivamente fueron revelados por fluorografía luego de sumergir la placa en una solución de 2-Metilnaftaleno con 0,4% de 2,5-difeniloxalone y exponer posteriormente a una placa radiográfica durante un periodo de 4 a 6 días a –70ºC.

Inhibición de la biosíntesis de glicolípidos

La depleción de gangliósidos totales de la célula, por inhibición de su biosíntesis, se realizó mediante la incubación de células CHO-K1 salvajes con el inhibidor d,1-threo-1-hexadecanolamino-3-pirrolidinpropano-1-ol, HCl (PPPP) (Matreya, Plea-

sant Gap, PA, U.S.A.) a una concentración de 2 μM durante un periodo de 5 días. La inhibición de la síntesis fue monitoreada a través del análisis de los gangliósidos totales mediante cromatografía en placa de HPTLC revelados por tinción con orcinol.

Inmunocitoquímica

Se tomaron cápsulas conteniendo células cho-k1 adheridas a cubreobjetos. las células, se lavaron 3 veces con pbs y se fijaron por tratamiento con acetona a -20ºc durante 7 minutos (este tratamiento fija y permeabiliza las células sin alterar la composición de los gangliósidos de la membrana). posteriormente, se bloquearon las posibles interacciones inespecíficas incubando con solución de bloqueo b durante 1 hora a 37ºc.

La ubicación subcelular del antígeno de interés se reveló incubando, primeramente, en presencia de la misma solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo específico (anticuerpo primario). las interacciones específicas entre el anticuerpo primario y el antígeno de interés se evidenciaron por la posterior incubación con un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo determinado. finalmente, el preparado es montado sobre un portaobjeto con 5 μl de fluorsave (calbiochem, california, u.s.a) y observado por microscopía de fluorescencia.

Western blot

Cápsulas con células CHO-K1 se lavaron 3 veces con PBS frío y se cosecharon con 1,4 mL de PBS. El extracto de células se centrifugó, eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 30 μL de PBS. Seguidamente, 30 μg de proteínas del homogenato fueron calentadas durante 5 minutos a 98ºC en presencia de una solución conteniendo 20 % 2-mercaptoetanol, para ser posteriormente resueltas en una electroforesis en gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Las proteínas fueron electroforéticamente transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Towbin y col., 1979) y su localización revelada por tinción con Ponceau S 0,2 % (p/v) en una solución de Ac. acético al 1% (v/v).

Para realizar el western blot, las proteínas no específicas fueron bloqueadas con solución de bloqueo A o TTBS-Leche (ver apéndice, soluciones) durante 1h. a

temperatura ambiente, y posteriormente incubadas con anticuerpo específico (anticuerpo primario) en presencia de solución de incubado A o TTBS-Leche (según la solución de bloqueo y el anticuerpo utilizados). Las bandas específicas fueron detectadas mediante la utilización de un anticuerpo secundario específico o proteína A acoplada a la enzima peroxidasa, en combinación con un equipo de detección por quimio-luminiscencia (NEN Life Science) y la exposición a una placa fotográfica. El peso molecular de cada banda fue calculada por extrapolación a un estándar de pesos moleculares sembrados en cada gel, mientras que la cantidad relativa de las mismas, fue evaluada con el programa de computación Scion Image (Scion Corporation, U.S.A).

Inmunoprecipitación de ERK2-HA

Células CHO-K1 transfectadas con el plásmido pcDNAIII-HA-MAPK (ERK2-HA) y cultivadas a 37ºC durante 24 hs. fueron lavadas 3 veces con PBS frío y cosechadas a 4ºC con 1,4 mL de *buffer* de lisado A. El extracto de células fue agitado con vortex a fin de favorecer el lisado de las mismas y posteriormente, fue clarificado mediante centrifugación a 13000 r.p.m. durante 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue incubado durante 4 hs. a 4ºC en presencia del anticuerpo monoclonal 12CA5 (anti-HA) a una dilución de 1/300 y 20 µl de proteína G-SEPHAROSE. El inmunocomplejo formado entre ERK2-HA y el anticuerpo 12CA5 unido a la proteína G-Sepharose se recuperó por centrifugación. Posteriormente, el precipitado así obtenido se lavó 3 veces con solución de lavado 1, 1 vez con solución de lavado 2 y finalmente 1 vez con *buffer* MAPK. Finalmente, y luego del último lavado, el precipitado fue resuspendido con 30 µl de *buffer* MAPK.

Determinación de la actividad de ERK

La medición de la actividad de la enzima ERK fue evaluada de dos maneras:

1. Midiendo la actividad quinasa de una ERK2-HA expresada de manera heteróloga frente a un sustrato artificial en presencia de [γ-^{32}P]ATP.
2. Revelando por *western blot* la fracción fosforilada de la población de ERK1/2 endógena con anticuerpo anti-P-ERK.

Ensayo de actividad quinasa de ERK2-HA

La enzima ERK2-HA previamente inmunoprecipitada fue sometida a un ensayo de actividad mediante el agregado de 30 μl de una mezcla de reacción conteniendo 1,5 mg/mL de proteína básica de mielina (PBM) (Sigma-Aldrich), 20 μM de ATP, 2,5 mM de DTT y 2 μCi de [γ-^{32}P]ATP en *buffer* MAPK. Luego de 30 minutos de incubación a 30ºC, la reacción fue detenida por el agregado de 25 μl de *buffer* de muestra con 20 % 2-mercaptoetanol (v/v). La muestra fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE, 13 % p/v) y transferida a una membrana de nitrocelulosa.

Con el objeto de poder ver la zona de la membrana de nitrocelulosa con el sustrato marcado, esta fue teñida con Ponceau S para luego ser recortada y expuesta a una placa radiográfica. Posteriormente, la radioactividad de la banda con la PBM marcada con ^{32}P fue cuantificada mediante el uso de un contador de centelleo.

La zona de la membrana conteniendo la enzima ERK2-HA fue revelada por Inmunoblot, utilizando el anticuerpo primario anti-HA policlonal.

La actividad relativa de la enzima ERK2-HA se definió como una relación entre las c.p.m incorporadas a la PBM y el área de la banda de ERK-HA en el Inmunoblot, cuantificada con el programa Scion Image.

Western blot de P-ERK1/2

Células CHO-K1 cultivadas a 37ºC durante 24 hs., fueron lavadas 3 veces con PBS frío y cosechadas a 4ºC con 1,4 mL de PBS. El extracto de células fue centrifugado y posteriormente se resuspendió el precipitado en 30 μL de PBS. 30 μg de proteínas del extracto fueron sometidos a SDS/PAGE (10 %, p/v) en presencia de 20 % 2-mercaptoetanol y posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa.

