

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS DE LICENCIATURA

**Estudio de la dinámica y organización del
receptor de acetilcolina nicotínico mediante
análisis de imágenes de superresolución y técnicas
avanzadas de microscopía de fluorescencia**

Alejo MOSQUEIRA

Septiembre de 2020

TEMA: Biofísica.

ALUMNO: Alejo Mosqueira
(alejomosqueira@gmail.com)

LU: 163/09

DIRECTOR: Dr. Francisco J. Barrantes
(rtfjb1@gmail.com)

CODIRECTORA: Dra. Laura C. Estrada
(lestrada@df.uba.ar)

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Neurobiología Molecular,
Instituto de Investigaciones Biomédicas
BIOMED (UCA - CONICET)

INICIO: Septiembre de 2019

FINALIZACIÓN: Septiembre de 2020

FECHA DE EXAMEN:

INFORME FINAL APROBADO POR:

Alumno: Alejo Mosqueira

Director: Francisco J. Barrantes

Jurada: Lía I. Pietrasanta

Co-Directora: Laura C. Estrada

Jurado: Oscar E. Martínez

Profesora de Tesis de Licenciatura

Jurado: Aníbal E. Disalvo

A mi familia.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Receptor de acetilcolina nicotínico	3
2.2. Colesterol	5
2.3. Microscopías de Superresolución	9
2.4. Membrana celular	11
2.5. Difusión lateral de proteínas de membrana	16
2.6. Organización del trabajo	18
3. Materiales y métodos	20
3.1. Cultivo de células, modificación de los niveles de colesterol celular y microscopia de superresolución STORM	20
3.2. Análisis de datos de microscopía de superresolución	20
3.2.1. Determinación de las coordenadas sub-difracción moleculares	20
3.2.2. Seguimiento de molécula única (SPT)	21
3.2.3. Criterio de exclusión de moléculas inmóviles	23
3.2.4. Análisis de desplazamientos cuadráticos medios (MSD)	24
3.2.5. Distribución de tiempos de escape	27
3.2.6. Análisis de recurrencia de trayectorias de molécula única	28
3.2.7. Análisis de segmentación de trayectorias únicas basado en tiempos de escape	29
3.2.8. Análisis de ángulos de giro (cambios direccionales)	31
3.2.9. Análisis de agrupamiento de receptores	33
3.2.10. Análisis estadísticos	33
4. Resultados	35
4.1. Parte I: Análisis de desplazamientos cuadráticos medios (MSD) de la difusión lateral del nAChR	35
4.1.1. Movimiento aparente del nAChR en la membrana celular	36
4.1.2. Análisis de desplazamiento cuadráticos medios (MSD)	39
4.1.3. Clasificación de las trayectorias en subpoblaciones según su capacidad difusiva	40
4.1.4. Hipótesis de ergodicidad	42
4.2. Parte II: Modelado biofísico de la dinámica del nAChR	47
4.2.1. Caminata aleatoria de tiempo continuo (CTRW)	47
4.2.2. Análisis de recurrencia	49
4.2.3. Análisis de segmentación de trayectorias basado en tiempos de escape	51
4.2.4. Análisis de cambios direccionales o ángulos de giro	57
4.2.5. Pasos anti-correlacionados y estancias de confinamiento	62
4.2.6. Análisis de acúmulos (clusters) del nAChR	64

5. Discusión	69
5.1. El nAChR exhibe un comportamiento poblacional altamente heterogéneo	69
5.2. Tiempos insuficientes de registro darían lugar a una ruptura de ergodicidad aparente	70
5.3. Heterogeneidad microscópica: las trayectorias individuales se encuentran interrumpidas por confinamientos transitorios en dominios nanométricos con altas concentraciones de obstáculos	71
5.4. Modulación de la dinámica difusional del nAChR: efectos sinérgicos del colesterol en el auto-agrupamiento del receptor y el atrapamiento en regiones confinadas	76
6. Conclusiones	80
7. Agradecimientos	82
Referencias	84

1. Resumen

En los últimos años, la física ha adquirido un papel preponderante en el entendimiento de la biología molecular a través de la aplicación de la mecánica estadística y el desarrollo de nuevas tecnologías (como la microscopía de superresolución o “nanoscopía”). En este trabajo, combinamos imágenes de superresolución de microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM) con una serie de análisis biofísicos para estudiar la difusión lateral del receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) de tipo muscular adulto en la superficie de células de mamífero CHO-K1/A5. Se observó que el nAChR exhibe una dinámica altamente heterogénea. Una proporción muy importante ($\sim 52 \pm 22$ %) se halló completamente inmóvil. La población móvil, por su parte, exhibió un comportamiento mayoritariamente subdifusivo (exponente de anomalía $\langle \beta \rangle \sim 0.85 \pm 0.23$ y coeficiente de difusión generalizado $\langle K_\beta \rangle \sim 0.26 \pm 0.41 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-\beta}$), junto con moléculas únicas de difusión Browniana y, otras minoritarias, superdifusivas. El ~ 90 % de los receptores (independientemente de su modalidad difusional) exhibieron un comportamiento de difusión intermitente entre dos estados: caminatas al azar (Browniana) interrumpidas por estancias de ~ 170 - 470 ms de duración en zonas de confinamiento con radios de $\sim 36 \pm 13$ nm y alto contenido de obstáculos. A nivel poblacional, los nAChRs forman parte de eventos de agregación supramolecular de $\sim 3.9 \pm 0.8$ s de duración y en zonas con radios promedio de 149 ± 13 nm. La modificación del contenido de colesterol de membrana produjo cambios tanto en la dinámica individual como en la poblacional. Por un lado, el enriquecimiento de colesterol disminuyó la proporción de trayectorias subdifusivas y aumentó considerablemente la proporción de trayectorias superdifusivas, generando un aumento en los parámetros dinámicos del receptor ($\langle \beta \rangle \sim 0.91 \pm 0.23$ y $\langle K_\beta \rangle \sim 0.43 \pm 0.79 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-\beta}$). Por otro lado, la reducción del colesterol se vio asociada a una desestabilización de los eventos que lo confinan y que lo agregan, reflejada en una reducción significativa de las duraciones (~ 250 - 700 ms y $\sim 2.5 \pm 0.1$ s, respectivamente) y de los tamaños ($\sim 32 \pm 13$ nm y $\sim 107 \pm 4$ nm radio, respectivamente) en donde ocurren. Por lo tanto, la combinación entre estancias de confinamiento del orden de milisegundos y eventos de auto agregación del receptor del orden de segun-

dos, ambos dependientes de la concentración de colesterol, determina la dinámica individual y poblacional del receptor en membrana.

2. Introducción

2.1. Receptor de acetilcolina nicotínico

La superfamilia de los canales iónicos pentaméricos gatillados por ligando (pLGIC) es una colección de proteínas integrales de membranas expresadas en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Estos receptores desarrollan funciones muy importantes en la señalización de la superficie celular, a través de la traducción de señales químicas contenidas en neurotransmisores en flujos iónicos rápidos en la membrana postsináptica. El receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) es uno de los receptores de neurotransmisores mejor caracterizados de esta familia, y uno de los más comunes tanto en el SNC como en el SNP en vertebrados [1]. Con aproximadamente 290kDa de peso molecular, el nAChR está compuesto por 5 subunidades que atraviesan completamente la membrana plasmática, formando una estructura pseudo-simétrica de tipo barril alrededor del poro central (canal) por el cual permean cationes Na^+ , K^+ y, en algunos casos, Ca^{2+} [2,3] (ver Figura 2.1). El nAChR responde al neurotransmisor endógeno, la acetilcolina (ACh), y a la nicotina (Nic), propiedad por la cual recibe su nombre. Existe otra variedad de receptores de acetilcolina, el receptor de acetilcolina muscarínico (mAChR), cuyo agonista endógeno también es la acetilcolina, pero que responde a otro agonista, la muscarina. El mAChR pertenece a la superfamilia de los receptores asociados a proteínas G (GPCR), que difieren tanto estructural como filogenéticamente de la de los pLGIC [4]. El nAChR posee dos sitios de unión a ligando con distinta afinidad, y ambos deben ser ocupados para generar la apertura total del canal iónico que es parte intrínseca de la proteína receptora. Cuando el receptor es activado, se genera un cambio conformacional que produce una rápida apertura del canal (en el orden de los ms) y un consecuente flujo de cationes, dando lugar a una rápida despolarización de la membrana [5].

Resultado de la gran diversidad de genes que codifican los 17 tipos de subunidades del nAChR identificados en vertebrados (α_{1-10} , β_{1-4} , δ , γ y ϵ), existe una gran variedad de subtipos de receptor con variados atributos de importancia fisiológica,

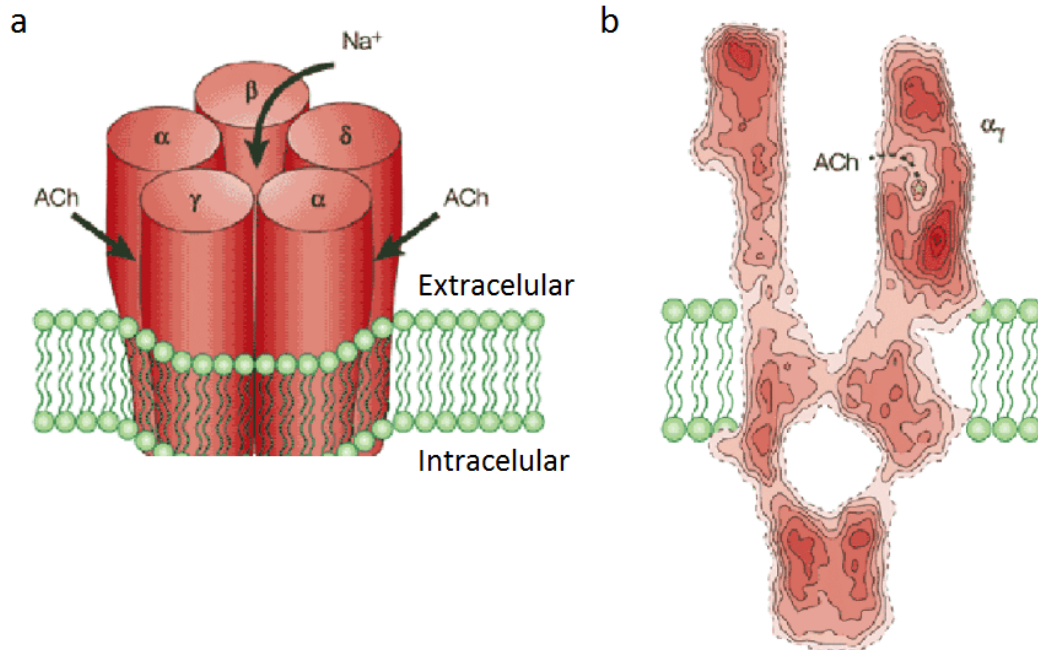


Figura 2.1: Esquema de la estructura del nAChR. (a) Representación del receptor de acetilcolina nicotínico de tipo muscular. Se muestran los sitios de unión de la acetilcolina y el poro central por el que permean cationes de sodio. (b) Corte transversal del receptor por microscopía electrónica. Se muestra la localización aproximada del sitio de unión de la ACh en una de las subunidades α [6].

clínica y farmacológica [7–11]. Según su estructura y su función, los subtipos pueden ser clasificados en dos grandes familias: los receptores nicotínicos de tipo muscular (subunidades α_1 , β_1 , δ , γ y ϵ), presentes en el músculo esquelético y en los órganos eléctricos de peces eléctricos [12]; y los receptores de tipo neuronal (subunidades α_{2-10} y β_{2-4}), presentes tanto en el SNC como en el SNP, así como también en otros tipos de células no neuronales (inmunes, linfocitos, epiteliales) [8, 13–15]. El nAChR de tipo muscular (el cual se estudia en el presente trabajo) está compuesto por dos subunidades α_1 , una subunidad β_1 , una subunidad δ y una subunidad γ en el receptor embrionario; en el receptor adulto la subunidad γ es reemplazada por una subunidad ϵ . Mientras que un sitio de unión a ligando se encuentra en la interfaz entre una subunidad α y una γ , el otro yace en la interfaz entre otra subunidad α y la δ , ambos con distinta afinidad (Figura 2.1) [16, 17]. El nAChR adulto se encuentra naturalmente agrupado en cúmulos de receptores a una densidad de ~ 10 -20 mil moléculas por μm^2 en la membrana post-sináptica de la placa neuromuscular, una

distribución topográfica de vital importancia para la neurotransmisión colinérgica que da lugar a la contracción muscular [18,19]. Cuando dicha distribución se encuentra afectada, tal como en la enfermedad autoinmune miastenia gravis, se produce una debilidad muscular crónica que dificulta el movimiento y, en algunos casos, afecta la deglución e incluso la respiración (ver revisión en [20]). El nAChR de tipo neuronal, por su parte, se encuentra tanto en la región pre- como post-sináptica, y una de sus principales funciones es regular la secreción de neurotransmisores en varias regiones del cerebro.

Además de la ACh o la Nic, existen otros agonistas y antagonistas que se unen con gran afinidad al receptor. Uno de ellos es la α -Bungarotoxina (α -BTX o BTX) [21], una toxina de una serpiente extremadamente venenosa proveniente de las regiones central y sudeste de China, la cobra taiwanesa *Bungarus multicinctus*. Este péptido de 74 aminoácidos y 8kDa de peso molecular se une de forma competitiva (antagonista) y con muy alta afinidad al nAChR de tipo muscular, produciendo un bloqueo potente del receptor en la placa neuromuscular, causando parálisis y falla respiratoria. Aislado y conjugado con un fluoróforo, la BTX ha sido ampliamente utilizada como sonda del nAChR tanto en análisis bioquímicos como en diversos tipos de microscopía de fluorescencia, jugando un papel fundamental en la caracterización de su estructura, así como también de su dinámica y organización en la placa neuromuscular y en diversas líneas celulares [22-25].

Es sabido que el nAChR interviene en una amplia variedad de procesos fisiológicos. Por lo tanto, su disfunción se encuentra asociada a un amplio rango de condiciones patológicas, tales como el dolor crónico, los desórdenes del espectro esquizofrénico, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y algunas enfermedades autoinmunes [8,26,27]. Por ello, comprender los fenómenos que determinan el balance homeostático espacio-temporal de este receptor es clave para entender la función de la sinapsis en salud y los procesos que subyacen a las condiciones patológicas.

2.2. Colesterol

El colesterol (3-hidroxi-5, 6 colesteno) es un tipo de lípido (esterol) altamente hidrofóbico, y un componente estructural esencial en las membranas de células ani-

males (Figura 2.2). Su principal importancia se debe a que constituye el 35-45 % mol del total de lípidos presentes en la membrana celular, siendo un regulador clave en las propiedades físicas de la membrana [28, 29]. En el sistema nervioso central, el colesterol se encuentra mayormente presente en las membranas de astrocitos, en vesículas sinápticas y en la mielina (componente que recubre los axones, de suma importancia para la eficacia de la conducción nerviosa). Sus funciones abarcan desde controlar la formación de la sinapsis y su función, hasta regular la organización de la membrana, la endocitosis y exocitosis.

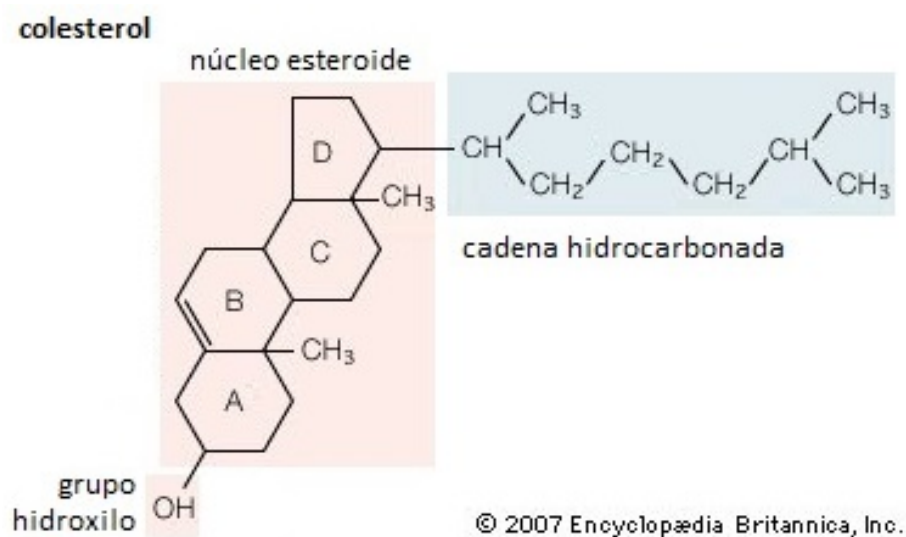


Figura 2.2: Estructura molecular del colesterol. El colesterol está conformado por una cabeza polar (o hidrofílica) (grupo hidroxilo OH), y una porción apolar (o hidrofóbica) conformada por un núcleo esteroide (constituido por cuatro carbociclos condensados A, B, C y D) y una cadena hidrocarbonada.

El ambiente lipídico de la membrana en el cual los receptores se encuentran embebidos afecta tanto su organización como sus propiedades funcionales. Se ha visto que el colesterol influencia la separación de la membrana en dominios líquido-ordenados (L_o) o "balsas lipídicas", de las cuales es parte constitutiva (Figura 2.3) [30–32]. Estas regiones de la membrana se caracterizan por un grado de organización mayor al resto de la membrana celular, en fase líquido-desordenada (L_d). Una de las funciones más importantes de las regiones L_o es que generan una compartimentalización de la membrana en nano y micro-dominios [33]. Estos dominios, ricos en

colesterol, pero también en glicoesfingolípidos y otros esteroides, poseen propiedades viscoelásticas diferentes, modificando tanto la organización como la difusión de proteínas transmembrana. Por ejemplo, se ha observado que participan del agrupamiento de proteínas, reclutando y excluyendo las mismas desde y hacia nano-dominios especializados [34, 35]. Sin embargo, aunque su existencia ha sido ampliamente demostrada en membranas artificiales y sus propiedades extensamente caracterizadas mediante complejos modelos computacionales, la definición de "balsas lipídicas" en células reales continúa siendo un debate controversial [36]. Esto es, en parte, debido a su tamaño, ya que, con tamaños característicos muy por debajo del límite de difracción de la luz (menores a 20 nm en células quiescentes y hasta 200 nm luego de la estimulación) [37–39], la medición de estas regiones es un desafío aun para las técnicas de microscopías más avanzadas. Su naturaleza dinámica también dificulta su observación, ya que se trata de estructuras dinámicas cuyas vidas medias tienen duraciones que van desde unos pocos milisegundos a decenas de segundos [40–43].

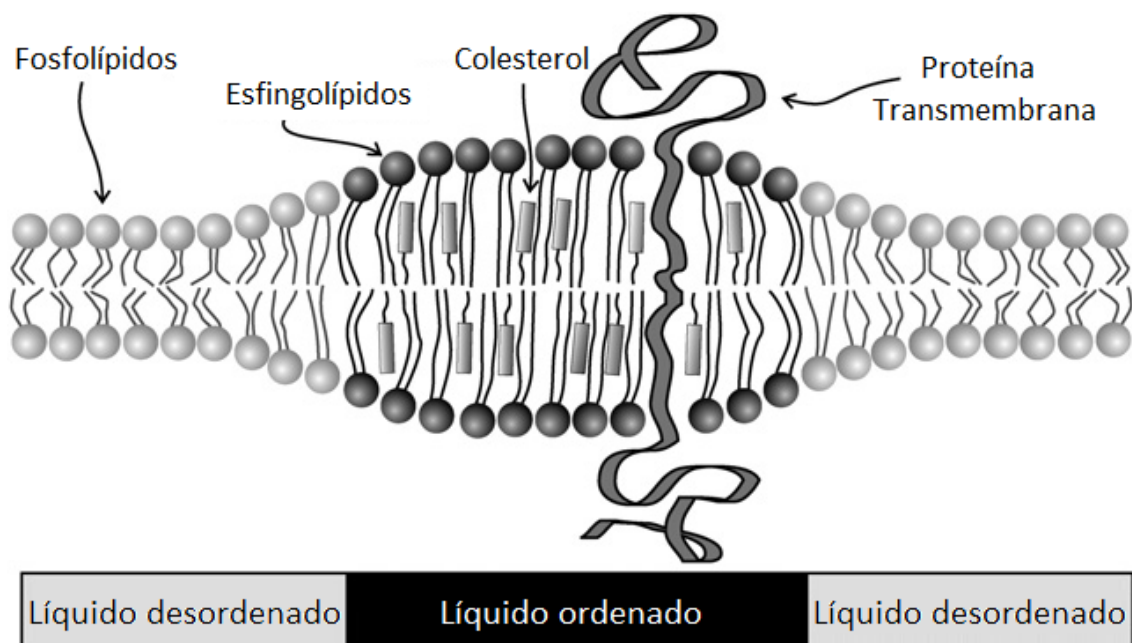


Figura 2.3: Dominios líquido-ordenado (L_o) y líquido-desordenado (L_d). Observar cómo los dominios ricos en colesterol (L_o) modifican la curvatura, el orden de las colas de los lípidos y el grosor de la membrana celular [44].

Una forma de dimensionar la importancia del colesterol en la membrana, además de su abundancia y de las funciones descritas anteriormente, es mediante el estudio

de los efectos producidos al cambiar su concentración. Cuando se incuban células vivas con metil- β -ciclodextrina ($M\beta CDx$ o CDx , un agente de unión específica al colesterol que no se une ni se inserta a la membrana) o saponinas, dos componentes que producen la disminución aguda del colesterol de membrana, no sólo muchas de las funciones celulares se ven modificadas, sino que muchas reacciones de señalización se encuentran prácticamente bloqueadas (algunos ejemplos pueden verse en [45–47]). Otro efecto asociado a la disminución en los niveles de colesterol de membrana es el aumento transitorio en la función de algunos canales iónicos, por ejemplo, el nAChR en células CHO-K1/A5 [48, 49]. El enriquecimiento de colesterol en membrana, en cambio, genera el efecto contrario. Estos resultados de “prendido” y “apagado” de funciones celulares mediados por colesterol, sugieren que gran cantidad de procesos que tienen lugar en la membrana celular dependen de dominios o estructuras dependientes de colesterol, posiblemente balsas lipídicas o dominios L_o .

El colesterol no sólo influencia el comportamiento de proteínas receptoras a través de cambios en la fluidez de la membrana o promoviendo su asociación/disociación con regiones especializadas, sino también a través de interacciones lípido-proteína, al unirse a secuencias de reconocimiento y unión al colesterol (CRAC y CARC) [50–53]. Uno de los receptores de neurotransmisores más estudiados respecto a sus interacciones lípido-proteína es el nAChR [28], el cual posee dominios de unión CRAC para hasta 15 moléculas de colesterol [51] (Figura 2.4). Existe amplia evidencia de las propiedades moduladoras ejercidas por este lípido sobre el nAChR [54]. En la escala subcelular, los nAChRs se encuentran organizados en dominios nanométricos e interactúan con dominios lipídicos ricos en colesterol (balsas lipídicas) tanto in vitro como in vivo [55–57]. La depleción aguda de colesterol reduce el número de receptores a través de la aceleración de la tasa de endocitosis y cambiando la internalización a otra ruta endocítica que involucra a la pequeña GTPasa Arf6 [58]. Sin embargo, estudios en células vivas no han arrojado resultados concluyentes sobre si los agregados de nAChR se encuentran asociados a nanodominios L_o ricos en colesterol [59].

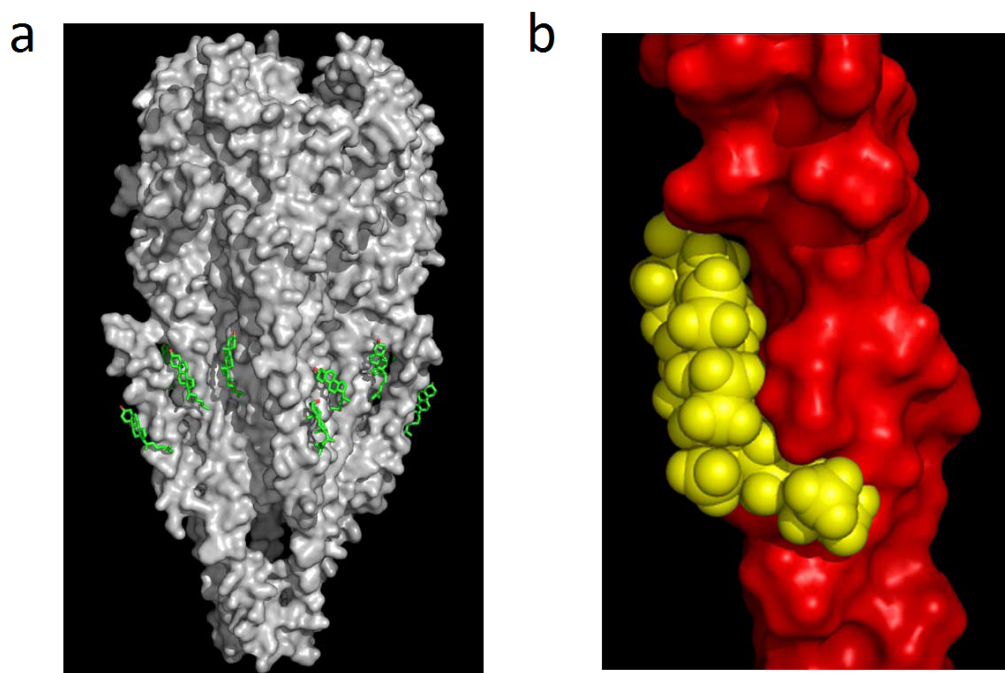


Figura 2.4: Sitios de unión al colesterol (CRAC) presentes en el nAChR. (a) Modelado molecular del nAChR (gris) y de moléculas de colesterol (verde) unidas a los sitios de reconocimiento y unión de colesterol, ubicados en la región transmembrana del receptor. (b) Modelado molecular del 4to dominio transmembrana de la subunidad γ del nAChR humano (rojo) con un colesterol unido (amarillo). Este dominio, ubicado en la parte extracelular, es el que mayor energía de interacción exhibe con el colesterol [60].

2.3. Microscopías de Superresolución

El premio Nóbel de Química del año 2014 fue otorgado a un desarrollo tecnológico que marcaría un cambio paradigmático en el campo de la biología molecular: la microscopía de fluorescencia de superresolución [61]. Hasta ese momento, el estudio de estructuras subcelulares se encontraba limitado a metodologías muy invasivas e inespecíficas como la microscopía electrónica. La microscopía de fluorescencia, en cambio, se encontraba restringida por el principio de Abbe, el cual establece una cota a la resolución que puede alcanzarse a través de métodos ópticos de medición, y, por ende, limitando el universo de estructuras observables. Debido a la difracción de la luz, el punto más pequeño que un lente o espejo de un microscopio puede enfocar un haz se encuentra dado por la longitud de onda incidente (λ) y la apertura numérica

(NA) del lente objetivo, de la forma:

$$\sin(\theta) = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.1)$$

Esta relación supone una resolución máxima de ~ 200 nm en el plano (x, y) y ~ 500 nm en la dirección axial z . Sin embargo, muchos organismos y estructuras de gran relevancia biológica (tales como virus, proteínas o moléculas más pequeñas) poseen tamaños mucho menores (ver Figura 2.5). Al intentar estudiar estructuras subcelulares en detalle mediante microscopía óptica, entonces, el límite de difracción constituye un enorme obstáculo.

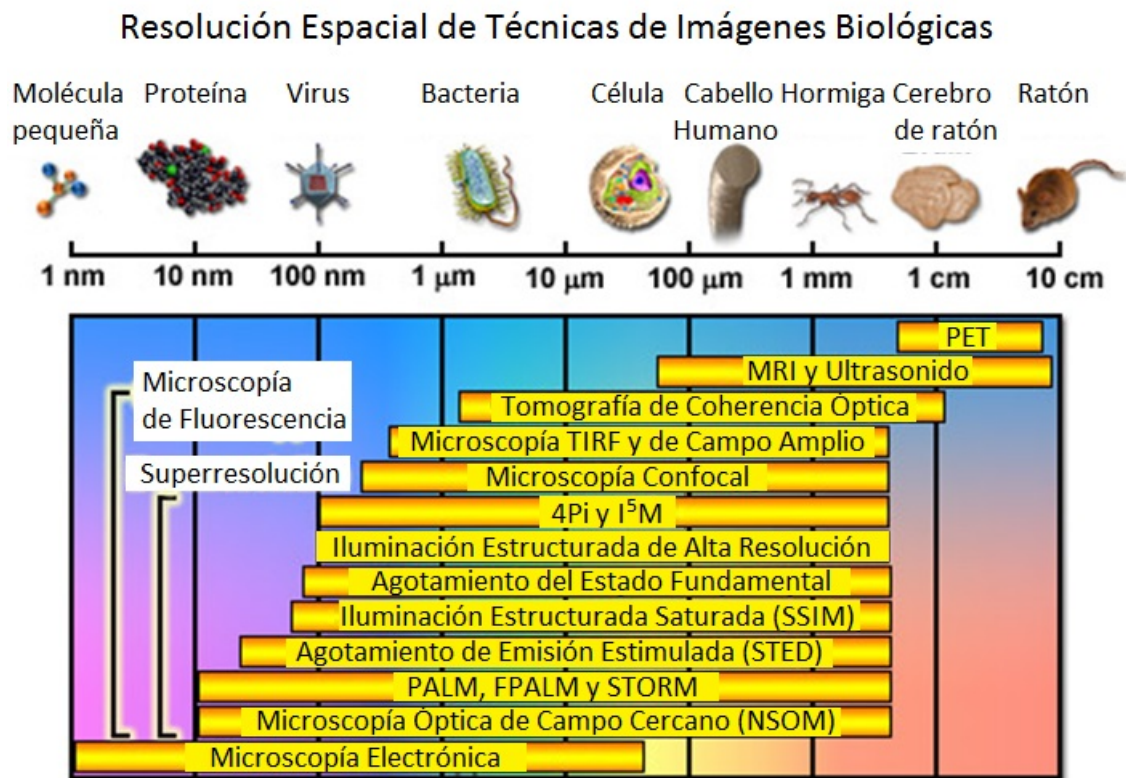


Figura 2.5: Resolución espacial de técnicas de imágenes biológicas. Se muestran las escalas características de distintos organismos biológicos de relevancia y las resoluciones mínimas alcanzadas por distintas técnicas de imágenes. Observar el límite de resolución para las microscopías de fluorescencia no súper resolutivas (~ 250 nm) y el correspondiente a las técnicas de superresolución (~ 10 - 100 nm). También se muestra la resolución para la microscopía electrónica (~ 1 nm), la cual continúa siendo superior a la lograda por técnicas de superresolución, pero de una manera más invasiva. Imagen obtenida de la página web de Zeiss.

La microscopía de superresolución óptica permitió superar este límite y resolver

estructuras de hasta uno a dos órdenes de magnitud menores ($\sim 5\text{-}50\text{ nm}$) que el establecido por la ecuación descrita anteriormente. Actualmente, existen varios tipos de microscopías de superresolución (o “nanoscopías”, por su capacidad de resolver estructuras en la escala nanométrica) que aplican estrategias diferentes para superar el límite predicho por el principio de Abbe y así mejorar significativamente la función de dispersión de puntos del microscopio (PSF; una medida del grado de distorsión en 3D de un punto objeto y, por ende, de la resolución del método) [62,63]. Estas técnicas de microscopía superresolutiva pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: aquellas basadas en métodos de excitación modelada (STED, RESOLF, SSIM), y aquellas basadas en imágenes de molécula única (PALM, STORM) [64]. El primer grupo se basa en usar una combinación de láseres con patrones especiales que permiten suprimir la emisión de fluoróforos que se encuentran alrededor de la zona que se quiere excitar, de tal forma de asegurarse que la información registrada provenga de una región más pequeña que la iluminada (y, por ende, que el límite de difracción) (Figura 2.6). El segundo grupo, en cambio, se basa en registrar moléculas individuales por un corto período de tiempo, de tal forma de que sus imágenes (aún difractadas por la luz) no se superpongan temporalmente. Luego, a través de ajustes matemáticos a las PSF de moléculas únicas, es posible determinar sus posiciones de forma muy precisa (sub-difracción) (Figura 2.7). En los últimos años, la microscopía de superresolución se convirtió en una poderosa herramienta para interrogar aspectos biológicamente relevantes de la estructura celular hasta el momento inaccesibles [62], contribuyendo ampliamente a nuestro conocimiento actual sobre la distribución y la dinámica de proteínas (Figura 2.8) [65–67] y lípidos de membrana [68].

