

INTRODUCCIÓN

2.1. LA MEMBRANA CELULAR

La célula, ya sea perteneciente a organismos procariotas o eucariotas, requiere de una barrera física que la separe y en determinadas situaciones, la aíse del medio externo. A su vez, necesita también mantener el contacto con el medio, ya que de él obtiene los nutrientes esenciales para la vida. Esta separación física entre el medio interno y el externo es la membrana celular. Las características de la membrana dependen del tipo de célula, aunque presentan componentes comunes, como son la presencia de una bicapa o matriz lipídica y proteínas.

Las membranas celulares no sólo presentan una función de barrera estática, sino que desempeñan funciones específicas:

- Protección de la célula frente posibles agresiones externas.
- Mantenimiento de la presión osmótica.
- Intercambio de determinadas moléculas hacia el interior y/o el exterior celular.
- Mantenimiento de proteínas capaces de realizar funciones específicas como puede ser el transporte selectivo de moléculas, o determinadas reacciones enzimáticas, entre otras.
- Transducción de señales mediante fijación selectiva a determinadas entidades químicas a través de receptores.
- Reconocimiento celular y posible fusión con otras células.
- Motilidad de determinadas células u orgánulos.

La membrana permite a la célula mantener un estrecho contacto entre el medio externo y el medio interno. Por ejemplo, si se detecta una elevada concentración de un determinado nutriente en el medio externo, la célula iniciará un proceso de expresión de transportadores específicos para este nutriente, con el fin de acumularlo en su interior y consumirlo. Paradójicamente, la membrana celular es una barrera prácticamente impermeable que hace posible el mantenimiento y separación de dos medios diferentes, como son el medio intracelular y el extracelular (Alberts et al., 2002).

Entre ambos lados de la membrana celular existe una diferencia de potencial electroquímico ($\Delta\tilde{\mu}_i$). Los iones mayoritariamente presentes en el medio extracelular son, Na^+ y Cl^- , mientras que los iones mayoritariamente presentes en el medio intracelular son, K^+ y fosfatos orgánicos aniónicos. Este desequilibrio de iones da lugar a una diferencia de potencial eléctrico en la membrana (potencial de membrana). El paso por la bicapa de pequeños iones, tales como Na^+ , K^+ o H^+ , es vital para el mantenimiento de este potencial así como para la conducción de algunos procesos de transporte.

La diferencia de potencial electroquímico presente en las células vivas se encuentra entre -20 mV y -200 mV (Lodish et al., 2003), aunque se pueden encontrar células con una diferencia de potencial de transmembrana positiva.

2.1.1. Composición

En la composición química de la membrana intervienen diversas moléculas: lípidos, proteínas y glúcidos. Los lípidos se encuentran dispuestos en forma de bicapa, mientras que las proteínas se disponen en forma irregular y asimétrica entre los mismos. Estos componentes confieren un cierto grado de movilidad a la membrana dando lugar al modelo conocido como *mosaico fluido* (Singer y Nicholson, 1972).

La membrana celular no es igual para todos los organismos vivos, existen diferencias, por ejemplo, entre organismos procariontas y eucariotas, incluso entre los miembros de estos dos grupos existen diferencias características en la composición de sus membranas.

Los componentes principales de las membranas celulares son:

- Fosfolípidos.
- Esteroles.
- Glucolípidos.
- Lipopolisacárido.
- Proteínas.

2.1.1.i Fosfolípidos

Los fosfolípidos son los componentes principales de la membrana celular. Son moléculas anfipáticas compuestas por una región hidrofílica o *cabeza polar* y una región hidrofóbica compuesta por dos cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos que constituyen la región apolar o *colas apolares*. La región polar presenta un grupo NH_3^+ y se conecta a la región apolar mediante la presencia de una molécula de glicerol, la cual se une a las colas apolares mediante enlaces de tipo éster. La región apolar se compone de dos cadenas hidrocarbonadas de longitud variable (comprendidas entre 14 y 24 átomos de carbono, generalmente). Las colas apolares presentan un cierto grado de movilidad debido a su estructura y a la posible presencia de dobles enlaces, como puede apreciarse en la figura 1. Los ácidos grasos insaturados determinan el empaquetamiento en el plano lateral de la bicapa (Houslay y Stanley, 1982; Bergethon, 1998).

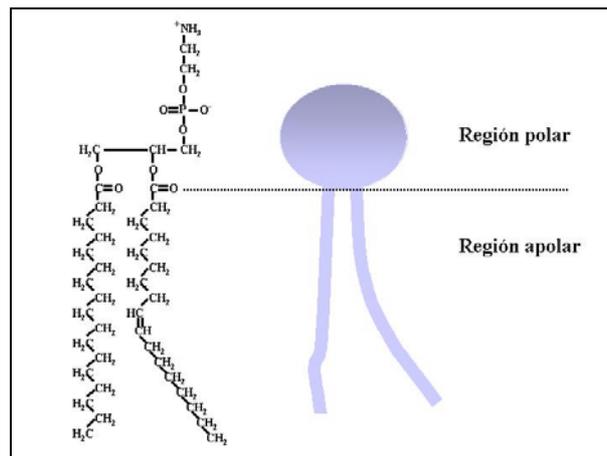


Figura 1. Estructura de un fosfolípido modelo.

Las moléculas de fosfolípido se estructuran, en función de su lipofilicidad, en forma de una bicapa continua de aproximadamente 5 nm de ancho. Esta bicapa, establecida como base para la estructura celular, es la matriz en la que se integran otras moléculas que tienen diferentes funciones y son imprescindibles para la vida (Alberts et al., 2002). Cabe destacar que no existe una composición lipídica estándar, sino que dependerá de la función de cada célula u orgánulo, aunque existen unos fosfolípidos, resumidos en la tabla 1, que se encuentran con más frecuencia en las membranas.

Tabla 1. Fosfolípidos más frecuentes en las membranas celulares.

Membranas Eucariotas	Membranas Procariotas
• Fosfatidilcolina	• Fosfatidiletanolamina
• Fosfatidiletanolamina	• Fosfatidilglicerol
• Fosfatidilserina	• Cardiolipina
• Fosfatidilinositol	• Glucolípidos [#]
• Cardiolipina	• Glucofosfolípidos [#]
• Esfingomielina*	

*En lugar de glicerol presenta D-4-esfingina. [#]Bacterias Gram positivas.

La composición lipídica de las membranas no es la misma según se considere la región extracelular o la región intracelular, esta asimetría entre monocapas es debida a las diferentes funciones que desempeñan ambas regiones. En la figura 2 puede observarse la distribución asimétrica de los fosfolípidos en diferentes membranas biológicas.

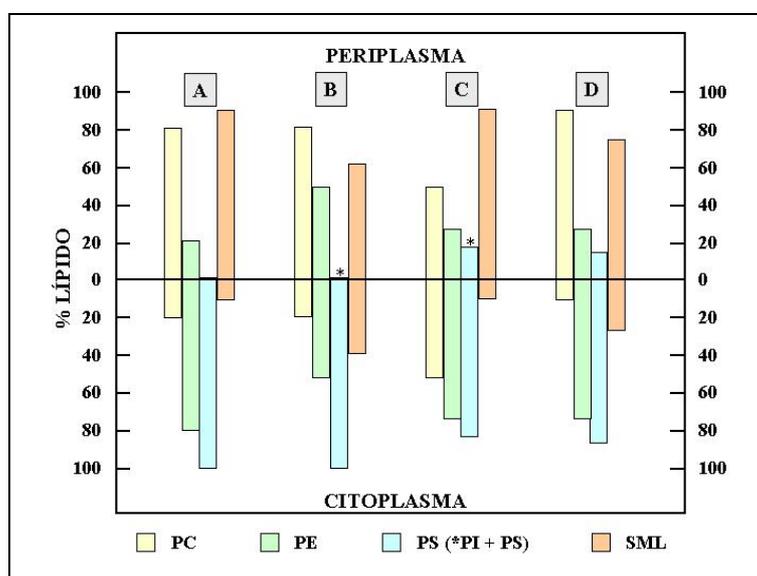


Figura 2. Composición lipídica asimétrica entre las monocapas de la membrana. (A) Membrana de eritrocito humano. (B) Membrana plasmática de hígado de rata. (C) Membrana plasmática de plaquetas de cerdo. (D) Envoltura de VSV crecido en células BHK-21 (Shinitzky, 1993).

Generalmente, en la región externa de las bicapas se encuentra fosfatidilcolina, esfingomielina y glucolípidos, mientras que en la región interna se encuentra

fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (Vance y Vance, 1996). En algunos casos, las bacterias son capaces de modificar la proporción entre ácidos grasos saturados e insaturados, con el fin de mantener la fluidez de la bicapa frente a variaciones del medio externo (por ejemplo, variaciones de la temperatura).

2.1.1.ii. Esteroles

El colesterol, es el esteroles más habitual presente en las membranas celulares eucariotas, mientras que las membranas procariotas carecen de esta molécula.

En la figura 3 se muestra la estructura del colesterol, que determina su localización en la membrana. El colesterol se encuentra insertado en la bicapa con su grupo hidroxilo C3 próximo a las cabezas polares de los fosfolípidos y su región apolar integrada entre las cadenas hidrocarbonadas apolares de los mismos (Huang, 1977).