La presencia de P-ERK1/2 fue revelada por *western blot* mediante el uso del anticuerpo primario anti-P-ERK a una dilución de 1/1000, mientras que el revelado de la enzima ERK1/2 total se logró lavando la membrana 5 minutos con NaOH 1N y reincubando la misma con el anticuerpo K-280 (anti-ERK) a la misma dilución.

La actividad relativa de las enzimas ERK1/2 se definió como la relación entre las señales del *western blot* revelado con anti-P-ERK y el *western blot* revelado con K-280, ambos cuantificados con el programa Scion Image.

Determinación de la actividad de EGFr

La actividad de EGFr fue evaluada de manera directa e indirecta.

El ensayo directo consistió en determinar por *western blot* la fracción de EGFr fosforilado en sus residuos de tirosina, revelado con anticuerpo anti-P-tirosina, y comparado a EGFr total revelado con un anticuerpo anti-EGFr. A tal efecto, células CHO-K1 transfectadas con el plásmido pLCNX-EGFr y cultivadas a 37ºC durante 24 hs., fueron lavadas 3 veces con PBS frío y cosechadas en presencia de PBS. 30 μg de proteínas del extracto celular fueron sometidos a SDS/PAGE (7,5 % p/v) en presencia de 20 % 2-mercaptoetanol y transferidos a una membrana de nitrocelulosa.

La presencia de P-EGFr se reveló por *western blot* mediante el uso del anticuerpo primario anti-P-tirosina (PY-20) a una dilución de 1/600, mientras que el revelado de EGFr total se logró lavando la membrana 5 minutos con NaOH 1 N y reincubando con el anticuerpo primario anti-EGFr a una dilución de 1/200.

La actividad relativa de EGFr resuelto de la relación entre las señales del *western blot* revelado con PY-20 y el *western blot* revelado con anti-EGFr.

La evaluación indirecta de la actividad de EGFr consistió en determinar las actividad relativa de la enzima ERK2-HA en células CHO-K1 previamente cotransfectadas con los plásmidos pLCNX-EGFr/pcDNAIII-HA-MAPK y luego de estimular con EGF.

Análisis de unión EGF-EGFr

Células CHO-K1 y Clon IST2A fueron transfectadas con el plásmido pLCNX-EGFr y cultivadas a 37ºC durante 24 hs. con 10 % SFB. Estas células fueron posteriormente resuspendidas mediante tratamiento con tripsina, repicadas en cápsulas mulit-well (24 wells) a una densidad de 80000 células/well y cultivadas a 37ºC en 400 μL de medio sin SFB por un nuevo periodo de 24 hs.

El ensayo de unión se llevó a cabo mediante la incubación de las células con dosis crecientes (0,1-4,0 nM) de [^{125}I]EGF (NEN, Boston, MA. U.S.A) en 200 μL de medio sin SFB durante 2 hs. a 4ºC.

Con el objeto de calcular la unión específica, se determinaron las uniones inespecíficas y totales incubando las muestras en presencia o ausencia de 250 nM de EGF no radioactivo. Al finalizar la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS frío para eliminar el [^{125}I]EGF en estado soluble, mientras que el [^{125}I]EGF unido a las célula y se resuspendió por tratamiento con NaOH 1N durante 10 minutos. Finalmente, el contenido radiactivo del lisado se determinó mediante el empleo de un contador γ.

La unión específica se determinó como la diferencia entre radioactividad (c.p.m) de la unión total menos la radioactividad (c.p.m) de la unión inespecífica. La constante de disociación (Kd) entre EGFr y [^{125}I]EGF se calculó utilizando el programa de compunción GraFit 2.11 (gentileza de la Dr. Silvia Kivatinitz, quien además nos brindo una valiosa asistencia en el análisis de los datos obtenidos)

Purificación de proteínas de membrana

Se tomaron cápsulas de 35 mm con células CHO-K1 que expresan de manera transiente el EGFr y se lavaron tres veces con PBS a 4ºC. Estas células se incubaron durante 1 h a 4ºC con 0.5 mg/mL de reactivo EZ-link (NHS-ss-Biotina) (Pierce, Rockford, IL. U:S:A). Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS-0.1 % BSA (p/v) y se cosecharon con 500 µL de *buffer* de lisado C. El extracto así obtenido fue incubado durante una hora con agitación frecuente y posteriormente centrifugado 10 minutos a 14000 g. Al cabo de ese tiempo, se tomó el sobrenadante, se mezcló con 20 µL de estreptavidina-agarosa (previamente lavado en *buffer* de lisado C) y se incubó 3 hs. a 4ºC con agitación. Finalmente, el complejo proteína-EZ-link-estreptavidina-agarosa fue purificado mediante tres lavados con *buffer* de lisado C, centrifugando y eliminando el sobrenadante en cada ocasión.

Lisis con detergente y gradiente de sucrosa

Células CHO-K1 cultivadas en cápsulas de 100 mm a 37ºC durante 24 hs., fueron lavadas 3 veces con *buffer* TNE frío y cosechadas a 4ºC con dos volúmenes de 700 µL del mismo *buffer*. El extracto de células fue centrifugado 5 minutos a 14.000 g, posteriormente se resuspendió el precipitado con 200 µL de *buffer* de lisado B y

se incubó inmediatamente durante 1 h. con agitación frecuente, cuidando de mantener la temperatura de la muestra a 4ºC.

Posteriormente, el extracto de células así obtenido fue procesado de dos maneras diferentes:

1). Centrifugación a 100.000 g

El extracto de 200 µL fue centrifugado a 100.000 g durante un periodo de 1 h. a 4ºC. Al cabo del mismo se separaron el sobrenadante del precipitado, el cual fue resuspendido con 200 µL de *buffer* TNE.

Para evitar interferencias del Tritón X-100 en la corrida electroforética, las proteínas del precipitado fueron purificadas por tratamiento con metanol/cloroformo 4:1 (v/v).

2). Centrifugación en gradiente de sucrosa

El extracto de células fue sembrado cuidadosamente en la superficie de 2 mL de un gradiente continuo de sucrosa (5-30 %, p/v), preparado previamente en *buffer* TNE con inhibidores de proteasas y enfriado a 4ºC. El material fue luego centrifugado a 125.000 g durante 12 hs. a 4ºC y posteriormente colectado en 12 fracciones de aproximadamente 180 µL c/u.

Las proteínas de cada fracción fueron precipitadas con 10 % (p/v) de ácido tricloracético (TCA) y centrifugadas a 14.000 g durante 15 minutos para finalmente ser sometidas a SDS/PAGE, transferencia a nitrocelulosa y *western blot*.