2.4. Membrana celular

La transmisión química de señales es una de las principales formas de transmisión de la información en el sistema nervioso central y periférico. Su correcto funcionamiento se basa en un equilibrio dinámico entre la organización supramolecular de los actores intervinientes, el ambiente lipídico, la dinámica en la membrana celular y el transporte vesicular [70]. En el caso particular de la transmisión sináptica, cuando una proteína receptora de neurotransmisor residente en la membrana postsinápti-

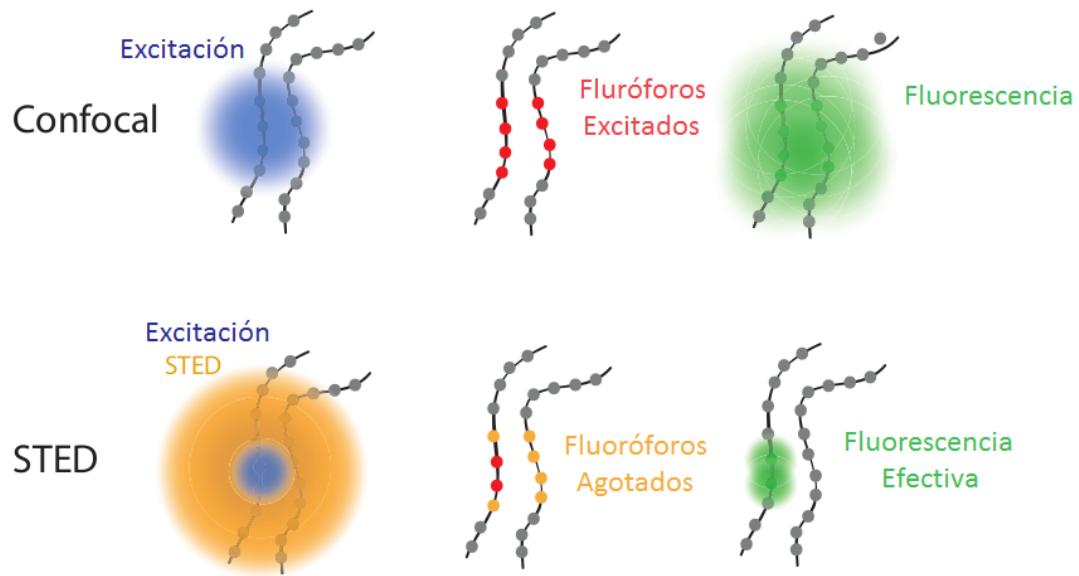


Figura 2.6: Microscopía confocal y STED (superresolución). Se esquematiza el principio de ambas metodologías y el incremento de la resolución al aplicarse sobre una misma estructura tipo filamento. Cada círculo del filamento es un fluoróforo. Mientras que la microscopía confocal no puede resolver las estructuras circulares individuales, debido a la superposición de la emisión supra-difracción de muchos fluoróforos individuales excitados al mismo tiempo, la microscopía de superresolución STED permite lograr una excitación más localizada (a través de la supresión de la emisión de los fluoróforos circundantes) y así aumentar la resolución alcanzada [69].

ca recibe información del exterior de la célula, se inicia una cadena de reacciones hacia el interior de ésta (cascada de señalización) para generar una respuesta. En particular, el número disponible de receptores de neurotransmisores y el tiempo que pasan en la región postsináptica y, más precisamente, en los sitios activos orientados a las áreas de liberación de neurotransmisores, afectan directamente la capacidad de transmitir dicha información de manera eficiente [71]. Por lo tanto, entender cómo difunden los receptores hacia dentro y fuera de las regiones sinápticas, y qué mecanismos afectan su organización en la membrana es fundamental para comprender la comunicación celular.

El modelo más ampliamente conocido y exitoso sobre la estructura y la organización de las membranas biológicas fue propuesto en 1972, por Singer y Nicolson: el modelo de mosaico fluido (MF) [72]. El modelo de MF propone que las membranas están conformadas por una bicapa lipídica, en donde proteínas y glicoproteínas

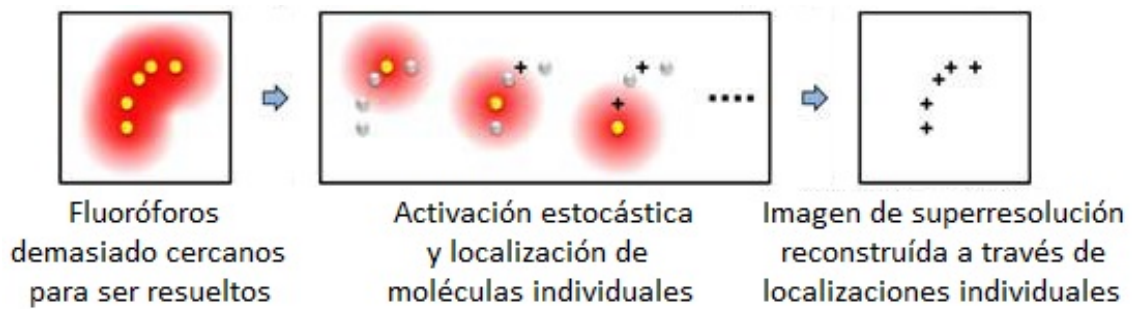


Figura 2.7: Microscopía de superresolución STORM. Esquema del principio STORM. Con microscopía de fluorescencia convencional, la emisión conjunta de todos los fluoróforos en la región de interés (círculos amarillos) son registrados, de tal forma que no pueden ser identificadas estructuras individuales que se encuentren más cercanas que el límite de difracción de la luz (esquema de la izquierda). En cambio, al utilizar una microscopía de tipo estocástica como STORM, es posible registrar intermitentemente un fluoróforo a la vez (esquema intermedio), de tal forma que, luego de cierto tiempo de registro, es posible recuperar la estructura original con una resolución muy por debajo del límite de difracción (esquema de la derecha). Imagen obtenida de la página web del laboratorio del Dr. Huang.

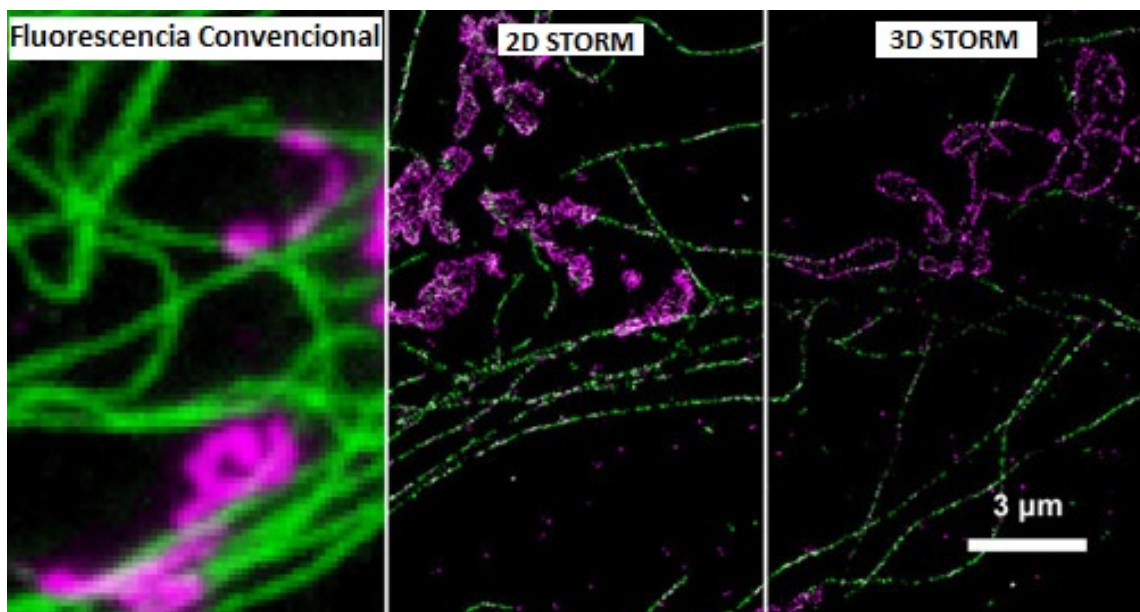


Figura 2.8: Comparación entre microscopía convencional y de superresolución. Microtúbulos (verde) y mitocondria (magenta) en células BS-C-1. Se muestra el resultado obtenido a través de imágenes de microscopía de fluorescencia (izquierda), y a través de microscopía de superresolución STORM en 2D (medio) y en 3D (derecha). Imagen tomada de la página web del laboratorio del Dr. Huang.

se encuentran insertas y fluyen libremente (Figura 2.9). Esta bicapa lipídica actúa como barrera entre el interior y el exterior celular. Si bien los conceptos esencia-

les del modelo de MF siguen siendo válidos, actualmente se sabe que la estructura de la membrana es mucho más compleja. La membrana celular es un ambiente altamente compartimentalizado, en donde las moléculas exhiben un comportamiento heterogéneo, resultante de interacciones con componentes de la membrana que restringen su movimiento y que son centrales para su función (Figura 2.10) [73–78]. A su vez, existe una matriz subcortical, la red de actina, que es capaz de interactuar tanto de forma directa (unión transitoria [79]) como indirecta (por ej. a través de la remodelación dinámica del cito-esqueleto en espinas dendríticas [80]) con las proteínas de membrana.

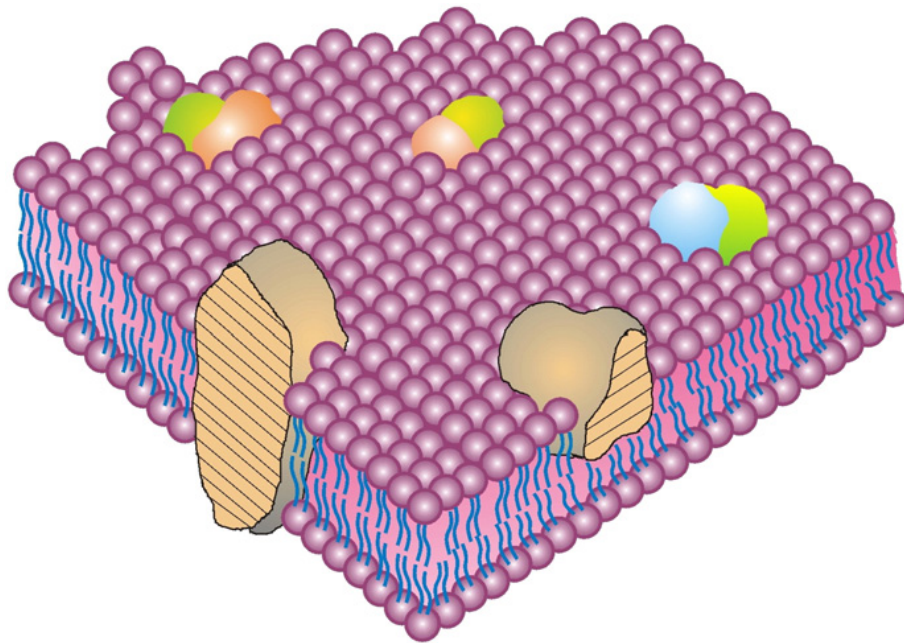


Figura 2.9: Modelo de Mosaico Fluido (MMF). En 1972, Singer y Nicolson propusieron uno de los modelos de las membranas biológicas más reconocido hasta el momento. El modelo consiste una bicapa lipídica (violeta) en donde se encuentran insertas proteínas y glicoproteínas. La imagen fue extraída del trabajo actual de uno de los fundadores del modelo [73], en el cual se discute la vigencia actual del mismo y la evolución que tuvo a lo largo de los años (Figura 2.10).

En los últimos años, se ha propuesto que la función celular puede ser explicada por la interrelación entre los distintos niveles de organización en la membrana [74,75]. En particular, técnicas de nanoscopía han permitido observar que muchas proteínas de membrana (lo que constituye el 3er. nivel de organización) se encuentran asociadas en ensamblajes nanoscópicos (“nanoclusters”), comprendiendo tamaños variables

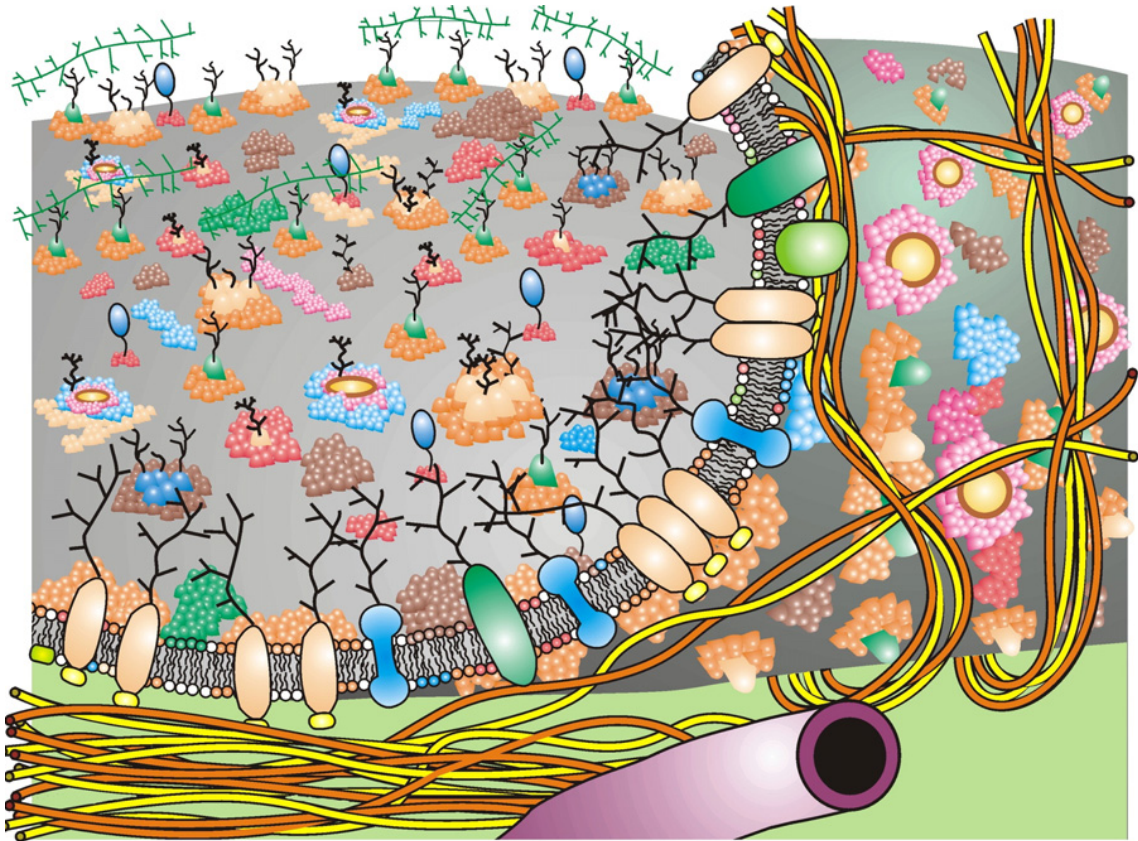


Figura 2.10: Modelo actual de la membrana celular. Al modelo fundacional de Mosaico Fluido se le suma la complejidad estructural y la heterogeneidad tridimensional de la membrana celular como se la conoce hoy en día. Observar la gran variedad de estructuras que compartimentalizan la bicapa lipídica en su aspecto bidimensional y que tienen un papel importante en la regulación de la función celular. Además, se incluye la red actina subcortical en la cara intracitoplasmática de la membrana, y la red de glicanos provenientes de las glicoproteínas y glucolípidos en la cara exofacial de la membrana. La imagen se extrajo de un trabajo reciente de uno de los fundadores del modelo de MF original [73].

(desde decenas a cientos de moléculas) en distintos tipos celulares [22,81]. Este nivel de organización ha demostrado ser crítico como componente regulatorio en la transducción de señales y la función celular [82–86]. El colesterol y los lípidos saturados, por otro lado, involucrados en la formación de dominios tipo balsas (L_o) (2do. nivel de organización), participan del reclutamiento selectivo de proteínas (en forma de acúmulos) y del intercambio entre ciertos lípidos y ciertas proteínas asociadas a balsas [34–36]. Finalmente, la auto-organización del citoesqueleto de actina (1er. nivel de organización) actúa sobre la organización dinámica de la membrana plasmática y promueve la compartimentalización de la misma [87–89]. Sin embargo, sigue siendo

poco comprendido cómo los distintos niveles de organización se interrelacionan para dar lugar al proceso de señalización celular. Dilucidar la topografía y la dinámica de proteínas de membrana es, entonces, de gran importancia, y se ha convertido en un tema de investigación muy relevante a lo largo de los últimos años, promoviendo el desarrollo de nuevos modelos teóricos, métodos computacionales e innovaciones tecnológicas [90–92].

2.5. Difusión lateral de proteínas de membrana

La membrana celular se comporta como un medio fluido en donde las proteínas y los lípidos son capaces de difundir lateralmente. Por lo tanto, la complejidad en su organización y su estructura se encuentra directamente reflejada en la dinámica heterogénea de sus constituyentes. Tras el desarrollo de microscopías de superresolución y análisis de seguimiento de moléculas únicas (SPT), por primera vez en la historia se logró seguir y caracterizar el movimiento individual de proteínas de membrana: A diferencia del movimiento térmico al azar (movimiento Browniano) descrito por Albert Einstein un siglo atrás [93], la traslación de proteínas de membrana se encuentra mayoritariamente caracterizada por una difusión de tipo anómala, es decir, desvíos de la “Brownianidad” producto de interacciones no térmicas con el medio circundante [77, 94–97]. Estas interacciones pueden estar relacionadas a procesos que dificultan la libre difusión de la molécula (tales como la difusión en dominios L_o o la difusión con saltos entre regiones compartimentadas de la membrana), dando lugar a un movimiento de tipo *subdifusivo* [75, 98], o a procesos en donde la difusión de la molécula se encuentra favorecida (*movimiento dirigido*), resultando en un movimiento de tipo *superdifusivo* [99] (ver Figura 2.11). En este último caso, se encuentran involucrados los denominados motores moleculares (proteínas capaces de transformar energía química en movimiento.) [100], por ej. a través del transporte vesicular.

A la fecha, varios modelos biofísicos han sido propuestos para intentar describir diferentes mecanismos moleculares que dan origen a los distintos tipos de difusión anómala. Mientras que algunos modelos describen las propiedades viscoelásticas de la bicapa lipídica (como el movimiento Browniano fraccional o fBm, una generalización

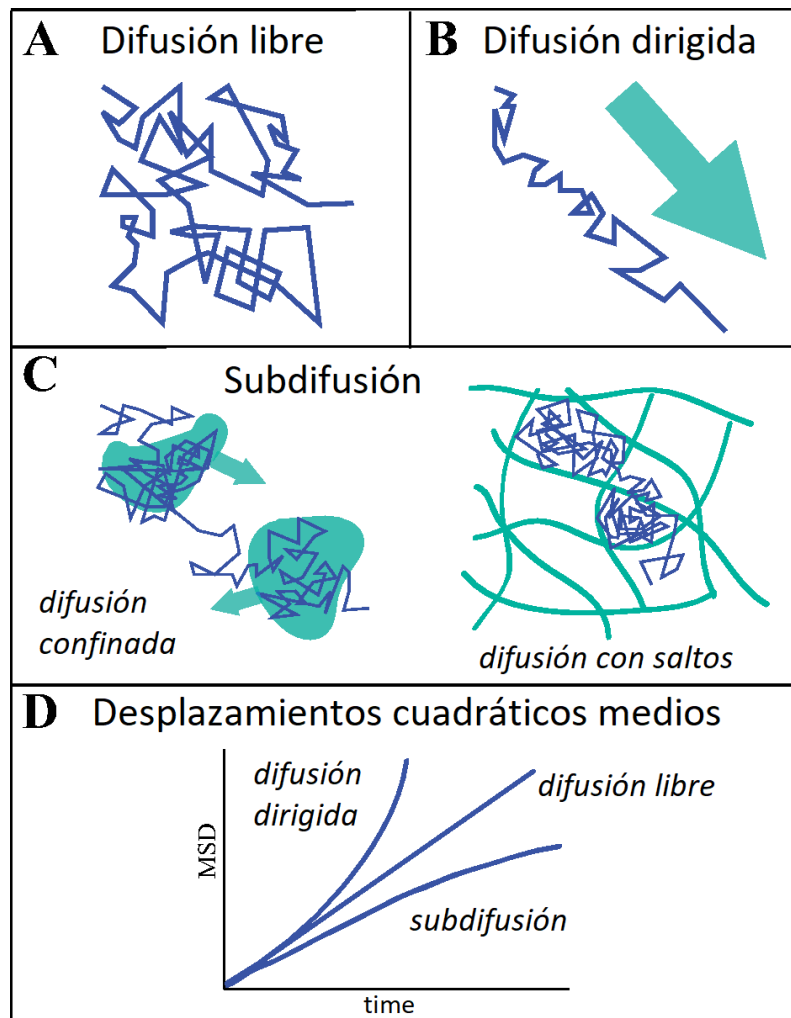


Figura 2.11: Difusión lateral de proteínas en la membrana celular. Se muestran ejemplos de trayectorias de moléculas únicas exhibiendo movimiento de tipo (a) Browniano (difusión libre), (b) superdifusivo (dirigido) y (c) subdifusivo. (d) Una forma de caracterizar la difusión de moléculas es a través del estudio de las curvas de desplazamiento cuadráticos medios (MSD). Mientras que el movimiento Browniano se caracteriza por una dependencia lineal con el tiempo, los movimientos subdifusivos y superdifusivos muestran dependencias sublineales y supralineales, respectivamente. Imagen extraída y modificada de [101].

del movimiento Browniano) [102,103] otros consideran la presencia de obstáculos en un medio densamente poblado (difusión obstruída u OD) [104,105], y otros describen eventos de inmovilización transitorios, dados por unión al citoesqueleto de actina o a complejos macromoleculares (movimiento al azar de paso continuo o CTRW) [106,107] (ver Figura 2.12). En algunos sistemas, se ha observado coexistencia de más de un modelo (*difusión mixta*) [108], dando lugar a patrones de movimientos aún más complejos, e incluso exhibiendo dependencias entre las propiedades dinámicas

y el tiempo de medición (*envejecimiento*), en clara contraposición a la hipótesis de ergodicidad de Boltzmann-Kinchin [109, 110]. Por lo tanto, la caracterización dinámica de proteínas de membrana no sólo permite extraer información sobre los procesos fisiológicos que regulan la actividad de la molécula en estudio, sino que también puede ser utilizada como medio para generar modelados teóricos de los fenómenos biológicos que tienen lugar en la membrana celular, así también como de su estructura y organización.

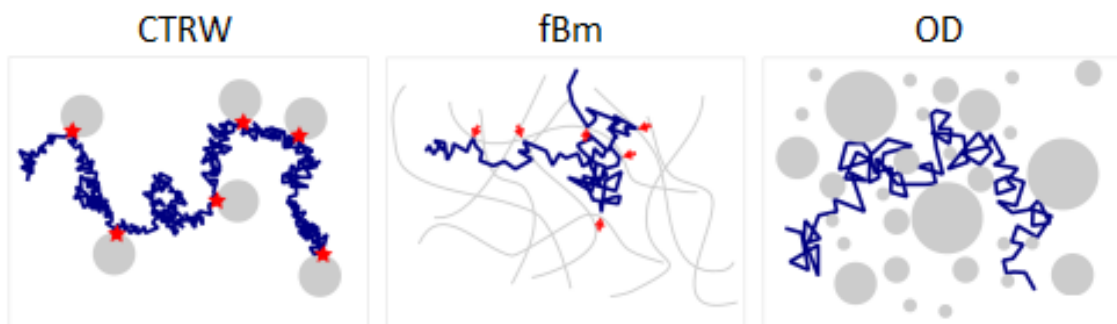


Figura 2.12: Modelado biofísico de la dinámica de proteínas. Se muestran esquemas de trayectorias únicas bajo distintos modelos biofísicos típicos de difusión lateral de proteínas en la membrana celular: (a) caminata al azar de tiempo continuo (CTRW), (b) movimiento Browniano fraccional (fBm) y (c) difusión obstruida (OD). Imagen extraída y modificada de [111].

2.6. Organización del trabajo

En este trabajo, a través de la implementación de una serie de análisis estadísticos y computacionales para el estudio del movimiento de proteínas únicas en imágenes de microscopía de superresolución STORM registradas previamente en el laboratorio, se caracterizará de forma exhaustiva la difusión y la organización del nAChR en la membrana de células CHO-K1/A5. Además, se propondrá un modelo biofísico que explique el comportamiento complejo exhibido por el nAChR, así como también su interacción con uno de los componentes estructurales más importantes de la membrana celular animal: el colesterol.

En primer lugar, se introducen muy brevemente las metodologías utilizadas para obtener las muestras biológicas y las imágenes de superresolución. Luego, se describen los diferentes análisis biofísicos implementados en el trabajo (ver [Materiales y](#)

métodos). En la siguiente sección, se exponen los **Resultados** de los análisis aplicados para el estudio de la dinámica y la organización del nAChR en la membrana plasmática de células CHO-K1/A5. La sección de **Resultados** se encuentra dividida en dos partes. En la **Parte I**, se caracteriza a nivel *poblacional* la dinámica del receptor en la membrana a través del estudio de desplazamientos cuadráticos medios (MSD), de su grado de inmovilización, y de la clasificación en subpoblaciones difusivas. Hacia el final del capítulo, se introduce el concepto de ergodicidad y se testea el comportamiento ergódico del sistema. Motivado por lo observado en la **Parte I** del trabajo, en la **Parte II** se realiza un estudio a nivel de *molécula única* de la difusión lateral del nAChR, acompañado de un modelado biofísico. Con este propósito, se aplican análisis novedosos para el estudio de la dinámica de moléculas únicas, tales como radios de escape, ángulos de giro, análisis de recurrencia y análisis de segmentación de trayectorias. La sección de **Resultados** concluye con un estudio de la organización en tiempo real del nAChR, a través de un análisis de la dinámica de los acúmulos supramoleculares del receptor. En el capítulo siguiente (**Discusión**), se integran e interpretan los resultados obtenidos, poniéndolos en contexto con bibliografía actual relevante al campo de estudio, y se propone un modelo biofísico que se ajusta a los resultados observados. Finalmente, se enuncian brevemente las **Conclusiones** del trabajo.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivo de células, modificación de los niveles de colesterol celular y microscopia de superresolución STORM

Las células de la línea celular CHO-K1/A5 fueron cultivadas según Roccamo y colaboradores [112]. El contenido del colesterol de dichas células fue modificado mediante los protocolos utilizados en nuestro laboratorio [49, 113, 114]. Las imágenes de microscopia óptica de superresolución analizadas en este trabajo fueron obtenidas mediante la técnica de STORM [22, 115].

3.2. Análisis de datos de microscopía de superresolución

3.2.1. Determinación de las coordenadas sub-difracción moleculares

La localización de las coordenadas (x, y) de los nAChRs se realizó usando el paquete de análisis de imágenes ThunderSTORM (<https://github.com/zitmen/thunderstorm>) [116], un plugin de ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). ThunderSTORM permite separar múltiples superposiciones de PSFs. Para tener en cuenta la naturaleza discreta de los píxeles en cámaras digitales, se ajustó una versión integrada de una función gaussiana en 2D a los perfiles de intensidad supra-difracción de cada fluoróforo, mediante el uso de rutinas de minimización por cuadrados mínimos tipo Levenberg-Marquardt. Las localizaciones que se encontraron demasiado cercanas una de la otra como para corresponder a moléculas independientes, fueron descartadas. El análisis de ajuste por emisión múltiple del ThunderSTORM fue habilitado, y se estableció un rango límite de intensidades entre 500-2000 fotones, para minimizar el error proveniente de la intensidad de fondo. Otros filtros del ThunderSTORM fueron habilitados para remover localizaciones duplicadas por la incertidumbre (como se describe en ref. [117]). La deriva lateral fue estimada experimentalmente utilizando esferas fluorescentes fiduciales de 100 nm de diámetro adheridas al cubreobjetos, y corregida por el filtro correspondiente de ThunderSTORM. La precisión en la localización fue calculada automáticamente a través de ThunderSTORM mediante la

aplicación de una versión modificada de la expresión descrita en ref. [118], la cual considera el proceso de multiplicación de electrones de las cámaras EM-CCD [119], a saber:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{2\sigma^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi\sigma^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (3.1)$$

Donde σ es el desvío estándar del ajuste de la PSF, a es el tamaño de píxel en nm, N es la intensidad expresada en número de fotones y b es el nivel de intensidad de fondo en fotones. La precisión de localización promedio obtenida fue de 37.58 ± 0.02 nm (ver Figura 3.1).

Precisión de localización y tiempo de fusión. La precisión de localización y el tiempo de fusión son dos parámetros esenciales en microscopía de tipo STORM y en microscopía de localización de molécula única en general. En la Figura 3.1 se muestran histogramas representativos a partir de los cuales se determinó la precisión de la localización promedio y la densidad de emisión típica para las moléculas de nAChR marcadas con BTX, así como también un ejemplo representativo de la distribución de tiempos de fusión junto a la predicción semi-empírica (como se describe en el trabajo de Annibale y colaboradores [120]).

3.2.2. Seguimiento de molécula única (SPT)

Las partículas fluorescentes fueron detectadas por un algoritmo de prueba de razón de verosimilitud (likelihood ratio test) usando ThunderSTORM [116], y exportadas en un formato adecuado para análisis de seguimiento de partícula única usando una rutina de Matlab creada en el laboratorio. Las trayectorias de las partículas detectadas (y validadas) fueron reconstruidas usando el paquete Localizer (<https://bitbucket.org/pdedecker/localizer>) [121] implementado en Igor Pro (Wavemetrics Inc. <https://www.wavemetrics.com>). Dos parámetros críticos deben ser establecidos en Localizer: el máximo número de imágenes que se permite “parpadear” a una dada molécula (3 fotogramas = 30 ms) (“tiempo de fusión”), y la distancia máxima (“Máxima distancia de salto”) entre dos puntos para poder ser considerados como provenientes de la misma trayectoria (3 píxeles). El “tiempo de

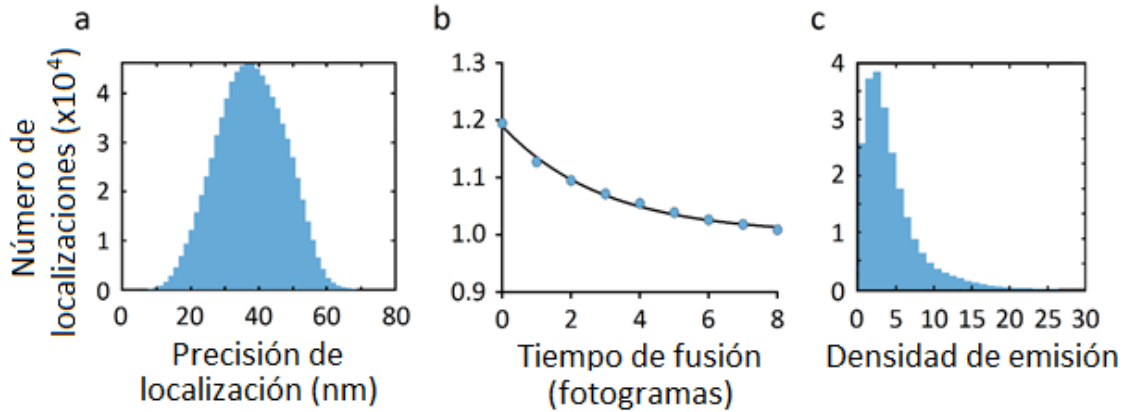


Figura 3.1: Precisión de localización, tiempo de fusión y densidad de emisión. a) Histograma de la precisión de localización para un experimento representativo, según el método de Quan y colaboradores [119] (ver ec. 3.1), aplicada a dos células CHO-K1/A5 marcadas con BTX. b) Determinación del tiempo de fusión óptimo, siguiendo el método de Annibale y colaboradores [120]. El gráfico muestra el número total de localizaciones en función de distintos tiempos de fusión, para un caso representativo de nAChRs marcados con BTX. En línea sólida se muestra el ajuste semi-empírico de la ec. 3.1. En el ejemplo que se muestra, el tiempo de fusión óptimo t_{off} fue de 3 fotogramas (30 ms). c) Histograma del número de localizaciones por fotograma, es decir, la densidad de emisión. La densidad de emisión típica obtenida fue 3.78 ± 0.01 moléculas por fotograma.

fusión” óptimo (t_{off}) fue determinado siguiendo el método de Annibale y colaboradores [120], el cual implica que el número de moléculas fluorescentes parpadeantes N presentes en la muestra puede ser estimado por el número de cuentas (localizaciones) a diferentes tiempos de oscuridad t_d , $N(t_d)$, a través de un ajuste con la ecuación semi-empírica:

$$N(t_d) = N(1 + n_{parpadeo}e^{\frac{1-t_d}{t_{off}}}) \quad (3.2)$$

En el régimen de bajos tiempos de oscuridad t_d . La máxima distancia establecida para el filtro de fusión fue determinada en nuestros experimentos con el tamaño de píxel de la cámara y aplicando el criterio de filtrado de distancia propuesto por Lu y colaboradores [122]. Brevemente, las localizaciones que reaparecieron en fotogramas consecutivos fueron consideradas como provenientes de la misma molécula (misma trayectoria) si el desplazamiento de un fotograma a otro (radio de seguimiento) fue menor a 106 nm (1 píxel). Esto nos permitió monitorear moléculas con coeficientes

de difusión de hasta $1,33 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, es decir, conservativamente mayores que el límite de difusión superior estimado para el nAChR por experimentos TIRF-SPT realizados previamente en nuestro laboratorio [114]. Siguiendo el argumento anterior, la “Máxima distancia de salto” fue deducida a través de considerar la distancia máxima que un nAChR puede “saltar” dentro de la ventana temporal de fusión establecida anteriormente, es decir, la máxima distancia que, en promedio, un receptor puede difundir en 3 fotogramas.