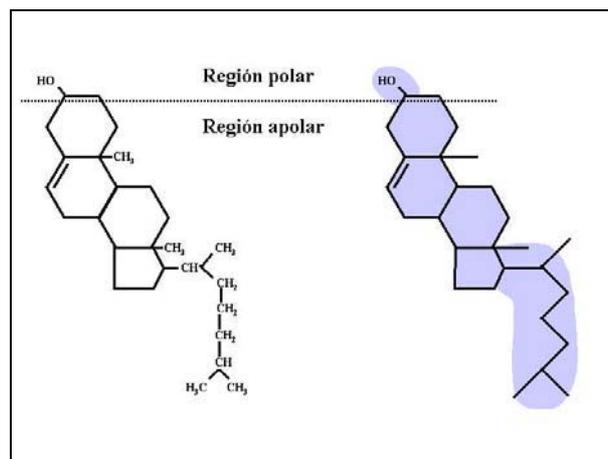


Figura 3. Estructura del colesterol.

Las moléculas de colesterol actúan como reguladoras de la fluidez de la membrana, evitando los cambios bruscos que produciría en la misma, por ejemplo, un incremento de la temperatura (Alberts et al., 2002).

En el caso de los organismos que carecen de colesterol, la función de estabilidad de la bicapa es proporcionada por otro tipo de esteroides, como el ergosterol.

2.1.1.iii. Glucolípidos

Los glucolípidos son moléculas lipídicas que presentan en su estructura cadenas de polisacáridos que quedan expuestas en el espacio extracelular (figura 4). Estos lípidos, se diferencian entre sí por la naturaleza de la parte glucídica que exponen. En las membranas citoplasmáticas de los organismos eucariotas y procariotas, los glucolípidos mayoritarios son los neutros, llamados así por presentar una cabeza polar formada por azúcares neutros (Alberts et al., 2002).

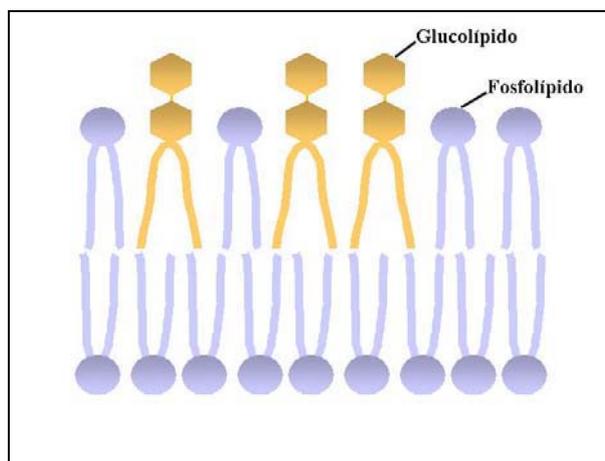


Figura 4. Disposición en la bicapa de las moléculas de glucolípidos.

Estos componentes de la bicapa pueden presentar función de protección y aislamiento, así como constituir una zona de reconocimiento para otras moléculas.

2.1.1.iv. Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) está presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, concretamente se encuentra situado en la mitad exterior de dicha membrana.

El LPS presenta una región hidrofóbica (lípidos A) situado en la membrana, de forma similar a como se encuentran situadas las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos. La región polar del LPS, como puede apreciarse en la figura 5, está formada por el core y en algunos casos por el antígeno O, ambos de naturaleza sacarídica.

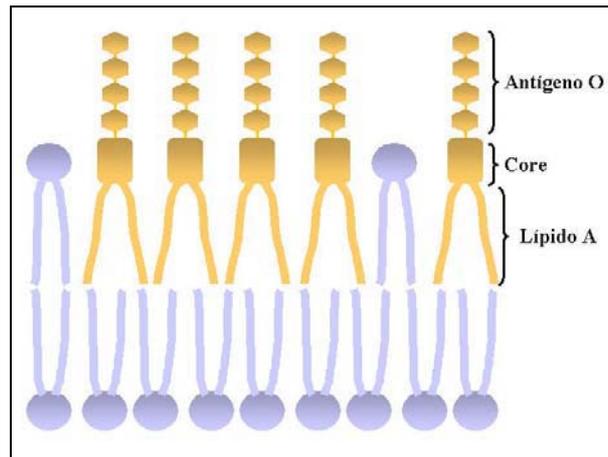


Figura 5. Fragmento de membrana externa bacteriana, mostrando la ubicación del LPS.

2.1.1.v. Proteínas

Las proteínas de membrana, como se verá posteriormente, pueden ser periféricas o integrarse parcial o totalmente en la membrana, siendo, generalmente, de tipo globular o fibroso. Su actividad es fundamental para el mantenimiento de los gradientes transmembranarios y el estudio de su estructura resulta prioritario. Cabe destacar, que la proporción de proteínas de membrana que han podido ser cristalizadas es muy baja.

Según su composición, las proteínas se pueden clasificar en:

- Proteínas simples: compuestas únicamente por aminoácidos.
- Proteínas conjugadas: compuestas por aminoácidos y por otros compuestos orgánicos o inorgánicos denominados *grupos prostéticos*.

Las proteínas de membrana se sitúan en función de la estructura de sus aminoácidos, concretamente de sus propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas. La mayoría de las membranas contienen aproximadamente un 40 % de lípidos y un 60 % de proteínas, aunque en algunas membranas de células eucariotas pueden llegar a representar un 80 % de la masa celular seca total (Lehninger et al., 2001).

2.1.2. Estructura

La estructura de la membrana celular es en forma de bicapa lipídica. Esta bicapa lipídica puede ser considerada como una matriz donde se incorporan otras muchas moléculas que forman parte también de las diferentes membranas celulares.

La bicapa lipídica es una estructura fluida y dinámica. Este dinamismo de la bicapa se conoce como *modelo de mosaico fluido*, en el que se encuentran implicadas activamente todas las moléculas que forman parte de la bicapa, ya sean fosfolípidos, glucolípidos, esteroides y proteínas, entre otros.

El *modelo del mosaico fluido*, postulado en 1972 por Singer y Nicholson, establece que los fosfolípidos de las membranas se encuentran ordenados en forma de bicapa fluida. La fluidez de esta bicapa permite el movimiento individual de las diferentes moléculas que forman parte de la misma. Este dinamismo molecular confiere a la membrana una gran elasticidad así como propiedades eléctricas y una relativa impermeabilidad frente a moléculas muy polares.

2.1.2.i. **Fluidez de la bicapa**

Los lípidos de las membranas pueden encontrarse, en función de la temperatura, en dos estados o fases diferentes: fase de *gel* (las cadenas hidrocarbonadas del lípido están rígidas), y fase de *crystal-líquido* o *fluida* (las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos están móviles). La temperatura a la cual se produce el cambio de estado de gel a cristal-líquido se denomina *temperatura de transición* (T_m) (figura 6). A valores de temperatura inferiores a la T_m , el lípido se encuentra en fase gel y a valores superiores, se encuentra en fase de cristal-líquido (Keough y Davis, 1979; Bergethon, 1998).

La cooperatividad de la transición (B) es un indicador del número de moléculas que cambian de estado simultáneamente durante la transición (Vance y Vance, 1996). En el caso de fosfolípidos puros, la T_m está bien definida y la transición se produce de forma altamente cooperativa. En los sistemas biológicos se encuentran mezclas lipídicas

complejas, formadas por más de un tipo de lípido, la transición se produce en un intervalo de temperaturas y suele existir una baja cooperatividad (Bergethon, 1998).

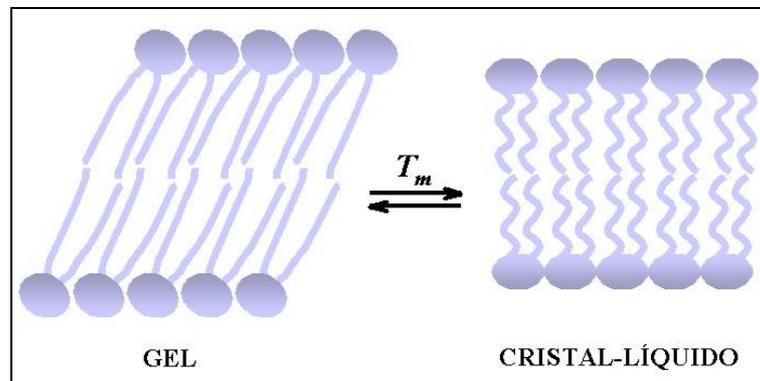


Figura 6. Transición de estado en una bicapa lipídica entre la fase de gel y la de cristal-líquido.

La T_m depende de las propiedades de los lípidos que constituyen la bicapa. La presencia de fosfolípidos de cadena corta o con insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas produce un descenso de T_m , debido a que una menor longitud de las cadenas reduce la tendencia de las colas a interaccionar entre ellas, y la presencia de dobles enlaces producen torsiones en las colas apolares que pueden facilitar su movilidad. Por otra parte, la presencia de fosfolípidos saturados en la bicapa, aumenta su T_m debido a que estos fosfolípidos presentan una elevada capacidad de agrupación y baja movilidad (Alberts et al., 2002).

Las técnicas microcalorimétricas, constituyen el método de elección para determinar los valores de T_m , así como los parámetros termodinámicos asociados al cambio de fase de los lípidos. No obstante, el cálculo de la T_m puede realizarse también por otras técnicas, como la resonancia magnética nuclear (RMN), la resonancia de spin electrónico o la fluorescencia. En la figura 7 se muestra un ejemplo de determinación de T_m por fluorescencia. El cálculo se realiza a partir de las variaciones de la anisotropía de una sonda fluorescente frente a los cambios de temperatura. El punto de inflexión de la curva obtenida corresponde a la temperatura de transición. El cálculo de T_m y B proporciona información relativa a la movilidad de la bicapa y a la posible localización de moléculas en la misma (Vázquez et al., 2001; Merino et al., 2002).