Cross-linking de proteínas de membrana

Células CHO-K1 que expresan EGFr, VSVG-YFP o GPI-YFP cultivadas durante un periodo de 48 hs. en presencia de 10 % SFB fueron lavadas 3 veces con PBS frío y cultivadas durante un periodo de 45 minutos a 4ºC, en presencia o ausencia de una solución 0,5 mM BS^3 en PBS.

Luego del periodo de incubación, el reactivo BS^3 libre fue bloqueado con el agregado de 0,5 mM Glicina en PBS durante un periodo de 15 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas 2 a 3 veces con PBS frío, cosechadas y centrifugadas durante 5 minutos a 10.000 g. Finalmente, el precipitado así obtenido fue re-

suspendido en 30 μL de PBS para su posterior análisis por SDS-PAGE, libre de 2-mercaptoetanol, e inmunotransferidas a nitrocelulosa.

Purificación de proteínas (Tratamiento con metanol/cloroformo)

Este procedimiento se utilizó para purificar y concentrar proteínas provenientes de extractos celulares.

Para ello, se tomaron 4 volúmenes de muestra a los que se les agregan 5 volúmenes de metanol/cloroformo 4:1 (v/v). En casos de menor cantidad de muestra se puede utilizar 1 volumen de muestra al que se le agregan 3 volúmenes de H_20 y 5 volúmenes de metanol/cloroformo. Esta mezcla se agita vigorosamente antes de centrifugar a 9.000 g durante 5 minutos, tras la cual se descarta la fase superior, cuidando de no romper la película de proteínas que se encuentran en la interfase metanol-H_2O:Cloroformo. Luego se agregan 3 volúmenes de metanol se agita vigorosamente y se procede a centrifugar durante 15 minutos a 9.000 g.

Finalmente el precipitado de proteínas resultante puede fue resuspendido en un *buffer* adecuado.

APENDICE

Soluciones

Acrilamida/bis-Acrilamida: Acrilamida 29,2 % (p/v), bis-Acrilamida 0,8 % (p/v).

***Buffer* de lisado A:** Hepes 10 mM, β-Gly-PO_4 40 mM, o-Vanadato 1 mM, Cl_2Mn 1 mM, ClMg 10 mM, EGTA 0,1 mM Tritón X-100 0,5 % (v/v) y los inhibidores de proteasas, PMSF 1 mM, Leu-Peptin 5 μg/mL y Aprotinina 5 μg/mL (se agregan en el momento de usar).

***Buffer* TNE:** Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 5 mM.

***Buffer* de lisado B:** Tritón X-100 1 %, Na_2CO3 0,1 M en *Buffer* TNE (pH final 11,0) y los inhibidores de proteasas Leu-Peptin 0,5 μg/mL, Aprotinin 5 μg/mL y Peptatin 0,7 μg/mL (se agregan en el momento de usar).

***Buffer* de lisado C:** Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %, Licina 10 mM, PMSF 1 mM (se agrega en el momento de usar).

***Buffer* de muestra (4X):** Glicerol 0,4 vol., 2-Mercaptoetanol 0,2 vol., *Upper Buffer* 0,5 vol., SDS 8% (p/v), Azul de Bromofenol 0,4 % (p/v).

***Buffer* de transferencia:** Running *Buffer* 540 mL y Metanol 160 mL.

***Buffer* MAPK:** MOPS 12,5 mM, β-Gly-PO_4 12,5 mM, Cl_2Mg 7,5 mM.

***Buffer* Tris Glicina (8X):** Tris 12g, Glicina 57g y H_2O (c.s.p 500 mL).

***Buffer* Tris-Sucrosa:** Sucrosa 0,25 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7,2).

***Lower Buffer* (4X):** Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8).

PBS: Fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5), NaCl 140 mM.

Running *Buffer*: *Buffer* Tris-Glicina (8X) 75 mL, SDS 10 % (p/v) 6 mL y H_2O (c.s.p 600 mL).

Solución de Bloqueo A (Inmunoblot): Albúmina Serica Bovina (BSA) 2,5 % y Poli vinilpirrolidona (PVP) 2,5 % (p/v) en TBS.

Solución de Bloqueo B (Inmunocitoquimica): BSA 3% en PBS.

Solución de Incubado(Inmunoblot): BSA 0,25 % y PVP 0.25 % (p/v) en TTBS.

Solución de lavado 1: ClLi 0,5 M, Tris 100 mM.

Solución de lavado 1: Tritón X-100 2%, o-Vanadato 2 mM en PBS.

TBE: Tris 89 mM, Ac. Bórico 89 mM, EDTA 2 mM.

TBS: Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 200 mM.

TTBS: Tween-20 0,5 % en TBS.

TTBS-Leche (Inmunoblot): Leche descremada en polvo 5 % (p/v) en *Buffer* (TTBS).

***Upper Buffer* (4X):** Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8).

Anticuerpos

Anticuerpos primarios

12CA5 (Anti-HA): Anticuerpo monoclonal de ratón (BabCO, Richmond, CA, U.S.A).

Anti-EGFr: Anticuerpo policlonal de oveja (GIBCO BRL).

Anti-GAP-43: Anticuerpo policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, U.S.A).

Anti-GFP: Anticuerpo policlonal de conejo (Roche Diagnostics Corporation, Applied Science, Indianapolis, U.S.A).

Anti-HA: Anticuerpo policlonal de conejo (BabCO, Richmond, CA, U.S.A).

Anti-fosfotirosina: Anticuerpo policlonal de conejo (New England Biolab, Beverly, MA, U.S.A).

K-280 (Anti-ERK): Anticuerpo policlonal de conejo (gentileza del Dr. Silvio Gudkind, NIDCR, NIH, U.S.A).

PY-20 (Anti-P-tirocina): Anticuerpo monoclonal de ratón.

SC-03G (Anti-EGFr): Anticuerpo policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, U.S.A).

Anticuerpos secundarios

Anti-IgG de cabra/peroxidasa: Anticuerpo policlonal conjugado a peroxidasa.

Anti-IgG de conejo/Rodamina: Anticuerpo policlonal conjugado a rodamina (Jackson InmunoResearch).

Anti-IgG de oveja/Peroxidasa: Anticuerpo policlonal de conejo.

Anti-IgG de ratón/fluoresceína: Anticuerpo policlonal de burro conjugado a fluoreceina (Jackson InmunoResearch).

Anti-IgG de ratón/Peroxidasa: Anticuerpo policlonal conjugado a peroxidasa.

Anti-IgG de ratón: Anticuerpo policlonal de conejo.

Marcadores secundarios:

Proteína A/Peroxidasa: Proteína A conjugada a peroxidasa.