3.2.3. Criterio de exclusión de moléculas inmóviles

La identificación y exclusión de moléculas inmóviles exhibiendo movimiento aparente (debido al error de localización) se realizó aplicando un método recientemente introducido por Golan y Sherman [123]. El método consiste en calcular la cantidad adimensional $R_g/\langle|\Delta r|\rangle$ con R_g el radio de giro y $\langle|\Delta r|\rangle$ el desplazamiento promedio. Para moléculas inmóviles, las sucesivas localizaciones se distribuyen alrededor de una función Gaussiana en 2D (debido al error de localización). El radio de giro para una distribución normal con varianza σ^2 toma la forma $R_g^2 = 2\sigma^2$. Por otro lado, el valor esperado para el desplazamiento promedio es igual a $\langle|\Delta r|\rangle = E(\sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}) = \sigma\sqrt{\pi}$ (ver demostración en el trabajo de Golan y Sherman), si x e y son distribuciones normales con media nula y varianza σ^2 . Entonces, si centramos la trayectoria en el origen de coordenadas, obtenemos que el parámetro adimensional toma la forma de $R_g/\langle|\Delta r|\rangle = \sqrt{2\sigma^2}/(\sigma\sqrt{\pi}) = (\sqrt{2}\sigma)/(\sigma\sqrt{\pi}) = \sqrt{2/\pi}$ para moléculas inmóviles centradas en el origen. De esta forma, se obtiene un parámetro adimensional que no sólo toma un valor constante para moléculas inmóviles, sino que es independiente del error de localización. Para moléculas difundiendo, por otra parte, este parámetro toma valores más grandes. Entonces, es posible construir una distribución de los valores que toma este parámetro para trayectorias aparentes de moléculas inmóviles en células fijadas, y usar dicha información para establecer un criterio de exclusión en los experimentos en células vivas. Por ejemplo, se puede definir un umbral por debajo del cual las trayectorias de moléculas únicas en células vivas sean clasificadas como potencialmente inmóviles y excluidas de los análisis dinámicos. En

nuestro caso, el umbral elegido fue el límite superior del intervalo de confianza al 95 % de la distribución obtenida en células fijadas (como sugieren los autores del artículo). De esa forma, al aplicar el criterio de exclusión en células vivas, existe sólo un 2,5 % de probabilidad de clasificar erróneamente como molécula móvil a una molécula inmóvil con movimiento aparente. Las distribuciones obtenidas para moléculas inmóviles provenientes de 6 experimentos en células fijadas (2 muestras independientes) se muestran en la Figura 3.2. Se obtuvieron límites superiores del intervalo de confianza al 95 % de entre 1,5 y 2,1. Se eligió el límite más conservativo (2,1) como umbral de exclusión para las trayectorias obtenidas en experimentos en células vivas.

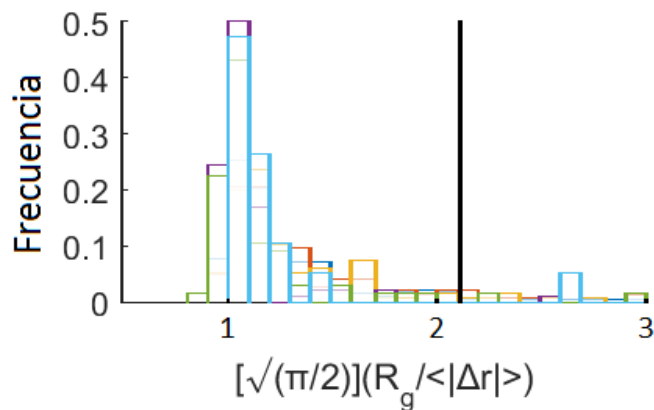


Figura 3.2: Criterio de exclusión de moléculas inmóviles. Histogramas del cociente normalizado entre el radio de giro y el tamaño medio de paso, para 2 muestras independientes de células CHO-K1/A5 control (6 células en total) fijadas químicamente y teñidas con Texas Red-mAb. Se obtuvieron umbrales de entre 1,5-2,1 (límites superiores del intervalo de confianza al 95 %). Se eligió el valor más conservativo (2,1, línea vertical negra) como umbral de identificación y exclusión de moléculas inmóviles en experimentos en células vivas.

3.2.4. Análisis de desplazamientos cuadráticos medios (MSD)

Para un espacio bi-dimensional (como puede ser aproximada la difusión lateral de una proteína en la membrana celular), el MSD puede escribirse como:

$$MSD = \langle \Delta r^2(t) \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} r^2(t) P(r, t) d^2r = 4Dt \quad (3.3)$$

Donde D es el coeficiente de difusión y t es el tiempo desde el inicio del proceso. Sin embargo, esta expresión asume un fluido puramente viscoso y homogéneo, tal que $P(r, t)$ es la función de distribución de probabilidad (PDF, también denominada propagador) del proceso difusivo, es decir, la probabilidad de encontrar una partícula a una distancia radial r del origen a un tiempo $t > 0$. Medios más complejos pueden llevar a sublinealidades en las curvas de MSD (difusión anómala), las cuales pueden ser modeladas como sigue:

$$MSD = \langle \Delta r^2(t) \rangle = K_\beta t^\beta \quad (3.4)$$

La difusión anómala es tenida en cuenta mediante la introducción de un exponente de anomalía β [110,124] y un coeficiente de difusión generalizado K_β , donde $MSD \sim t^\beta$. Mientras que para $\beta = 1$ el movimiento resultante es una difusión Browniana, para $0 < \beta < 1$ se describe un comportamiento subdifusivo y para $\beta > 1$, en cambio, uno superdifusivo (ver Figura 3.3).

Típicamente, los desplazamientos cuadráticos medios se estudian a través de un promedio temporal (TA MSD) para trayectorias individuales, o por un promedio del ensamble (EA MSD) sobre varias trayectorias a un tiempo determinado. El TA MSD puede calcularse para una dada trayectoria j de la siguiente forma:

$$TA\ MSD = \langle \Delta r^2(t_{lag} = m\Delta t) \rangle_T = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^{T/\Delta t} R_j^2(t_i + m\Delta t) \quad (3.5)$$

$$R_j^2(t_i + m\Delta t) = [x_j(t_i + m\Delta t) - x_j(t_i)]^2 + [y_j(t_i + m\Delta t) - y_j(t_i)]^2 \quad (3.6)$$

donde (x_j, y_j) es la posición de la partícula registrada a M tiempos discretos $t_i = i\Delta t$ con desplazamientos diferentes de NaN (es decir, sin contar los tiempos en los que el fluoróforo ingresó a un estado oscuro y no pudo ser registrado, es decir, los tiempos de parpadeo), Δt es el tiempo entre cada fotograma tomado en el registro o la inversa de los fotogramas por segundo del video (en nuestro caso, $\Delta t = 10$ ms o 0,01 s), T es el tiempo total promediado e i es el número de fotograma. El EA MSD, por otro lado, puede ser calculado sobre un intervalo temporal $m\Delta t$ de la forma:

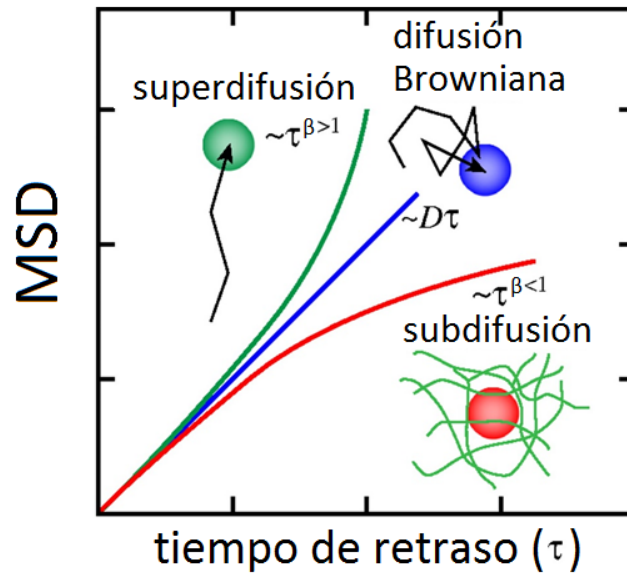


Figura 3.3: Análisis de desplazamientos cuadráticos medios (MSD). Se muestran curvas ilustrativas de las distintas modalidades difusivas que pueden identificarse a través del análisis de MSD, según la dependencia con el tiempo de retraso exhibida. Para dependencias lineales ($\beta = 1$), se obtienen caminatas al azar (difusión Browniana o térmica). Un β distinto a 1, en cambio, corresponde a difusión anómala. Para $\beta < 1$ la difusión es anómala subdifusiva, mientras que para $\beta > 1$ la difusión es anómala superdifusiva. Imagen extraída y modificada del trabajo de Mackintosh y colaboradores [125].

$$EA \text{ MSD} = \langle \Delta r^2(t_{lag} = m\Delta t) \rangle_{ens} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N R_j^2(t_i + mt) \quad (3.7)$$

donde N es el número total de trayectorias disponibles (diferentes de $N \times N$) a un dado tiempo t_i , donde t_i es el tiempo inicial relativo al primer punto de la trayectoria. Si reescribimos la ec. 3.4 tomando el logaritmo de ambos lados:

$$\log(\text{MSD}) = \log(K_\beta t^\beta) = \log(K_\beta) + \log(t^\beta) = \log(K_\beta) + \beta \log(t) \quad (3.8)$$

Es decir, si las curvas de MSD individuales cumplen con la ec. 3.4, en escala logarítmica deberían exhibir una dependencia lineal con el tiempo, cuya pendiente es el exponente de anomalía. El coeficiente de difusión generalizado, por su parte, puede ser calculado a través de la ordenada al origen. De esta forma, se ve fácilmente

te que tanto el exponente de anomalía como el coeficiente de difusión generalizado pueden obtenerse a partir de un simple ajuste lineal de las curvas de MSD en escala logarítmica. Siguiendo el criterio de Golan y Sherman [123], el exponente de difusión anómala β fue obtenido a través de ajuste lineal de los primeros 50 puntos de las curvas de TA MSD en escala logarítmica. Los coeficientes de difusión generalizados, K_β , también fueron obtenidos mediante un ajuste lineal de los primeros 50 puntos de las curvas de TA MSD en escala logarítmica, pero evaluados en $t = 1$ (ver ec. 3.8), también siguiendo el criterio de Golan y Sherman.

3.2.5. Distribución de tiempos de escape

El tiempo de escape es el intervalo durante el cual una partícula difunde dentro de un radio umbral R_{UM} antes de escapar (Figura 3.4). Para estudiar si existe una dependencia entre el tiempo de escape con el tamaño de la zona en donde la molécula difunde (para áreas más grandes se esperaría que a la molécula le tome más tiempo escapar, a menos que haya algún proceso que la detenga), se calculó la duración de los eventos en los cuales las trayectorias de moléculas únicas permanecieron dentro de áreas circulares de radio R_{UM} crecientes (radios de escape), como se describe en ref. [108]. Brevemente, para cada trayectoria j :

a) Se generaron los desplazamientos cuadráticos

$$R_{t_{ret}=\Delta t, i, j^2} \quad (3.9)$$

Para cada tiempo $t_i = i\Delta$, donde Δt corresponde al tiempo inter-fotograma (o a la inversa de la frecuencia de registro) (en nuestro caso, $\Delta t = 10$ ms).

b) Luego, se buscó el primer desplazamiento para el cual valiera

$$R_{t_{ret}=\Delta t, i, j^2} < R_{UM}^2 \quad (3.10)$$

A este tiempo se lo llamó $t_k = k\Delta t$, es decir, el tiempo correspondiente al fotograma k a tiempo de retraso $t_{lag} = \Delta t$.

c) Luego, se observaron los desplazamientos cuadráticos a tiempos t_k para tiempos

de retraso crecientes $t_{lag} = 2\Delta t, 3\Delta t, \dots$ hasta que la relación $R_{t_{ret},k,j}^2 > R_{UM}^2$ fuera satisfecha o la trayectoria terminara. Esto se cumple para cierto tiempo de escape

$$t_{ret} = t_F = F\Delta t \quad (3.11)$$

d) Cuando se obtuvo un tiempo de escape, se continuó desde $t_k + t_F + \Delta t = t_{k+F+1}$ buscando el siguiente desplazamiento que satisficiera la relación:

$$R_{\Delta t,i,j}^2 < R_{UM}^2 \quad (3.12)$$

para $(i \geq k + F + 1)$

e) Si el desplazamiento se encontraba, se repetían los pasos (b-c) hasta el final de la trayectoria. Finalmente, se construyó la función de distribución acumulada para todos los tiempos de escape resultantes.

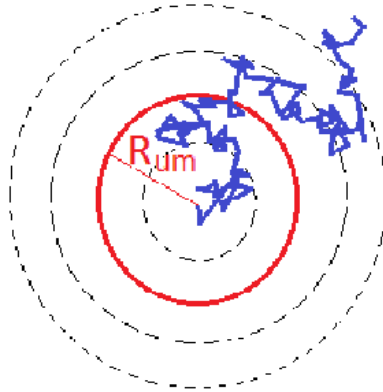


Figura 3.4: Análisis de tiempo de escape. Esquema representativo del análisis de tiempos de escape para distintos radios umbrales (R_{um}). Se muestra cómo las distintas áreas son concéntricas al origen de la trayectoria (trazo azul). El tiempo de escape es el que le toma a cada trayectoria escapar de un radio umbral determinado (radio de escape).

3.2.6. Análisis de recurrencia de trayectorias de molécula única

La presencia de períodos de confinamiento dentro de trayectorias individuales fue analizada usando un algoritmo recientemente desarrollado [126], el cual se basa

en la evaluación del número total de visitas (recurrencias) realizadas por una dada molécula móvil a un lugar determinado del espacio. Para ello, para cada par j -ésimo de localizaciones consecutivas de una dada trayectoria (con $j = 1, 2, 3, \dots, N-1$, con N número de localizaciones de la trayectoria), se construye un círculo con diámetro igual a la distancia que las separa y centrado entre medio de ellas, y se calcula la cantidad de visitas V_j que realiza la molécula a la región delimitada por dicho círculo (ver esquema ilustrativo en Figura 3.5). Esto se hace para todos los pares de localizaciones de la trayectoria. Para evaluar si el círculo corresponde a una zona de confinamiento, se establece un umbral de visitas. El umbral se define por inspección ocular. En este trabajo, el umbral de visitas se definió como $V_j = 6$ visitas, ya que fue el menor número de visitas que dio resultados más consistentes (estancias de confinamiento coincidentes con aquellas porciones de las trayectorias en donde se observa una marcada reducción de la movilidad).

Debido a que la metodología no considera los tiempos en donde el fluoróforo parpadea, es necesario interpolar los tiempos de parpadeo presentes en las trayectorias de moléculas únicas. Para ello, previo a aplicar el análisis de recurrencia se realizó una interpolación lineal a los tiempos de parpadeo, tal como sugieren los autores del trabajo. Esta aproximación es lo suficientemente buena para tiempos de parpadeo bajos, como los observados para la sonda utilizada en este trabajo (Figura 3.1). Para descartar el reconocimiento de eventos de confinamientos artefactuales producidos por pasos interpolados provenientes de tiempos de parpadeos prolongados, se estableció una cantidad de pasos umbral: Si la estancia de confinamiento encontrada está compuesta por menos de 5 localizaciones reales (no interpoladas), el evento es descartado.

3.2.7. Análisis de segmentación de trayectorias únicas basado en tiempos de escape

Como método independiente para el reconocimiento de eventos de confinamiento a nivel de molécula única, se aplicó un análisis de segmentación desarrollado previamente en el grupo de la codirectora de este trabajo [127]. El método permite segmentar trayectorias individuales en porciones confinadas y en zonas con difusión

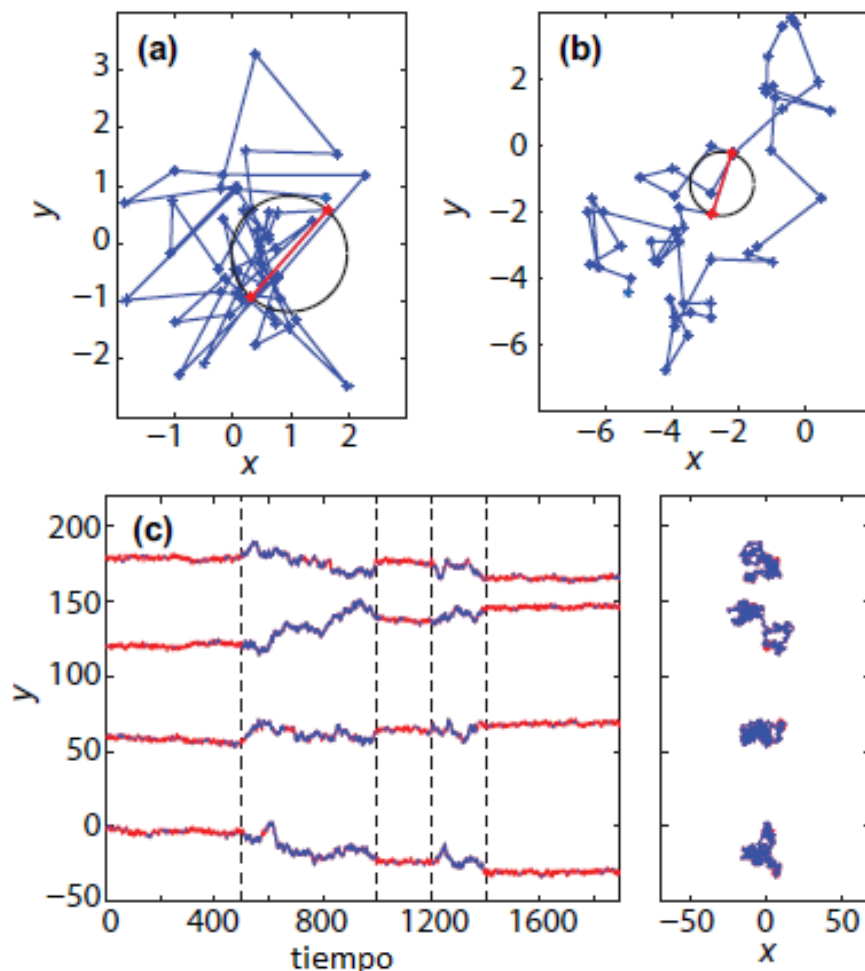


Figura 3.5: Diagrama del análisis de recurrencia. Se muestran simulaciones numéricas de una trayectoria simulada que exhibe una estancia de confinamiento (a) y una trayectoria que no (b). En cada una se muestra para un par de localizaciones (rojo) la construcción del círculo (negro) en el que se evaluará la cantidad de visitas recibidas, para luego definir si pertenece o no a una estancia de confinamiento. En el caso (a) se hallaron 17 visitas, mientras que en el caso (b) se halló sólo 1. En (c) se muestran los valores en la coordenada en y de las trayectorias simuladas mostradas en el panel derecho, las cuales exhiben estancias de confinamiento prolongadas. Las líneas punteadas separan las porciones libres (trazos azules) de las confinadas (trazos rojos). La figura fue extraída y traducida del trabajo de Sikora y colaboradores [126].

dirigida. Sin embargo, en el presente trabajo se implementó únicamente el algoritmo para reconocer regiones confinadas, el cual se basa en los tiempos de escape descritos en la sección 3.2.5, es decir, en la probabilidad de que una dada molécula se mantenga difundiendo dentro de una región de radio R luego de haber dado una cantidad n de pasos (Figura 3.6). Como este análisis tampoco considera los tiem-

pos de parpadeo, se aplicó una interpolación lineal y una cantidad de pasos umbral previo a la aplicación del método, al igual que se describe en la sección anterior. Se establecieron 5 pasos como umbral (equivalente a las 6 visitas/localizaciones establecidas como umbral en el análisis de recurrencia). Luego, a través de la expresión para la probabilidad acumulada Ψ de hallar una caminata que se mantenga confinada durante un tiempo t en una región con radio R , en función del parámetro adimensional $\sigma^2 n/R^2$ [128]:

$$\log(\Psi) = (-1,163 \pm 0,004) \frac{\sigma^2 n}{R^2} + (0,2364 \pm 0,006) = (-2,325 \pm 0,009) \frac{Dt}{R^2} + (0,2356 \pm 0,0063) \quad (3.13)$$

Donde σ^2 es la varianza de todos los pasos de la trayectoria, n la cantidad de pasos, $D = \sigma^2/2\tau$ es el coeficiente de difusión, $t = \tau n$ la duración de la trayectoria y τ el tiempo entre fotogramas ($\tau = 10$ ms, en nuestro caso); es posible establecer un criterio para la evaluación de confinamiento en una trayectoria única. Para ello, el algoritmo define una probabilidad umbral $p_c = 0,95$ y compara si el parámetro adimensional $\sigma^2 n/R^2$ es mayor a $[0,236 - \log(1 - p_c)]/1,163$ para un dado par de localizaciones consecutivas. Si se cumple la condición, pasa al siguiente par de localizaciones y vuelve a evaluar el criterio, y así sucesivamente hasta que la condición deje de cumplirse, estableciendo el final del evento de confinamiento.

3.2.8. Análisis de ángulos de giro (cambios direccionales)

El análisis de ángulos de giro estudia los cambios de dirección (en forma de cambios de orientación o ángulos de giro) desplegados por la trayectoria de una dada molécula cada cierta cantidad de pasos (o tiempo de retraso) (Figura 3.7) [129,130]. Por ejemplo, los ángulos de giro de una dada molécula para un tiempo de retraso igual a un fotograma son aquellos ángulos que forman pasos sucesivos de su trayectoria (saltando de a 1 paso a la vez). Los ángulos de giro para tiempo de retraso igual a dos fotogramas también son los ángulos formados por desplazamientos sucesivos, pero cada dos fotogramas. Para un tiempo de retraso igual a 20 fotogramas, se calculan los ángulos producidos por desplazamientos sucesivos cada 20 fotogra-

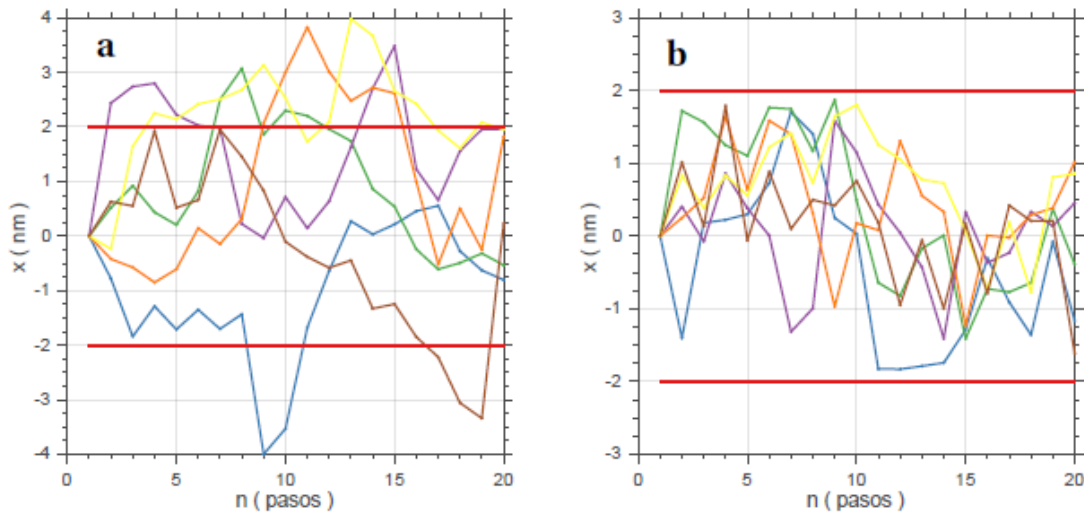


Figura 3.6: Análisis de segmentación de trayectorias en regiones confinadas y libres. Se muestran los valores en la coordenada x que toman trayectorias simuladas para el caso de moléculas que (a) logran escapar de una región de radio $R = 2$ en un tiempo menor a n pasos, o que (b) se mantienen difundiendo dentro de dicha región para todo tiempo menor a n pasos. Figura extraída de la Tesis de Licenciatura de Augusto Kielbowicz [127].

mas (ver Figura 3.7, izquierda). Una vez calculados los ángulos de giro de todas las trayectorias, se construye la función de densidad de probabilidad para los distintos tiempos de retraso. De esta forma, es posible analizar la correlación a corto plazo (tiempos de retrasos pequeños) y a largo plazo (tiempos de retrasos grandes).

Una de las mayores fortalezas de este análisis es que permite distinguir si existen correlaciones en el desplazamiento de las moléculas. Por ejemplo, si la distribución de ángulos de giro resulta plana, las moléculas no tienen ninguna predilección en la dirección de movimiento (es decir, siguen un movimiento *Browniano*) y se dice que los pasos están no correlacionados. En cambio, si la distribución de ángulos de giro tiene un máximo en 0° o en 180° , significa que las moléculas tienen una dirección de movimiento privilegiada y que su desplazamiento está correlacionado. En el caso de que la distribución muestre un máximo en 0° , las trayectorias tenderían a avanzar hacia adelante (movimiento *positivamente* correlacionado). En el caso de que el máximo se encuentre en 180° , por el contrario, las trayectorias tenderían a volver entre sus pasos (movimiento *negativamente* correlacionado o anti-correlacionado). Además, la distribución de ángulos de giro también permite distinguir diferentes

mecanismos de difusión anómala (no browniana), por ej. los modelos de movimiento Browniano fraccional (fBm) y difusión obstruida (OD).

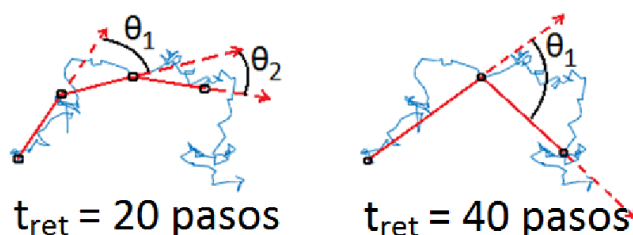


Figura 3.7: Diagrama esquemático representativo del procedimiento llevado a cabo por el análisis de ángulos de giro [130]. Brevemente, el método consiste en calcular los ángulos relativos (o ángulos de giro) que forma una dada trayectoria (trazo azul) para un dado tiempo de retraso (t_{ret}) o cantidad de pasos (por ejemplo, 20 pasos en el esquema de la izquierda o 40 pasos en el de la derecha).

3.2.9. Análisis de agrupamiento de receptores

Se aplicó el agrupamiento jerárquico de enlace centroide y el agrupamiento espacial basado en densidad con análisis de ruido (DBSCAN), integrados en el software qSR de código abierto desarrollado por Cissé y su grupo de trabajo (www.github.com/cisselab/qSR) [131, 132], para identificar en tiempo real la formación de grupos de moléculas nAChR. Para evitar la identificación de grupos artefactuales producidos por el agrupamiento de múltiples localizaciones provenientes de una misma molécula, se analizaron las localizaciones promedio de moléculas únicas. Únicamente para este análisis, las localizaciones promedio de moléculas inmóviles también fueron incluidas. La escala espacial del análisis se fijó en 100 nm y el número mínimo de partículas fue 20 en el análisis DBSCAN (cúmulos con menos de 20 moléculas fueron descartados). La tolerancia al tiempo de oscuridad (máximo tiempo permitido entre 2 localizaciones consecutivas para ser consideradas como parte del mismo grupo) se fijó en 1 s.

3.2.10. Análisis estadísticos

Para evaluar la significancia estadística, se emplearon ANOVA de una o dos vías (o sus análogos no paramétricos, según corresponda), a través del programa

GraphPad Prism 6. Comparaciones múltiples se llevaron a cabo usando los tests de Tukey o Dunn, según corresponda. Los valores se encuentran expresados en media \pm desvío estándar (D.E.) a menos que se aclare lo contrario. Para evaluar normalidad en los datos, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra. Para comparar dos distribuciones, en cambio, se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras.

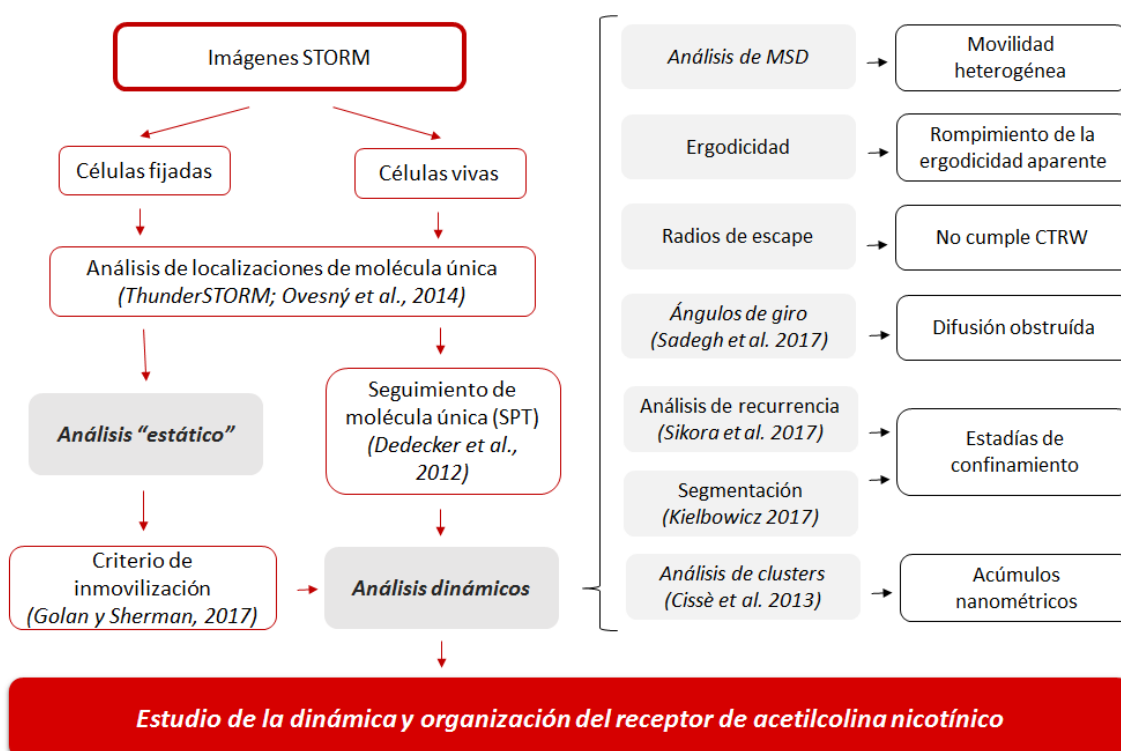


Figura 3.8: Diagrama de flujo de los análisis implementados en el trabajo. Partiendo de imágenes de microscopía de superresolución STORM en células vivas y fijadas, se esquematiza el orden en el que se aplicaron los distintos análisis, nombrando brevemente resultados relevantes obtenidos en cada caso.

4. Resultados

4.1. Parte I: Análisis de desplazamientos cuadráticos medios (MSD) de la difusión lateral del nAChR

El presente trabajo se encuentra enfocado en el estudio exhaustivo del comportamiento individual y colectivo de una proteína receptora, el receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR), difundiendo en la membrana celular. Para ello, se analizaron imágenes de experimentos de microscopía de fluorescencia de superresolución en su modalidad STORM/GSDIM. Esta tecnología permite hacer un seguimiento en tiempo real del receptor a nivel de molécula única, a partir del cual es posible extraer propiedades sobre el sistema y sobre las interacciones con el medio en el que se encuentra inmerso (la membrana plasmática). Los experimentos de microscopía STORM en células vivas procesados, analizados y discutidos en la presente Tesis de Licenciatura fueron realizados previamente en el laboratorio por el Dr. Francisco J. Barrantes. Los experimentos STORM en células fijadas químicamente, por otro lado, fueron realizados en conjunto por el Dr. Francisco J. Barrantes y por el alumno Alejo Mosqueira. Como modelo experimental se utilizó la línea celular clonal CHO-K1/A5 [112], la cual expresa de forma heteróloga en su membrana el nAChR de tipo muscular adulto. Además, se utilizaron incubaciones con ciclodextrina (CDx) o ciclodextrina cargada con colesterol (CDx-Chol) para estudiar los efectos que tiene la modificación aguda de colesterol de membrana en la difusión del receptor. Los nAChRs fueron marcados con dos tipos de sondas fluorescentes: AlexaFluor⁵⁵⁵-BTX, para experimentos en células vivas; o anticuerpos monoclonales primarios mAb35 contra la subunidad α , seguido de marcado secundario con anticuerpos etiquetados con Texas Red, para células fijadas. Las imágenes de superresolución fueron adquiridas de la superficie adherida al cubreobjetos (cara ventral de la célula), en una región de interés (ROI) de 10 μm x 10 μm , a una velocidad de 100 fotogramas por segundo y con una duración total de 7000 fotogramas (70 segundos). En total, se analizaron entre 8 y 15 experimentos en células vivas para cada condición experimental, y 6 experimentos en células fijadas (sólo control). La validación de las localizaciones de

molécula única en las imágenes de superresolución fueron llevadas a cabo a través del programa ThunderSTORM [116] (Figura 4.1a). La reconstrucción de las trayectorias de molécula única se realizó utilizando el programa Localizer [121] (Figura 4.1b). Las trayectorias con menos de 50 pasos temporales (es decir, con una diferencia de 50 fotogramas entre el tiempo inicial y el final de las posiciones registradas) fueron descartadas de los análisis dinámicos (a menos que se aclare lo contrario), para mayor robustez en los resultados. Para una descripción más detallada de la metodología implementada en el presente trabajo, ver la sección correspondiente en [Materiales y métodos](#).