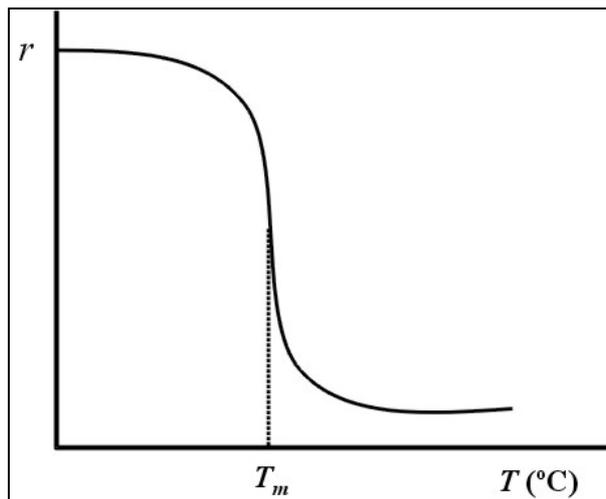


Figura 7. Ejemplo del cálculo de la temperatura de transición a partir de los valores de anisotropía de la fluorescencia (r).

2.1.2.ii. Propiedades dinámicas

El grado de fluidez de la bicapa depende de las moléculas que forman parte de la misma, es decir, de la proporción de ácidos grasos saturados frente a insaturados o de la proporción de moléculas tales como el colesterol, por ejemplo.

Los principales procesos dinámicos que ocurren en una membrana biológica se definen a continuación (Shinitzky, 1993; Bergethon, 1998):

- Rotación de los enlaces de carbono: Movimiento de rotación alrededor de las uniones C-C a lo largo de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (figura 8a).
- Flexibilidad de la cadena hidrocarbonada: Las cadenas hidrocarbonadas de ácido graso presentan un alto grado de movilidad, sobretodo en el caso de cadenas que presenten dobles enlaces en su estructura (figura 8b).
- Difusión rotacional: Movimiento de rotación de las moléculas de la membrana alrededor de sí mismas. La difusión rotacional puede darse de dos formas, mediante rotación alrededor de un eje móvil, que también presenta rotación (figura 8c superior), o alrededor de un eje fijo (figura 8c inferior).
- Difusión lateral: Movimiento translacional a lo largo de la superficie de la bicapa (figura 8d). Este movimiento puede ocurrir con idéntica probabilidad en

todas direcciones de forma completamente aleatoria. La difusión lateral depende del grado de rigidez de la membrana.

- **Fluctuaciones:** Movimientos de la bicapa similares a ondulaciones de la misma (figura 8e). Las fluctuaciones de las membranas suelen presentarse en las proximidades de la fase de transición de los lípidos que constituyen la bicapa (ver apartado 2.1.2.i.).
- **Difusión transmembrana:** La difusión transmembrana o *flip-flop* es un movimiento de translocación de una molécula (generalmente de lípido) de una mitad a otra de la bicapa (figura 8f).

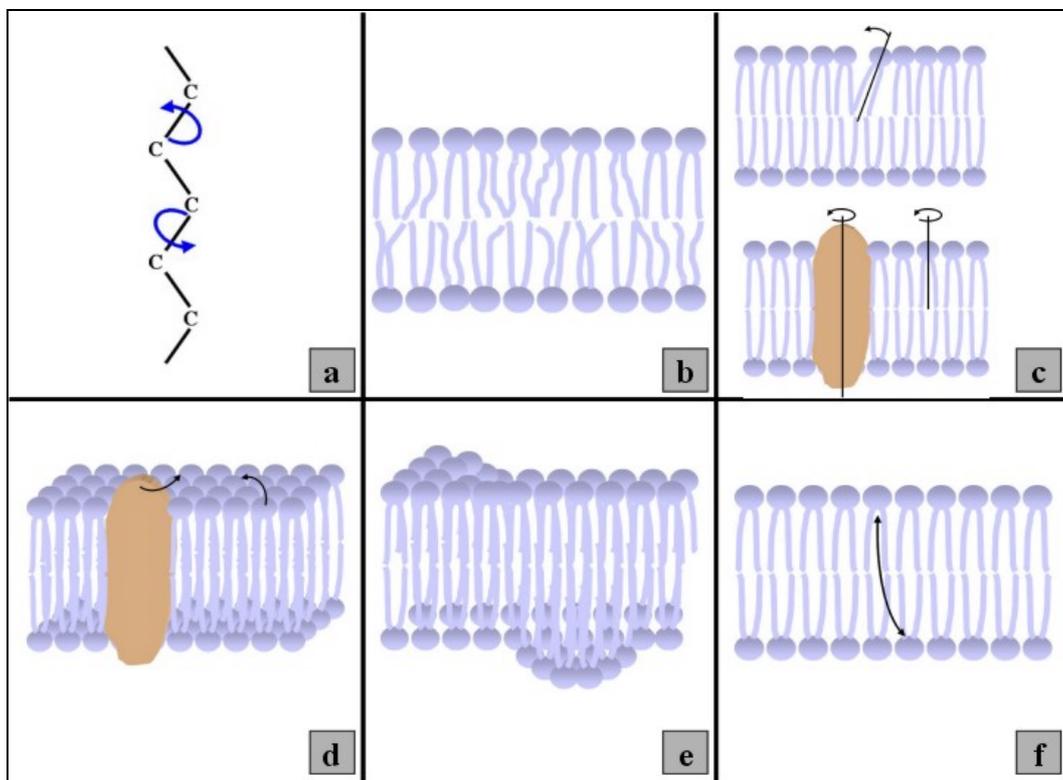


Figura 8. Efectos dinámicos de la membrana biológica: **(a)** Rotación de los enlaces de carbono. **(b)** Flexibilidad de la cadena hidrocarbonada. **(c)** Difusión rotacional. **(d)** Difusión lateral. **(e)** Fluctuación de la bicapa. **(f)** Difusión transmembrana.

2.1.2.iii. Ordenación

La estructura de las membranas biológicas no es homogénea sino que presenta diversos modos de ordenación de su estructura (Shinitzky, 1993):

- Orden orientacional: Cada una de las moléculas de lípido que forman parte de la membrana presentan una orientación propia en la bicapa (figura 9a). La presencia de proteínas insertadas en la membrana da lugar a un incremento del orden de la bicapa y de su rigidez.
- Dominios: Como sistemas heterogéneos que son, las membranas celulares presentan una gran diversidad de moléculas en su estructura. La forma en que estas moléculas se encuentran asociadas determina la presencia de regiones más ordenadas y estables que otras (figura 9b). Estas regiones ordenadas son denominadas *microdominios*, entre los que se encuentran los *rafts*, formados por colesterol o esfingolípidos (Simons e Ikonen, 1997). En las bicapas lipídicas pueden observarse otro tipo de dominios, denominados *nanodominios*, no debidos a una heterogeneidad de la membrana, sino a cambios en sus propiedades fisicoquímicas, como puede ser un cambio de estado de los fosfolípidos. La aparición de dominios en las membranas obedece a multitud de parámetros como pueden ser la carga neta de la membrana, las fuerzas de interacción, la composición de la membrana y efectos externos como puede ser un soporte para su visualización (Tokumasu et al., 2003a). Existe un tercer tipo de dominio, el *macrodominio*, provocado por la inserción de una proteína en la membrana y constituido por la relación que se establece entre las moléculas de fosfolípido y las moléculas de proteína.

La presencia de microdominios en las bicapas y sobretodo en el caso de los *rafts*, da lugar a regiones de resistencia a la acción de surfactantes, son las denominadas *membranas resistentes a surfactantes* (DRM) (Brown y London, 1998). Las DRM están formadas, habitualmente, por esfingolípidos y colesterol y se caracterizan por su resistencia frente a la acción sobretodo de surfactantes no iónicos y Tritón X-100 (Anderson y Jacobson, 2002; Simons e Ikonen, 1997).

- Asimetría de la bicapa: Las dos monocapas que componen la membrana celular presentan una composición y estructura diferentes (figura 9c). Los carbohidratos, por ejemplo, se encuentran situados exclusivamente en la monocapa extracelular. La asimetría de la bicapa se debe a los diferentes requerimientos de la célula.

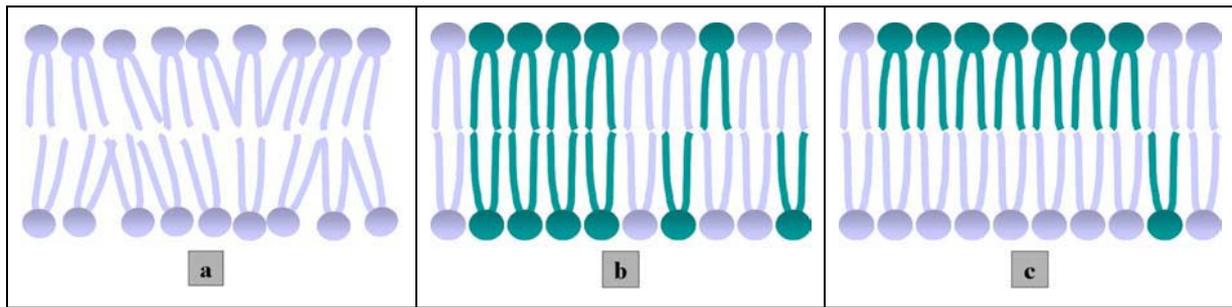


Figura 9. Tipos de ordenación de la bicapa: **(a)** Orden orientacional. **(b)** Dominios. **(c)** Asimetría.