Plásmidos recombinantes

Plásmido recombinante	*Proteína que codifica*
pcDNAIII-HA-MAPK	**ERK2-HA**
pCR3.1-GAP-43	**GAP-43** (desarrollado por el Dr. J.L. Daniotti)
pEYFP-GPI-YFP	**GPI-YFP** (gentileza del Dr. Simons K. European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany.)
pEYFP-VSVG-CFP	**VSVG-YFP** (gentileza del Dr. Simons K.)
pIWD-Sial-T2-HA	**Sial-T2-HA**
pLCNX-EGFr	**EGFr** (Humano) (gentileza del Dr Silvio Gutkind, NIDCR, NIH, USA)
pVg-RXR	**RXR** (Retinoid X receptor) y **VgEcR** (receptor de ecdisona modificado) (Invitrogen Corp., Carlbad, U.S.A).

TRABAJOS PUBLICADOS

Los resultados presentados en los Capitulo I a III de este trabajo de tesis fueron objeto de la siguiente publicación internacional con referato.

- **Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides.**
  Adolfo R. Zurita, Hugo J.F. Maccioni and Jose L. Daniotti.
  Biochemical Journal 355: 465-472 (2001).

Asimismo, participé también durante este período en el desarrollo de otras líneas de investigación, trabajando en colaboración con miembros del laboratorio en el que desarrolle mis tareas. De esas colaboraciones surgieron los siguientes trabajos científicos:

- ***Mouse b1,3-Galactosyltransferase (GA1/GM1/GD1b Synthase): protein characterization, tissue expression, and developmental regulation in neural retina.***
  Jose L. Daniotti, José A. Martina, **Adolfo R. Zurita** and Hugo J.F. Maccioni.
  Journal of Neuroscience Research 58: 318-327 (1999).

- ***GM3:a2,8 Sialyltransferase (GD3 Synthase): protein characterization and sub-Golgi location in cho-k1 cells.***
  Jose L. Daniotti, José A. Martina, Claudio Giraudo, **Adolfo R. Zurita** and Hugo J.F. Maccioni.
  Journal of Neurochemistry 74: 1711 1719 (2000).

- ***GD3 expression in CHO-K1 cells increases growth rates, induces morphological changes and affects cell-substrate interactions.***
  Jose L. Daniotti, **Adolfo R. Zurita**, Vera M. T. Trindade, and Hugo J. F. Maccioni.
  Neurochemical Research 27: 1421-1429 (2002)

- ***Effect of gangliosides on the distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in plasma membrane from CHO-K1 Cells.***
  Pilar M. Crespo, **Adolfo R**. **Zurita**, José L. Daniotti.
  Journal of Biological Chemistry. 277(47): 44731-44739 (2002).

Deseo destacar que en esta ultima publicación (*Journal of Biological Chemistry*) tuve una participación relevante, ya que contribuí con el desarrollo de un nuevo clon estable de células CHO-K1 y en la puesta a punto de las técnicas de solubilización con Tritón X-100 a 4°C, *cross-linking* de proteínas de membrana y centrifugación en gradiente continuo de sucrosa, donde algunos de los resultados obtenidos y publicados forman parte del Capitulo IV del presente trabajo de tesis.

REFERENCIAS

A

- Abe A., Radin N., Shayman J., Wotring L., Zipkin R., Sivakumar R., Ruggieri J., Carson K. and Ganem B., (1995). *Structural and stereochemical studies of potent inhibitors of glucosylceramide synthase and tumor cell growth.* J. Lipid Res. 36(3):611-21.
- Amthauer R., Kodukula K., Gerber L. and Udenfriend S., (1993). *Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is present in the endoplasmic reticulum.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 90(9):3973-3977.
- Anne B. Vojtek and Channing J., (1998). *Increasing Complexity of the Ras Signaling Pathway.* J. Biol. Chem. 273:19925-19928.
- Arni S., Keilbaugh S., Ostermeyer A. and Brown D., (1998). *Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues.* J. Biol. Chem. 273: 28478-28486.
- Arreaza G., Melkonian K., Lafevre-bernt M. and Brown D., (1994). *Triton X-100-resistant membrane complexes from cultured kidney epithelial cell contain the Src family protein tyrosine kinase p62^{yes}.* J. Biol. Chem. 269: 16123-19127.

B

- Bao J., Alroy L., Waterman H., Schejter E., Brodie C., Gruemberg J. and Yarden Y., (2000). *Threonine phosphorylation diverts internalised epidermal growth factor receptor from a degradative pathway to the recycling endosome.* J. Biol. Chem. 275: 26178-26186.
- Basu S., Kaufman B. and Roseman S., (1968). *Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain.* J. Biol. Chem. 243:5802-5804.
- Benard O., Naor Z. and Seger R., (2001). *Role of dynamin, Src, and Ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone*. J. Biol. Chem. 276(7):4554-4563.
- Bitton R., Guthmann M., Gabri M., Carnero A., Alonso D., Fainboim L. and Gomez D., (2002). *Cancer vaccines: An update with special focus on ganglioside antigens (Review)*. Oncol Rep. 9(2):267-276

- Blazquez C., Galve-Roperh I. and Guzman M., (2000). *De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase*. Faseb J. 14(14):2315-22.
- Bremer E., Schlessinger J. and Hakomori S., (1986). *Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor*. J. Biol. Chem. 261(5):2434-40
- Brown D. and Rose J., (1992). *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface.* Cell. 68(3):533-544.
- Burke P., Schooler K. and Wiley H., (2001). *Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by endocitosis and intracellular trafficking.* Mol. Biol. Cell. 12:1897-1910.

C

- Caputto R., Maccioni H. and Arce A., (1974). *Biosynthesis of brain gangliosides.* Mol. Cell. Biochem. 4: 97-106.
- Carpenter G., and Cohen S., (1990). *Epidermal growth factor.* J. Biol. Chem. 265: 7709-7712.
- Ceresa B. and Schmid S., (2000). *Regulation of signal transduction by endocytosis.* Current Opinion in Cell Biology. 12: 204-210.
- Chen D., Water S., Holdt K. and Pessin J., (1996). *SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signalling pathways.* J. Biol. Chem. 271: 6328-6332.
- Chu K., Ravindranath M., Gonzales A., Nishimoto K., Tam W., Soh D., Bilchik A., Katopodis N. and Morton D., (2000). *Gangliosides as targets for immunotherapy for pancreatic adenocarcinoma*. Cancer. 88(8):1828-1836.
- Cook S. and McCormick F., (1993). *Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf.* Science. 262(5136):1069-1072.
- Coso O., Chiariello M., Yu J., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T. and Gutkind J., (1995). *The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway*. Cell. 81(7):1137-1146.

- Crespo P., Zurita A. and Daniotti J., (2002). *Effect of gangliosides on the distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in plasma membrane from CHO-K1 Cells.* J. Biol. Chem. 277(47):44731-44739.