4.1.1. Movimiento aparente del nAChR en la membrana celular

Una simple inspección ocular de las trayectorias reconstruidas parece indicar una gran heterogeneidad en la dinámica traslacional del nAChR, gobernada por un alto grado de confinamiento (Figura 4.1 b). Sin embargo, la primera consideración para tener en cuenta al analizar datos de microscopía STORM es que una fracción no despreciable de las trayectorias reconstruidas puede parecer confinada, pero, en realidad, corresponder a receptores completamente inmóviles. Esto se debe a la naturaleza misma de la metodología implementada: Las microscopías de fluorescencia de superresolución de tipo estocástico de molécula única (*single-molecule localization microscopies* (SMLM), STORM entre ellas) permiten resolver estructuras por debajo del límite de difracción de la luz (~ 200 nm) a través de una estimación de la posición de moléculas individuales. Como toda estimación, posee una incerteza asociada (~ 40 nm, en nuestro caso, ver Figura 3.1 en [Materiales y métodos](#)), la cual no es despreciable y produce una diferencia entre la posición real de la molécula en cuestión (el receptor) y la resultante de la medición. Sucesivos errores en dicha aproximación dan como resultado fluctuaciones al azar alrededor de la posición real, las cuales pueden ser lo suficientemente grandes como para ser confundidas con un receptor móvil, lo que se conoce como *movimiento aparente*. Si no se tiene en cuenta la posible presencia de estos movimientos aparentes, moléculas inmóviles pueden ser incorrectamente clasificadas como móviles e incluidas en los promedios sobre las propiedades dinámicas del sistema. En consecuencia, los resultados e interpretacio-

nes sobre la dinámica poblacional pueden ser completamente erróneos. Para evitar este problema, es necesario aplicar un criterio que nos permita distinguir robustamente entre aquellas moléculas confinadas pero móviles de aquellas completamente inmóviles, de tal forma de excluir estas últimas de los análisis dinámicos.

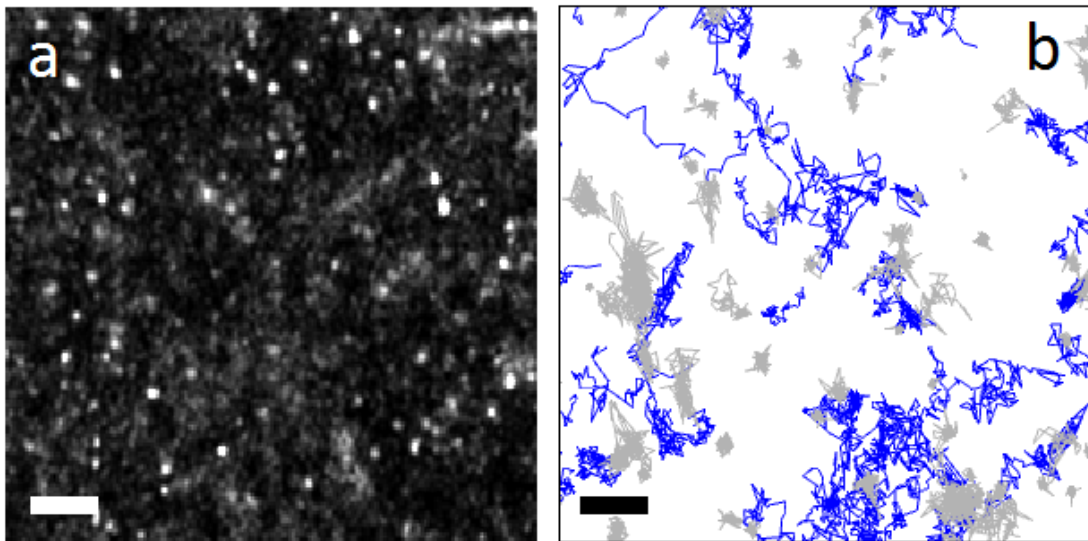


Figura 4.1: Localizaciones de molécula única y trayectorias reconstruidas para nAChRs difundiendo lateralmente en la membrana de células CHO-K1/A5. (a) Imagen representativa de una proyección en 2D de las localizaciones validadas a partir de imágenes STORM de una célula CHO-K1/A5 viva teñida con AlexaFluor.⁵⁵⁵-BTX. Cada región brillante corresponde a cúmulos de nAChRs. La intensidad de la proyección representa una suavización gaussiana de la densidad local de receptores. (b) Trayectorias individuales de nAChRs móviles (trazos azules) e inmóviles (trazos grises), clasificados según el criterio definido en [123]. Se puede observar el alto nivel de confinamiento e inmovilización del receptor. Barra de escala: 500 nm.

Recientemente, Golan y Sherman [123] desarrollaron un criterio basado en la razón entre el radio de giro y el desplazamiento medio de trayectorias de partículas únicas:

$$\sqrt{\pi/2}(R_g/\langle|\Delta r|\rangle), \quad (4.1)$$

Donde R_g es el radio de giro, $\langle|\Delta r|\rangle$ es el desplazamiento medio de una dada trayectoria y $\sqrt{\pi/2}$ una constante de normalización (ver [Materiales y métodos](#)). Esta razón se mantiene relativamente constante para partículas completamente inmóviles que exhiben un movimiento aparente, pero aumenta para partículas móviles. La mayor ventaja de este método respecto de métodos previamente utilizados (como el radio

de giro o el umbral en el coeficiente de difusión D_{um}) [110] es que es independiente del error de localización. De esta forma, se pueden utilizar trayectorias aparentes de receptores inmóviles en *células fijadas* para caracterizar la distribución de dicho parámetro y luego establecer un criterio para identificar los receptores inmóviles en *células vivas*. Golan y Sherman proponen tomar como umbral el límite superior del intervalo al 95 % de confianza (es decir, sólo un 2,5 % de probabilidad de clasificar falsamente una molécula inmóvil como móvil). Aplicando dicho criterio en 6 células CHO-K1/A5 fijadas provenientes de dos experimentos independientes, se obtuvieron límites del intervalo al 95 % de confianza de 1,5-2,1, definiendo como umbral el valor más alto (2,1). Trayectorias en células vivas que no superaran dicho umbral, fueron clasificadas como provenientes de moléculas inmóviles y también excluidas de los análisis posteriores. Se obtuvo un valor promedio de $52 \pm 22\%$ de receptores inmóviles (Figura 4.2). No se observaron diferencias significativas al modificar los niveles de colesterol en membrana.

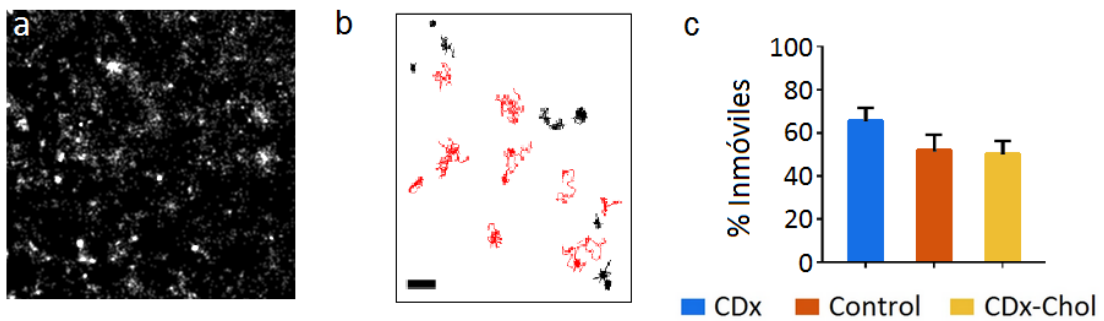


Figura 4.2: Criterio de clasificación de trayectorias en móviles e inmóviles. (a) Proyección en 2D de las localizaciones validadas a partir de imágenes STORM, correspondiente a una región de $5 \times 5 \mu\text{m}$ de una célula CHO-K1/A5 control fijada químicamente y teñida con Texas Red-mAb (ver [Materiales y métodos](#) para más detalles). Cada región brillante corresponde a cúmulos de localizaciones individuales de nAChRs. La intensidad de la proyección representa una suavización gaussiana de la densidad local de localizaciones. (b) Trayectorias móviles (trazo rojo) e inmóviles (trazo negro) de nAChRs resultantes de la aplicación del criterio de Golan y Sherman [123] a una situación control. Barra de escala: 500 nm. (c) Porcentajes medios y error estándar de la media (S.E.M.) del porcentaje de receptores inmóviles para las células analizadas bajo las distintas condiciones experimentales.

4.1.2. Análisis de desplazamiento cuadráticos medios (MSD)

Para caracterizar el comportamiento difusional heterogéneo de los nAChRs restantes (móviles), se procedió primero a analizar sus desplazamientos cuadráticos medios (MSD) (ver sección correspondiente en [Materiales y métodos](#)). Estudiar las curvas de MSD es uno de los criterios más comúnmente utilizados para detectar desvíos de la caminata al azar (movimiento Browniano) en análisis de difusión de proteínas. Caracterizar este tipo de difusión no azarosa (*difusión anómala*) es sumamente útil, ya que permite comprender los procesos fisiológicos celulares subyacentes y, en última instancia, comprender cómo se encuentran regulados. Estos procesos que regulan la difusión lateral de proteínas pueden ser agrupados en dos grandes categorías: Por un lado, aquellos mecanismos relacionados al transporte celular activo (que utilizan energía) que dan lugar a una difusión de tipo dirigida o *superdifusiva*; por el otro, procesos celulares más complejos, tales como la aglomeración molecular, el confinamiento, las interacciones proteína-proteína, o las heterogeneidades espaciales, los cuales dan lugar a una difusión anómala de tipo *subdifusiva*. A partir de estudiar la dependencia que tiene la curva de MSD con el tiempo de retraso, es decir, el exponente de anomalía β , es posible identificar estos distintos motivos difusionales a nivel de molécula única. Si el exponente de anomalía resultante es igual a 1 (dependencia lineal con el tiempo), la trayectoria sigue un movimiento térmico, al azar (Browniano). En cambio, si el exponente de anomalía es distinto de 1, la trayectoria sigue un movimiento de tipo anómalo: subdifusivo para el caso de $\beta < 1$ y superdifusivo para $\beta > 1$.

En la Figura 4.3a se muestran las curvas de MSD de las trayectorias individuales para condiciones experimentales control. La distribución de exponentes de anomalía β obtenida muestra una alta heterogeneidad en los motivos difusionales exhibidos por el receptor: desde valores de 0,3 (marcadamente subdifusivos), pasando por valores cercanos a 1 (característicos de movimiento Browniano), hasta tomar valores cercanos a 1,6 (considerablemente superdifusivos). El exponente de anomalía promedio obtenido fue de $\langle \beta \rangle = 0,85 \pm 0,23$ para células control, lo que indica que **la dinámica del nAChR es mayoritariamente subdifusiva**. Por su parte, los

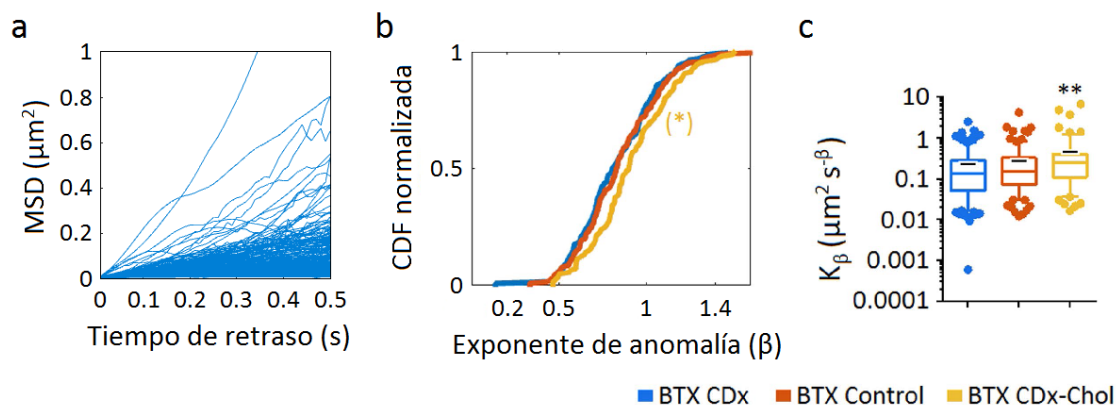


Figura 4.3: Análisis de desplazamientos cuadráticos medios (MSD) para trayectorias individuales de nAChRs. (a) Curvas de MSD para trayectorias de nAChRs en células control, cuya bondad del ajuste por una función lineal en escala logarítmica fue de $R > 0,9$ (curvas azules). (b) Función de distribución acumulada (CDF) normalizada de los exponentes de anomalía correspondientes a las trayectorias mostradas en la figura (a) (situación control, trazo naranja) y las correspondientes a las condiciones con colesterol de membrana modificado (CDx, trazo azul; CDx-Chol, trazo amarillo). (c) Distribución normalizada de los coeficientes de difusión generalizados (K_β), en escala logarítmica, para células control y células con colesterol modificado. Estadística: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****).

coeficientes de difusión generalizados también tomaron valores variados, abarcando varios órdenes de magnitud (desde 10^{-2} hasta $10^0 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-\beta}$), y con un valor promedio de $\langle K_\beta \rangle = 0,26 \pm 0,41 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-\beta}$ para situación control. Cuando se compararon estos resultados con los obtenidos al modificar el colesterol de membrana (Figura 4.3b-c), se halló una presencia mayor de modos más difusivos ($\langle \beta \rangle = 0,91 \pm 0,23$, $p < 0,5$) en células con colesterol enriquecido, acompañada por un aumento considerable en los coeficientes de difusión generalizados ($0,43 \pm 0,79 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-\beta}$, $p < 0,01$). En células donde el colesterol había sido depletado no se encontraron cambios significativos en la dinámica poblacional del receptor.

4.1.3. Clasificación de las trayectorias en subpoblaciones según su capacidad difusiva

A continuación, se procedió a realizar un análisis más detallado de la heterogeneidad observada en la difusión lateral del receptor en la membrana. Para ello, se definió un criterio de clasificación de las trayectorias individuales basado en el exponente de anomalía. Las trayectorias fueron agrupadas en 3 subpoblaciones difusivas

diferentes: Subdifusiva (SB; para $\beta \leq 0,9$), Browniana (B; para $0,9 < \beta \leq 1,1$) y Superdifusiva (SP; para $\beta > 1,1$). Debido a la gran proporción de trayectorias subdifusivas y al amplio rango de exponentes hallados, se decidió dividir, a su vez, la subpoblación SB en 3 subgrupos: Subdifusiva I (SB I; para $\beta \leq 0,5$), Subdifusiva II (SB II; para $0,5 < \beta \leq 0,7$) y Subdifusiva III ($0,7 < \beta \leq 0,9$) (ver Tabla 4.1 y Figura 4.4). Las trayectorias que no superaron una bondad de 0,9 en el ajuste de su curva de MSD ($\sim 4-14$ % del total) fueron separadas en una sexta subpoblación, denominada “Difusión Desconocida” (o DD). La naturaleza de esta subpoblación no puede ser analizada por medio del modelo propuesto para las curvas de MSD y, por lo tanto, son excluidas de esta sección. Los exponentes de anomalía de las 5 subpoblaciones analizadas dieron valores medios de: $0,45 \pm 0,05$ (SB I), $0,61 \pm 0,05$ (SB II), $0,80 \pm 0,06$ (SB III), $1,00 \pm 0,06$ (B), y $1,23 \pm 0,12$ (SP) (Figura 4.5 a). Por su parte, los coeficientes de difusión generalizados tuvieron valores medios de: $0.029 \pm 0.016 \mu\text{m}^2\text{s}^{-\beta}$ (SB I), $0.059 \pm 0.029 \mu\text{m}^2\text{s}^{-\beta}$ (SB II), $0.14 \pm 0.07 \mu\text{m}^2\text{s}^{-\beta}$ (SB III), $0.35 \pm 0.26 \mu\text{m}^2\text{s}^{-\beta}$ (B), y $0.81 \pm 0.81 \mu\text{m}^2\text{s}^{-\beta}$ (SP) (Figura 4.5 b). **Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los coeficientes de difusión generalizados de las distintas subpoblaciones difusivas.**

Cuando se compararon los resultados obtenidos para la situación control con los correspondientes a la **situación de enriquecimiento de colesterol en membrana**, se **observó un aumento significativo en la proporción de trayectorias que exhibían una modalidad SP** (de ~ 3 % a ~ 10 %, $p = 0,042$; ver Tabla 4.1 y Figura 4.6). Este aumento en la proporción de moléculas en estado SP podría explicar el aumento en el exponente de anomalía y el coeficiente de difusión generalizado observado en el estudio poblacional bajo las mismas condiciones experimentales.

En resumen, un elevado porcentaje de los nAChRs se encuentran completamente inmóviles en la membrana celular de las células CHO-K1/A5 (~ 50 %). La población móvil restante, por su parte, exhibe un comportamiento anómalo subdifusivo. Sin embargo, a nivel de molécula única, el comportamiento es altamente heterogéneo: desde trayectorias subdifusivas, Brownianas y, en menor medida, superdifusivas; sugiriendo que la actividad del nAChR está siendo regulada por variados procesos fisiológicos que coexisten en la membrana plasmática. Si bien no se observó que la

Tabla 4.1: Porcentaje de las trayectorias en cada una de las subpoblaciones definidas a través del criterio de separación según rangos de exponentes de anomalía β^* en condiciones control y bajo condiciones de modificación del colesterol de membrana**

Tratamiento	Subdifusiva I	Subdifusiva II	Subdifusiva III	Browniana	Superdifusiva
Porcentaje de trayectorias (media \pm D.E.)					
CDx	10,75 \pm 7,64	27,7 \pm 8,71	31,04 \pm 10,15	12,80 \pm 9,74	3,24 \pm 3,51
Control	8,63 \pm 5,90	31,91 \pm 11,65	30,08 \pm 15,99	22,39 \pm 13,76	3,08 \pm 4,03
CDx-Chol	5,67 \pm 8,41	25,79 \pm 18,66	33,39 \pm 9,84	20,34 \pm 10,35	10,07 \pm 8,27

*Los grupos se encuentran ordenadas desde el menos difusivo (izquierda) hacia el más difusivo (derecha). Los grupos resultantes de la clasificación de trayectorias basada en la modalidad difusional fueron los siguientes: Subdifusivo I ($\beta \leq 0,5$), Subdifusivo II ($0,5 < \beta \leq 0,7$), Subdifusivo III ($0,7 < \beta \leq 0,9$), movimiento Browniano ($0,9 < \beta \leq 1,1$), y Superdifusivo ($\beta > 1,1$). Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas entre las condiciones control y enriquecimiento de colesterol para la población Superdifusiva ($p = 0,042$). **Trayectorias que no satisficieron la condición de bondad del ajuste de 0,9 (“Difusión Desconocida”) no se incluyeron en la tabla. Estas representaron una proporción variable de alrededor del 4-14 %.

reducción de los niveles de colesterol tengan un efecto considerable en la difusión del receptor a nivel poblacional, el aumento de colesterol en membrana producen un desplazamiento del comportamiento poblacional a modalidades más difusivas, lo cual se vio reflejado en un aumento del exponente de anomalía, del coeficiente de difusión generalizado y en la mayor proporción de trayectorias superdifusivas observadas bajo esta condición experimental.

4.1.4. Hipótesis de ergodicidad

Una propiedad muy importante en la mecánica estadística es la ergodicidad. La hipótesis de ergodicidad asume que los promedios temporales de una cantidad estadística son equivalentes a los promedios sobre el ensamble estadístico (conjunto de copias del sistema) en el límite de tiempo de medición infinito. En otras palabras, si queremos describir un sistema a través de los promedios de ciertas cantidades estadísticas como, por ejemplo, el exponente de anomalía o el coeficiente de difusión generalizado, presupondría lo mismo calcularlas a través de un promedio temporal sobre una única molécula lo suficientemente larga o calcularlas a través de un promedio espacial sobre muchas moléculas (“copias”) en un momento determinado. Dependiendo de las condiciones experimentales, entonces, es posible estudiar las propiedades estadísticas de un sistema *ergódico* a través de promedios temporales

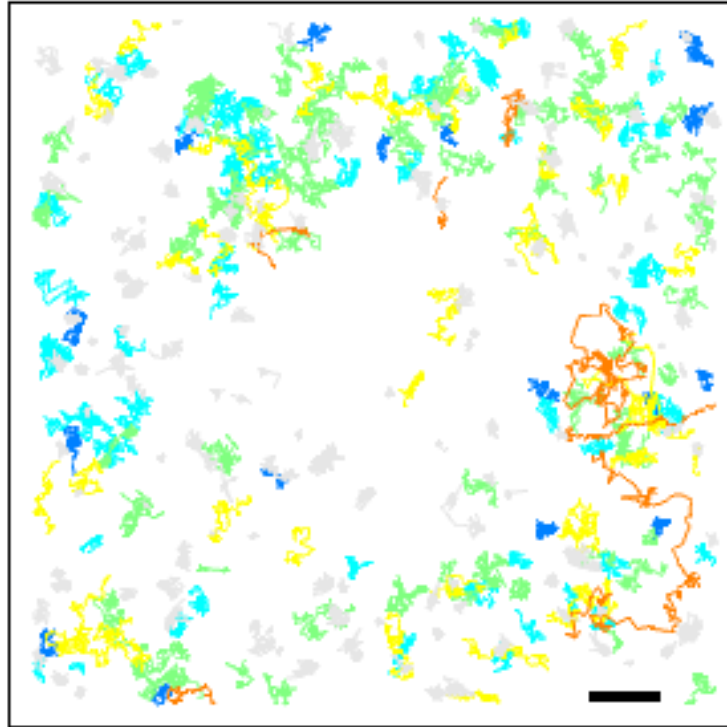


Figura 4.4: Trayectorias de nAChRs individuales para situación control, clasificadas en subpoblaciones difusionales según el exponente de anomalía. ROI de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ representativo de un experimento de STORM en célula CHO-K1/A5 viva teñida con AlexaFluor⁵⁵⁵-BTX. Se muestran las trayectorias de moléculas únicas coloreadas según la subpoblación a la que pertenecen: Subdifusiva I (SB I, azul), Subdifusiva II (SB II, celeste), Subdifusiva III (SB III, verde), Browniana (B, amarillo) y Superdifusiva (SP, naranja). Las curvas grises corresponden a las trayectorias previamente clasificadas como inmóviles, según el criterio recientemente propuesto por Golan y Sherman [123]. Barra de escala: $1\ \mu\text{m}$.

(si se tienen pocas copias, pero son lo suficientemente largas) o de promedios sobre el ensamble (si se tienen muchas copias, pero no lo suficientemente largas). Ambas estrategias serán equivalentes e igualmente correctas. Sin embargo, esto no siempre sucede. Muchos sistemas biológicos violan la hipótesis de ergodicidad, por lo general debido a la presencia de inmobilizaciones transitorias o heterogeneidades espaciales [108, 110, 133–137]. En estos casos, los promedios temporales se convierten en variables aleatorias y la equivalencia anteriormente enunciada pierde su validez, en violación al teorema central del límite [138]. La pregunta lógica que surge entonces es: ¿Cumple nuestro sistema la hipótesis de ergodicidad? Y en caso de que no lo haga: ¿Son representativas de las propiedades del sistema las cantidades calculadas con

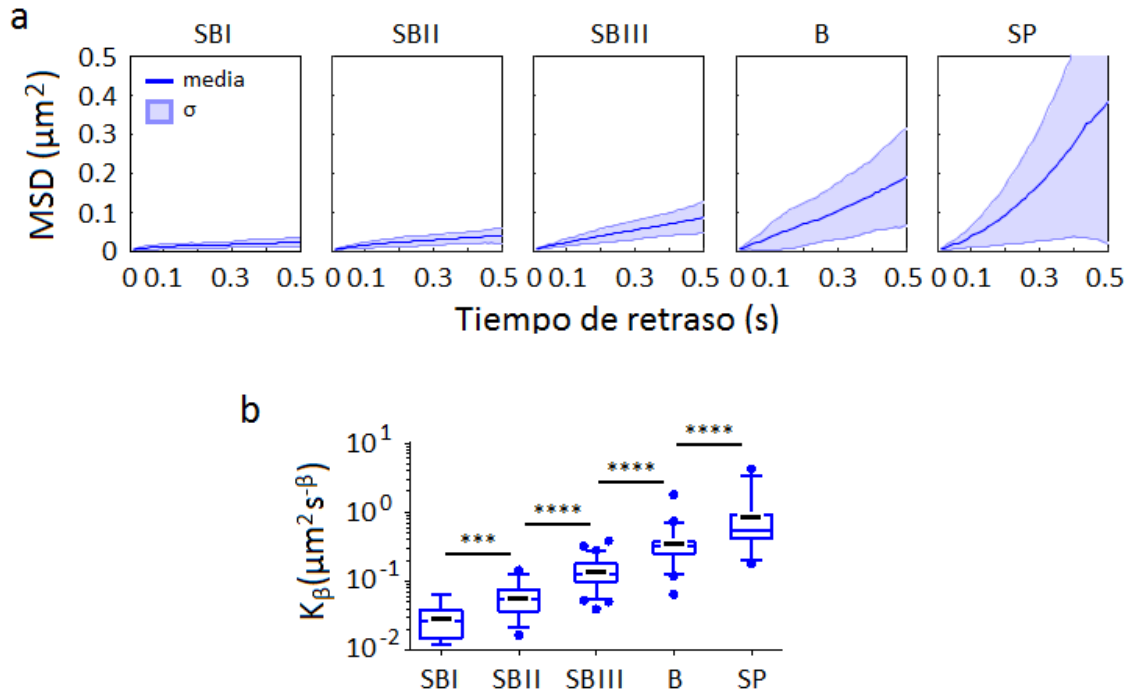


Figura 4.5: Resultados cuantitativos del análisis de MSD de los nAChRs separados en subpoblaciones difusionales, para situación control. (a) Promedio y desvío estándar (σ) de las curvas de MSD de las trayectorias pertenecientes a cada subpoblación difusiva. (b) Mediante el ajuste lineal de cada curva de MSD en escala logarítmica, se obtuvo el exponente de anomalía (β) y el coeficiente de difusión generalizado (K_β) de cada trayectoria (ver [Materiales y métodos](#)). En el gráfico se muestran los diagramas de caja de los K_β para los nAChRs divididos en las subpoblaciones difusivas. Los “bigotes” del diagrama de caja corresponde a los intervalos de confianza al 95%; los límites de la caja indican el intervalo de confianza al 75%; el símbolo – negro indica la media y la línea horizontal coloreada indica la mediana. Los puntos afuera de los intervalos de confianza se denominan atípicos. p-valores: $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****).

anterioridad a través de los promedios temporales? ¿Cuál sería el promedio indicado para describir un sistema que viola la hipótesis de ergodicidad? Lo recientemente expuesto junto al alto rango de valores obtenidos en el cálculo de las distintas cantidades estadísticas calculadas en este capítulo (a través de promedios temporales) nos obliga a evaluar la hipótesis de ergodicidad en nuestro sistema.

Tradicionalmente, la presencia de una *ruptura de ergodicidad débil* (WEB: *weak ergodicity breaking*) se testea comparando las curvas de TA MSD y EA MSD. Si el sistema es ergódico, la teoría predice que el TA MSD debería converger al EA MSD y los parámetros estimados por los dos promedios deberían ser iguales. Sin embargo,

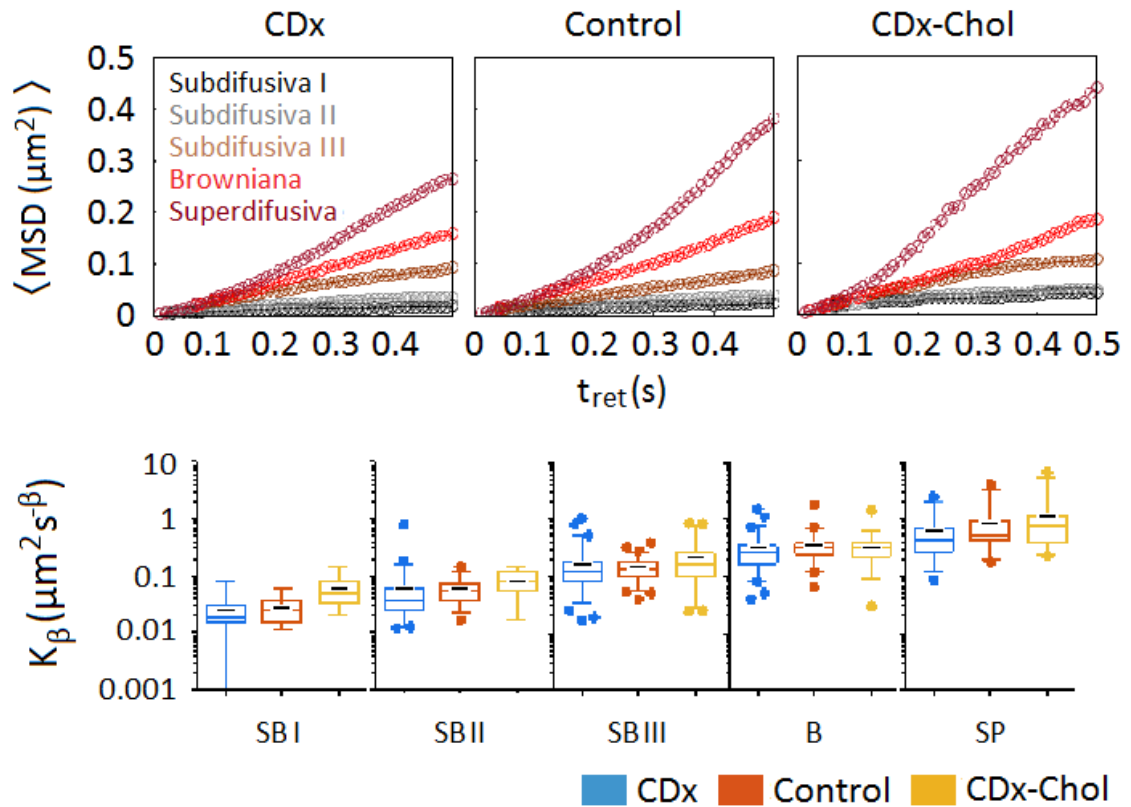


Figura 4.6: Análisis de MSD de los nAChRs separadas en subpoblaciones difusionales, para situación control y con modificaciones de colesterol de membrana. Arriba, promedio de las curvas de MSD correspondientes a trayectorias de nAChRs, separadas en subpoblaciones difusivas según su exponente de anomalía β . Cada color representa a una subpoblación difusiva diferente. Abajo, diagramas de cajas de los coeficientes de difusión generalizados, K_β , para las trayectorias correspondientes a cada una de las subpoblaciones difusivas, ordenadas según exponente de anomalía β creciente. Los “bigotes” del diagrama corresponde al intervalo de confianza al 95%; los límites de la caja indican el intervalo de confianza al 75%; el símbolo – negro indica la media y la línea horizontal coloreada indica la mediana. Los puntos afuera de los intervalos de confianza son valores atípicos.

como toda medición experimental conlleva un cierto nivel de error, los valores teóricos y las estimaciones empíricas necesariamente van a diferir. Cuánto difieran estos valores depende de condiciones experimentales como p.ej. el tamaño de la muestra. Por ello, al comparar las curvas de TA MSD y EA MSD, es importante considerar una medida de la precisión de las estimaciones (p.ej., incluyendo intervalos de confianza). De lo contrario, un proceso puede ser falsamente clasificado como no ergódico debido a limitaciones experimentales dadas por el tamaño de la muestra. En el presente trabajo se compararon las curvas del EA TA MSD (el promedio de

ensamble del TA MSD) y del EA MSD junto a su intervalo de confianza al 95 %, tal como se describe en ref. [139]. En nuestro sistema puede observarse una leve diferencia entre ambas curvas (Figure 4.7), lo que podría sugerir **presencia de WEB**. Sin embargo, ambas curvas convergen a tiempos de retraso más grandes para todas las condiciones experimentales, lo cual, sumado a la complejidad de la membrana celular y las limitaciones estadísticas del tamaño de la muestra, hacen **necesario realizar estudios adicionales para confirmar la naturaleza aparentemente no ergódica del sistema**. Dichos estudios serán introducidos y discutidos en el capítulo siguiente.

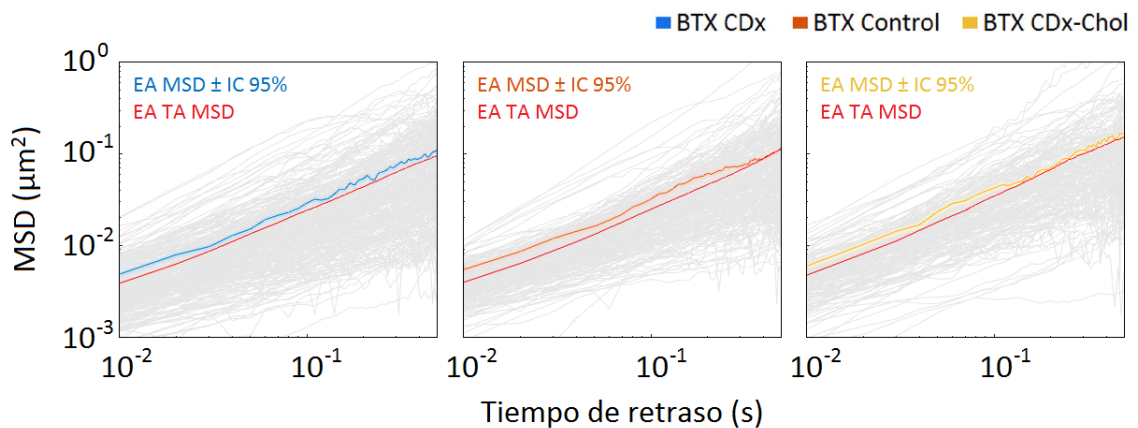


Figura 4.7: Testeo de la hipótesis de ergodicidad. Se muestra el promedio del ensamble del MSD (EA MSD, trazos coloreados), junto al intervalo de confianza (IC) al 95 % (sombras coloreadas) calculado de forma teórica como en Janczura y Weron [139], para células control y para aquellas con niveles de colesterol reducidos (CDx) o enriquecido (CDx-Chol). Además, se calculó el promedio del ensamble del TA MSD (EA TA MSD, trazos rojos) para testear la hipótesis de ergodicidad. Se observa una leve diferencia entre las curvas obtenidas por ambos promedios, bajo todas las condiciones experimentales, lo que sugiere la posibilidad de que exista una ruptura de ergodicidad débil (WEB). Los trazos grises corresponden a las curvas de MSD individuales para moléculas únicas de nAChRs.