2.1.2.iv. Membranas eucariotas y procariotas

Las membranas de los organismos vivos pueden diferenciarse, principalmente, según si éstos son procariotas o eucariotas. Los organismos eucariotas, en general, presentan una única membrana celular (membrana plasmática o citoplasmática), mientras que los organismos procariotas pueden presentar dos membranas celulares (membrana externa o lipopolisacárido y membrana interna, plasmática o citoplasmática). En la figura 10 puede observarse el esquema de una membrana modelo correspondiente a un organismo eucariota (figura 10a) y a uno procariota (figura 10b), concretamente de una bacteria Gram negativa.

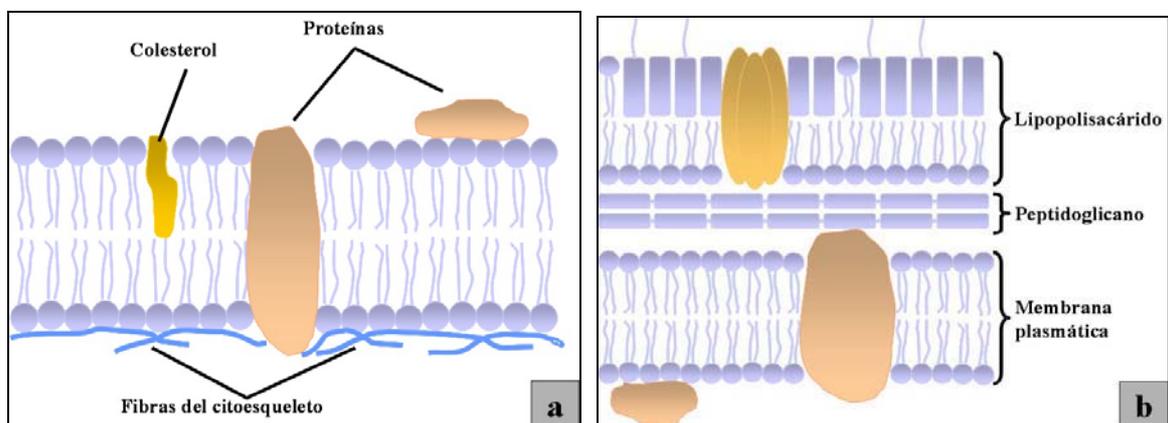


Figura 10. Estructura de la membrana celular: **(a)** Membrana eucariota. **(b)** Membrana procariota (bacteria Gram negativa).

En el caso de las bacterias existe una cubierta, ausente en el resto de organismos vivos, que protege la célula sin ser específicamente una membrana, es el peptidoglicano, también denominado mucopéptido o mureína. El peptidoglicano está formado por largas

cadena de polisacáridos que consisten en residuos de N-acetil-glucosamina (NAG) que alternan con los de ácido N-acetil-murámico (NAM), atravesadas por cadenas cortas de aminoácidos, dando lugar a una tupida red. La principal diferencia entre la membrana de las bacterias Gram positivas y las Gram negativas, es que en las bacterias Gram positivas el tamaño del peptidoglicano es muy superior al de las bacterias Gram negativas, ya que en éstas no existe membrana externa (LPS).

Los organismos eucariotas, a diferencia de los procariotas, presentan orgánulos separados físicamente del citoplasma por una membrana que los rodea. Esta membrana, de igual forma que en la célula, presenta una composición dependiente de los requerimientos del orgánulo, siendo diferente para cada uno de ellos.

2.2. PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Las proteínas de membrana son las principales herramientas de comunicación entre el interior y el exterior de la célula, gracias a ellas se produce el intercambio de moléculas tales como nutrientes o productos de desecho, así como la recepción de señales externas.

En la figura 11 se puede observar la situación de las proteínas en una membrana. Las proteínas de membrana se suelen clasificar en función de la facilidad con la que pueden ser extraídas de la bicapa, en:

- Proteínas periféricas (extrínsecas): Situadas en la región polar de la bicapa, ya sea interna o externa. Pueden ser extraídas fácilmente de la misma sin necesidad de destruirla, mediante utilización de soluciones de moderada y alta fuerza iónica. Estas proteínas se encuentran unidas a la membrana mediante fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno o iónicos. Generalmente, las proteínas periféricas presentan carga neta positiva, siendo necesaria la presencia de lípidos cargados negativamente en la membrana para dar lugar a un anclaje de tipo electrostático (Vance y Vance, 1996).
- Proteínas integrales (intrínsecas): Son aquellas proteínas que están integradas en la membrana y se pueden encontrar, por tanto, a ambos lados de la bicapa. Las proteínas integrales son de difícil extracción y generalmente requieren de la utilización de surfactantes para su aislamiento.
 - Proteínas integrales parciales: Proteínas que no atraviesan totalmente la bicapa, sino que penetran hasta un cierto nivel (core) de la membrana.
 - Proteínas integrales totales: Proteínas capaces de atravesar totalmente la bicapa lipídica. Estas proteínas son también denominadas *proteínas de transmembrana*. Un caso especial de proteínas integrales totales son las *proteínas politópicas*, que atraviesan varias veces la bicapa, generalmente en forma de zig-zag. Las proteínas politópicas son denominadas por algunos autores como “proteínas serpiente” debido a su disposición.

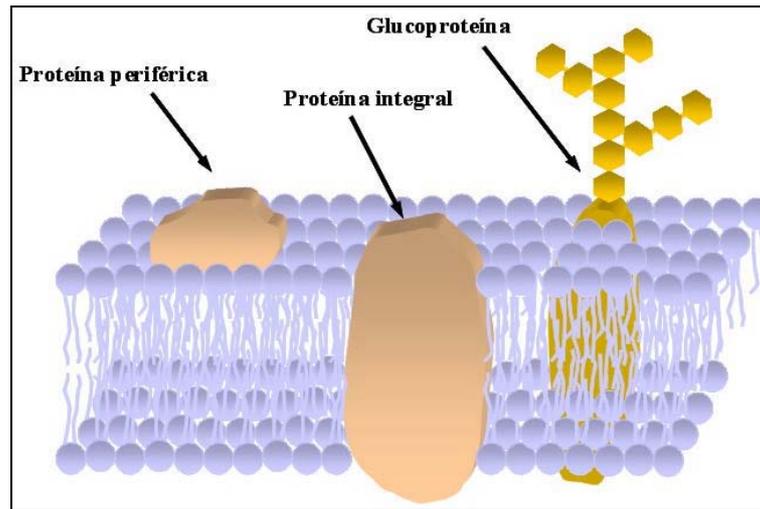


Figura 11. Disposición de las principales proteínas de membrana.

Las proteínas de membrana se pueden diferenciar, además de por su disposición en la bicapa, por su función en la misma. Así, se puede distinguir entre:

- Formadoras de canales: Proteínas integrales dispuestas en la membrana de tal manera que dan lugar a la formación de un poro o canal, habitualmente hidrofílico. Por estos poros o canales se permite la entrada y salida de determinadas sustancias de la célula.
- Transportadoras: Proteínas, generalmente integrales, cuya función es el transporte de moléculas a través de la membrana.
- Receptores: Proteínas, generalmente integrales, que reconocen determinadas moléculas a las cuales se unen para dar lugar a una determinada función o señal.
- Enzimas: Proteínas, tanto integrales como periféricas, capaces de realizar una determinada reacción en la superficie de la membrana.
- Anclajes del citoesqueleto: Proteínas periféricas situadas en la región citoplasmática de la membrana y que sirven de punto de unión o anclaje para los filamentos del citoesqueleto.
- Marcadores de identidad de la célula: Glucolípidos y glucoproteínas característicos de cada individuo y que sirven de reconocimiento para células procedentes de otro individuo. Las cadenas de carbohidratos procedentes, tanto de los glucolípidos, como de las glucoproteínas dan lugar a una especie de cubierta denominada *glucocálix* (Lehninger et al., 2001).

2.2.1. Citocromo c

El citocromo c es una proteína periférica globular de tipo catiónico, de 12,4 kDa de peso molecular, encargada de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria entre la citocromo c reductasa y la citocromo c oxidasa, situada en la parte interna de la membrana mitocondrial. Es una proteína que presenta un grupo hemo enlazado de forma covalente a su estructura. El átomo de hierro del grupo hemo pasa del estado férrico (Fe^{3+}) al estado ferroso (Fe^{2+}) cada vez que acepta un electrón. Los citocromos sólo son capaces de transportar un electrón cada vez, es por esta razón que existen varios puntos de acumulación y dispersión de electrones a lo largo de la cadena respiratoria (Alberts et al., 2002).

En la figura 12 se presenta la estructura del Cyt c constituida por 104 aminoácidos, de los cuales 12 son aniónicos y 24 son catiónicos, o lo que es lo mismo, sus aminoácidos cargados (35 % del total de aminoácidos) se distribuyen en 67 % de aminoácidos catiónicos y 33 % de aminoácidos aniónicos. Esta predominancia de carga positiva hace que esta proteína se una mayoritariamente a lípidos con carga neta negativa, mientras que presente poca unión en lípidos zwitteriónicos.