D

- Daniotti J., Landa C. and Maccioni H., (1994). *Regulation of ganglioside composition and synthesis is different in developing chick retinal pigment epithelium and neural retina.* J. Neurochem. 62(3):1131-1136.
- Daniotti J., Martina J., Giraudo C., Zurita A. and Maccioni H., (2000). *GM3 α2,8-sialiltransferase (GD3 synthase): Protein characterization and sub-Golgi location in CHO-K1 cells.* J. Neurochem. 74: 1711-1720.
- Daniotti J., Rosales Fritz V., Kunda P., Nishi T. and Maccioni H., (1997). *Cloning, characterization and developmental expression of alpha2,8 sialyltransferase (GD3 synthase, ST8Sia I) gene in chick brain and retina.* Int. J. Dev. Neurosci.15(6):767-776.
- Daub H., Wallasch C., Lankenau A., Herrlich A. and Ullrich A., (1997). *Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor.* The EMBO Journal. 16(23):7032-7044.
- Daub H., Weiss F., Wallasch C. and Ullrich A., (1996). *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors.* Nature. 379(6565):557-560.
- Decker S., (1993). *Transmembrane signalling by epidermal growth factor receptor lacking autophosphorylation sites.* J. Biol. Chem. 268: 9176-9179.
- Denhardt D., (1996). *Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling.* Biochem. J. 318:729-747.
- Dhillon A., Pollock C., Steen H., Shaw P., Mischak H. and, Kolch W., (2002). *Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259.* Mol Cell Biol. 22(10):3237-3246.
- Durieux I., Martel M. and Got R., (1990). *Solubilization of UDPglucose-ceramide glucosyltransferase from the Golgi apparatus.* Biochim. Biophys. Acta. 1024(2):263-266.

F

- Fanger G., Johnson N. and Johnson G., (1997). *MEK kinase are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42.* The EMBO Journal. 16: 4961-4972.
- Farooqui T., Franklin T., Pearl D. and Yates A., (1997). *Ganglioside GM1 enhances induction by nerve growth factor of a putative dimer of TrkA.* J. Neurochem. 68: 2348-2355.
- Fish R., (1996). *Role of gangliosides in tumour progression: a molecular target for cancer therapy?*. Med. Hypotheses. 46(2):140-144.
- Friedrichson T. and Kurzchalia T., (1998). *Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking*. Nature. 394: 802-805.
- Fukuda M., Gotoh Y. and Nishida E., (1997). *Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase.* The EMBO Journal. 16: 1901-1908.
- Furuchi T. and Anderson R., (1998). *Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK)*. J. Biol. Chem. 273: 21099-21104.
- Fukumoto S., Mutoh T., Hasegawa T., Miyazaki H., Okada M., Goto G., Furukawa K. and Urano T., (2000). *GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation.* J. Biol. Chem. 275(8):5832-5838.

G

- Galbiati F., Volonté D., Meani D., Milligan G., Lunlin D., Lisanti M. and Parenti M., (1999) .*The dually acylated NH_2-terminal domain of G_{i1a} is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains.* J. Biol. Chem.274: 4843-5850.
- Garrington T. and Johnson G., (1999). *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways.* Current Opinion in Cell Biology. 11: 211-218.
- Geisler F., (1998). *Clinical trials of pharmacotherapy for spinal cord injury.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 845:374-381.

- Geisler F., Coleman W., Grieco G., Poonian D., the Sygen Study Group, (2001). *The Sygen multicenter acute spinal cord injury study*. Spine. 26(24 Suppl):S87-S98.
- Geisler F., Dorsey F. and Coleman W., (1992). *GM-1 ganglioside in human spinal cord injury*. J. Neurotrauma. 9 (2):S517-S530.
- Giraudo C., Daniotti J. and Maccioni H., (2001). *Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98(4):1625-1630.
- Giraudo C., Rosales Fritz V. and Maccioni H., (1999). *GA2/GM2/GD2 synthase localizes to the trans-Golgi network of CHO-K1 cells.* Biochem. J. 342(3):633-640.
- Gkantiragas I., Brugger B., Stuven E., Kaloyanova D., Li X., Lohr K. and Lottspeich F., (2001). *Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex.* Mol. Biol. Cell. 12(6):1819-1833.

H

- Hackel P., Zwick E., Prenzel N. and Ullrich A., (1999). *Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways.* Current Opinion In Cell Biology. 11: 184-189.
- Hakomori S., (1970). *Cell density-dependent changes of glycolipid concentrations in fibroblasts and loss of this response in virus transformed cells.* Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A 90:10300-10304.
- Hakomori S., (1981). *Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis.* Amm. Rev. Biochem. 50: 733-764.
- Holthuis J., Pomorski T., Raggers R., Sprong H. and Van Meer G., (2001). *The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport*. Physiol. Rev. 81(4):1689-1723.
- Hordijk P., Verlaan I., Jalink K., van Corven E. and Moolenaar W., (1994). *cAMP abrogates the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway in fibroblasts.* J. Biol. Chem. 269:3534-3538.
- Horibata Y., Okino N., Ichinose S., Omori A. and Ito M., (2000). *Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel acidic endoglycoceramidase from the jellyfish, Cyanea nozakii*. J. Biol. Chem. 275(40):31297-31304.

- Hunter T., (1998). *The cronian lecture, 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease.* Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci. 353. 583-605.

I

- Ishii K., Kamohara S., Hayashi H., Todaka M., Kanai F., Imanaka T. and Ebina Y., (1994). *Epidermal growth factor triggers the translocation of insulin-responsive glucose transporter (GLUT4).* Biochem. Biophys. Res. Commun. 205(1):857-863.
- Ito M. and Yamagata T., (1986). *A novel glycosphingolipid-degrading enzyme cleaves the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids.* J. Biol. Chem. 261: 14278-14282.
- Ito M., Ikegami Y. and Yamagata T., (1991). *Activator proteins for glycosphingo-lipid hydrolysis by endoglycoceramidases. Elucidation of biological functions of cell- surface glycosphingolipids in situ by endoglycoceramidases made possible using these activator proteins.* J. Biol. Chem. 266: 7919-7926.
- Iwabuchi K., Yamamura S., Prinetti A., Handa K. and Hakomori S., (1998). *GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells*. J. Biol. Chem. 273(15):9130-9138.

J

- JI L., Makoto I., Zhang G. and Yamagata T., (1995). *The hydrolysis of cell surface glycosphingolipids by endoglycoceramidase reduces epidermal growth factor receptor phosphorylation in A431 cells.* Glycobiology. 5 (3): 343-350.