4.2. Parte II: Modelado biofísico de la dinámica del nAChR

En el capítulo anterior se demostró mediante varios enfoques de *análisis poblacional* que los receptores móviles exhiben un comportamiento altamente heterogéneo, con modalidades subdifusivas, Brownianas y superdifusivas. Además, se observó que ciertas variables estadísticas relacionadas a su movimiento (como el coeficiente de difusión generalizado y el exponente de anomalía) exhiben distribuciones amplias, extendidas por varios órdenes de magnitud, lo que podría sugerir la presencia de una ruptura débil de ergodicidad (WEB). Cuando se testeó dicha hipótesis, se vio que los promedios espaciales y temporales diferían levemente a tiempos cortos, pero convergían a tiempos largos, por lo que los resultados sobre ergodicidad del sistema no fueron concluyentes. Para estudiar más detalladamente este problema y poder concluir qué tipo de comportamiento exhibe el nAChR, en el presente capítulo se analiza el comportamiento de la movilidad del nAChR *a nivel de molécula única* y se testean los datos experimentales contrastándolos con distintos modelos biofísicos (tanto ergódicos como no ergódicos) característicos de distintas modalidades de difusión de proteínas en membranas biológicas. Por último, se interpreta la adecuación de los modelos más plausibles en el marco de los procesos fisiológicos subyacentes que podrían regular la movilidad traslacional del nAChR en la membrana celular.

4.2.1. Caminata aleatoria de tiempo continuo (CTRW)

A la fecha, varios modelos biofísicos han sido propuestos para intentar describir diferentes propiedades observadas en la traslación lateral de proteínas de membrana, como es el caso de la difusión anómala (no Browniana) y la ruptura de ergodicidad débil (WEB). El modelo biofísico de difusión anómala no ergódica por excelencia es la caminata aleatoria de tiempo continuo (CTRW). Este modelo consiste en una caminata al azar con inmovilizaciones transitorias, cuyos tiempos de permanencia poseen una distribución de probabilidad que escala como $\sim t^{-(\beta+1)}$. Si $\beta \leq 1$, el tiempo medio de permanencia diverge y la ventana temporal experimental (el tiempo promedio de registro o largo promedio de las trayectorias) no puede alcanzar el tiempo característico del sistema, dando lugar a WEB.

Una forma de analizar si los datos experimentales pueden ser explicados por este modelo (por ende, confirmar la existencia de WEB) es analizar la distribución de *tiempos de escape*, es decir, los intervalos durante los cuales las trayectorias permanecen dentro de un área con un dado radio R_{UM} (*radio de escape*) (ver [Materiales y métodos](#)). Si la dinámica de las trayectorias a largo plazo se encuentra dominada por eventos de inmovilización, el tiempo que les tome escapar de un área con un dado radio va a estar mayormente determinado por la duración promedio de dichas inmovilizaciones y no por el tamaño de dicha área. Es decir, la distribución de los tiempos de espera no dependería del radio. En cambio, si se observa una dependencia entre los tiempos y los radios de escape, se concluye que la dinámica del receptor a largo plazo no está dominada por la inmovilización y el modelo CTRW queda descartado. Al cuantificarse la duración de los eventos en los cuales las trayectorias de moléculas únicas permanecen dentro de áreas de radios crecientes R_{UM} [108, 110], la distribución de tiempos de espera mostró una clara dependencia con radios de escape de entre ~ 20 a 250 nm (Figura 4.8). Más aún, cuando analizamos la dependencia de los tiempos de espera con los radios de escape para las células con niveles de colesterol modificados, se encontraron resultados similares, los cuales no se ajustan a lo predicho por el modelo de CTRW. Estos resultados sugieren fuertemente que **la dinámica traslacional del receptor de acetilcolina en la membrana de las CHO-K1/A5 no puede ser explicada por el modelo CTRW y que el proceso de difusión sería, en realidad, de tipo ergódico.**

¿Cómo puede un sistema mostrar signos de ergodicidad y no ergodicidad al mismo tiempo? Una posible explicación reside en lo propuesto recientemente por Grebenkov [140]. Grebenkov analiza un modelo de difusión intermitente entre dos estados con coeficientes de difusión D_1 y D_2 , tasas de cambio k_{12} y k_{21} , y tiempos de residencia promedio en cada estado $1/k_{12}$ y $1/k_{21}$. Si ambos tiempos de residencia promedio son pequeños en relación con la duración promedio de las trayectorias, las moléculas cambian de estado lo suficientemente rápido como para llegar a explorarlos por completo. De esta forma, cada molécula llevará suficiente información de los estados accesibles por el sistema, y, por lo tanto, la hipótesis de ergodicidad se satisface. En cambio, si los tiempos de residencia en cada estado son comparables o mayores a

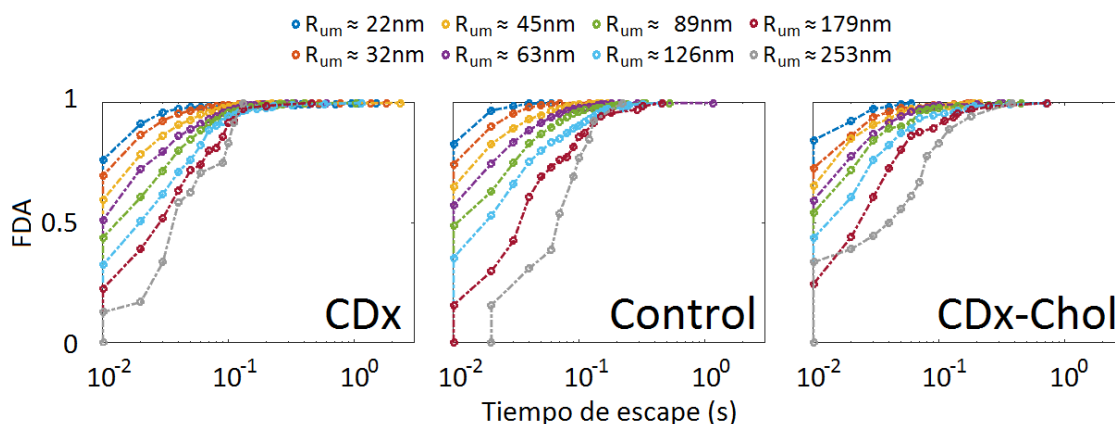


Figura 4.8: Análisis de tiempos de escape: Testeo del modelo de CTRW. Función de distribución acumulada (FDA) normalizada de los tiempos de escape obtenidos para radios umbral crecientes, desde ~ 22 nm hasta ~ 253 nm. El código de colores correspondiente se muestra en la leyenda. Se puede observar claramente la dependencia de la distribución con el radio umbral para todas las condiciones experimentales (Control, CDx: depleción de colesterol, y CDx-Chol: enriquecimiento de colesterol), indicando que los resultados observados en nuestro sistema no se ajustan a las predicciones del modelo CTRW.

la duración promedio de las trayectorias, una fracción importante de las moléculas llevará información de un sólo estado y, por lo tanto, no será representativa de la dinámica de la población. En dicho caso, las curvas de TA MSD exhibirán una distribución amplia y el parámetro de ergodicidad tomará valores aleatoriamente grandes, sugiriendo la presencia de WEB. Sin embargo, como el modelo de difusión intermitente entre dos estados es un modelo ergódico, se dice que esta ruptura de ergodicidad es *aparente*, debido a tiempos de medición insuficientes (en comparación a los tiempos característicos del sistema). La pregunta que cabe hacerse es, entonces, si las propiedades difusivas aparentemente contradictorias exhibidas por el nAChR pueden ser explicadas por este modelo de difusión intermitente. Esta hipótesis y distintos modelos biofísicos serán puestos a prueba en las secciones siguientes.

4.2.2. Análisis de recurrencia

Por simple inspección ocular de las trayectorias individuales del receptor (Figura 4.4), se puede observar que la dinámica del nAChR se encuentra caracterizada por eventos de confinamiento. En muchos casos, además, el confinamiento pareciera

extenderse a lo largo de toda la trayectoria. Es posible, entonces, que la aparente contradicción exhibida por la dinámica del receptor pudiese ser explicada por un modelo de intercambio intermitente entre dos estados, uno de ellos de tipo difusión confinada y con tiempos de residencia comparables a los tiempos característicos del sistema (trayectoria promedio). Para evaluar esta hipótesis, se aplicó un análisis desarrollado recientemente [126] que permite analizar trayectorias de moléculas únicas paso por paso en busca de recurrencia en los desplazamientos (ver [Materiales y métodos](#)). Tales interrupciones en los desplazamientos obedecerían a estancias transitorias en regiones de la membrana celular que la molécula visita recurrentemente (lo que los autores denominan *estancias de confinamiento*). En particular, el análisis es capaz de hallar dichas regiones (*zonas de confinamiento*) y caracterizar tanto su duración como su tamaño. Al analizar nuestros datos experimentales se vio que **prácticamente todas las trayectorias de los nAChRs se confinan en áreas nanométricas por un determinado período** (Figura 4.9a). La distribución de tiempos de residencia resultó tener una cola exponencial, con un tiempo de decaimiento característico de 171 ± 9 ms (Figura 4.9b). Las áreas cubiertas por las estancias de confinamiento tuvieron tamaños promedio de 4659 ± 3372 nm² (Figura 4.9c), equivalente a un área con radio promedio de 36 ± 13 nm. El porcentaje promedio en el que una trayectoria explora el estado confinado resultó ser de 33 ± 22 % (Figura 4.9d).

Cuando se analizaron los efectos producidos por disminución inducida del colesterol en la membrana, se observaron cambios significativos tanto en los tiempos característicos (257 ± 9 ms) como en los tamaños (3833 ± 3601 nm² de área o radios promedios de 32 ± 13 nm) de las regiones en los que una molécula se confina, indicando que dichas regiones son fuertemente dependientes del colesterol (Figura 4.9b,c). Si bien se observa una tendencia opuesta para las células que fueron enriquecidas con colesterol exógeno (disminución del tiempo característico de residencia, a 135 ± 5 ms), dicha diferencia no fue estadísticamente significativa. Coincidente con lo observado en los tiempos característicos de confinamiento, los porcentajes promedios en los que las trayectorias únicas se confinan también mostraron una **tendencia lineal e inversamente proporcional entre los niveles de colesterol en membrana**

y el grado de confinamiento: a menor nivel de colesterol, mayor estancias de confinamiento; a mayor nivel de colesterol, mayor estancias de confinamiento (Figura 4.9d).

Por otra parte, cuando se repitió el análisis de recurrencia por separado a las trayectorias pertenecientes a cada subpoblación difusional (SB I, II, III, B y SD), se observó que **esencialmente todas las trayectorias, independientemente de su modalidad difusional, exhiben un comportamiento de difusión intermitente entre porciones de difusión libre (no confinada) y porciones en donde la molécula se confina por distintos intervalos de tiempo dentro de zonas nanométricas** (Figura 4.10a). Sorpresivamente, la subpoblación con tiempos característicos más cortos resultó ser la SB I, seguida de la SB II, luego de la SB III, de la B y finalmente la SP (Figura 4.10b y Tabla 4.2), coincidente con el orden de cada subpoblación según el exponente de anomalía. Más aún, cuando se calculó el porcentaje promedio que cada trayectoria pasa en el estado confinado, separándolas en las distintas subpoblaciones, se halló, nuevamente, que el orden resultante coincide con el orden de menor a mayor motivo difusional (**a mayor tiempo de confinamiento promedio, menor difusión resultante**; Figura 4.10c). Esto sugiere que existe una fuerte **correlación entre el tiempo que el receptor pasa en el estado confinado y el motivo difusional resultante del análisis de MSD**. Resultados similares se observaron para las condiciones experimentales con niveles modificados de colesterol de membrana.

4.2.3. Análisis de segmentación de trayectorias basado en tiempos de escape

Motivado por lo encontrado por el análisis de recurrencia, se procedió a estudiar de forma complementaria e independiente los cambios de estados difusivos en trayectorias de partículas únicas. Para esto, se utilizó un algoritmo de segmentación de trayectorias únicas recientemente desarrollado en el grupo de la codirectora de este trabajo [127], el cual permite determinar segmentos de las trayectorias en donde la molécula se mantiene confinada. A diferencia del análisis de recurrencia que evalúa el número de visitas dentro de una región determinada, el algoritmo aquí utilizado

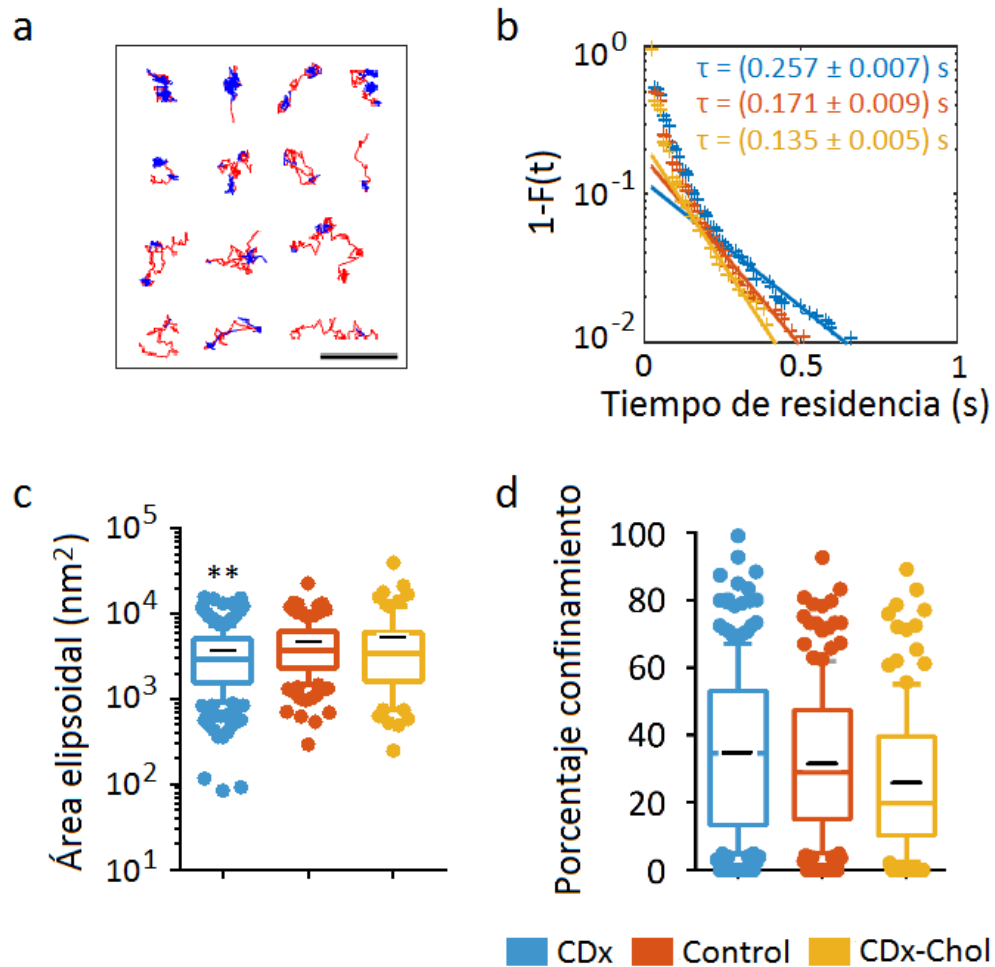


Figura 4.9: Análisis de recurrencia: confinamientos transitorios en nanodominios dentro de trayectorias individuales. (a) Trayectorias representativas de nAChRs difundiendo en la membrana celular (célula control). En azul se resaltan las estancias de confinamiento encontradas con el análisis de recurrencia [126]. Barra de escala: 1 μm . (b) Función de distribución acumulada complementaria (o función de supervivencia) de los tiempos de residencia en el estado confinado, para situaciones control y para modificación de colesterol (CDx: depleción de colesterol; CDx-Chol: enriquecimiento de colesterol). Las colas de las curvas fueron ajustadas por una función de decaimiento exponencial, a partir de la cual se obtuvo el tiempo de decaimiento característico (τ). (c) Diagramas de caja de las áreas de las porciones de las trayectorias en el estado confinado (zonas de confinamiento), obtenidas a partir del ajuste por superficies elípticas. (d) Diagrama de cajas del porcentaje de pasos en el estado confinado de las trayectorias de nAChR. Los “bigotes” del diagrama de caja corresponde a los intervalos de confianza al 95 %; los límites de la caja indican el intervalo de confianza al 75 %; el símbolo – negro indica la media y la línea horizontal indica la mediana. Los puntos afuera de los intervalos de confianza se denominan atípicos. Estadística: $p < 0,01$ (**).

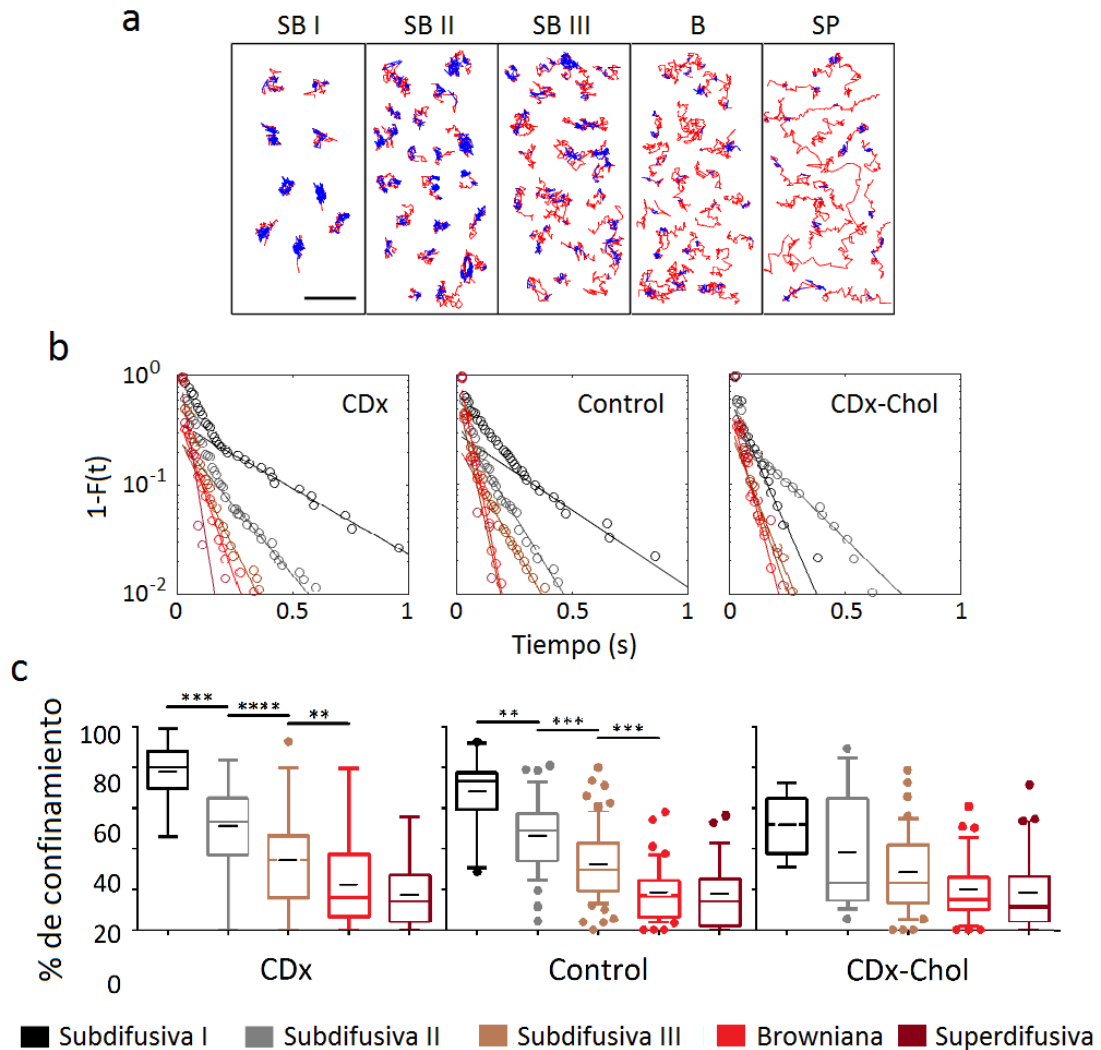


Figura 4.10: Análisis de recurrencia para las trayectorias separadas según su difusividad. (a) Trayectorias representativas de los nAChRs pertenecientes a las distintas subpoblaciones difusionales resultantes de la clasificación según el exponente de anomalía: Subdifusiva I (SB I), II (SB II), III (SB III), Browniana (B) y Superdifusiva (SP) (ver [Materiales y métodos](#)). En azul se resaltan las estancias de confinamiento encontradas con el análisis de recurrencia [126]. Notar la disminución de las estancias de confinamiento desde la subpoblación SB I hasta la SP. Por simplicidad, sólo se muestran ejemplos de situación control. Ejemplos similares se obtuvieron para células con depleción o enriquecimiento de colesterol. Barra de escala: 1 μm . (b) Función de supervivencia de los tiempos de residencia en el estado confinado para las distintas subpoblaciones difusivas. Se muestran los resultados para situaciones control y para situaciones de niveles de colesterol modificados (CDx: depleción de colesterol; CDx-Chol: enriquecimiento de colesterol). Las colas de las curvas fueron ajustadas por una función de decaimiento exponencial, a partir de la cual se obtuvo el tiempo de decaimiento característico (τ). (c) Porcentaje de pasos en el estado confinado para las trayectorias únicas agrupadas en las subpoblaciones difusivas de (a). Los “bigotes” del diagrama de caja corresponde a los intervalos de confianza al 95 %; los límites de la caja indican el intervalo de confianza al 75 %; el símbolo negro indica la media y la línea horizontal coloreada indica la mediana. Los puntos afuera de los intervalos de confianza se denominan atípicos. p-valores: $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****).

Tabla 4.2: Tiempos característicos de las estancias de confinamiento para cada subpoblación, resultante del ajuste por una función de decaimiento exponencial de las funciones de supervivencia de las estancias de confinamiento.

Subpoblación	Subdifusiva I	Subdifusiva II	Subdifusiva III	Browniana	Superdifusiva
	CDx				
Tau (s)	0,361 ± 0,033	0,174 ± 0,009	0,103 ± 0,009	0,073 ± 0,007	0,033 ± 0,013
	Control				
Tau (s)	0,310 ± 0,022	0,129 ± 0,012	0,116 ± 0,008	0,041 ± 0,003	0,045 ± 0,014
	CDx-Chol				
Tau (s)	0,097 ± 0,044	0,213 ± 0,012	0,060 ± 0,012	0,044 ± 0,008	0,055 ± 0,008

*Los grupos se encuentran ordenadas desde el menos difusivo (izquierda) hacia el más difusivo (derecha). Los grupos resultantes de la clasificación de trayectorias basada en la modalidad difusional fueron los siguientes: Subdifusivo I ($\beta \leq 0,5$), Subdifusivo II ($0,5 < \beta \leq 0,7$), Subdifusivo III ($0,7 < \beta \leq 0,9$), movimiento Browniano ($0,9 < \beta \leq 1,1$), y Superdifusiva ($\beta > 1,1$).

se basa en estudiar los radios de escape, es decir, la probabilidad de que una dada molécula (el receptor en este caso) logre escapar luego de n pasos de una región circular de radio R . Luego, a través de un ajuste teórico a los datos experimentales, es capaz de reconocer segmentos de la trayectoria en donde el receptor permanece confinado (lo que el autor denomina “cúmulos” y aquí denominados eventos de confinamiento) (ver [Materiales y métodos](#)).

Al igual que se vio con el análisis de recurrencia, **prácticamente todos los nAChRs individuales (~90%) se encuentran de forma intermitente con regiones del espacio en donde se confinan** (Figura 4.11). La función de supervivencia de los tiempos de confinamiento nuevamente exhibió una cola exponencial (ver Figura 4.11a), con tiempo característico de 469 ± 24 ms (promedio \pm 95%CI). Las áreas promedio de las regiones donde el receptor se confina fueron de 4688 ± 3614 nm² (Figura 4.11b). El tiempo relativo que cada trayectoria pasa en el estado confinado (porcentaje de trayectoria confinada; Figura 4.11c) fue de aproximadamente 37%, muy similar al hallado por el método de recurrencia. Cuando se compararon estos resultados con los obtenidos en células con menor (CDx) o mayor (CDx-Chol) contenido de colesterol en membrana, se vio que, en ambos casos, los tiempos característicos aumentaron significativamente (a 693 ± 46 ms y 617 ± 75 ms, respetivamente). El tamaño de dichas zonas, por otra parte, resultó ser directa-

mente proporcional a los niveles de colesterol en membrana, disminuyendo al quitar colesterol y aumentando al agregarlo ($4384 \pm 3869 \text{ nm}^2$ para CDx, $p < 0,001$; $5226 \pm 3406 \text{ nm}^2$ para CDx-Chol, $p < 0,01$). Finalmente, el tiempo relativo que pasa una molécula en el estado confinado resultó ser levemente mayor en las células tratadas con CDx (de 37 % a 42 %, $p < 0,05$).

Al aplicar el análisis a las trayectorias separadas en subpoblaciones difusivas según su exponente de anomalía (Figura 4.12), se vio que las estancias de confinamiento son una propiedad característica de la difusión lateral del receptor en membrana, sin importar la modalidad difusiva resultante: está presente en las trayectorias menos móviles, en las brownianas, e incluso en las superdifusivas (Figura 4.12a). Cuando analizamos los tiempos relativos que pasan las trayectorias de cada subpoblación en el estado confinado, volvimos a encontrar una correlación con la modalidad difusiva resultante (Figura 4.12b).

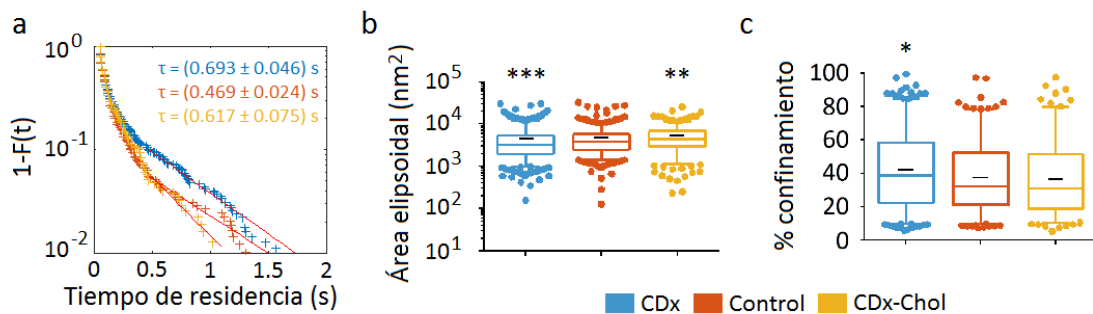


Figura 4.11: Análisis de segmentación poblacional. (a) Función acumulada complementaria (o función de supervivencia) de los tiempos de residencia para situación control y para cada tratamiento. Observar que las distribuciones tienen una cola exponencial, de las cuales se obtuvieron los tiempos de confinamiento característicos. Las líneas rojas corresponden al ajuste exponencial de la cola de las distribuciones (para tiempos mayores a 350 ms). (b) Áreas de confinamiento para situación control y para los distintos tratamientos (CDx: depleción de colesterol, CDx-Chol: enriquecimiento de colesterol). (c) Tiempos relativos de confinamiento (respecto al largo total de la trayectoria) o porcentaje de pasos confinados, para situación control y para CDx y CDx-Chol. Los “bigotes” del diagrama de caja corresponde a los intervalos de confianza al 95 %; los límites de la caja indican el intervalo de confianza al 75 %; el símbolo – negro indica la media y la línea horizontal coloreada indica la mediana. Los puntos afuera de los intervalos de confianza se denominan atípicos. p-valores: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

De esta forma, se encontró que **la dinámica del nAChR puede ser explica-**

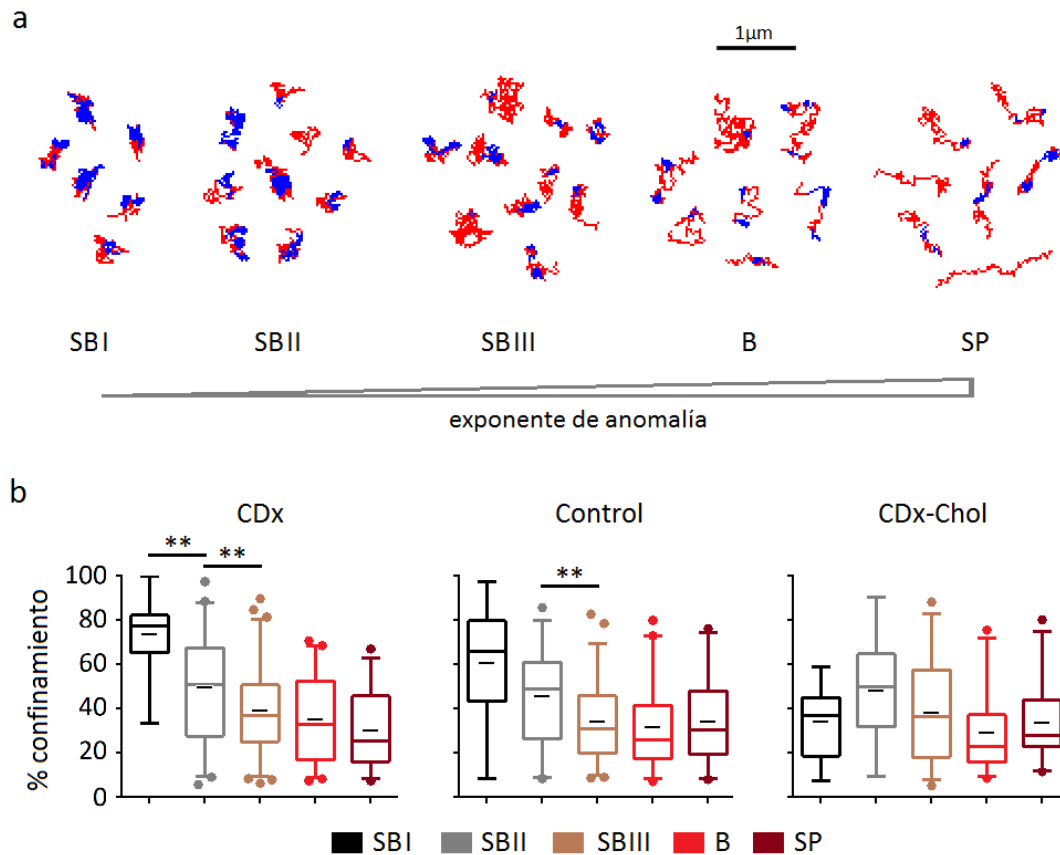


Figura 4.12: Análisis de segmentación aplicado a subpoblaciones. (a) Ejemplos representativos de trayectorias analizadas para situación control, separadas en las distintas subpoblaciones difusivas y ordenadas según el exponente de anomalía (SB: subdifusiva, B: browniana, SP: superdifusiva). Los tramos azules muestran los segmentos identificados como confinados. Observar la disminución de la presencia de tramos confinados a medida que aumenta el exponente de anomalía. (b) Tiempos relativos de confinamiento (respecto al largo total de la trayectoria) o porcentaje de pasos confinados, para las distintas subpoblaciones difusivas y para los distintos tratamientos (CDx: depleción de colesterol, CDx-Chol: enriquecimiento de colesterol). Los “bigotes” del diagrama de caja corresponde a los intervalos de confianza al 95 %; los límites de la caja indican el intervalo de confianza al 75 %; el símbolo negro indica la media y la línea horizontal indica la mediana. Los puntos afuera de los intervalos de confianza se denominan atípicos. p-valores: $p < 0,01$ (**).

da por el modelo de difusión intermitente entre dos estados, con tiempos de estancias comparables con el tiempo de medición experimental. La duración de las estancias de confinamiento es altamente dependiente del colesterol, sugiriendo que el colesterol está fuertemente relacionado a dichos eventos, probablemente a través de balsas lipídicas o dominios líquido-ordenados. Todo

parece indicar, entonces, que **la difusión lateral del nAChR en la membrana celular de células CHO-K1/A5 es un proceso de tipo ergódico, pero que tiempos de medición insuficientes** (en comparación a los tiempos característicos del sistema) dan lugar a WEB aparente. Finalmente, **la modalidad difusiva exhibida por las curvas de MSD resultó ser una medición indirecta del grado de confinamiento a nivel de molécula única**. Por lo tanto, la difusión anómala subdifusiva exhibida por el receptor a nivel poblacional estaría asociada a eventos de confinamiento transitorios, confirmando que un estudio más exhaustivo de la dinámica de trayectoria única es capaz de develar propiedades del sistema que de otra forma permanecían ocultas.