La unión del Cyt c a la bicapa es directamente dependiente de la composición lipídica y puede adoptar diferentes conformaciones en función de la unión (Salamon y Tollin, 1997; Oellerich et al, 2004). Se han observado tres tipos de localización de esta proteína en las bicapas lipídicas: superficial, parcialmente insertada en la bicapa y completamente insertada en el core de la bicapa lipídica.

Gly Asp Val Glu Lys Gly Lys Lys Ile Phe Val Gln Lys Cys Ala Gln Cys His Thr Val
Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly Pro Asn Leu His Gly Leu Phe Gly Arg Lys Thr
Gly Gln Ala Pro Gly Phe Thr Tyr Thr Asp Ala Asn Lys Asn Lys Gly Ile Thr Trp Lys
Glu Glu Thr Leu Met Glu Tyr Leu Glu Asn Pro Lys Lys Tyr Ile Pro Gly Thr Lys Met
Ile Phe Ala Gly Ile Lys Lys Lys Thr Glu Arg Glu Asp Leu Ile Ala Tyr Leu Lys Lys Ala
Thr Asn Glu

Figura 12. Secuencia de aminoácidos que compone el Cyt c. En rojo se indican los aa aniónicos y en azul los aa catiónicos.

La estructura terciaria del citocromo c, cuya estructura se muestra en la figura 13, está formada predominantemente por hélices α encargadas de envolver y proteger al grupo hemo, confiriendo así a la molécula un ambiente interno hidrofóbico excepto en un extremo del grupo hemo que se halla expuesto al exterior, y un ambiente externo altamente hidrofílico (Lehninger et al., 2001).

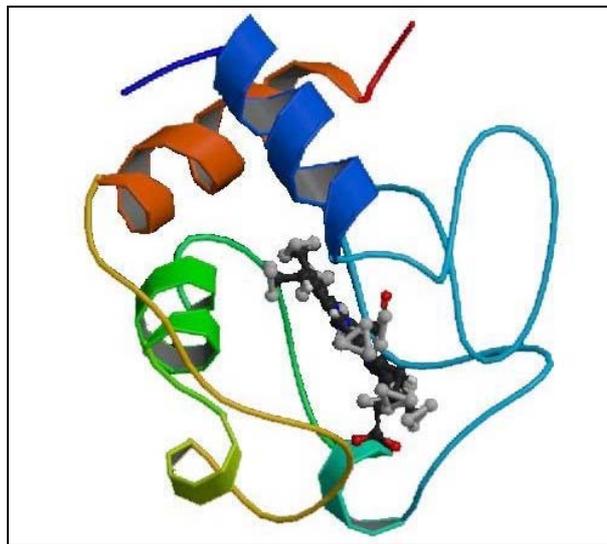


Figura 13. Estructura terciaria del citocromo c en su forma reducida, mostrándose el grupo prostético (1GIW de PDB).

Las células de los organismos pluricelulares presentan una cierta renovación, siendo eliminadas por el propio organismo, mediante el mecanismo conocido como *apoptosis* o *muerte celular programada* y posteriormente reemplazadas. El mecanismo de apoptosis está mediado por *caspasas*, enzimas proteolíticas situados en el interior de la célula en su forma inactiva (*procaspasas*). Es precisamente la activación de las *procaspasas* a *caspasas* el mecanismo desencadenante de la apoptosis, conocido como *cascada de las caspasas* (Alberts et al., 2002).

La apoptosis es un proceso que se inicia con la salida del Cyt c del interior mitocondrial debido a diferentes estímulos de muerte celular (Cai et al., 1998). Existen diferentes teorías que tratan de explicar la forma en que se produce la salida del Cyt c de la mitocondria, una de ellas implica a la proteína *Bax*, presente en el citosol de la célula. Tras el estímulo de muerte celular, *Bax* se trasloca desde el citosol hasta la membrana externa de la mitocondria donde se ancla dando lugar así a una proteína integral de

membrana y formando un canal por el cual se produce la salida del Cyt c. Otra de las teorías planteadas es la fragmentación de la membrana externa de la mitocondria por diferentes mecanismos (Desagher y Martinou, 2000). La salida del Cyt c del interior de la mitocondria puede ser prevenida e incluso bloqueada por la proteína *Bcl-2* (Yang et al. 1997; Kluck et al., 1997).

El Cyt c es considerado un paradigma de proteína periférica de membrana, y su relación con los fosfolípidos ha sido ampliamente estudiada mediante diferentes técnicas (Subramanian et al., 1998; Mueller et al., 2000). La interacción de esta proteína con los fosfolípidos de las membranas depende directamente de la carga de los mismos, así como de la fuerza iónica del medio en el que se encuentra. Se ha demostrado asimismo, que la interacción depende, tanto de factores electroquímicos como de la hidrofilia de ambos componentes (Subramanian et al., 1998). Los estudios realizados con el Cyt c sugieren su uso como modelo de proteína periférica.

2.2.2. Melitina

La melitina es una de las principales toxinas presentes en el veneno de la abeja europea (*Apis mellifera*) (Habermann, 1972). Es un péptido anfipático de ~ 4,6 kDa, constituido por 26 aminoácidos, que se muestran en la figura 14, de los cuales cinco son catiónicos y ninguno de ellos es aniónico, por tanto, el 100 % de los aminoácidos cargados de la MLT (19 % del total de aminoácidos) son catiónicos. La presencia de estos aminoácidos cargados positivamente en la estructura de la MLT hace que la proteína se una de manera prioritaria a fosfolípidos con carga negativa.

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
--

Figura 14. Secuencia de aminoácidos que compone la MLT. En azul se representan los aa catiónicos.

Los aminoácidos de este péptido se encuentran dispuestos en forma de hélice α (Terwillinger y Eisenberg, 1982). La MLT, en solución o en presencia de una membrana lipídica, puede presentar un cierto grado de polimerización. En solución

acuosa, la MLT adopta una conformación no ordenada (*random coil*), mientras que en una membrana, este péptido adopta su conformación ordenada en hélice α , como la observada en la figura 15. La concreta disposición que adopte en la bicapa lipídica, depende de la composición de la misma (Kriech y Conboy, 2003), así, la MLT puede encontrarse en forma monomérica, dimérica o tetramérica.

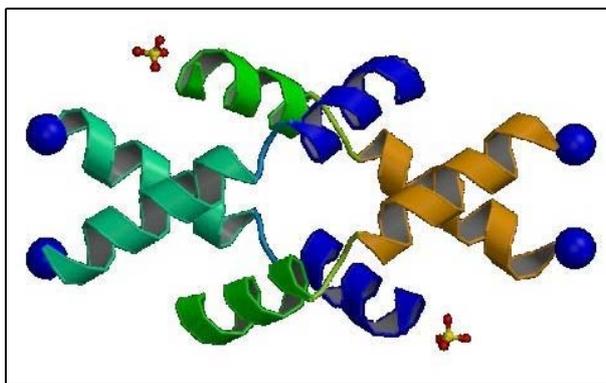


Figura 15. Estructura del tetrámero de melitina (2MLT de PDB).

Este péptido presenta acción lítica sobre las membranas biológicas (Dempsey, 1990). El mecanismo por el cual la MLT produce la lisis celular es por la formación de poros o canales en la membrana. La formación de estos poros depende tanto de la composición lipídica de la membrana, como de la concentración de toxina (Hincha y Crowe, 1996; Gómara et al., 2003; Takei et al., 1999). En algunos casos, como es la presencia de lípidos aniónicos en la membrana, la formación de estos poros puede dar lugar a la completa disrupción de la vesícula lipídica, de la misma forma en que lo haría un surfactante (Ladokhin y White, 2001).

La localización de la MLT en la bicapa depende de la composición de la misma, de la rigidez de los fosfolípidos que la constituyen y de la conformación adoptada por el péptido, aunque de forma mayoritaria se encuentra situada paralelamente a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (Hristova et al., 2001; Gómara et al., 2003). De la misma forma que ocurre con el Cyt c, el conocimiento existente de la MLT hace que pueda emplearse como un modelo de inserción en la bicapa.

2.2.3. Porina Omp1 de *Serratia marcescens*

Las porinas son proteínas integrales capaces de formar canales hidrofílicos en las membranas externas de las bacterias Gram negativas. Son proteínas bastante estables en solución, contrariamente a lo que ocurre en la mayoría de proteínas integrales, y esta característica facilita su cristalización (Garavito y Rosenbusch, 1980).

Las porinas, a pesar de ser proteínas integrales, presentan una elevada proporción de aminoácidos polares. Aunque presentan dominios estructurales α y β , son mayoritarias las hojas β , las cuales caracterizan su estructura y determinan su función (Nikaido y Saier, 1992; Cowan et al., 1992).

En la figura 16 puede observarse que la estructura de la Omp1 presenta un total de 374 aminoácidos, de los cuales 35 son catiónicos y 46 son aniónicos. En porcentajes, se puede decir que la Omp1 presenta un 22 % de aminoácidos cargados en su estructura. De estos aminoácidos, el 43 % están cargados positivamente, mientras que el resto, un 57 %, lo están negativamente.