K

- Kalka D, von Reitzenstein C, Kopitz J, Cantz M., (2001). The plasma membrane ganglioside sialidase cofractionates with markers of lipid rafts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 283(4):989-993
- Kasahara K., Watanabe K., Takeuchi K., Kaneko H., Oohira A., Yamamoto T. and Sanai Y., (2000). *Involvement of gangliosides in glycosylphosphatidylinositol-*

anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling in lipid rafts. J. Biol. Chem. 275:34701-34709.

- Kasahara K., Watanabe Y., Yamamoto T. and Sanai Y., (1997). *Association of Src family tyrosine kinase Lyn with ganglioside G_{D3} in rat brain.* J. Biol. Chem. 272: 29947-29953.
- Kawai H., Allende M., Wada R., Kono M., Sango K., Deng C., Miyakawa T., Crawley J., Werth N., Bierfreund U., Sandhoff K. and Proia R., (2001). *Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures.* J. Biol. Chem. 276: 6885-6888.
- Keller P., Toomre D., Diaz E., White J. and Simons K., (2001). *Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells.* Nature Cell Biology. 3: 140-149.
- Kirchhausen T., (2002). *Clathrin adaptors really adapt*. Cell. 17;109 (4):413-416.
- Klint P., Kanda S. and Claesson-Welsh L., (1995). *Shc a novel 89-kDa component couple to the Grb2-Sos complex in fibroblast growth factor-2-stimulated cells.* J. Biol. Chem. 270: 23337-23344.
- Kolesnick R. and Krönke M., (1998). *Regulation of ceramide production and apoptosis*. Annu. Rev. Physiol. 60,643-665.

L

- Ladisch S., Kitada S. and Hays E., (1987). *Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice*. J. Clin. Invest. 79(6):1879-1882.
- Laemmli U., (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227(259):680-685.
- Lannert H., Gorgas K., Meissner I., Wieland F. and Jeckel D., (1998). *Functional organization of the Golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. Lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late Golgi.* J. Biol. Chem. 273: 2939-2946.
- Ledeen R., (1985). *Gangliosides of the neuron.* TIBS. 8: 169-174.
- Lemmon M., Bu Z., Ladbury J., Zhou M., Pinchasi D., Lax I., Engelman D. and Schlessinger J., (1997). *Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer* The EMBO Journal. 16: 281-294.
- Li R. and Ladisch S., (1991). *Shedding of human neuroblastoma gangliosides*. Biochim. Biophys. Acta. 1083(1):57-64

- Li R., Kong Y. and Ladisch S., (1998). *Nerve growth factor-induced neurite formation in PC12 cell is independent of endogenous cellular gangliosides.* Glycobiology. 8 (6): 597-603.
- London E. and Brown D., (2000). *Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domain (rafts).* Biochim. Biophys. Acta. 1508: 182-195.
- Luttrell L., Daaka Y. and Lefkowitz R., (1999). *Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-couples receptors.* Current Opinion in Cell Biology. 11: 177-183.

M

- Maccioni H., Daniotti J. and Martina J., (1999). Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. Biochim. Biophys. Acta. 1437(2):101-118.
- Maccioni H., Giraudo C. and Daniotti J., (2002). *Understanding the stepwise synthesis of glycolipids*. Neurochemical Research. 27(7-8):629-936.
- Maccioni H., Rosales Fritz V., Maxzud K., Daniotti J. and Martina J., (1996). *Compartmental organization of ganglioside synthesis in the Golgi complex.* Biocell. 20(3):279-286.
- Mamounas M., Ross S., Luong C., Brown E., Coulter K., Carroll G. and Englesberg E., (1991). *Analysis of the genes involved in the insulin transmembrane mitogenic signal in Chinese hamster ovary cells, CHO-K1, utilizing insulin-independent mutants*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 88(9):3530-3534.
- Matsubara T., Ishikawa D., Taki T., Okahata Y. and Sato T., (1999). *Selection of ganglioside GM1-binding peptides by using a phage library*. FEBS Lett. 456: 253-256.
- Maurer B., Melton L., Billups C., Cabot C., Reynolds C., (2000). *Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between n-(4-hydroxyphenyl)retinamide and modulators of ceramide metabolism.* Journal of the National Cancer Institute. 92 (23):1897-1909.
- McCabe J. and Berthiaume L., (2001). N-*terminal protein acylation confers localization to cholesterol, sphingolipid-enriched membranes but not to lipid rafts/caveolae.* Mol. Biol. Cell. 12: 3601-3617.

- Meuillet E., Kroes R., Yamamoto H., Warner T., Ferrari J., Mania-Farnell B., George D., Rebbaa A., Moskal J. and Bremer E., (1999). *Sialidase gene transfection enhances epidermal growth factor receptor activity in an epidermoid carcinoma cell line, A431.* Cancer Res. 59: 234-240.
- Meuillet E., Mania-Farnell B., George D., Inokuchi J. and Bremer E., (2000). *Modulation of EGF receptor activity by changes in the GM3 content in a human epidermoid carcinoma cell line, A431*. Exp. Cell. Res. 256(1):74-82.
- Miljan E., Meuillet E., Mania-Farnell B., George D., Yamamoto H., Simon H. and Bremer E., (2002). *Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides*. J. Biol. Chem. 277:10108-10113.
- Mineo C., Gill G. and Anderson R., (1999)*. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae.* J. Biol. Chem. 274: 30636-30643.
- Mineo C., James G., Smart E. and Anderson R., (1996)*. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane.* J. Biol. Chem. 271: 11930-11935.
- Mitsuda T., Furukawa K., Fukumoto S., Miyazaki H., Urano T. and Furukawa K., (2002)*. Over-expression of ganglioside GM1 result in the dispersion of platelet derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals.* J. Biol. Chem. Published online ahead of print January 8, 2002.
- Moghal N. and Sternberg P., (1999). *Multiple positive and negative regulators of signalling by the EGF-receptor.* Current Opinion in Cell Biology. 11. 190-196.
- Morrison D. and Cutler R., (1997). *The complexity of Raf-1 regulation.* Current Opinion in Cell Biology. 9(2):174-179.
- Morrison P., Saltiel A. and Rosner M., (1996). *Role of mitogen-activated protein kinase in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C.* J. Biol. Chem. 271:12891-12896.
- Murali R., Brennan P., Kieber-Emmons T. and Greene M., (1996). *Structural analysis of p185$^{c\text{-}neu}$ and epidermal growth factor receptor tyrosine kinases: Oligomerization of kinase domain.* Proc. Natl. Acad. Sci USA. 93: 6252-6257.
- Mutoh t., Tokuda A., Inokuchi J. and Kuriyama M., (1998). *Glucosylceramide synthase inhibitor inhibit the action of nerve growth factor in PC12 cells.* J. Biol. Chem. 273: 26001-26007.