4.2.4. Análisis de cambios direccionales o ángulos de giro

Para investigar el posible sustrato físico subyacente al comportamiento subdifusivo ergódico del nAChR, se recurrió al análisis de la distribución de los cambios direccionales o *ángulos de giro* [129, 130]. Dicho análisis estudia los cambios de dirección (en forma de cambios de orientación o ángulos de giro) desplegados por una molécula cada cierta cantidad de pasos (o tiempo de retraso) a lo largo de su trayectoria (ver [Materiales y métodos](#)). Una de las mayores fortalezas de este análisis es que permite evaluar si existen correlaciones en el desplazamiento de las moléculas. Si la distribución de ángulos de giro resulta plana, las moléculas no tienen ninguna predilección en la dirección de movimiento (es decir, siguen un movimiento Browniano) y se dice que los pasos están no correlacionados. En cambio, si la distribución de ángulos de giro tiene un máximo en 0° o en 180° , significa que las moléculas tienen una dirección de movimiento privilegiada y que su desplazamiento está correlacionado. En el caso de que la distribución muestre un máximo en 0° , las trayectorias tenderían a avanzar hacia adelante (movimiento *positivamente* correlacionado). En el caso de que el máximo se encuentre en 180° , por el contrario, las trayectorias tenderían a volver entre sus pasos (movimiento *negativamente* correlacionado o anti-correlacionado). Al aplicar el análisis a la población de nAChRs, se halló que la distribución de la probabilidad de ángulos de giro crecía gradualmente desde los $60\text{-}90^\circ$ en adelante hasta alcanzar un máximo en $\theta = 180^\circ$ (Figura 4.13)

para todos los tiempos de retraso y todas las condiciones experimentales, un claro indicativo de pasos anti-correlacionados. También se observó, bajo condiciones control y de depleción de colesterol, que dichas distribuciones tenían una dependencia temporal: a mayor tiempo de retraso, las distribuciones mostraron una tendencia a aplanarse (des-correlacionarse). Esta característica sugiere que la dinámica a corto plazo del nAChR se encontraría gobernada por el confinamiento, pero que a largo plazo los receptores tenderían a escapar de dichas zonas.

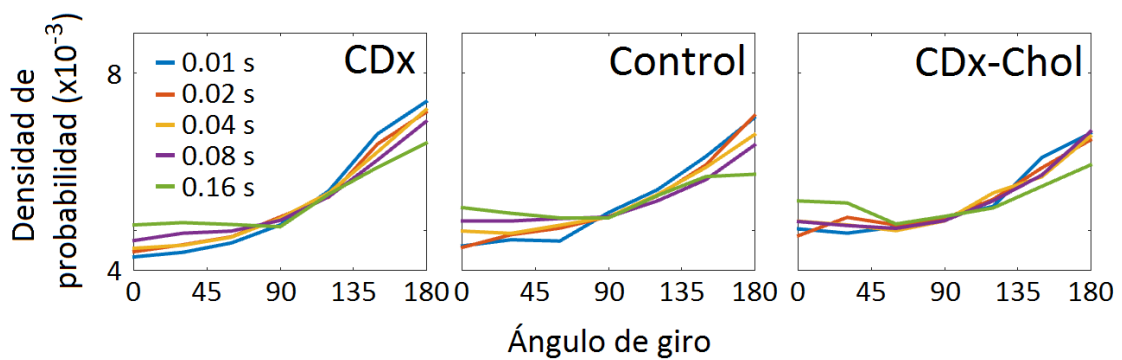


Figura 4.13: Análisis de ángulos de giro. Densidad de probabilidad de los ángulos de giro para t_{ret} crecientes (desde 10 ms a 160 ms, ver código de colores en figura) para células control y células con los niveles de colesterol modificados (CDx: depleción de colesterol; CDx-Chol: enriquecimiento de colesterol). La probabilidad de densidad se encuentra normalizada de tal forma que la integral bajo la curva es igual a uno.

Recientemente, el análisis de ángulos de giro fue empleado para estudiar la correlación en el movimiento de los canales de potasio regulados por voltaje tipo Kv1.4 y Kv2.1 [129]. Krapf y colaboradores observaron que este tipo de canal iónico también sigue un movimiento de tipo anti-correlacionado. Para lograr comprender la naturaleza física que daba lugar a dicho comportamiento, compararon los resultados experimentales con los obtenidos por simulaciones numéricas de dos modelos biofísicos ergódicos extensamente testeados, conocidos por dar lugar a dinámica de tipo subdifusiva con pasos anti-correlacionados: movimiento Browniano fraccional (fBm) y difusión obstruida (OD) (ver Figura 4.14a). El modelo fBm simula el movimiento de partículas en un fluido viscoelástico, en el cual una fuerza restitutiva lleva a las partículas a volver entre sus pasos. El modelo OD, por su parte, simula el movimiento de partículas en un medio con presencia de obstáculos inmóviles o casi

inmóviles, los cuales dificultan y obstruyen el movimiento. Aunque las distribuciones de los ángulos muestran un máximo en 180° para ambos modelos, en el primero se alcanza una meseta, en contraste con los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo. Estos resultados indican que la dinámica del nAChR se explica mejor mediante el modelo de OD.

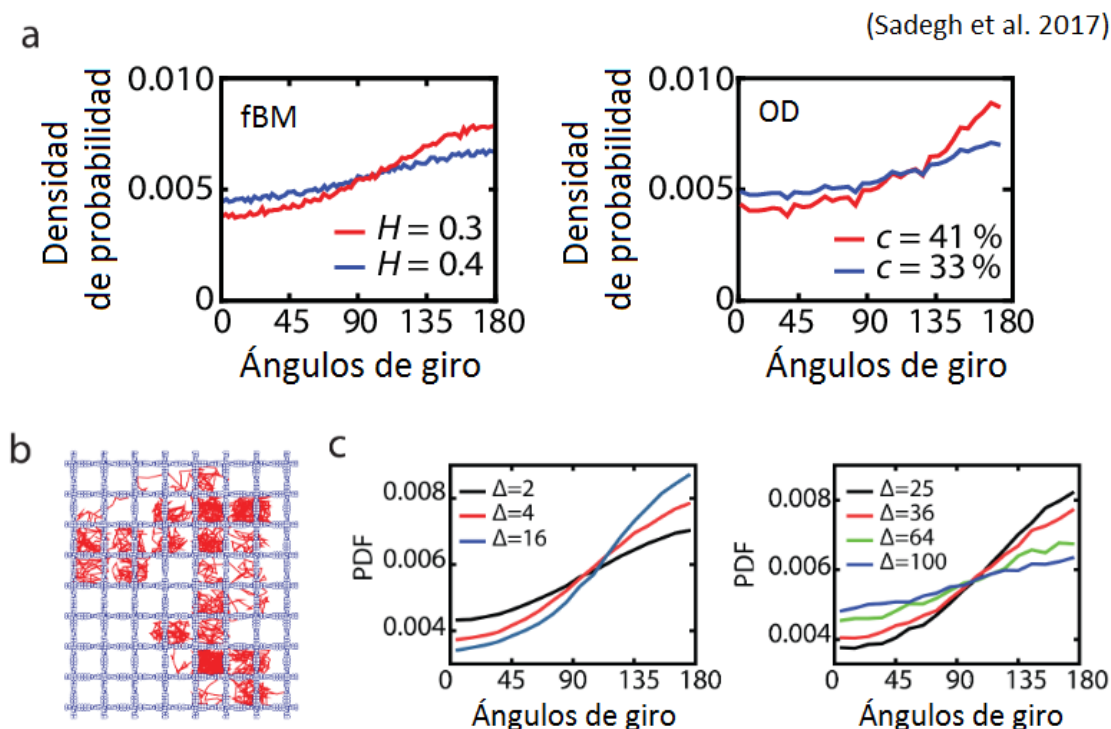


Figura 4.14: Simulaciones numéricas de modelos ergódicos con pasos anticorrelacionados. (a) Izquierda, función densidad de probabilidad (PDF) de los ángulos de giro para simulaciones numéricas de movimiento Browniano fraccional (fBM) para 2 exponentes de Hurst diferentes. Observar que la distribución alcanza rápidamente una meseta. Derecha, PDF de los ángulos de giro para simulaciones numéricas de movimiento de tipo percolación (difusión obstruida con alto porcentaje de obstáculos) para 2 densidades de obstáculos c . Observar que la distribución crece indefinidamente. (b) Simulaciones numéricas del modelo de tipo de vallas permeables (un tipo de modelo de difusión obstruida). En rojo se muestra una trayectoria de molécula única, la cual queda atrapada en una celda de la red y tiene una cierta probabilidad de permear a través de una valla hacia una celda vecina. Dicha probabilidad está relacionada a la concentración de obstáculos que se quiere simular (a mayor concentración de obstáculos, menor probabilidad de permear). (c) PDF de los ángulos de giro obtenidos para 1000 trayectorias de 10.000 pasos cada una, difundiendo dentro de la valla permeable, con probabilidad de permear de 5%, para distintos tiempos de retraso (Δ). Observar la dependencia de la distribución con el tiempo de retraso. Las imágenes fueron extraídas y editadas del trabajo de Sadegh y colaboradores [129].

Dos propiedades adicionales pueden ser obtenidas mediante la inspección de las distribuciones de ángulos de giro. En primer lugar, comparando las pendientes con las obtenidas con las simulaciones de OD con una concentración de obstáculos creciente (Figura 4.14a), se puede inferir que la difusión del nAChR se encuentra obstaculizada por una concentración alta de partículas inmóviles. En segundo lugar, la dependencia de la distribución de ángulos de giro con el tiempo de retraso (la diferencia estadística entre las distribuciones para tiempos de retraso t_{lag} de 0,01 s y 0,50 s fue de $p < 10^{-15}$ para situación control) es característica de difusión de tipo anti-correlacionada en una estructura con un tamaño característico, lo cual nos lleva a descartar la posibilidad de que se encuentren involucradas estructuras fractales. Un comportamiento similar fue observado previamente en simulaciones de caminatas al azar en un modelo de vallas permeables [129], es decir, caminatas al azar dentro de una malla con baja probabilidad de permeación (ver Figura 4.14b,c). En resumen, **los resultados obtenidos se ajustan al modelo de receptores difundiendo en una estructura con un tamaño característico, determinada por una alta concentración de obstáculos.** No se encontraron cambios significativos en las distribuciones de las curvas de ángulos de giro para los tratamientos.

A continuación, se repitió el análisis de ángulos de giro, pero esta vez para las distintas subpoblaciones difusionales resultantes de la clasificación por exponente de anomalía (SB I, II, III, B y SP) (Figura 4.15). Tal como era de esperarse, la subpoblación Browniana (B), si bien mostró una distribución angular levemente anti-correlacionada a tiempos pequeños, rápidamente tendió a una distribución plana característica de la caminata al azar (pasos des-correlacionados). La subpoblación superdifusiva (SP) mostró una distribución angular levemente anti-correlacionada a pequeños tiempos, pero tendió rápidamente a una distribución altamente correlacionada con un máximo en $\theta = 0^\circ$ para tiempos más largos (> 40 ms), lo cual significa que la dinámica a largo plazo está gobernada por un movimiento que tiende a avanzar sobre sus pasos (característico de movimientos superdifusivos). Las tres subpoblaciones subdifusivas (SB I, II y III) mostraron una distribución creciente desde $60-90^\circ$ en adelante, hasta alcanzar un pico en $\theta = 180^\circ$, característico de movimiento anti-correlacionado. Sorpresivamente, la pendiente de la distribución

resultó ser paulatinamente decreciente desde la subpoblación menos difusiva (SB I) a la más difusiva (SB III), es decir, tendiendo a des-correlacionarse a medida que nos acercamos a la subpoblación Browniana. **La “fuerza” de la anti-correlación en el desplazamiento de los receptores, entonces, resulta ser inversamente proporcional al grado de subdifusión: a mayor anti-correlación, menor difusividad resultante.** Resultados similares se encontraron en las células con niveles de colesterol disminuidos (CDx) y aumentados (CDx-Chol) en Figura 4.15.

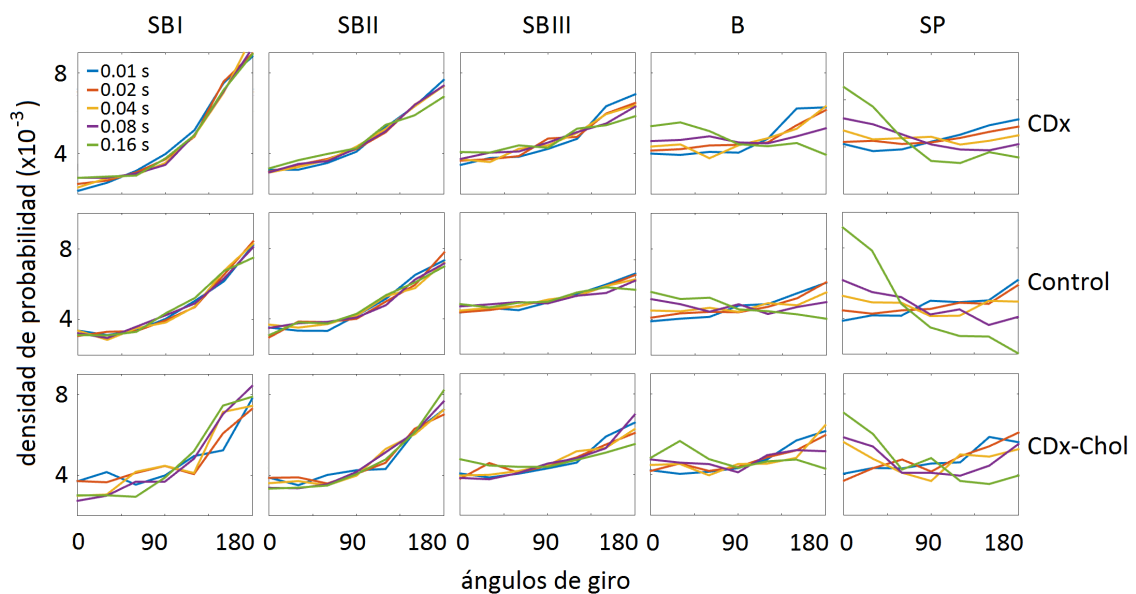


Figura 4.15: Análisis de ángulos de giro para las trayectorias separadas según su difusividad. Función de densidad de probabilidad de los ángulos de giro para cada subpoblación difusiva: Subdifusiva I (SB I), II (SB II), III (SB III), Browniana (B) y Superdifusiva (SP). Se muestran distribuciones de ángulos de giro correspondientes a tiempos de retraso crecientes, partiendo de 10 ms hasta 160 ms (ver código de colores en la esquina superior izquierda), para situación control y para los tratamientos (CDx: depleción de colesterol; CDx-Chol: enriquecimiento de colesterol).

En el modelo de OD (el modelo que mejor explica el comportamiento observado para el nAChR), la pendiente de la curva está relacionada con la concentración de obstáculos en el medio. Cuanto mayor pendiente (mayor anti-correlación), mayor concentración de obstáculos. Una posible interpretación sería entonces que el aumento en la anti-correlación observado en las subpoblaciones menos difusivas es debido a que dichas moléculas se encuentran con regiones con mayor concentración de obstáculos. Sin embargo, hay que ser cautos a la hora de interpretar estos resul-

tados. Distribuciones similares podrían esperarse si, por ejemplo, dichas moléculas se encontraran más frecuentemente o pasaran más tiempo dentro de regiones con concentraciones de obstáculos similares. En ese caso, la pendiente de la distribución de ángulos de giro no estaría dada por la concentración de obstáculos sino, en cambio, por una cuestión meramente estadística, resultante del promedio entre los pasos anti-correlacionados y los des-correlacionados: a mayor cantidad de pasos anti-correlacionados presentes en las trayectorias, mayor contribución de estos pasos a los promedios y, por ende, mayor anti-correlación resultante en la distribución angular. Esta segunda hipótesis tiene sustento en lo observado anteriormente para el análisis de recurrencia de las subpoblaciones, donde se vio una correlación importante entre el tiempo que los receptores individuales pasan en un estado confinado y el motivo difusional resultante al aplicar un análisis de MSD (Figura 4.10 y Figura 4.12). Es decir, para la subpoblación SB I, que tiene más pasos en estado confinado, es sensato esperar que el promedio entre los pasos libres y los confinados resulte en una distribución de ángulos más inclinada hacia el perfil confinado (más anti-correlación o pendiente más abrupta). La progresiva disminución de pasos confinados observada para las subpoblaciones SB II y III y, por ende, la menor contribución del confinamiento en los promedios, explicarían la caída paulatina en la pendiente de las distribuciones angulares correspondientes. Este interrogante será respondido en la siguiente sección.

4.2.5. Pasos anti-correlacionados y estancias de confinamiento

Como hemos visto, a partir del análisis de las curvas de MSD y de ángulos de giro, se halló que la dinámica del receptor de acetilcolina muestra un comportamiento ergódico y mayoritariamente subdifusivo, caracterizado por pasos anti-correlacionados que se ajustan al modelo de difusión obstruida en una estructura con una escala de tamaño característico (no fractal) y alta densidad de obstáculos. Además, a través del análisis de recurrencia y de segmentación de trayectorias, se encontró que el comportamiento individual del receptor está gobernado por estancias de confinamiento transitorio dentro de zonas nanométricas con una escala espacial bien definida. Es lógico pensar, entonces, que las zonas de confinamiento nanométri-

cas halladas sean, en realidad, la estructura no fractal predicha por el análisis de ángulos de giro. Tanto la “fuerza” de la anti-correlación como el porcentaje de pasos confinados exhibieron un comportamiento completamente análogo: a mayor tiempo en el estado confinado o a mayor anti-correlación, menor difusión (exponente de anomalía) resultante del análisis de MSD, apoyando la hipótesis de que ambos tipos de aproximaciones analíticas convergen, revelando de manera complementaria las propiedades del mismo fenómeno.

Sacando ventaja de la capacidad de seccionar las trayectorias individuales en regiones libres y confinadas, se procedió a testear dicha hipótesis mediante el estudio de la distribución de ángulos de giro, pero esta vez estudiando ambos estados difusivos (libre y confinado) por separado (Figura 4.16). Se encontró que en las zonas de confinamiento el receptor muestra desplazamientos anti-correlacionados (máximo en $\theta = 180^\circ$). En cambio, las porciones libres muestran un comportamiento diferente: pasos des-correlacionados a tiempos cortos (distribución plana, correspondiente a un movimiento Browniano) y positivamente correlacionados a tiempos largos (con un máximo en $\theta = 0^\circ$, correspondiente a un movimiento que tiende a avanzar entre sus pasos). Estos resultados verifican la hipótesis de que **la estructura no fractal observada en el análisis de ángulos de giro, con alta concentración de obstáculos, que obliga a los receptores a volver entre sus pasos, no es ni más ni menos que el conjunto de zonas de confinamiento**. Es decir, zonas de la membrana con radios promedio de 36nm en donde se aglomera una gran cantidad de obstáculos, los cuales dificultan la libre difusión del receptor en la membrana y lo confinan por un determinado período de tiempo.

Al repetir el análisis de ángulos de giro para las porciones confinadas de las subpoblaciones SB I, II y III (Figura 4.17), se observó que **todas las trayectorias se encuentran con zonas de confinamiento con concentraciones de obstáculos similares** (igual pendiente). Es decir, las diferencias en las pendientes observadas para las distribuciones de ángulos de giro pertenecientes a distintas subpoblaciones subdifusivas (Figura 4.15) no estarían dadas por diferencias significativas en la concentración de obstáculos en las zonas que atraviesan sino a estancias de confinamiento más prolongadas. Este resultado está en concordancia con lo hallado por

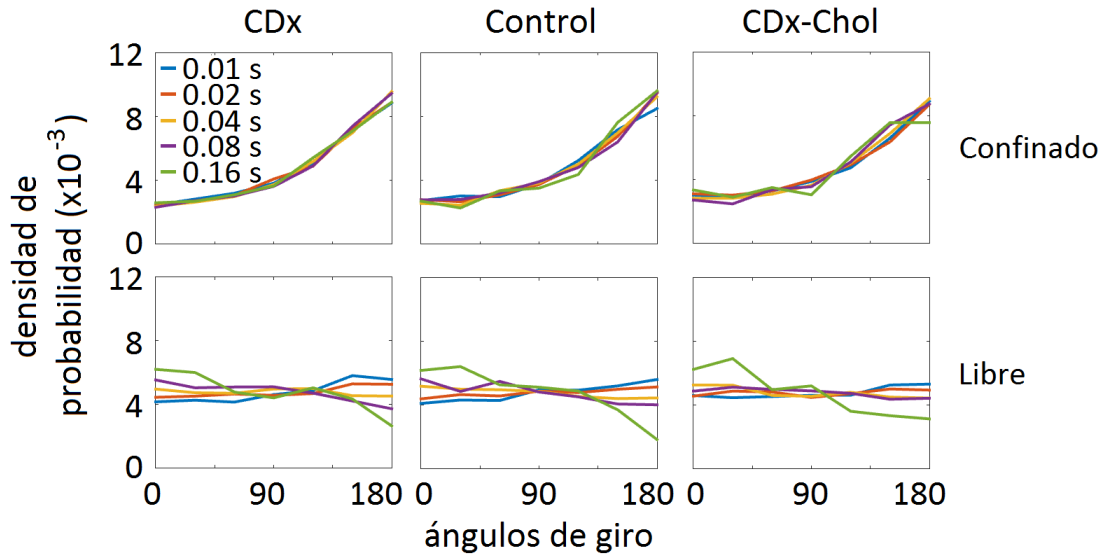


Figura 4.16: Análisis de ángulos de giro para las porciones libres y confinadas de trayectorias únicas. (a) Función de densidad de probabilidad de los ángulos de giro para las porciones confinadas (arriba) y libres (abajo) de trayectorias únicas de nAChR. Distribuciones de ángulos de giro correspondientes a tiempos de retraso crecientes se encuentran indicadas por el código de colores, partiendo de 10 ms (azul) hasta 160 ms (verde). Se muestran los resultados para situación control y para los tratamientos (CDx: depleción de colesterol; CDx-Chol: enriquecimiento de colesterol). Notar que la anti-correlación sólo se observa en las porciones confinadas de las trayectorias.

los análisis de recurrencia y de segmentación (Figura 4.9, Figura 4.10 y Figura 4.12) y responde la pregunta que motivó esta sección. Más aún, los mismos resultados se hallaron para las distintas condiciones experimentales (CDx y CDx-Chol), lo cual indicaría que el **colesterol no afectaría la concentración de obstáculos en el medio, pero sí regularía el tamaño de las zonas de permanencia, así como el tiempo de las estancias en las zonas donde el receptor se confina.**

4.2.6. Análisis de acúmulos (clusters) del nAChR

El objetivo final del presente trabajo es intentar comprender el sustrato físico detrás del alto nivel de confinamiento observado en la dinámica individual del receptor. En estudios previos realizados en el laboratorio se ha observado un alto nivel de auto-agregación del nAChR en dímeros, trímeros y en compuesto oligoméricos más complejos [113, 114, 141]. Más aún, se ha visto que el receptor tiene prefe-

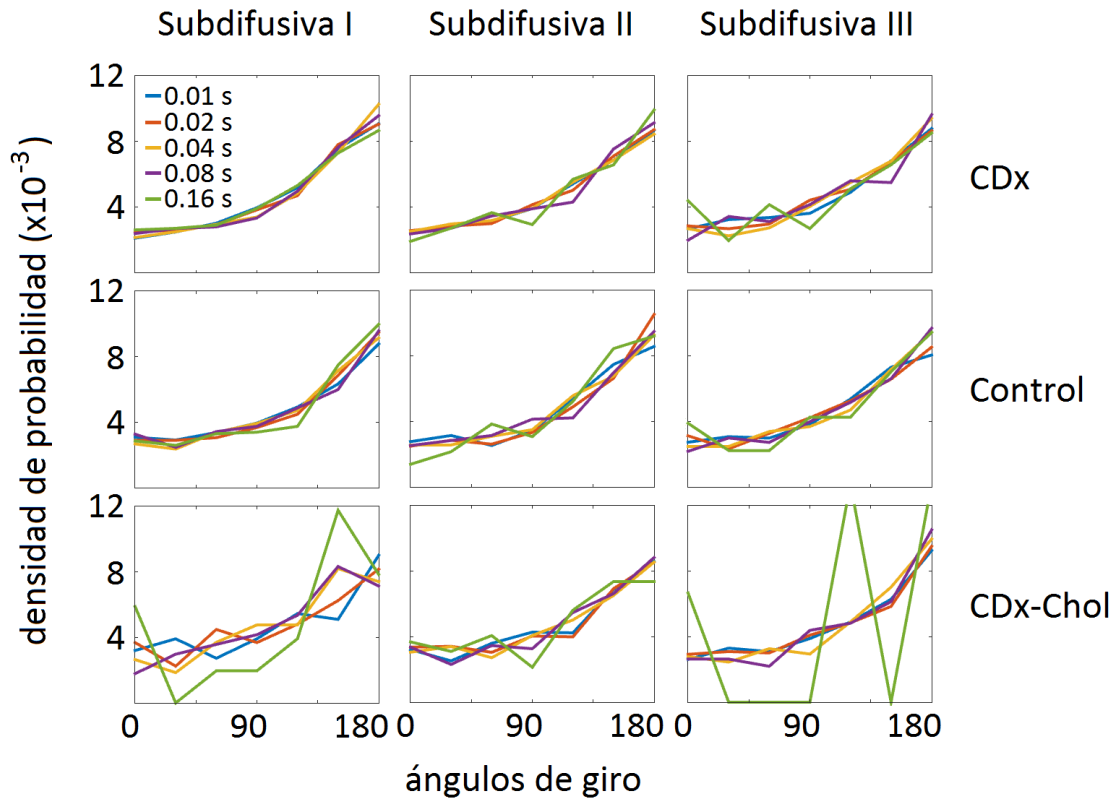


Figura 4.17: Análisis de ángulos de giro para las porciones confinadas de trayectorias únicas, agrupadas según su difusividad. Función de densidad de probabilidad de los ángulos de giro para las porciones confinadas de las trayectorias correspondientes a las subpoblaciones Subdifusiva I (SB I), II (SB II) y III (SB III). Distribuciones de ángulos de giro correspondientes a tiempos de retraso crecientes se encuentran indicadas por el código de colores, partiendo de 10 ms (azul) hasta 160 ms (verde).

rencia por las zonas de membrana celular denominadas balsas lipídicas o regiones líquido-ordenadas (L_o) [142], zonas en las cuales existen mayores niveles de colesterol, esfingomiélin y de lípidos saturados. Una hipótesis posible es, entonces, que el agrupamiento del mismo receptor en zonas L_o sea el sustrato físico que sirve de obstáculo en regiones por las que el receptor difunde, impidiendo su libre difusión por un tiempo determinado hasta que logra escapar. Para evaluar esta hipótesis, se aplicó un algoritmo de análisis cuantitativos de microscopías de superresolución (qSR) desarrollado recientemente por Cissè y colaboradores [131, 132], el cual nos permite seguir el agrupamiento del nAChR en tiempo real (ver [Materiales y métodos](#)).

Como se muestra en la Figura 4.18, se pudieron observar eventos de agrupamien-

to dinámicos en la forma de ráfagas de localizaciones de moléculas únicas en zonas restringidas de la membrana celular. Dichos eventos se encuentran conformados por períodos de muy alta actividad (caracterizados por un ascenso abrupto en la distribución acumulada de localizaciones individuales; ver líneas coloreadas en Figura 4.18a), seguidos por períodos de baja o nula actividad (caracterizados por un amentamiento de la distribución acumulada; ver líneas horizontales grises en Figura 4.18a). Dichos períodos corresponderían, respectivamente, a una etapa de ensamblaje seguida por desarmado de los acúmulos de receptores en tiempo real (acúmulos dinámicos). La organización espacial de las localizaciones de molécula única pertenecientes a cada uno de los 4 acúmulos dinámicos mostrados en la Figura 4.18a (líneas coloreadas azul, amarilla, violeta y verde) se muestran en la Figura 4.18b. A partir de la distribución de las moléculas, puede observarse claramente que los eventos de agrupamiento y des-agrupamiento del receptor se dan en zonas muy restringidas de la membrana celular, por lo que se trataría de acúmulos de tamaño nanométrico o “*nanoclusters*”.

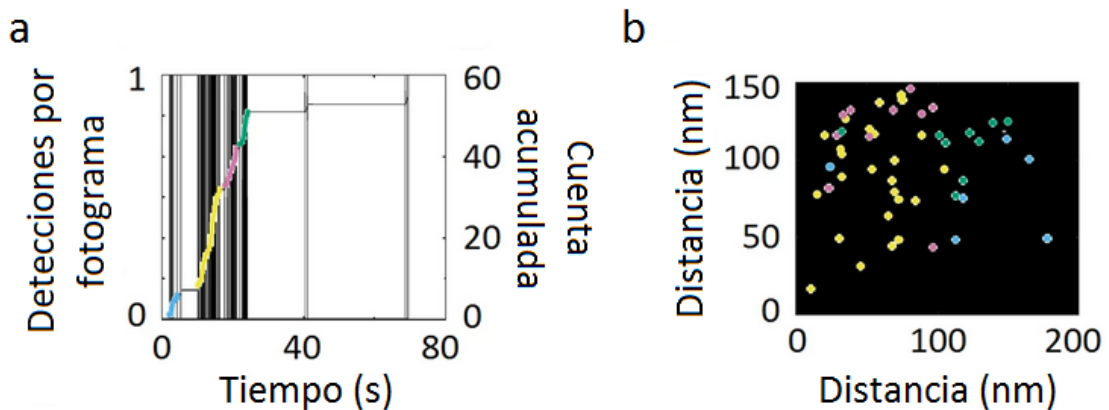


Figura 4.18: Ejemplo representativo del algoritmo de qSR implementado para el estudio de la agrupación del nAChR en tiempo real. (a) Se muestran las ráfagas de localizaciones de molécula única (líneas verticales; eje de la izquierda), cuya coincidencia temporal identifica la formación de un “nanoacúmulo” (*nanocluster*) dinámico (cada color corresponde a un acúmulo diferente). Además, las localizaciones individuales se encuentran superpuestas con su correspondiente cuenta acumulada (eje de la derecha derecha). Las mesetas horizontales corresponden a la etapa de desarmado de los acúmulos. (b) En una región de 150 nm \times 200 nm se muestra la distribución espacial de las localizaciones individuales de los acúmulos mostrados en (a) (mismo código de colores).

En situación control, se observa que los receptores participan de eventos de auto-agrupamiento en zonas con radios de 149 ± 13 nm (media \pm error estándar de la media) (ver Figura 4.19). La duración promedio en que dichos eventos se forman y desarman resultó ser de 3.90 ± 0.77 s, tiempo en el que decenas de receptores (30 ± 8 moléculas) pueblan el acúmulo promedio. Al analizar los efectos del colesterol en estos eventos colectivos, **se vieron efectos significativos en aquellas células en donde se redujo el colesterol de membrana mediante CDx**: no sólo las dimensiones de las zonas de acumulación disminuyeron su tamaño (de 149 ± 13 nm a 107 ± 4 nm; $p < 0,0001$), sino que las duraciones también fueron significativamente menores que en la situación control (de 3.90 ± 0.77 a 2.45 ± 0.14 s; $p < 0,0001$). Estos resultados, junto a la notable disminución de la cantidad de receptores promedio en los acúmulos (16 ± 1) en células con colesterol depleteado, sugieren que **en los eventos de agrupamiento dinámicos del receptor estarían mediados por regiones ricas en colesterol (L_o), y que niveles menores de este esterol producirían una desestabilización de dichas regiones**. En las células en donde los niveles de colesterol habían sido experimentalmente aumentados, en cambio, no se observaron cambios significativos en las propiedades espaciales (radios de 149 ± 13 nm) ni en las propiedades temporales (2.96 ± 0.32 s de duración promedio) de los eventos de agrupamiento, por lo que cantidades similares de receptores resultaron agrupados (20 ± 3 moléculas por acúmulo). No se observaron cambios significativos en la frecuencia de eventos por acúmulo de receptores en las células con los niveles de colesterol modificados, midiéndose en las tres condiciones experimentales tiempos medios entre eventos de aproximadamente 0.17 s.