La Omp1 es una porina inespecífica de 42 kDa presente en la membrana externa de la bacteria Gram negativa *Serratia marcescens*. Como puede verse en la figura 17, la Omp1 presenta una estructura de barril formada por 16 hojas β dispuestas de forma antiparalela, dando lugar a un canal hidrofílico que atraviesa la membrana y permite el paso de moléculas polares a través del mismo. Ésta es la vía de entrada de determinados antibióticos. La ausencia de esta porina en la membrana de *Serratia marcescens* da lugar a la resistencia de la bacteria frente a antibióticos como, por ejemplo, algunos derivados β -lactámicos y quinolonas (Puig et al., 1993).

El tamaño de poro que presenta esta proteína se determinó empleando la técnica conocida como *Black lipid bilayer* (Benz et al., 1997), siendo éste de 1,18 nm de diámetro (Ruiz, 2002).

Met Lys Arg Asn Ile Leu Ala Val Val Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Gly Ala
Ala Asn Ala Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys Leu Asp Leu Tyr
Gly Lys Val Asp Gly Leu His Tyr Phe Ser Asp Asp Lys Gly Asn Asp Gly
Asp Gln Thr Tyr Val Arg Phe Gly Phe Lys Gly Glu Thr Gln Ile Thr Asp Gln
Leu Thr Gly Tyr Gly Gln Trp Glu Tyr Asn Val Gln Ala Asn His Ser Glu Ser
Gln Gly Thr Glu Gly Thr Lys Thr Arg Leu Gly Phe Ala Gly Leu Lys Phe Ala
Asp Tyr Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Val Leu Tyr Asp Val
Glu Gly Trp Thr Asp Met Leu Pro Glu Phe Gly Gly Asp Thr Tyr Thr Tyr Thr
Asp Asn Phe Met Thr Gly Arg Thr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Arg Asn Asn
Asn Phe Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu Asn Phe Ala Val Gln Tyr Gln Gly
Lys Asn Gln Asn Asp Gly Arg Asn Val Lys Lys Gln Asn Gly Asp Gly Trp
Gly Ile Ser Ser Thr Tyr Asp Ile Gly Glu Gly Val Ser Phe Gly Ala Ala Tyr
Ala Ser Ser Asn Arg Thr Asp Asp Gln Gln Leu Arg Ser Asn Glu Arg Gly
Asp Lys Ala Asp Ala Trp Thr Val Gly Ala Lys Tyr Asp Ala Asn Asn Val
Tyr Leu Ala Ala Met Tyr Ala Glu Thr Arg Asn Met Thr Pro Phe Gly Gly
Gly Asn Phe Gly Ala Gly Cys Ala Ala Thr Asp Asp Lys Cys Gly Gly Phe
Ala Ser Lys Thr Gln Asn Phe Glu Val Thr Ala Gln Cys Gln Phe Asp Phe Gly
Leu Arg Pro Glu Val Ser Tyr Leu Gln Ser Lys Gly Lys Asn Leu Asn Val Pro
Gly Val Gly Ser Asp Gln Asp Leu Val Lys Tyr Val Ser Val Gly Thr Thr Tyr
Tyr Phe Asn Lys Asn Met Ser Thr Tyr Val Asp Tyr Lys Ile Asn Leu Leu Asp
Asp Asn Glu Phe Thr Lys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Asp Asp Ile Val Ala Val
Gly Leu Val Ala Gln Phe

Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la Omp1. En rojo se representan los aa aniónicos y en azul los aa catiónicos.



Figura 17. Estructura terciaria de la Omp1. Izquierda, vista longitudinal. Derecha, vista zenital. Se muestran en amarillo las 16 hojas β antiparalelas (véase el sentido de las flechas). Imágenes obtenidas utilizando RasMol.

La secuencia genética de la porina Omp1 fue comparada con las secuencias de otras porinas de Enterobacterias. Los porcentajes de identidad obtenidos respecto a la porina Omp1 fueron: 94 % para la OmpF de *Serratia marcescens*, 69 % para la Omp2 de *Salmonella typhimurium*, 66 % para la OmpC de *Klebsiella pneumoniae*, 65 % para la OmpC de *Salmonella typhimurium*, 62 % para la OmpC de *Escherichia coli*, y finalmente, 59 % para la OmpC de *Serratia marcescens*. Esta proteína, presenta una alta homología con las porinas OmpC de las diversas especies de Enterobacterias, aunque, contrariamente, la Omp1 se expresa en condiciones de baja osmolaridad, de la misma forma que lo haría la OmpF de *Escherichia coli* (Ruiz, 2002).

2.2.4. Lactosa permeasa de *Escherichia coli*

La lactosa permeasa de *Escherichia coli* es una proteína politópica altamente flexible de 47 kDa, formada por 417 aminoácidos predominantemente hidrofóbicos dispuestos en forma de hélice α (~ 70 %) (le Coutre et al., 1997; Patzlaff et al., 1998). La LacY presenta una estructura formada por 12 hélices α que atraviesan la membrana en forma de “zig-zag”, conectadas entre sí mediante *loops* hidrofílicos. Sus extremos carboxilo y amino terminales se encuentran orientados hacia el citoplasma (Kaback, 1996). La LacY es un transportador activo secundario de membrana que cataliza el acoplamiento estequiométrico y translocación de la lactosa u otros galactósidos y un protón (simporte β -galactósido/ H^+) (Kaback, 1986, 1989, 1990, 1992).

La estructura primaria de la LacY, presentada en la figura 18, consta de 417 aminoácidos, de los cuales 45 presentan carga (11 % del total). De estos aminoácidos cargados, 28 son catiónicos y 17 son aniónicos. Por tanto, de los aminoácidos de la LacY que presentan carga, el 62 % son de tipo catiónico y el 38 % son aniónicos, aproximadamente. A pH fisiológico, la mayoría de sus aminoácidos son neutros y apolares.

Met Tyr Tyr Leu Lys Asn Thr Asn Phe Trp Met Phe Gly Leu Phe Phe Phe Tyr Phe
Phe Ile Met Gly Ala Tyr Phe Pro Phe Phe Pro Ile Trp Leu His Asp Ile Asn His Ile Ser
Lys Ser Asp Thr Gly Ile Ile Phe Ala Ala Ile Ser Leu Phe Ser Leu Leu Phe Gln Pro Leu
Phe Gly Leu Leu Ser Asp Lys Leu Gly Leu Arg Lys Tyr Leu Leu Trp Ile Ile Thr Gly
Met Leu Val Met Phe Ala Pro Phe Phe Ile Phe Ile Phe Gly Pro Leu Leu Gln Tyr Asn Ile
Leu Val Gly Ser Ile Val Gly Gly Ile Tyr Leu Gly Phe Cys Phe Asn Ala Gly Ala Pro Ala
Val Glu Ala Phe Ile Glu Lys Val Ser Arg Arg Ser Asn Phe Glu Phe Gly Arg Ala Arg
Met Phe Gly Cys Val Gly Trp Ala Leu Gly Ala Ser Ile Val Gly Ile Met Phe Thr Ile Asn
Asn Gln Phe Val Phe Trp Ile Gly Ser Gly Cys Ala Leu Ile Leu Ala Val Leu Leu Phe
Phe Ala Lys Thr Asp Ala Pro Ser Ser Ala Thr Val Ala Asn Ala Val Gly Ala Asn His
Ser Ala Phe Ser Leu Lys Leu Ala Leu Glu Leu Phe Arg Gln Pro Lys Leu Trp Phe Leu
Ser Leu Tyr Val Ile Gly Val Ser Cys Thr Tyr Asp Val Phe Asp Gln Gln Phe Ala Asn
Phe Phe Thr Ser Phe Phe Ala Thr Gly Glu Gln Gly Thr Arg Val Phe Gly Tyr Val Thr
Thr Met Gly Glu Leu Leu Asn Ala Ser Ile Met Phe Phe Ala Pro Leu Ile Ile Asn Arg Ile
Gly Gly Lys Asn Ala Leu Leu Leu Ala Gly Thr Ile Met Ser Val Arg Ile Ile Gly Ser Ser
Phe Ala Thr Ser Ala Leu Glu Val Val Ile Leu Lys Thr Leu His Met Phe Glu Val Pro
Phe Leu Leu Val Gly Cys Phe Lys Tyr Ile Thr Ser Gln Phe Glu Val Arg Phe Ser Ala
Thr Ile Tyr Leu Val Cys Phe Cys Phe Phe Lys Gln Leu Ala Met Ile Phe Met Ser Val
Leu Ala Gly Asn Met Tyr Glu Ser Ile Gly Phe Gln Gly Ala Tyr Leu Val Leu Gly Leu
Val Ala Leu Gly Phe Thr Leu Ile Ser Val Phe Thr Leu Ser Gly Pro Gly Pro Leu Ser Leu
Leu Arg Arg Gln Val Asn Glu Val Ala

Figura 18. Secuencia de aminoácidos de la LacY. En rojo se representan los aa aniónicos y en azul los aa catiónicos.

Mediante mutagénesis selectiva, métodos bioquímicos y métodos predictivos basados en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, se llegó a establecer un

modelo para la estructura secundaria de la LacY, como se muestra en la figura 19. La aplicación de diversos métodos espectroscópicos o inmunológicos a una extensa librería de mutantes de la proteína (más de 400), ha permitido proponer un modelo para la estructura terciaria (Kaback y Wu, 1997 y Kaback et al.,1997; Kaback et al., 2001) en el que se basó el primer mecanismo de acción (Venkatesan y Kaback, 1998).