- Mutoh T., Tokuda A., Miyadai T., Hamaguchi M. and Fujiki N., (1995). *Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 92(11):5087-5091.

N

- Nakano J., Asagami R. and Ko L., (1996). *Human melanoma cell lines deficient in GD3 ganglioside expression exhibit altered growth and tumorogenic characteristics.* J. Invest. Dermatol. 107(4): 543-548.
- Nakano J., Yasui H., Ko L. and Muto M., (1999). *Biologic roles of gangliosides G(M3) and G(D3) in the attachment of human melanoma cell to extracellular matrix proteins.* J. Invest. Dermatol. 4(2): 173-176.
- Nakayama J., Fukuda M., Hirabayashi Y., Kanamori A., Sasaki K., Nishi T. and Fukuda M., (1996). *Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 AND GT3 are synthesized by a single enzyme*. J. Biol. Chem. 271: 3684-3691.
- Nichols B., (2002). *A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex.* Nature Cell. Biol. 4(5):374-378.

O

- Ostermeyer A., Beckrich B., Ivarson K., Grove K. and Brown D., (1999). *Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein*. J. Biol. Chem. 274:34459-34466.

P

- Paul P., Kamisaka Y., Marks D. and Pagano R., (1996). *Purification and characterization of UDP-glucose:ceramide-glucosyltransferase from rat liver Golgi membranes.* J. Biol. Chem. 271(4):2287-2293.
- Perry D., (2000). *The role of de novo ceramide synthesis in chemotherapy-induced apoptosis*. Ann. N. Y. Acad. Sci. USA. 905: 91-96.
- Perz M. and Torli*ƒ*ska T., (2001). *Insulin receptor – structural and functional characteristics*. Med. Sci. Monit. 7(1): 169-177.

R

- Rebbaa A., Hurh J., Yamamoto H., Kersey D. and Bremer E., (1996). *Ganglioside GM3 inhibition of EGF receptor mediated signal transduction.* Glycobiology. 6: 399-406.
- Reise D. and Stern D., (1998). *Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signalling network.* Bioessays. 20: 41-48.
- Riboni L. and Tettamanti G., (1991) . *Rapid internalization and intracellular metabolic processing of exogenous ganglioside by cerebellar granule cells differentiated in culture.* J. Neurochem. 57(6):1931-1939.
- Riboni L., Bassi R., Conti M. and Tettamanti G., (1993). *Metabolism of exogenous ganglioside GM1 in cultured cerebellar granule cells. The fatty acid and sphingosine moieties formed during degradation are re-used for lipid biosynthesis.* FEBS Lett. 322(3):257-260.
- Riggott M. and Matthew W., (1997). *Neurite outgrowth is enhanced by anti-idiotypic monoclonal antibodies to the gangliosideGM1.* Exp. Neurol. 145(1): 278-287.
- Ringerike T., Blystad F., Levy F., Madshus I. and Stang E., (2002). *Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae*. J. Cell. Sci. 115: 1331-1340.
- Roepstorff K., Thomsen P., Sandvig K. and Van Deurs B., (2002). *Sequestration of EGF receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding*. J. Biol. Chem. J. Biol. Chem. 277(21):18954-18960.
- Rosales Fritz V., Daniotti J. and Maccioni H., (1997). *Chinese hamster ovary cells lacking GM1 and GD1a synthesize gangliosides upon transfection with human GM2 synthase.* Biochim. Biophys. Acta. 1354(2):153-158.
- Rosales Fritz V., Maxzúd K. and Maccioni H., (1996). *GT3 synthesis in the proximal Golgi occurs in a compartment different from those for GD3 and GM3 synthesis.* J. Neurochem. 67(4):1393-1400.

S

- Sakaguchi K., Okabayashi Y., Kido Y., Kimura S., Matsumura Y., Inushima K., Kasuga M., (1998). *Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts*

with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells. Mol. Endocrinol. 12(4):536-543.

- Sandhoff K. and Kolter T., (1997). *Biochemistry of glycosphingolipid degradation*. Clin. Chim. Acta. 266(1):51-61.
- Saqr H., Pearl D. and Yates A., (1993). *A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes*. J. Neurochem. 61(2):395-411.
- Sasaoka T., Langlois W., Leitner J., Draznin B. and Olefsky J., (1994). *The signal pathway coupling epidermal growth factor receptor to activation of p21^{raf}.* J. Biol. Chem. 269: 32621-32625.
- Scales S., Gomez M. and Kreis T., (2000). *Coat proteins regulating membrane traffic*. Int. Rev. Cytol. 195:67-144.
- Schaefer G., Akita R. and Sliwkowski M., (1999). *A discrete three-amino acid segment (LVI) at C-terminal end of kinase-impaired ErbB3 is required for trans-activation of ErbB2.* J. Biol. Chem. 274: 859-866.
- Schlessinger J., (2000). *Cell signalling by receptor tyrosine kinases*. Cell. 103. 211-225.
- Schramm K., Niehof M., Radziwill G., Rommel C. and Moelling K., (1994). *Phosphorylation of c-Raf-1 by protein kinase A interferes with activation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201(2):740-747.
- Schroeder R., Ahmed S., Zhu Y., London E. and Brown D., (1998). *Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains.* J. Biol. Chem. 273(2):1150-1157.
- Schwartz M. and Baron V., (1999). *Interaction between mitogenic stimuli, or, thousand and one connections.* Current opinion in cell biology. 11: 197-202.
- Simons K. and Ikonen E., (1997). *Functional rafts in cell membranes*. Nature 387(6633):569-572.
- Simons K. and Toomre D., (2000). *Lipid rafts and signal transduction.* Nature reviews. 1: 31-39.
- Simons M., Friedrichson T., Schulz J., Pitto M., Masserini M. and Kurzchalia T., (1999). *Exogenous administration of gangliosides displaces GPI-anchored proteins from lipid microdomain in living cells.* Mol. Biol. Cell. 10: 3187-3196.