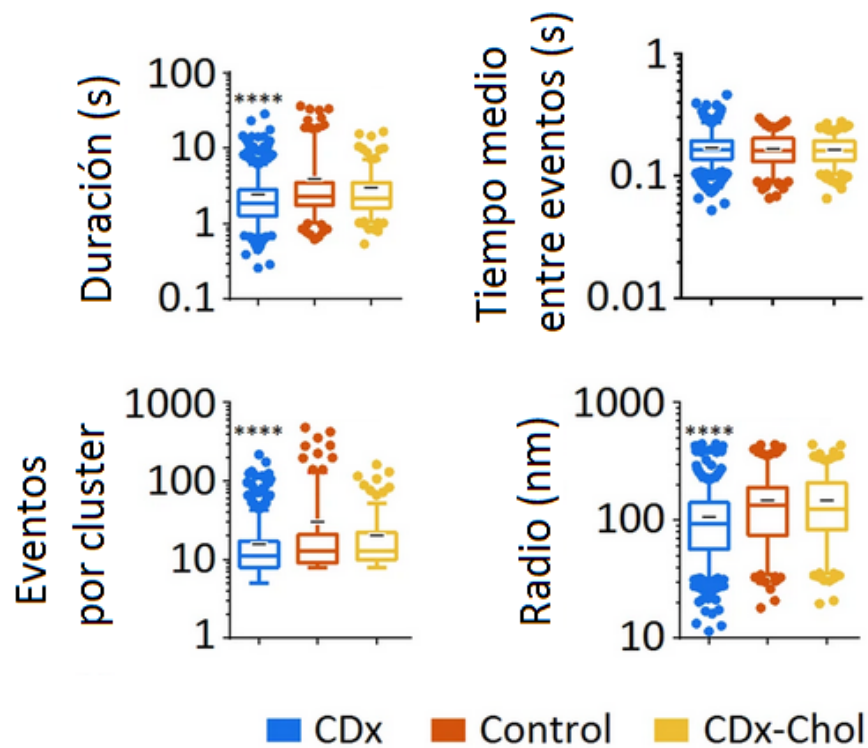


Figura 4.19: Seguimiento en tiempo real de la dinámica de nanoacúmulos de nAChRs en situación control y en condiciones de depleción o enriquecimiento de colesterol de membrana. Diagramas de cajas de las métricas obtenidas a partir de aplicar el análisis de acúmulos de Cissé y colaboradores [131, 132] al nAChR (escala logarítmica): duración, tiempo medio entre eventos (es decir, períodos sin eventos dentro un mismo acúmulo), eventos por acúmulo, y radio RMS de los acúmulos, bajo situación control y condiciones con niveles de colesterol de membrana modificados. Los bigotes representan el intervalo de confianza al 95 % y los puntos corresponden a los valores que se encuentran fuera de dicho intervalo. Los límites de las cajas indican el intervalo de confianza al 75 %. Las líneas horizontales negras indican los valores medios y las líneas horizontales coloreadas los valores medianos. Estadística: $p < 0,0001$ (****).

5. Discusión

5.1. El nAChR exhibe un comportamiento poblacional altamente heterogéneo

La membrana celular de células de mamíferos es un ambiente muy complejo tanto desde el punto de vista estructural como funcional. En tal ambiente, sumamente dinámico, algunas proteínas logran difundir en el plano de la membrana de forma completamente azarosa y descorrelacionada (movimiento térmico o Browniano). Sin embargo, el movimiento traslacional de la mayor parte de las proteínas en la superficie celular suele estar caracterizado por desvíos del movimiento Browniano, es decir, difusión anómala. Esto se debe a que las proteínas interactúan de forma no térmica con el ambiente lipídico circundante, a través de eventos de inmovilización transitorios, movimiento abarrotado, heterogeneidades espaciales, e interacciones proteína-proteína, entre otros [143–145]. Esta complejidad supone un gran desafío a la hora de desentramar los procesos involucrados en la regulación y la función de la membrana celular y sus constituyentes.

A través de la combinación de microscopía de superresolución STORM y métodos novedosos para el análisis de difusión de moléculas únicas, se ha logrado caracterizar de forma exhaustiva la dinámica del receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) en la membrana celular de células CHO-K1/A5. Como ha sido observado en trabajos anteriores [114, 146, 147] y confirmado en el presente estudio, la difusión lateral del nAChR en la membrana celular es altamente heterogénea. Un porcentaje muy elevado ($\sim 52\%$) de los receptores se halla completamente inmóvil en la escala temporal registrada experimentalmente. Es sabido que la línea celular clonal de mamífero CHO-K1/A5 no posee moléculas que naturalmente inmovilizan al nAChR como la rapsina ni proteínas de andamiaje tradicionalmente involucradas en la formación de agregados supramoleculares del receptor como la agrina o MusK. La inmovilización, entonces, sería producida por otras moléculas de andamiaje, por la auto-agregación de nAChRs en especies oligoméricas superiores [148], o una combinación de ambas. La población móvil restante, por su parte, se encuentra gobernada por difusión de

tipo anómala subdifusiva. Sin embargo, algunos receptores exhiben un comportamiento de tipo Browniano, y algunos pocos, una dinámica superdifusiva.

5.2. Tiempos insuficientes de registro darían lugar a una ruptura de ergodicidad aparente

La hipótesis de ergodicidad forma parte del núcleo de la mecánica estadística. La convergencia entre los promedios temporales y los promedios del ensamble es un resultado directo de ésta [77]. La forma de probar si un sistema de partículas difundiendo en una membrana se comporta de forma ergódica ha sido tradicionalmente a través de comparar los promedios temporales y del ensamble de las curvas de MSD [110, 133]. Sin embargo, esto es cierto para tiempos de registro lo suficientemente largos. Si el tiempo promedio que las sondas exploran el sistema es inferior o comparable a los tiempos característicos de los procesos con los que interactúa, las moléculas exploran sólo una región limitada del espacio durante su vida media, proporcionando información de tan sólo algunos de dichos procesos. En estos casos, los promedios temporales sobre una molécula no son representativos de las propiedades del sistema, difiriendo necesariamente de los promedios del ensamble. Producto de estas limitaciones experimentales, algunos sistemas ergódicos pueden exhibir comportamientos no ergódicos. Esto es particularmente crítico para algunos modelos que muestran una convergencia lenta, como el modelo de difusión obstruida (OD) con concentraciones de obstáculos cercanas a la crítica [77], o el modelo de difusión intermitente entre dos estados con tiempos de residencia comparables al tiempo explorado por las moléculas únicas [133, 140]. En nuestros experimentos, la comparación entre los promedios temporales y del ensamble de las curvas de MSD reveló una ruptura de ergodicidad (Figura 4.7). Sin embargo, al estudiar la duración de los eventos en los cuales las trayectorias permanecen dentro de áreas circulares de radios R_{UM} crecientes [108, 110], se observó que los tiempos de escape dependen del radio de escape (Figura 4.8), indicando que la dinámica a largo plazo del receptor no estaría dominada por la inmovilización. Esta última característica no se ajusta a las predicciones esperadas por el modelo no ergódico por excelencia, el mo-

delo de “caminata aleatoria de tiempo continuo” CTRW (*continuous time random walk*) [143–145], y sugiere que, en cambio, la ruptura de ergodicidad es aparente.

5.3. Heterogeneidad microscópica: las trayectorias individuales se encuentran interrumpidas por confinamientos transitorios en dominios nanométricos con altas concentraciones de obstáculos

La aplicación de una serie de herramientas analíticas para inspeccionar trayectorias individuales en detalle, introducidas por el grupo de Laura Estrada [127] e, independientemente, por el grupo de Diego Krapf [126], nos permitió revelar la presencia de estancias de confinamiento en prácticamente todas las trayectorias de nAChR ($\sim 90\%$) (Figuras 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 y Tabla 4.2), incluidas las que se mueven Brownianamente o de forma superdifusiva. Las trayectorias móviles fueron interrumpidas en todos los casos por estancias de confinamiento de duración variable (desde cientos de milisegundos hasta segundos), en zonas con radios aproximados de 36-39 nm. Otros estudios de trayectorias de partículas únicas (*single-particle tracking*, SPT) reportaron que cerca del 20% de los nAChRs en mioblastos musculares muestran difusión restringida en pequeños dominios con tamaños similares [147]. Aquí encontramos que las subpoblaciones menos difusivas son las que exhiben los tiempos más largos de detenciones en el estado confinado; las estancias de confinamiento de las trayectorias Brownianas tuvieron duraciones menores, mientras que las estancias más cortas fueron exhibidas por las trayectorias pertenecientes a la subpoblación superdifusiva (Figuras 4.10 y 4.12). De esta forma, mediante dos estrategias completamente independientes, fue posible verificar que la difusión lateral del receptor en la membrana celular se encuentra gobernada por la probabilidad de encuentro con regiones confinadas y el tiempo que pasa dentro de estas, independientemente de la modalidad difusiva exhibida. Los tiempos característicos de las estancias de confinamiento resultaron ser del orden de la duración de la trayectoria promedio (tiempo promedio en el que una sonda explora el espacio de fases del sistema), sugiriendo que la ruptura de ergodicidad observada sería *aparente*, debido a tiempos de

registros insuficientes en comparación con los tiempos característicos que el receptor pasa en los estados difusivos disponibles. Aún más, tiempos de confinamiento del orden y hasta superiores al largo de la trayectoria promedio podrían explicar el alto porcentaje de inmovilización observado en el receptor ($\sim 52\%$): parte de los receptores inmóviles podrían corresponder, en realidad, a moléculas atravesando estancias de confinamiento más prolongadas, explorando sólo el estado confinado durante el tiempo que fueron registradas. Sorpresivamente, los tiempos característicos de los estados de confinamiento medidos por el método basado en tiempos de escape [127] fueron de 2 a 5 veces mayores que los medidos por el método de recurrencia [126]. Sin embargo, el hecho de que las demás propiedades se mantengan similares (tamaño y tiempos relativos de confinamiento), sugiere que ambos métodos están identificando similares cantidades de pasos confinados. Una posible explicación para la diferencia encontrada podría ser, entonces, que el análisis de recurrencia desarrollado por el grupo de Krapf tiende a separar los pasos confinados en un mayor número de eventos, mientras que el análisis de segmentación desarrollado en el grupo de la codirectora de este trabajo tiende a agruparlos en un menor número de eventos.

La distribución de los ángulos de giro desplegados por trayectorias individuales a distintos intervalos de tiempo, por otra parte, brindó información adicional sobre el sistema [129,130]. Los nAChRs exhibieron giros con preferencia hacia ángulos de 180° (Figura 4.13), lo cual implica que la molécula tiende a cambiar de dirección y volver sobre sus pasos, una propiedad característica de movimiento con pasos anticorrelacionados. Comportamientos similares fueron observados previamente en los canales de potasio activados por voltaje Kv1.4 y el Kv2.1, producto de la compartimentalización de la membrana [48,77]. La forma en la que los ángulos de giro se encuentran distribuidos, además, nos permite evaluar dos modelos biofísicos ampliamente estudiados, conocidos por modelar difusión anómala con pasos anticorrelacionados: el movimiento fraccional Browniano (fBm) y el modelo de difusión obstruída (OD). Las trayectorias subdifusivas de nAChR mostraron una distribución angular que se ajusta a lo predicho por el segundo modelo (Figuras 4.14 y 4.15), sugiriendo que el modelo fBm debería ser descartado en favor del modelo OD, e indicando la presencia de obstáculos que impiden o retrasan el movimiento del receptor. Los pasos anti-

correlacionados, además, fueron dependientes del tiempo de retraso, una propiedad consistente con difusión en una malla [129] y el modelo de vallas y piquetas [149]. En comparación con las simulaciones numéricas de Krapf y colaboradores [129], la pendiente de las distribuciones angulares para las subpoblaciones subdifusivas SBI I y II sugiere concentraciones de obstáculos cercanas a la crítica (Figuras 4.16 y 4.17), resultante, por ej. de la estabilización del nAChR por el citoesqueleto de actina [150]. Finalmente, la disminución en la pendiente de la distribución de ángulos de giro que se observa en subpoblaciones más difusivas (Figura 4.15) sugiere que (i) las diferencias entre las subpoblaciones se da por el encuentro con zonas con concentraciones de obstáculos diferentes (a mayor concentración, mayor pendiente y menor difusividad) o que (ii) la proporción entre los pasos fuera y dentro de las regiones con obstáculos en trayectorias individuales incrementa a medida que lo hace la difusividad. En este último caso, el aumento en la pendiente de la distribución angular en subpoblaciones menos difusivas estaría asociado a una mayor presencia de pasos obstaculizados en las trayectorias únicas y, por ende, una mayor contribución de este tipo de movimiento en los promedios angulares.

¿Podrían las zonas en donde el receptor se confina transitoriamente estar relacionadas con las regiones con tamaños característicos y altas concentraciones de obstáculos predichas por el análisis de ángulos de giro? Al seccionar las trayectorias en su parte confinada y su parte libre (no confinada), hallamos que la porción confinada de las trayectorias es la que se ajusta al modelo de difusión obstruida, mientras que las porciones libres corresponden a difusión de tipo Browniana (Figura 4.16). Esto sugiere que las zonas de confinamiento son el conjunto de regiones que generan la anticorrelación del movimiento del receptor, y que el confinamiento estaría dado por la presencia de una alta concentración de obstáculos. Además, se observó que las distribuciones de ángulos de giro son esencialmente las mismas para las distintas subpoblaciones difusivas: descorrelacionadas para las zonas libres y anticorrelacionadas para las zonas confinadas. Esto indica que las regiones de confinamiento que interrumpen la difusión libre de nAChRs individuales son esencialmente las mismas y tienen concentraciones de obstáculos similares (cercanas a la crítica) bajo todas las condiciones experimentales (Figura 4.16 y 4.17). Los cambios en la pendiente de las

distribuciones de los ángulos de giro para las trayectorias completas estarían dados por una cuestión meramente estadística: a mayor cantidad de pasos confinados en la trayectoria, mayor contribución de la anticorrelación en la distribución angular y, por ende, mayor pendiente. Esta es una observación clave: el tiempo relativo que una dada trayectoria pasa entre los estados libre y confinado determina el régimen difusional resultante (a mayor confinamiento, menor difusión) y es responsable de la gran amplitud de la heterogeneidad macroscópica observada en la población general.

Recientemente, He y colaboradores [151] estudiaron la movilidad del nAChR en la membrana de células musculares de *Xenopus*. A través del seguimiento de trayectorias individuales de receptores previamente marcados con puntos cuánticos (*quantum dots*), observaron que el nAChR no obedece una estadística Gaussiana. Los autores propusieron que esta “no Gaussianidad” provenía del alto nivel de inmovilización desplegado por el receptor en la membrana. Para explicar la heterogeneidad observada, se propuso una variante del modelo de valla (*picket-fence model*) de Kusumi [98, 152], el cual denominaron “modelo de valla dinámico”. El modelo original de Kusumi propone la existencia de “corrales” formados por la red de filamentos de actina que convergen en “piquetes” de proteínas unidas a actina. Los piquetes y los corrales actúan como barreras físicas para las proteínas de membrana, las cuales pueden ser “saltadas” con cierta probabilidad. Sin embargo, hasta el momento esta hipótesis no había sido probada. En el presente trabajo, mediante la aplicación de un riguroso criterio recientemente introducido por Golan y Sherman [123], se descartó la posibilidad de que la subpoblación inmóvil sea la responsable del comportamiento no ergódico (ya que fue excluída de los análisis dinámicos). En cambio, se demostró que el nAChR sigue una difusión de tipo *ergódica*, caracterizada por un intercambio intermitente entre dos estados [140]: libre (Browniano) y confinado en zonas del espacio con alta densidad de obstáculos. Además, se demostró que el receptor transita estancias de confinamiento en áreas con radios de $\sim 36\text{-}39$ nm, escalas espaciales similares en la que operan las inmovilizaciones observadas en corrales de actina [152–154]. Estas observaciones verifican la hipótesis de que el receptor difunde libremente en un medio sumamente heterogéneo que promueve su confinamiento en regiones reducidas del espacio, lo cual puede ser interpretado como un modelo

de valla dinámico. Estas vallas actuarían como barreras físicas que restringirían el movimiento de las partículas, las cuales a su vez actuarían de obstáculos para las demás partículas confinadas dentro de dichos dominios.

Algunos obstáculos característicos para la difusión lateral de proteínas de membrana son el auto-agregamiento de las proteínas, piquetas formadas por otras proteínas inmovilizadas o difundiendo muy lentamente, corrales de actina sub-membrana, o heterogeneidades en la membrana dada por dominios líquido-ordenados (L_o) (“balsas” lipídicas). Cualquiera de estos obstáculos (o una combinación de ellos) agregan complejidad a los mecanismos de inmovilización o confinamiento transitorios y pueden dar lugar a un comportamiento no ergódico aparente [155], debido a que pueden actuar en diferentes escalas espaciales y temporales. En particular, los obstáculos con los que se encuentra frecuentemente el nAChR en la membrana celular podrían ser proteínas de la misma especie, transitando estancias de confinamiento. Para probar esta hipótesis, se realizó un estudio de seguimiento en tiempo real de asociación y disociación de acúmulos de receptores. Se halló que, además del confinamiento observado a nivel de partícula única, decenas a cientos de receptores participan de eventos “sociales” de auto-agregación, con tiempos de asociación y disociación de algunos segundos de duración (~ 3.9 s), en zonas de entre ~ 20 nm y ~ 400 nm de radio (~ 149 nm en promedio). Si bien estos eventos exhiben tamaños promedio superiores a los desplegados por las zonas de confinamiento a nivel de molécula única (~ 36 - 39 nm), es posible que los eventos de confinamiento correspondan a (i) moléculas participando de eventos de agrupación pequeños, o (ii) que, debido a la alta concentración de obstáculos presentes, sólo logran explorar una región pequeña del acúmulo antes de escapar y continuar con su libre movimiento en la membrana celular.

5.4. Modulación de la dinámica difusional del nAChR: efectos sinérgicos del colesterol en el auto-agrupamiento del receptor y el atrapamiento en regiones confinadas

El colesterol posiblemente afecta la difusividad de nAChR a través de dos mecanismos complementarios (no excluyentes): (i) a través del estado físico de la bicapa lipídica (dominios L_o y L_d , entre otros estados posibles), sumamente influido por la composición química de los lípidos que la componen, y (ii) a través de la abundancia y/o el tamaño de los nanodominios ricos en colesterol/esfingolípidos. El mecanismo (ii) pareciera influenciar mayoritariamente la cinética en el rango de segundos a través de la formación y desarmado de agregados nanométricos de AChRs, los cuales pudieron ser seguidos en tiempo real (Figura 4.18 y 4.19). Adicionalmente, el comportamiento anticorrelacionado desplegado por las moléculas de receptor que surgen del análisis de ángulos de giro (Figura 4.13, 4.14, 4.15, 4.16 y 4.17) puede ser explicado por la presencia de dominios L_o ricos en colesterol/esfingolípidos actuando como heterogeneidades laterales en el plano de la membrana, es decir, obstáculos que el nAChR tiene que esquivar en un escenario de vallas permeables.

La posibilidad de que los dominios L_o nanométricos tengan un papel (directo o indirecto) en los eventos de confinamiento se encuentra apoyado experimentalmente de forma independiente. Cuando se reconstituyen en un sistema modelo de esfingomiélinea-colesterol-POPC (1:1:1), los nAChRs purificados de *Torpedo* no exhiben preferencia por los dominios L_o [156]. Sin embargo, la inclusión de especies moleculares de esfingomiélinea que generan asimetrías en la bicapa al enriquecer el contenido de esfingolípidos en la parte externa de la membrana parece favorecer la inclusión y el enriquecimiento del nAChR en dominios L_o [142]. Entonces, los nAChRs pueden habitar/ser excluidos de dominios L_o (“balsas”) dependiendo de la composición del microambiente lipídico local, y esto, a su vez, facilitar la auto-agregación del receptor. Esto es particularmente relevante a la función de la sinapsis colinérgica: además de la concentración mayor de colesterol en comparación a otros lípidos de membrana en la placa neuromuscular o en la sinapsis electromotora de *Torpedo* [157], una característica particular de estas dos sinapsis es la extraordi-

nariamente alta densidad de proteínas de nAChR [158], una propiedad compartida con la línea celular CHO-K1/A5 [113] estudiada aquí, aunque en un grado menos pronunciado.

Se sabe que la agregación molecular en membranas celulares produce desviaciones de la difusión Browniana (ver ref. [159]). En nuestra hipótesis, los dominios L_o ricos en colesterol podrían dificultar o reducir la difusión y concentrar nAChR lentos o inmóviles. Excluimos los receptores inmóviles del análisis difusional, pero se debe tener en cuenta que estas macromoléculas estáticas constituyen una gran proporción de la población total (y por lo tanto se encuentran incluidas en el análisis de agrupamiento supramolecular de los receptores en tiempo real; Figura 4.19). Recientemente, estructuras dependientes de colesterol denominadas “jaulas” fueron reportadas en la línea CHO (células parentales de nuestra línea CHO-K1/A5) [160]. Las jaulas son más grandes y duraderas que los supuestos tamaños de algunos dominios tipo “balsa”, y se encuentran estabilizadas dentro de corrales de actina aún más grandes y más duraderos. La depleción de colesterol desestabiliza estas barreras difusionales, en coincidencia con lo que observamos en el presente trabajo con los acúmulos nanométricos (Figura 4.19). Los nanodominios de confinamiento que observamos (~ 36 - 39 nm de radio) son similares a otros recientemente revelados en imágenes estáticas de nanodominios dependientes de colesterol, como los que albergan receptores de dopamina (~ 35 nm de radio [161]), o nanodominios nacidos en balsa de proteínas ancladas a GPI (~ 40 nm [149]).

Además de las estancias de confinamiento nanométricos transitorias y reversibles, con duraciones en el orden de los cientos de milisegundos, observamos otro proceso dinámico regulando la actividad del receptor y ocurriendo en una ventana temporal más larga, del orden de los segundos. Este proceso dinámico mucho más lento correspondería al ensamblaje/residencia/disociación de acúmulos de proteínas en áreas confinadas. Observamos diferencias significativas en los radios, en el número de eventos y en las duraciones de estos acúmulos nanométricos luego de haber modificado los niveles de colesterol en membrana (Figura 4.19), sugiriendo que dominios ricos en colesterol participarían de la auto-agregación del receptor.

Resumiendo, a *nivel de partícula única*, el nAChR difunde de forma Browniana

(*estado 1*) por la membrana celular, hasta encontrarse con regiones con concentraciones altas de obstáculos que restringen su movimiento por un tiempo determinado (*estado 2*) hasta que logra escapar, retomando su movimiento libre. Este intercambio entre dos estados se repite indefinidamente y gobierna el movimiento lateral del receptor en la membrana. El modelo de *difusión intermitente entre dos estados* (Browniano y confinado) ha sido caracterizado recientemente tanto de forma teórica [140] como experimental en canales de sodio [133], pero es la primera vez que se caracteriza en un receptor de neurotransmisor como el nAChR. En este modelo, el colesterol se encontraría regulando el tiempo promedio en el que un dado receptor reside en el estado confinado, $1/k_{21}$, a través de la modificación de la tasa de cambio k_{21} o probabilidad de escape de dicho estado. A *nivel poblacional*, por otra parte, el receptor participa de eventos de auto-aglomeración más duraderos, y en regiones 2 a 3 veces más grandes que las zonas de confinamiento. Sin embargo, ambos procesos interrumpen la libre difusión del receptor, llevándolo a estados más confinados, con dependencias similares al colesterol. Esto sugiere que la auto-aglomeración del receptor podría ser, de hecho, al menos uno de los sustratos físicos que actúan como obstáculos para los demás receptores de la misma especie. Las diferencias de tamaños podrían deberse (i) a que las áreas fueron calculadas de distintas maneras (mientras que el análisis de recurrencia toma el desvío estándar de la distribución de localizaciones en estado confinado para calcular el área de confinamiento, el análisis de acúmulos dinámico calcula el radio RMS de la distribución de sus constituyentes, luego utilizado para calcular el área del acúmulo) o (ii) a que el receptor confinado explora una porción menor de la región total en donde se aglomera. En este escenario, los receptores que forman parte de la subpoblación inmóvil ($\sim 52\%$ del total) podrían ser aquellos que no lograron escapar del estado confinado durante el tiempo en que fueron registrados. De esta forma, el comportamiento individual (*nanoscópico*) y el grupal (*mesoscópico*) se encontrarían íntimamente relacionados a través de regiones ricas en colesterol, tipo balsas lipídicas, las cuales gobiernan y determinan su dinámica macroscópica, demostrando la importancia que tiene la interrelación entre los distintos niveles de organización de la membrana plasmática en la dinámica de proteínas y la función celular [74, 75] (ver esquema de la Figura

5.1).

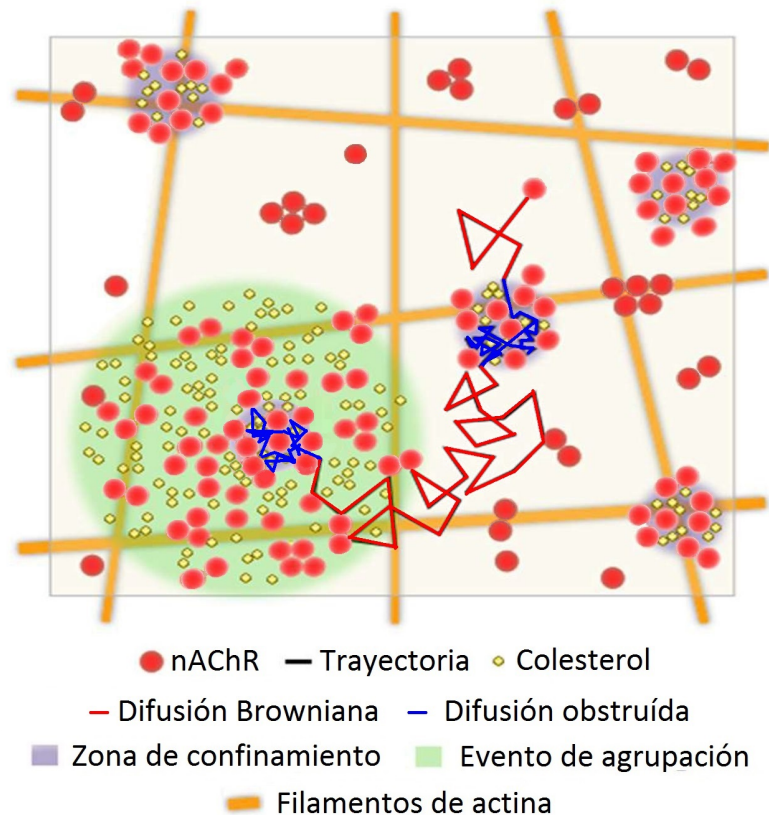


Figura 5.1: Diagrama esquemático del movimiento traslacional complejo exhibido por el nAChR en la membrana celular. A nivel individual, las macromoléculas de nAChR (puntos rojos) exhiben un comportamiento de intercambio entre dos estados: caminata libre (difusión Browniana; trazo rojo) interrumpida por estancias de confinamiento transitorias (difusión obstruida; trazo azul). Estas interrupciones ocurren en áreas pequeñas ($\sim 36\text{-}39$ nm de radio, en promedio) con alta densidad de obstáculos (círculos púrpuras), donde los receptores residen transitoriamente por un promedio de $\sim 170\text{-}470$ ms. A nivel poblacional, eventos de agrupamiento dinámico, atrapamiento e inmovilización transitoria tienen lugar en regiones más grandes (~ 149 nm de radio, círculo verde) y durante más tiempo (~ 3.9 s). Ambos procesos se encuentran regulados de forma similar por los niveles de colesterol en membrana (círculos amarillos), sugiriendo la presencia de dominios L_o . La red de actina cortical sub-membrana (filamentos anaranjados) pueden también actuar como corrales o vallas, o reorganizando y compartimentalizando la membrana, restringiendo así la difusión del nAChR.

6. Conclusiones

A través de la combinación de técnicas de biología molecular, microscopía de superresolución, nuevos métodos de análisis de seguimiento de moléculas únicas y modelado numérico, el presente trabajo se planteó como un abordaje multidisciplinario al estudio de la difusión lateral del nAChR en la membrana celular de células de mamífero.

A nivel de molécula única, aproximadamente la mitad de los receptores se encontraron completamente inmóviles en la membrana celular. La población móvil restante, en cambio, resultó estar gobernada por un intercambio entre dos estados: caminata al azar (Browniana) interrumpida por eventos de confinamiento en zonas de $\sim 36\text{-}39$ nm de radio y con alta densidad de obstáculos. Estas zonas actúan como vallas permeables con obstáculos que actúan de piquetas, como en el modelo de vallas y piquetas dinámico. El tiempo relativo que un dado receptor pasa en el estado confinado determina la modalidad difusional resultante y es la fuente de la dinámica heterogénea del receptor en la membrana. Los tiempos característicos que el receptor pasa en el estado confinado ($\sim 170\text{-}470$ ms) son del orden del tiempo medio explorado por los receptores, lo que da lugar a una ruptura de ergodicidad aparente. A su vez, sugiere que parte de la alta inmovilización observada podría estar dada por receptores atravesando estancias de confinamiento prolongadas. A nivel poblacional y en una escala temporal de segundos, decenas a cientos de receptores participan de eventos de asociación/estabilización/disociación en zonas de $\sim 20\text{-}400$ nm de radio. Estos eventos de agrupamiento son independientes de proteínas conocidas por promover la inmovilización y agrupación del nAChR en la placa neuromuscular, como la rapsina, agrina y MuSK.

Tanto la dinámica individual como la poblacional del receptor se encuentran ampliamente influenciadas por los niveles de colesterol en membrana. Más aún, se observaron cambios similares en las dimensiones temporales y espaciales de las zonas que agrupan o que confinan al receptor al modificar los niveles de colesterol, lo que sugiere que ambos procesos estarían relacionados entre sí y mediados por la compartimentalización de la membrana celular en dominios L_o o “balsas” lipídicas.

Estos mecanismos actuarían en la nano- y meso-escala, en el rango de milisegundos a segundos, promoviendo la agregación del receptor y aumentando su densidad local, lo que en última instancia favorecería la probabilidad de transmisión de la información entre el exterior y el interior celular.

7. Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecerle a mi director, el Dr. Francisco Barrantes (Pancho para los amigos, o los becarios que le guardamos mucho aprecio), por su acompañamiento y por todo lo que me enseñó a lo largo de este tiempo. Gracias por confiar y por apostar en mí desde el principio. Por darme la libertad y los recursos para explorar mis intereses e inquietudes. Por las innumerables discusiones. Por transmitirme su pasión por la ciencia y confirmarme que elegí el camino correcto. Quisiera hacer extensivo este agradecimiento a mi co-directora Laura Estrada. Sin sus valiosas críticas y consejos este trabajo no sería el mismo.

Quisiera también agradecerles a mis compañeros del laboratorio, a los que están y a los que estuvieron. A Pol, a Eze, a Yanni, a Anita, a Tiby, a Euge, a Nicky, a Nacho, a Héctor. Gracias por el apoyo, los consejos, la ayuda. Pero sobre todo, gracias por las innumerables tardes de mates, charlas y risas, que hicieron de este tiempo una experiencia muchísimo más amena. El trabajo en equipo tiene tanto de trabajo como de equipo. ¡Y qué equipo!

A mis amigos de toda la vida, en especial a Charly y a Belu. Para encender una llama sólo hace falta una chispa. Gracias por aportarme la chispa que me impulsó a decidirme a estudiar esta carrera. Gracias por las incontables tardes de divague científico y por las interminables noches de estudio, sin las cuales, muy probablemente, hoy no estaría acá defendiendo mi tesis. También quisiera agradecerles por los consejos y críticas que me ayudaron a avanzar en la escritura.

Les agradezco profundamente a mis viejos, que me acompañaron de forma incondicional en este largo camino. Sin su apoyo, nada de esto hubiera sido posible. Esta tesis lleva impresa gran parte del esfuerzo, dedicación y compromiso que supieron transmitirme a lo largo de mi vida. Gracias por abrirme las puertas a explorar libremente el camino que me apasiona, y ayudarme a transformarlo en el que recorro día a día. Quiero agradecerles también a mis hermanos y a mi hermana, a mis tíos, mis primos, y a toda mi familia.

Por último, quiero agradecerles a quienes están conmigo día y noche, quienes hacen que el camino, a veces incierto, se sienta más firme, y que todo el esfuerzo

valga la pena. Empezar una carrera no es fácil. Terminarla, mucho menos. En medio de una pandemia, ¡ni te cuento! Gracias por la infinita paciencia, comprensión y apoyo, por las numerosas noches que las privé de sueño por quedarme trabajando en la tesis, y por otras tantas que dedicaron a corregir errores en este escrito. Gracias infinitas a los dos amores de mi vida: a mi novia, Clari, y a Ruby, nuestra perrita.

Referencias

- [1] J.-P. Changeux, “The nicotinic acetylcholine receptor: a typical ‘allosteric machine’,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 373, no. 1749, p. 20170174, 2018.
- [2] I. I. Krivoi, T. M. Drabkina, V. V. Kravtsova, A. N. Vasiliev, M. J. Eaton, S. N. Skatchkov, and F. Mandel, “On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and na⁺, k⁺-atpase,” *Pflügers Archiv*, vol. 452, no. 6, pp. 756–765, 2006.
- [3] S. Vernino, M. Rogers, K. A. Radcliffe, and J. A. Dani, “Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors,” *Journal of Neuroscience*, vol. 14, no. 9, pp. 5514–5524, 1994.
- [4] F. J. Barrantes, “Phylogenetic conservation of protein–lipid motifs in pentameric ligand-gated ion channels,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1848, no. 9, pp. 1796–1805, 2015.
- [5] E. X. Albuquerque, E. Pereira, N. G. Castro, M. Alkondon, S. Reinhardt, H. Schröder, and A. Maelicke, “Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system.,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 757, p. 48, 1995.
- [6] A. Karlin, “Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 3, no. 2, pp. 102–114, 2002.
- [7] H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, *et al.*, “Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation,” *Nature*, vol. 421, no. 6921, pp. 384–388, 2003.
- [8] C. Gotti, L. Riganti, S. Vailati, and F. Clementi, “Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery,” *Current pharmaceutical design*, vol. 12, no. 4, pp. 407–428, 2006.
- [9] H.-Y. Wang, D. H. Lee, M. R. D’Andrea, P. A. Peterson, R. P. Shank, and A. B. Reitz, “ β -amyloid_{1–42} binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity implications for alzheimer’s disease pathology,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 8, pp. 5626–5632, 2000.
- [10] H. Rollema, L. Chambers, J. Coe, J. Glowa, R. Hurst, L. Lebel, Y. Lu, R. Mansbach, R. Mather, C. Rovetti, *et al.*, “Pharmacological profile of the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid,” *Neuropharmacology*, vol. 52, no. 3, pp. 985–994, 2007.
- [11] L. F. Martin and R. Freedman, “Schizophrenia and the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor,” *International review of neurobiology*, vol. 78, pp. 225–246, 2007.