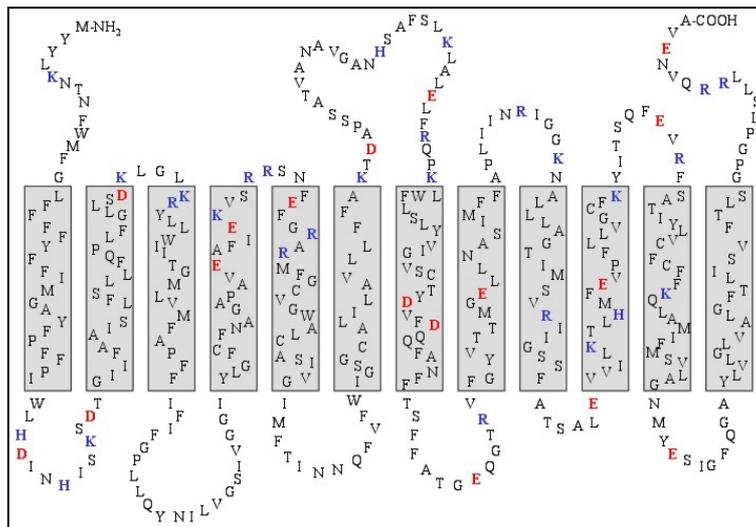


Figura 19. Estructura secundaria de la LacY. En rojo se representan los aa aniónicos y en azul los aa catiónicos. En gris se indican las regiones de transmembrana de la proteína desde la hélice I a la XII. Imagen modificada a partir de Kaback y Wu, 1999.

La estructura tridimensional, mostrada en la figura 20, fue obtenida mediante difracción de rayos X en el año 2003 (Abramson et al., 2003), empleando para ello el mutante C154G de LacY. Este modelo permitió establecer un mecanismo de acción más detallado.

La función transportadora de la proteína se realiza mediante un cambio conformacional de la misma. En el transporte activo secundario, la energía necesaria para llevar a cabo el transporte no procede del ATP, sino que se debe a la existencia de la llamada *fuerza protonomotora* o *protonomotriz*, concepto que hace referencia a la existencia de un potencial electroquímico. Esta diferencia de potencial es aprovechada por las proteínas transportadoras para conducir moléculas de mayor tamaño, tales como aminoácidos o disacáridos, en contra de un gradiente de concentración. A este mecanismo se le denomina *acoplamiento* o *transducción energética de membrana*.

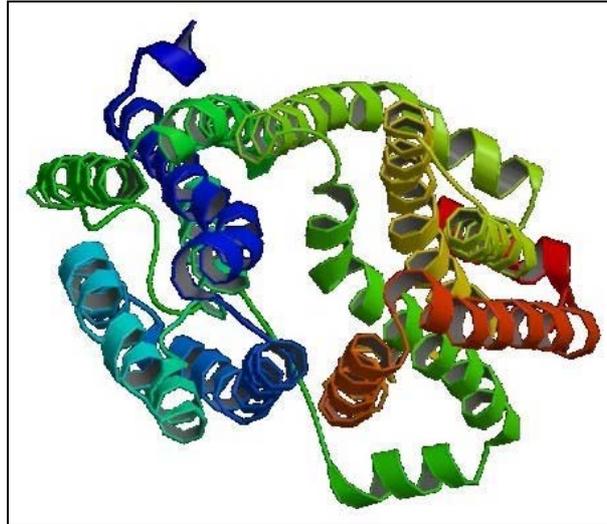


Figura 20. Modelo de la estructura terciaria de la LacY (1PV6 de PDB). Para facilitar su comprensión, cada una de las α -hélices se presenta de un color diferente.

Este tipo de transporte puede producirse de dos formas, esquematizadas en la figura 21:

- Simporte o Cotransporte: El ión y la molécula a transportar atraviesan la membrana siguiendo el mismo sentido.
- Antiporte o Contratransporte: El ión y la molécula a transportar atraviesan la membrana en sentidos opuestos.

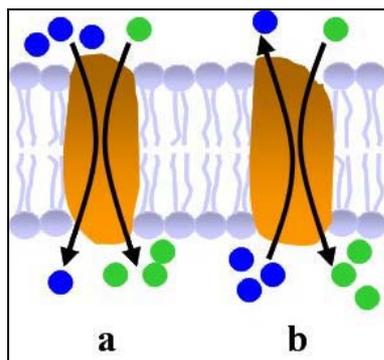


Figura 21. Procesos de transporte activo secundario.

- a) Proceso de simporte.
- b) Proceso de antiporte.

La estructura que la LacY adopta en la membrana da lugar a una cavidad hidrofílica que divide la estructura de la proteína en dos regiones. Esta cavidad se forma entre las hélices I, II, IV y V del dominio N-terminal y las hélices VII, VIII, X y XI del dominio C-terminal. El lugar de unión al sustrato se encuentra situado en esta cavidad

hidrofílica a una distancia similar entre cada lado de la membrana (Abramson et al., 2003). El mecanismo por el cual la LacY realiza el transporte de lactosa al interior celular puede ser explicado mediante un esquema cinético sencillo consistente en seis etapas (Kaback et al., 2001): (1) protonación de la proteína, (2) unión de la lactosa a la membrana, (3) cambio conformacional de la LacY que resulta en una translocación de la lactosa y el H⁺ a la parte opuesta de la membrana, (4) liberación del sustrato, (5) liberación del H⁺ y (6) cambio conformacional de la LacY a su forma original.

La LacY puede ser definida como un paradigma de proteína de transporte activo secundario pudiendo ser utilizada como modelo para el estudio de este tipo de proteínas. Es interesante mencionar su homología con proteínas transportadoras de antibióticos que pueden proporcionar resistencia frente a los mismos.

2.3. RECONSTITUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA

El modelo de membrana más ampliamente utilizado para la reconstitución de proteínas de membrana es el liposoma. El mecanismo por el cual se incorporan proteínas en la bicapa lipídica se conoce como *reconstitución*. Existen diversos métodos de reconstitución, aunque en todos ellos se requiere de liposomas y surfactantes específicos.

2.3.1. Liposomas

Un liposoma se puede definir como una vesícula esférica, formada por una o varias bicapas fosfolipídicas, la cual puede ser utilizada como modelo de membrana, o como vector para el transporte de determinadas moléculas.

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que tienden a agrupar sus regiones homólogas en medio acuoso. La preparación de los liposomas, generalmente se lleva a cabo por hidratación de las moléculas de lípido y agitación mecánica (Lasic, 1987a y b). El proceso de hidratación de los liposomas es un paso crítico en su formación ya que, en muchos casos, del proceso de hidratación dependerá el producto final. En general, una baja concentración del lípido, agitación vigorosa y una cierta cantidad de lípido cargado produce liposomas de pequeño tamaño, con pocas bicapas y homogéneos (Lasic y Martin, 1991).

Los liposomas se pueden clasificar en función de su estructura y de su tamaño en (Vance y Vance, 1996):

- Liposomas multilaminares grandes (MLV): Formados por más de una bicapa, dispuestas en forma concéntrica y separadas entre sí por amplios espacios acuosos. Los liposomas MLV, debido a su particular estructura se encuentran limitados al estudio físico de la organización de la bicapa ya que no son modelos biomiméticos.

- Liposomas unilaminares: Formados por una única bicapa, siendo por ello biomiméticos. Los liposomas unilaminares se pueden clasificar asimismo según su tamaño en:
 - Liposomas unilaminares grandes (LUV): Presentan un diámetro entre 50 y 500 nm. Son los más aptos para el estudio biofísico de las membranas biológicas, ya que su distribución lipídica entre la monocapa interna y la externa es aproximadamente de 1:1 (tabla 2).
 - Liposomas unilaminares pequeños (SUV): Presentan un diámetro entre 25 y 40 nm. Las dimensiones de estos liposomas condicionan su utilización como modelos de membrana, ya que su radio de curvatura es demasiado pequeño y su volumen interno no es suficiente ni tan solo para realizar estudios de permeabilidad o de intercambio de iones. La proporción de lípido entre la monocapa interna y la externa en estos liposomas es de aproximadamente 1:2 (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros diferenciales entre diferentes liposomas según su tamaño (Vance y Vance, 1996).

Diámetro (nm)	Relación molar MI/ME	V interno (μl/μmol)	Nº moléculas por vesícula	Nº vesículas por μmol de lípido
25	0,46	0,3	$4,8 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^{14}$
100	0,85	2,5	$9,7 \cdot 10^4$	$6,2 \cdot 10^{12}$
500	0,97	15,0	$2,6 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^{11}$

En la figura 22 se puede observar que los liposomas unilaminares se obtienen a partir de liposomas multilaminares, mediante diferentes métodos como pueden ser la sonicación (Huang, 1969), la extrusión (Hope et al., 1985) o la utilización de ciclos de congelación-descongelación, entre otros (Basu y Basu, 2002).

Existen métodos alternativos para la preparación de liposomas, además de la sonicación o la extrusión, uno de ellos está mediado por la utilización de surfactantes. Cuando se preparan liposomas por este método, adición y posterior eliminación de surfactantes, se requieren concentraciones bajas de lípido para obtener una buena homogeneidad de los liposomas finales (Wacker y Schubert, 1998). La formación de liposomas por este método se produce en cuatro etapas:

1. Adición de surfactante para dar lugar a la formación de micelas mixtas.
2. Eliminación del surfactante que se encuentre en forma monomérica, y que está en equilibrio con los agregados micelares. En esta primera etapa se inicia la formación de vesículas discoidales mixtas que se fusionan lateralmente.
3. Eliminación de las moléculas de surfactante que se encuentran formando parte de las micelas mixtas lípido-surfactante.
4. Reorganización de las moléculas de lípido y de las moléculas de surfactante residuales, dando lugar a la formación de liposomas estables.