- Slevin M., Kumar S., He X. and Gaffney J., (1999). *Physiological concentrations of gangliosides GM1, GM2 and GM3 differentially modify basic-fibroblast-growth-factor-induced mitogenesis and the associated signalling pathway in endothelial cells.* Int. J. Cancer. 82: 412-423.
- Song J., Hirschman J., Gunn K. and Dohlman H., (1996). Regulation of membrane and subunit interactions by N-myristoylation of a G protein alpha subunit in yeast. J. Biol. Chem. 271(34):20273-20283.
- Sorkin A. and Carpenter G., (1991). *Dimerization of internalized epidermal growth factor receptor.* J. Biol. Chem. 266: 23453-23460.
- Sorokin A., Lemmon M., Ullrich A. and Schlessinger J., (1994). *Stabilisation of an active dimer form of the epidermal growth factor receptor by introduction of an inter-receptor disulfide bond.* J. Biol. Chem. 269: 9752-9759.
- Spiegel S., Matyas G., Cheng L. and Sacktor B., (1988). *Asymmetric distribution of gangliosides in rat renal brush-border and basolateral membranes*. Biochim. Biophys. Acta. 938(2):270-278.
- Sprong H., Degroote S., Claessens T., van Drunen J., Oorschot V., Westerink B., Hirabayashi Y., Klumperman J., van der Sluijs P. and, van Meer G., (2001). *Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex*. J. Cell. Biol.155 (3):369-380.
- Stan R., (2002). *Structure and function of endothelial caveolae*. Microsc. Res. Tech. 57(5):350-364
- Suarez Pestana E., Greiser U., Fernández L., Lage A., Perez R. and Böhmer F., (1997). *Growth inhibition of human lung adenocarcinoma cells by antibodies against epidermal growth factor receptor and by ganglioside GM3: involvement of receptor-directed protein tyrosine phosphatase(s).* British Journal of Cancer. 72 (2): 21-220.
- Suarez Pestana E., Tenev T., Gross S., Stoyanov B., Ogata M. and Böhmer F., (1999). *The transmembrane protein tyrosine phosphatase RPTPsigma modulates signaling of the epidermal growth factor receptor in A431 cells*. Oncogene. 15;18 (28):4069-4079.
- Subramaniam P. and Johnson H., (2002). *Lipid microdomains are required sites for the selective endocytosis and nuclear translocation of IFN-gamma, its re-*

ceptor chain IFN-gamma receptor-1, and the phosphorylation and nuclear translocation of STAT1alpha. J. Immunol.169 (4):1959-1969.

- Sugiyama K. and Saito M., (1999). *Growth- and development-dependent expression of gangliosides in rat hepatocytes and liver tissues*. Biol. Chem. 80(4):413-418.

T

- Taylor C., Coetzee T. and Pfeiffer S., (2002). *Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane.* J. Neurochem. 81(5):993-1004.
- Tifft C. and Proia R., (2000). *Stemming the tide: glycosphingolipid synthesis inhibitors as therapy for storage diseases.* Glycobiology.10 (12):1249-1258.
- Towbin H., Staechelin T. and Gordon J., (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc. Natl. Acad. Sci USA. 76: 4350-4354.
- Tzahar E., Pinkas-Kramarski R., Moyer J., Klapper L., Alroy I., Levkowitz G., Shelly M., Henis S., Eisenstein M., Ratzkin B., Sela M., Andrews G. and Harden Y., (1997). *Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signalling network.* The EMBO Journal. 16(16):4938-4950.
- Tzahar E., Waterman H., Chen X., Levkowitz G., Karunagaran D., Lavi S., Ratzkin B. and Yarden Y., (1996). *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor.* Mol. Cell. Biol. 16(10): 5276-5287.

V

- Van Brocklyn J., Vandenheede J., Fertel R., Yates A. and Rampersaud A., (1997). *Ganglioside GM1 activates the mitogen-activated protein kinase Erk2 and p70 S6 kinase in U-1242 MG human glioma cells.* J. Neurochem. 69: 116-125.
- Velasco A., Hendricks L., Moremen K., Tulsiani D., Touster O. and Farquhar M., (1993). *Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of alpha-mannosidase I and II*. J. Biol. Chem. 122(1):39-51.
- Vojtek A. and Der C., (1998). *Increasing Complexity of the Ras Signalling pathway.* J. Biol. Chem. 273: 19928-19928.

- Vyas K., Patel H., Vyas A. and Schnaar R., (2001). *Segregation of gangliosides GM1 and GD3 on cell membranes, isolated membrane rafts, and defined supported lipid monolayers.* Biol. Chem. 382 (2):241-50.

W

- Waheed A., Shimada Y., Heijnen H., Nakumura M., Inomata M., Hayashi M., Iwashita S., Slot J. and Ohno-Iwashita Y., (2001). *Selective binding of perfringolysin o derivative to cholesterol-rich membrane microdomain (RAFTs).* Proc. Natl. Acad. Sci USA. 98: 4926-4931.
- Wang X., Sun P. and Paller A., (2002). *Ganglioside induces caveolin-1 redistribution and interaction with the epidermal growth factor receptor*. J. Biol. Chem. Sep 26. [Paper in Press]
- Wang X., Rahman Z., Sun P., Meuillet E., George D., Bremer E., Al-Qamari A. and Paller A., (2001a). *Ganglioside modulates ligand binding to the epidermal growth factor receptor*. J. Invest. Dermatol. 116(1):69-76.
- Wang X., Sun P., O'Gorman M., Tai T., Paller A., (2001b). *Epidermal growth factor receptor glycosylation is required for ganglioside GM3 binding and GM3-mediated suppression [correction of suppresion] of activation*. Glycobiology. 11(7):515-522.
- Waterman H., Sabanai I., Geiger B. and Yarden Y., (1998). *Alternative intracellular routing of receptor may determine signal potency.* J. Biol. Chem. 273: 13819-13827.
- Waters S., Holt K., Ross S., Syu L., Guan K., Saltiel A., Koretzky G., Pessin J., (1995). *Desensitization of Ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex.* J. Biol. Chem. 270: 20883-20886.
- Waugh M., Lawson D. and Hsuan J., (1999). *Epidermal growth factor receptor activation is localized within low-buoyant density, non-caveolar membrane domains*. Biochem. J. 337: 591-597.
- Weis F. and Davis R., (1990). *Regulation of epidermal growth factor receptor signal transduction. Role of gangliosides.* J. Biol. Chem. 265: 12059-12066.
- Wera S. and Hemmings B., (1995). *Serine/threonine protein phosphatases*. Biochem. J*. 311 (1):17-29.*

Y

- Yamashita T., Wada R., Sasaki T., Deng C., Bierfreund U., Sandhoff K. and Proia R., (1999). *A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation.* Proc. Natl. Acad. Sci USA. 96 (16): 9142-9147.
- Yates A., Walters J., Wood C. and Johnson J., (1989). *Ganglioside modulation of cyclic AMP-dependent protein kinase and cyclic nucleotide phosphodiesterase in vitro*. J. Neurochem. 53: 162-167.
- Yates A., Saqr H. and Van Brockyn J,. (1995). *Ganglioside modulation of the PDGF receptor. A model for ganglioside functions*. J. Neurooncol. 24(1):65-73.

Z

- Zhou Q., Hakomori S., Kitamura K. and Igarashi Y., (1994). GM3 directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-N-acetyl-GM3 directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction. J. Biol. Chem. 269(3):1959-1965.