- [12] S. J. Tzartos, T. Barkas, M. T. Cung, A. Mamalaki, M. Marraud, P. Orlewski, D. Papanastasiou, C. Sakarellos, M. Sakarellos-Daitsiotis, P. Tsantili, *et al.*, “Anatomy of the antigenic structure of a large memberane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor,” *Immunological reviews*, vol. 163, no. 1, pp. 89–120, 1998.
- [13] V. Itier and D. Bertrand, “Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function,” *FEBS letters*, vol. 504, no. 3, pp. 118–125, 2001.
- [14] F. Clementi, D. Fornasari, and C. Gotti, “Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function,” *European journal of pharmacology*, vol. 393, no. 1-3, pp. 3–10, 2000.
- [15] J. Lindstrom, R. Schoepfer, and P. Whiting, “Molecular studies of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor family,” in *Molecular neurobiology*, pp. 281–337, Springer, 1988.
- [16] H. R. Arias, “Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors,” *Neurochemistry international*, vol. 36, no. 7, pp. 595–645, 2000.
- [17] P.-J. Corringer, N. L. Novère, and J.-P. Changeux, “Nicotinic receptors at the amino acid level,” *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 40, no. 1, pp. 431–458, 2000.
- [18] N. Hirsch, “Neuromuscular junction in health and disease,” *British journal of anaesthesia*, vol. 99, no. 1, pp. 132–138, 2007.
- [19] J. M. Lindstrom, “Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 998, no. 1, pp. 41–52, 2003.
- [20] M. L. Paz and F. J. Barrantes, “Autoimmune attack of the neuromuscular junction in myasthenia gravis: nicotinic acetylcholine receptors and other targets,” *ACS chemical neuroscience*, vol. 10, no. 5, pp. 2186–2194, 2019.
- [21] S. Couturier, D. Bertrand, J.-M. Matter, M.-C. Hernandez, S. Bertrand, N. Millar, S. Valera, T. Barkas, and M. Ballivet, “A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homooligomeric channel blocked by α -btx,” *Neuron*, vol. 5, no. 6, pp. 847–856, 1990.
- [22] A. Mosqueira, P. A. Camino, and F. J. Barrantes, “Cholesterol modulates acetylcholine receptor diffusion by tuning confinement sojourns and nanocluster stability,” *Scientific reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018.
- [23] C. D. Dellisanti, Y. Yao, J. C. Stroud, Z.-Z. Wang, and L. Chen, “Crystal structure of the extracellular domain of nacr $\alpha 1$ bound to α -bungarotoxin at 1.94 Å resolution,” *Nature neuroscience*, vol. 10, no. 8, pp. 953–962, 2007.

- [24] L. F. Padilla-Morales, J. O. Colón-Sáez, J. E. González-Nieves, O. Quesada-González, and J. A. Lasalde-Dominicci, “Assessment of the functionality and stability of detergent purified nachr from torpedo using lipidic matrixes and macroscopic electrophysiology,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1858, no. 1, pp. 47–56, 2016.
- [25] T. Araud, S. Graw, R. Berger, M. Lee, E. Neveu, D. Bertrand, and S. Leonard, “The chimeric gene chrfa7a, a partial duplication of the chrna7 gene, is a dominant negative regulator of $\alpha 7^*$ nachr function,” *Biochemical pharmacology*, vol. 82, no. 8, pp. 904–914, 2011.
- [26] A. Del Bufalo, A. Cesario, G. Salinaro, M. Fini, and P. Russo, “Alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors as target for the treatment of chronic pain,” *Current pharmaceutical design*, vol. 20, no. 38, pp. 6042–6047, 2014.
- [27] J. Lindstrom, “Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease,” *Molecular neurobiology*, vol. 15, no. 2, pp. 193–222, 1997.
- [28] F. Barrantes, “Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function,” *Brain Research Reviews*, vol. 47, no. 1-3, pp. 71–95, 2004.
- [29] K. Simons and J. L. Sampaio, “Membrane organization and lipid rafts,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 3, no. 10, p. a004697, 2011.
- [30] I. Levental, F. J. Byfield, P. Chowdhury, F. Gai, T. Baumgart, and P. A. Janmey, “Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma-membrane vesicles,” *Biochemical Journal*, vol. 424, no. 2, pp. 163–167, 2009.
- [31] M. Hao, S. Mukherjee, and F. R. Maxfield, “Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 23, pp. 13072–13077, 2001.
- [32] S. N. Ahmed, D. A. Brown, and E. London, “On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 36, pp. 10944–10953, 1997.
- [33] L. D. Zajchowski and S. M. Robbins, “Lipid rafts and little caves: compartmentalized signalling in membrane microdomains,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 3, pp. 737–752, 2002.
- [34] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, and C. Eggeling, “The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 18, no. 6, p. 361, 2017.
- [35] J. Fantini, R. M. Epanand, and F. J. Barrantes, “Cholesterol-recognition motifs in membrane proteins,” in *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function*, pp. 3–25, Springer, 2019.

- [36] A. Kusumi, T. K. Fujiwara, T. A. Tsunoyama, R. S. Kasai, A.-A. Liu, K. M. Hirose, M. Kinoshita, N. Matsumori, N. Komura, H. Ando, *et al.*, “Defining raft domains in the plasma membrane,” *Traffic*, vol. 21, no. 1, pp. 106–137, 2020.
- [37] L. J. Pike, “Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function,” *Journal of lipid research*, vol. 47, no. 7, pp. 1597–1598, 2006.
- [38] P. F. Almeida, A. Pokorny, and A. Hinderliter, “Thermodynamics of membrane domains,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1720, no. 1-2, pp. 1–13, 2005.
- [39] C. Yuan, J. Furlong, P. Burgos, and L. J. Johnston, “The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside gm1 domains in sphingomyelin/dopc/cholesterol membranes,” *Biophysical journal*, vol. 82, no. 5, pp. 2526–2535, 2002.
- [40] N. Komura, K. G. Suzuki, H. Ando, M. Konishi, M. Koikeda, A. Imamura, R. Chadda, T. K. Fujiwara, H. Tsuboi, R. Sheng, *et al.*, “Raft-based interactions of gangliosides with a gpi-anchored receptor,” *Nature Chemical Biology*, vol. 12, no. 6, pp. 402–410, 2016.
- [41] M. Kinoshita, K. G. Suzuki, N. Matsumori, M. Takada, H. Ano, K. Morigaki, M. Abe, A. Makino, T. Kobayashi, K. M. Hirose, *et al.*, “Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs,” *Journal of Cell Biology*, vol. 216, no. 4, pp. 1183–1204, 2017.
- [42] K. G. Suzuki, R. S. Kasai, K. M. Hirose, Y. L. Nemoto, M. Ishibashi, Y. Miwa, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi, “Transient gpi-anchored protein homodimers are units for raft organization and function,” *Nature chemical biology*, vol. 8, no. 9, pp. 774–783, 2012.
- [43] K. G. Suzuki, H. Ando, N. Komura, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi, “Revealing the raft domain organization in the plasma membrane by single-molecule imaging of fluorescent ganglioside analogs,” in *Methods in enzymology*, vol. 598, pp. 267–282, Elsevier, 2018.
- [44] S. Semrau and T. Schmidt, “Membrane heterogeneity—from lipid domains to curvature effects,” *Soft Matter*, vol. 5, no. 17, pp. 3174–3186, 2009.
- [45] J. M. Green, A. Zheleznyak, J. Chung, F. P. Lindberg, M. Sarfati, W. A. Frazier, and E. J. Brown, “Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving $\alpha v \beta 3$, integrin-associated protein (cd47), and heterotrimeric g proteins,” *The Journal of cell biology*, vol. 146, no. 3, pp. 673–682, 1999.
- [46] K. Monastyrskaya, A. Hostettler, S. Buergi, and A. Draeger, “The nk1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is

- dependent on lipid raft integrity,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 8, pp. 7135–7146, 2005.
- [47] L. Abrami, S. Liu, P. Cosson, S. H. Leppla, and F. G. van der Goot, “Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process,” *The Journal of cell biology*, vol. 160, no. 3, pp. 321–328, 2003.
- [48] J. Santiago, G. R. Guzmán, L. V. Rojas, R. Marti, G. A. Asmar-Rovira, L. F. Santana, M. McNamee, and J. A. Lasalde-Dominicci, “Probing the effects of membrane cholesterol in the torpedo californica acetylcholine receptor and the novel lipid-exposed mutation α 418w in xenopusocytes,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 49, pp. 46523–46532, 2001.
- [49] V. Borroni, V. Borroni, C. Baier, T. Lang, I. Bonini, M. White, I. Garbus, and F. Barrantes, “Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane,” *Molecular membrane biology*, vol. 24, no. 1, pp. 1–15, 2007.
- [50] J. Fantini and F. J. Barrantes, “Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1788, no. 11, pp. 2345–2361, 2009.
- [51] C. J. Baier, J. Fantini, and F. J. Barrantes, “Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor,” *Scientific reports*, vol. 1, p. 69, 2011.
- [52] J. Fantini and F. J. Barrantes, “How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including crac, carc, and tilted domains,” *Frontiers in physiology*, vol. 4, p. 31, 2013.
- [53] J. Fantini, C. Di Scala, C. J. Baier, and F. J. Barrantes, “Molecular mechanisms of protein-cholesterol interactions in plasma membranes: Functional distinction between topological (tilted) and consensus (carc/crac) domains,” *Chemistry and physics of lipids*, vol. 199, pp. 52–60, 2016.
- [54] F. J. Barrantes, “Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor,” *Journal of neurochemistry*, vol. 103, pp. 72–80, 2007.
- [55] J. L. Bruses, N. Chauvet, and U. Rutishauser, “Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons,” *Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 2, pp. 504–512, 2001.
- [56] J. Campagna and J. Fallon, “Lipid rafts are involved in c95 (4, 8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering,” *Neuroscience*, vol. 138, no. 1, pp. 123–132, 2006.

- [57] S. Marchand, A. Devillers-Thiéry, S. Pons, J.-P. Changeux, and J. Cartaud, “Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts,” *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 20, pp. 8891–8901, 2002.
- [58] V. Borroni and F. J. Barrantes, “Cholesterol modulates the rate and mechanism of acetylcholine receptor internalization,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 19, pp. 17122–17132, 2011.
- [59] C. B. Kamerbeek, V. Borroni, M. F. Pediconi, S. B. Sato, T. Kobayashi, and F. J. Barrantes, “Antibody-induced acetylcholine receptor clusters inhabit liquid-ordered and liquid-disordered domains,” *Biophysical journal*, vol. 105, no. 7, pp. 1601–1611, 2013.
- [60] F. J. Barrantes, “Cholesterol and nicotinic acetylcholine receptor: An intimate nanometer-scale spatial relationship spanning the billion year time-scale,” *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, vol. 5, no. s1, pp. S67–S86, 2016.
- [61] S. W. Hell and J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy,” *Optics letters*, vol. 19, no. 11, pp. 780–782, 1994.
- [62] S. J. Sahl, S. W. Hell, and S. Jakobs, “Fluorescence nanoscopy in cell biology,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 18, no. 11, p. 685, 2017.
- [63] L. Schermelleh, A. Ferrand, T. Huser, C. Eggeling, M. Sauer, O. Biehlmaier, and G. P. Drummen, “Super-resolution microscopy demystified,” *Nature cell biology*, vol. 21, no. 1, pp. 72–84, 2019.
- [64] B. Huang, M. Bates, and X. Zhuang, “Super-resolution fluorescence microscopy,” *Annual review of biochemistry*, vol. 78, pp. 993–1016, 2009.
- [65] B. Huang, H. Babcock, and X. Zhuang, “Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells,” *Cell*, vol. 143, no. 7, pp. 1047–1058, 2010.
- [66] P. R. Nicovich, D. M. Owen, and K. Gaus, “Turning single-molecule localization microscopy into a quantitative bioanalytical tool,” *Nature protocols*, vol. 12, no. 3, pp. 453–460, 2017.
- [67] M. Shannon and D. M. Owen, “Bridging the nanoscopy-immunology gap,” *Frontiers in Physics*, vol. 6, p. 157, 2019.
- [68] C. Eggeling, K. I. Willig, and F. J. Barrantes, “STED microscopy of living cells—new frontiers in membrane and neurobiology,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 126, no. 2, pp. 203–212, 2013.
- [69] R. R. Dijkstra, “Design and realization of a CW-STED super-resolution microscope setup,” Master’s thesis, University of Twente, the Netherlands, 2012.

- [70] K. Lepeta, M. V. Lourenco, B. C. Schweitzer, P. V. Martino Adami, P. Banerjee, S. Catuara-Solarz, M. de La Fuente Revenga, A. M. Guillem, M. Haidar, O. M. Ijomone, *et al.*, “Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders—a review from students to students,” *Journal of neurochemistry*, vol. 138, no. 6, pp. 785–805, 2016.
- [71] E. Roob III, N. Trendel, P. R. ten Wolde, and A. Mugler, “Cooperative clustering digitizes biochemical signaling and enhances its fidelity,” *Biophysical journal*, vol. 110, no. 7, pp. 1661–1669, 2016.
- [72] S. J. Singer and G. L. Nicolson, “The fluid mosaic model of the structure of cell membranes,” *Science*, vol. 175, no. 4023, pp. 720–731, 1972.
- [73] G. L. Nicolson, “The fluid—mosaic model of membrane structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1838, no. 6, pp. 1451–1466, 2014.
- [74] A. Kusumi, K. G. Suzuki, R. S. Kasai, K. Ritchie, and T. K. Fujiwara, “Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane,” *Trends in biochemical sciences*, vol. 36, no. 11, pp. 604–615, 2011.
- [75] A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, and K. G. Suzuki, “Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of singer and nicolson’s fluid-mosaic model,” *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 28, pp. 215–250, 2012.
- [76] M. Rao and S. Mayor, “Active organization of membrane constituents in living cells,” *Current opinion in cell biology*, vol. 29, pp. 126–132, 2014.
- [77] D. Krapf, “Mechanisms underlying anomalous diffusion in the plasma membrane,” in *Current topics in membranes*, vol. 75, pp. 167–207, Elsevier, 2015.
- [78] J. Bernardino de la Serna, G. J. Schütz, C. Eggeling, and M. Cebecauer, “There is no simple model of the plasma membrane organization,” *Frontiers in cell and developmental biology*, vol. 4, p. 106, 2016.
- [79] T. D. Pollard, “Actin and actin-binding proteins,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 8, no. 8, p. a018226, 2016.
- [80] A. Chazeau and G. Giannone, “Organization and dynamics of the actin cytoskeleton during dendritic spine morphological remodeling,” *Cellular and molecular life sciences*, vol. 73, no. 16, pp. 3053–3073, 2016.
- [81] E. Lyman, C.-L. Hsieh, and C. Eggeling, “From dynamics to membrane organization: experimental breakthroughs occasion a “modeling manifesto”,” *Biophysical journal*, vol. 115, no. 4, pp. 595–604, 2018.

- [82] L. Johannes, W. Pezeshkian, J. H. Ipsen, and J. C. Shillcock, “Clustering on membranes: fluctuations and more,” *Trends in cell biology*, vol. 28, no. 5, pp. 405–415, 2018.
- [83] J. Goyette and K. Gaus, “Mechanisms of protein nanoscale clustering,” *Current opinion in cell biology*, vol. 44, pp. 86–92, 2017.
- [84] J. Griffie, G. Burn, and D. M. Owen, “The nanoscale organization of signaling domains at the plasma membrane,” in *Current topics in membranes*, vol. 75, pp. 125–165, Elsevier, 2015.
- [85] M. F. Garcia-Parajo, A. Cambi, J. A. Torreno-Pina, N. Thompson, and K. Jacobson, “Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization,” *Journal of cell science*, vol. 127, no. 23, pp. 4995–5005, 2014.
- [86] K. I. Willig and F. J. Barrantes, “Recent applications of superresolution microscopy in neurobiology,” *Current opinion in chemical biology*, vol. 20, pp. 16–21, 2014.
- [87] K. Gowrishankar, S. Ghosh, S. Saha, C. Rumamol, S. Mayor, and M. Rao, “Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules,” *Cell*, vol. 149, no. 6, pp. 1353–1367, 2012.
- [88] M. Fritzsche, D. Li, H. Colin-York, V. Chang, E. Moeendarbary, J. Felce, E. Sezgin, G. Charras, E. Betzig, and C. Eggeling, “Self-organizing actin patterns shape membrane architecture but not cell mechanics,” *Nature communications*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2017.
- [89] J. M. Kalappurakkal, P. Sil, and S. Mayor, “Toward a new picture of the living plasma membrane,” *Protein Science*, vol. 29, no. 6, pp. 1355–1365, 2020.
- [90] M. Cebecauer, M. Spitaler, A. Sergé, and A. I. Magee, “Signalling complexes and clusters: functional advantages and methodological hurdles,” *Journal of cell science*, vol. 123, no. 3, pp. 309–320, 2010.
- [91] I. M. Khater, I. R. Nabi, and G. Hamarneh, “A review of super-resolution single-molecule localization microscopy cluster analysis and quantification methods,” *Patterns*, vol. 1, no. 3, p. 100038, 2020.
- [92] M. Baaden, “Visualizing biological membrane organization and dynamics,” *Journal of molecular biology*, vol. 431, no. 10, pp. 1889–1919, 2019.
- [93] A. Einstein *et al.*, “On the motion of small particles suspended in liquids at rest required by the molecular-kinetic theory of heat,” *Annalen der physik*, vol. 17, no. 549-560, p. 208, 1905.
- [94] G. J. Schütz, H. Schindler, and T. Schmidt, “Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion,” *Biophysical journal*, vol. 73, no. 2, p. 1073, 1997.

- [95] J.-P. Bouchaud and A. Georges, “Anomalous diffusion in disordered media: statistical mechanisms, models and physical applications,” *Physics reports*, vol. 195, no. 4-5, pp. 127–293, 1990.
- [96] R. Metzler, J.-H. Jeon, A. G. Cherstvy, and E. Barkai, “Anomalous diffusion models and their properties: non-stationarity, non-ergodicity, and ageing at the centenary of single particle tracking,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 16, no. 44, pp. 24128–24164, 2014.
- [97] K. Jacobson, P. Liu, and B. C. Lagerholm, “The lateral organization and mobility of plasma membrane components,” *Cell*, vol. 177, no. 4, pp. 806–819, 2019.
- [98] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, and A. Kusumi, “Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane,” *The Journal of cell biology*, vol. 157, no. 6, pp. 1071–1082, 2002.
- [99] H. Qin, D. T. Burnette, Y.-K. Bae, P. Forscher, M. M. Barr, and J. L. Rosenbaum, “Intraflagellar transport is required for the vectorial movement of trpv channels in the ciliary membrane,” *Current Biology*, vol. 15, no. 18, pp. 1695–1699, 2005.
- [100] M. Schliwa and G. Woehlke, “Molecular motors,” *Nature*, vol. 422, no. 6933, pp. 759–765, 2003.
- [101] J. S. Morrison, *Deciphering multi-state mobility within single particle trajectories of proteins on the plasma membrane*. PhD thesis, University of British Columbia, 2010.
- [102] B. B. Mandelbrot and J. W. Van Ness, “Fractional brownian motions, fractional noises and applications,” *SIAM review*, vol. 10, no. 4, pp. 422–437, 1968.
- [103] W. Deng and E. Barkai, “Ergodic properties of fractional brownian-langevin motion,” *Physical Review E*, vol. 79, no. 1, p. 011112, 2009.
- [104] M. J. Saxton, “Anomalous diffusion due to obstacles: a monte carlo study,” *Biophysical journal*, vol. 66, no. 2, pp. 394–401, 1994.
- [105] A. V. Weigel, S. Ragi, M. L. Reid, E. K. Chong, M. M. Tamkun, and D. Krapf, “Obstructed diffusion propagator analysis for single-particle tracking,” *Physical Review E*, vol. 85, no. 4, p. 041924, 2012.
- [106] H. Scher and E. W. Montroll, “Anomalous transit-time dispersion in amorphous solids,” *Physical Review B*, vol. 12, no. 6, p. 2455, 1975.
- [107] H. Scher, “Time-scale invariance in transport and relaxation,” *Physics Today*, pp. 26–34, 1991.

- [108] A. V. Weigel, B. Simon, M. M. Tamkun, and D. Krapf, “Ergodic and nonergodic processes coexist in the plasma membrane as observed by single-molecule tracking,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 16, pp. 6438–6443, 2011.
- [109] S. Burov, R. Metzler, and E. Barkai, “Aging and nonergodicity beyond the khinchin theorem,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 30, pp. 13228–13233, 2010.
- [110] C. Manzo, J. A. Torreno-Pina, P. Massignan, G. J. Lapeyre Jr, M. Lewenstein, and M. F. G. Parajo, “Weak ergodicity breaking of receptor motion in living cells stemming from random diffusivity,” *Physical Review X*, vol. 5, no. 1, p. 011021, 2015.
- [111] M. Woringer and X. Darzacq, “Protein motion in the nucleus: from anomalous diffusion to weak interactions,” *Biochemical Society Transactions*, vol. 46, no. 4, pp. 945–956, 2018.
- [112] A. Roccamo, M. Pediconi, E. Aztiria, L. Zanello, A. Wolstenholme, and F. Barrantes, “Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 11, no. 5, pp. 1615–1623, 1999.
- [113] R. Kellner, C. Baier, K. Willig, S. W. Hell, and F. Barrantes, “Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy,” *Neuroscience*, vol. 144, no. 1, pp. 135–143, 2007.
- [114] G. Almarza, F. Sánchez, and F. J. Barrantes, “Transient cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor cell-surface mobility,” *Plos one*, vol. 9, no. 6, p. e100346, 2014.
- [115] F. J. Barrantes, “Single-molecule localization super-resolution microscopy of synaptic proteins,” in *Chemical and Synthetic Approaches in Membrane Biology*, pp. 157–198, Springer, 2016.
- [116] M. Ovesný, P. Křížek, J. Borkovec, Z. Švindrych, and G. M. Hagen, “Thunderstorm: a comprehensive imagej plug-in for palm and storm data analysis and super-resolution imaging,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 16, pp. 2389–2390, 2014.
- [117] F. Huang, S. L. Schwartz, J. M. Byars, and K. A. Lidke, “Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging,” *Biomedical optics express*, vol. 2, no. 5, pp. 1377–1393, 2011.
- [118] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, “Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes,” *Biophysical journal*, vol. 82, no. 5, pp. 2775–2783, 2002.

- [119] T. Quan, S. Zeng, and Z. Huang, “Localization capability and limitation of electron-multiplying charge-coupled, scientific complementary metal-oxide semiconductor, and charge-coupled devices for superresolution imaging,” *Journal of biomedical optics*, vol. 15, no. 6, p. 066005, 2010.
- [120] P. Annibale, S. Vanni, M. Scarselli, U. Rothlisberger, and A. Radenovic, “Quantitative photo activated localization microscopy: unraveling the effects of photoblinking,” *PloS one*, vol. 6, no. 7, p. e22678, 2011.
- [121] P. Dedecker, S. Duwé, R. K. Neely, and J. Zhang, “Localizer: fast, accurate, open-source, and modular software package for superresolution microscopy,” *Journal of biomedical optics*, vol. 17, no. 12, p. 126008, 2012.
- [122] H. E. Lu, H. D. MacGillavry, N. A. Frost, and T. A. Blanpied, “Multiple spatial and kinetic subpopulations of camkii in spines and dendrites as resolved by single-molecule tracking palm,” *Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 22, pp. 7600–7610, 2014.
- [123] Y. Golan and E. Sherman, “Resolving mixed mechanisms of protein subdiffusion at the t cell plasma membrane,” *Nature communications*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2017.
- [124] V. Tejedor and R. Metzler, “Anomalous diffusion in correlated continuous time random walks,” *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, vol. 43, no. 8, p. 082002, 2010.
- [125] F. C. MacKintosh, “Active diffusion: the erratic dance of chromosomal loci,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 19, pp. 7138–7139, 2012.
- [126] G. Sikora, A. Wyłomańska, J. Gajda, L. Solé, E. J. Akin, M. M. Tamkun, and D. Krapf, “Elucidating distinct ion channel populations on the surface of hippocampal neurons via single-particle tracking recurrence analysis,” *Physical Review E*, vol. 96, no. 6, p. 062404, 2017.
- [127] A. A. Kielbowicz Valarezo, “Análisis estadístico y modelado numérico de trayectorias de partícula única: mecanismos de difusión y confinamiento,” Master’s thesis, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 2017.
- [128] M. J. Saxton, “Lateral diffusion in an archipelago. single-particle diffusion,” *Biophysical journal*, vol. 64, no. 6, pp. 1766–1780, 1993.
- [129] S. Sadegh, J. L. Higgins, P. C. Mannion, M. M. Tamkun, and D. Krapf, “Plasma membrane is compartmentalized by a self-similar cortical actin meshwork,” *Physical Review X*, vol. 7, no. 1, p. 011031, 2017.
- [130] S. Burov, S. A. Tabei, T. Huynh, M. P. Murrell, L. H. Philipson, S. A. Rice, M. L. Gardel, N. F. Scherer, and A. R. Dinner, “Distribution of directional change as a signature of complex dynamics,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 49, pp. 19689–19694, 2013.

- [131] I. I. Cisse, I. Izeddin, S. Z. Causse, L. Boudarene, A. Senecal, L. Muresan, C. Dugast-Darzacq, B. Hajj, M. Dahan, and X. Darzacq, “Real-time dynamics of rna polymerase ii clustering in live human cells,” *Science*, vol. 341, no. 6146, pp. 664–667, 2013.
- [132] J. Andrews, W. Conway, W.-K. Cho, A. Narayanan, J.-H. Spille, N. Jayanth, T. Inoue, S. Mullen, J. Thaler, and I. Cissé, “qsr: a quantitative super-resolution analysis tool reveals the cell-cycle dependent organization of rna polymerase i in live human cells,” *Scientific reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2018.
- [133] A. Weron, K. Burnecki, E. J. Akin, L. Solé, M. Balcerek, M. M. Tamkun, and D. Krapf, “Ergodicity breaking on the neuronal surface emerges from random switching between diffusive states,” *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [134] E. Barkai, “Weak ergodicity breaking for anomalous diffusion,” *Physics Today*, vol. 65, no. 8, p. 29, 2012.
- [135] G. Bel and E. Barkai, “Weak ergodicity breaking in the continuous-time random walk,” *Physical review letters*, vol. 94, no. 24, p. 240602, 2005.
- [136] A. Lubelski, I. M. Sokolov, and J. Klafter, “Nonergodicity mimics inhomogeneity in single particle tracking,” *Physical review letters*, vol. 100, no. 25, p. 250602, 2008.
- [137] Y. He, S. Burov, R. Metzler, and E. Barkai, “Random time-scale invariant diffusion and transport coefficients,” *Physical Review Letters*, vol. 101, no. 5, p. 058101, 2008.
- [138] A. Rebenshtok and E. Barkai, “Distribution of time-averaged observables for weak ergodicity breaking,” *Physical review letters*, vol. 99, no. 21, p. 210601, 2007.
- [139] J. Janczura and A. Weron, “Ergodicity testing for anomalous diffusion: Small sample statistics,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 142, no. 14, p. 04B603_1, 2015.
- [140] D. S. Grebenkov, “Time-averaged mean square displacement for switching diffusion,” *Physical Review E*, vol. 99, no. 3, p. 032133, 2019.
- [141] F. Barrantes, “Recent developments in the structure and function of the acetylcholine receptor,” in *International Review of Neurobiology*, vol. 24, pp. 259–341, Elsevier, 1983.
- [142] V. L. Perillo, D. A. Penalva, A. J. Vitale, F. J. Barrantes, and S. S. Antolini, “Transbilayer asymmetry and sphingomyelin composition modulate the preferential membrane partitioning of the nicotinic acetylcholine receptor in lo domains,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 591, pp. 76–86, 2016.

- [143] M. J. Saxton, “Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients,” *Biophysical journal*, vol. 72, no. 4, pp. 1744–1753, 1997.
- [144] M. J. Saxton and K. Jacobson, “Single-particle tracking: applications to membrane dynamics,” *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, vol. 26, no. 1, pp. 373–399, 1997.
- [145] J.-H. Jeon, V. Tejedor, S. Burov, E. Barkai, C. Selhuber-Unkel, K. Berg-Sørensen, L. Oddershede, and R. Metzler, “In vivo anomalous diffusion and weak ergodicity breaking of lipid granules,” *Physical review letters*, vol. 106, no. 4, p. 048103, 2011.
- [146] C. J. Baier, C. E. Gallegos, V. Levi, and F. J. Barrantes, “Cholesterol modulation of nicotinic acetylcholine receptor surface mobility,” *European Biophysics Journal*, vol. 39, no. 2, p. 213, 2010.
- [147] J. Piguet, C. Schreiter, J.-M. Segura, H. Vogel, and R. Hovius, “Acetylcholine receptor organization in membrane domains in muscle cells evidence for rapsyn-independent and rapsyn-dependent mechanisms,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 1, pp. 363–369, 2011.
- [148] F. Barrantes, “Oligomeric forms of the membrane-bound acetylcholine receptor disclosed upon extraction of the m (r) 43,000 nonreceptor peptide,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 92, no. 1, pp. 60–68, 1982.
- [149] Y. L. Nemoto, R. J. Morris, H. Hijikata, T. A. Tsunoyama, A. C. Shibata, R. S. Kasai, A. Kusumi, and T. K. Fujiwara, “Dynamic meso-scale anchorage of gpi-anchored receptors in the plasma membrane: prion protein vs. thy1,” *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 75, no. 3-4, pp. 399–412, 2017.
- [150] J. Kwik, S. Boyle, D. Fooksman, L. Margolis, M. P. Sheetz, and M. Edidin, “Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate-dependent organization of cell actin,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 24, pp. 13964–13969, 2003.
- [151] W. He, H. Song, Y. Su, L. Geng, B. J. Ackerson, H. Peng, and P. Tong, “Dynamic heterogeneity and non-gaussian statistics for acetylcholine receptors on live cell membrane,” *Nature communications*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2016.
- [152] T. K. Fujiwara, K. Iwasawa, Z. Kalay, T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, Y. M. Umemura, H. Murakoshi, K. G. Suzuki, Y. L. Nemoto, N. Morone, *et al.*, “Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane,” *Molecular biology of the cell*, vol. 27, no. 7, pp. 1101–1119, 2016.
- [153] Z. Kalay, T. K. Fujiwara, A. Otaka, and A. Kusumi, “Lateral diffusion in a discrete fluid membrane with immobile particles,” *Physical Review E*, vol. 89, no. 2, p. 022724, 2014.

- [154] D. Goswami, K. Gowrishankar, S. Bilgrami, S. Ghosh, R. Raghupathy, R. Chadda, R. Vishwakarma, M. Rao, and S. Mayor, “Nanoclusters of gpi-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity,” *Cell*, vol. 135, no. 6, pp. 1085–1097, 2008.
- [155] Y. Mardoukhi, J.-H. Jeon, and R. Metzler, “Geometry controlled anomalous diffusion in random fractal geometries: looking beyond the infinite cluster,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 17, no. 44, pp. 30134–30147, 2015.
- [156] V. Bermúdez, S. S. Antollini, G. A. F. Nievas, M. I. Aveldaño, and F. J. Barrantes, “Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstitution,” *Journal of lipid research*, vol. 51, no. 9, pp. 2629–2641, 2010.
- [157] N. P. Rotstein, H. R. Arias, F. J. Barrantes, and M. Aveldano, “Composition of lipids in elasmobranch electric organ and acetylcholine receptor membranes,” *Journal of neurochemistry*, vol. 49, no. 5, pp. 1333–1340, 1987.
- [158] F. J. Barrantes, “The lipid environment of the nicotinic acetylcholine receptor in native and reconstituted membrane,” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 24, no. 5, pp. 437–478, 1989.
- [159] R. Metzler, J.-H. Jeon, and A. Cherstvy, “Non-brownian diffusion in lipid membranes: Experiments and simulations,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1858, no. 10, pp. 2451–2467, 2016.
- [160] M. Goiko, J. R. De Bruyn, and B. Heit, “Short-lived cages restrict protein diffusion in the plasma membrane,” *Scientific reports*, vol. 6, p. 34987, 2016.
- [161] T. Rahbek-Clemmensen, M. D. Lycas, S. Erlendsson, J. Eriksen, M. Apuschkin, F. Vilhardt, T. N. Jørgensen, F. H. Hansen, and U. Gether, “Super-resolution microscopy reveals functional organization of dopamine transporters into cholesterol and neuronal activity-dependent nanodomains,” *Nature communications*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2017.

Tesis disponible bajo Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial –
Compartir Igual (by-nc-sa) 2.5 Argentina.

Buenos Aires, 2020