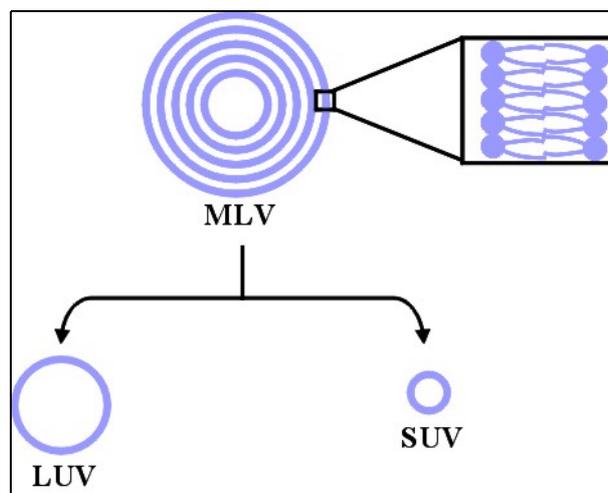


Figura 22. Clasificación de los liposomas en función de su tamaño.

Los liposomas formados mediante la técnica de utilización de surfactantes serán estables siempre que la concentración de surfactante residual se encuentre por debajo de su CMC.

Los liposomas, por su gran versatilidad en cuanto a composición lipídica, así como por su homogeneidad en tamaño, son ampliamente utilizados para el estudio de las diferentes propiedades y fenómenos que tienen lugar en la membrana celular. Asimismo, pueden ser utilizados en el ámbito biomédico y de investigación, como análogos que son de las membranas celulares naturales. La aplicación de los liposomas en investigación biológica y bioquímica, pueden clasificarse en las siguientes categorías (Basu y Basu, 2002):

- Interacción proteína-lípido.
- Regulación de la función de las proteínas por lípidos.
- Dinámica de la membrana.
- Estructura de proteínas asociadas a la membrana.
- Sistemas de liberación de biomoléculas y pequeñas moléculas en las células.

2.3.2. Surfactantes

Los surfactantes son moléculas anfipáticas constituidas por una cabeza polar y una cadena hidrocarbonada apolar (en algunos casos dos). Son moléculas imprescindibles, en muchos casos, para la extracción y purificación de proteínas de membrana (Jones et al., 1987), así como para su posterior reincorporación en proteoliposomas, teniendo un papel crucial en la obtención de cristales 2D.

Los surfactantes pueden ser de diversos tipos, dependiendo de su estructura química, aunque comúnmente se suelen clasificar en función de su grupo polar (Jones y Chapman, 1995) en:

- Iónicos: Presentan una o más cargas en su cabeza polar.
 - Aniónicos: Cargados negativamente.
 - Catiónicos: Cargados positivamente.
 - Zwiteriónicos: Presentan una carga positiva y una negativa. Su carga neta es cero.
- No iónicos: No presentan cargas superficiales.

En general, los surfactantes no iónicos son considerados como agentes capaces de solubilizar proteínas sin alterar de forma importante sus características estructurales. En algunos casos, sobretodo en surfactantes de cadena corta (entre 7 y 10 átomos de carbono en su cadena alifática) puede producirse un efecto de inactivación de la proteína. Este efecto es menos habitual en surfactantes de cadena media (cadenas de entre 12 y 14 carbonos) o larga (le Maire et al., 2000). Los surfactantes iónicos son muy buenos agentes solubilizadores, aunque presentan el inconveniente que pueden dar lugar a la desnaturalización de las proteínas.

En la figura 23 se muestra la estructura química de dos de los surfactantes no iónicos más ampliamente utilizados en la reconstitución de proteínas de membrana funcionalmente activas en bicapas lipídicas (Robl et al., 2000), el OG y el DDM. El OG es un surfactante considerado de cadena corta, presenta una cadena hidrocarbonada formada por 8 átomos de carbono y es utilizado habitualmente en la reconstitución de porinas. El DDM es un surfactante de cadena media, presenta 12 átomos de carbono en su cadena hidrocarbonada y es ampliamente utilizado en la solubilización de proteínas de membrana con mantenimiento de sus propiedades funcionales (le Maire et al., 2000).

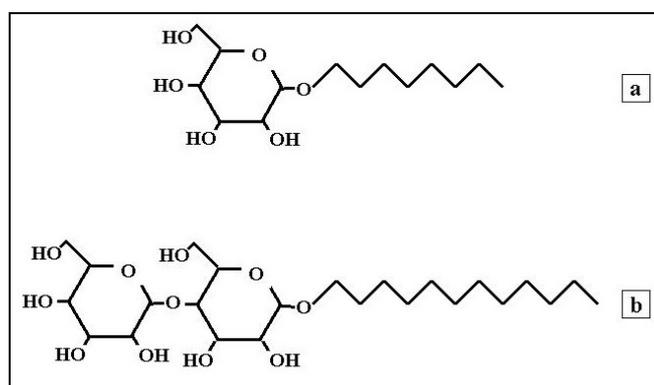


Figura 23. Estructura química de los surfactantes: (a) OG. (b) DDM.

Los dos parámetros principales que definen las propiedades fisicoquímicas de un surfactante son su concentración micelar crítica y su número de agregación.

2.3.3. Micelas

Las micelas pueden definirse como agregados formados por la asociación espontánea de moléculas anfipáticas, con el fin de reducir la superficie de contacto de las regiones hidrofóbicas con el solvente acuoso. Dependiendo de su forma y de sus características, estas moléculas pueden formar las estructuras siguientes (figura 24):

- Micela: Las moléculas se organizan de forma que la región hidrofílica queda expuesta hacia el exterior y la lipofílica hacia el interior.
- Micela inversa: Las moléculas se organizan de forma que la región lipofílica queda expuesta hacia el exterior y la región hidrofílica hacia el interior.

- Micela tubular: Micelas dispuestas de tal manera que forman una estructura cilíndrica. Las micelas tubulares pueden ser simples o inversas.

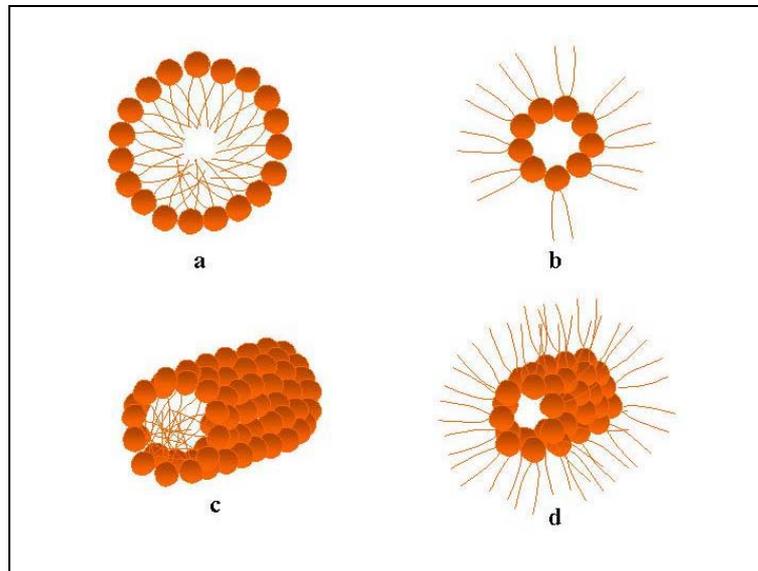


Figura 24. Tipos de micelas: **(a)** Micela. **(b)** Micela inversa. **(c)** Micela tubular. **(d)** Micela tubular inversa.

El tamaño y forma de la micela depende de las propiedades de las cadenas hidrocarbonadas, de esta forma, las micelas pueden ser esféricas, elipsoidales, o similares a un disco plano (Bergethon, 1998), aunque la forma más común es la esférica.

La unidad fundamental de la micela no siempre es la molécula del fosfolípido, otras moléculas anfipáticas, como los surfactantes, por ejemplo, pueden dar lugar a la formación de micelas, e incluso algunas proteínas pueden asociarse dando lugar a estructuras similares a micelas.

En el caso de las proteínas, las estructuras formadas pueden asemejarse a micelas, aunque no puede definirse un valor de concentración micelar crítica. El proceso por el cual se agregan las proteínas presenta una baja cooperatividad, y el grado de asociación aumenta con la concentración, dando lugar a dímeros, trímeros, tetrameros, oligómeros o polímeros (Jones y Chapman, 1995).

2.3.3.i. Concentración micelar crítica

La concentración micelar crítica (CMC) se define como la concentración a partir de la cual las moléculas se agrupan para dar lugar a la micela. El valor de la CMC depende del balance lipofilia-hidrofilia de la molécula anfipática. Las moléculas que presentan regiones hidrofóbicas largas, generalmente presentan valores de CMC bajos. La CMC disminuye conforme aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada y se encuentra condicionada por las propiedades del medio. La fuerza iónica y la temperatura afectan a las interacciones electrostáticas entre los grupos polares, afectando así a la determinación de la CMC (Jones y Chapman, 1995).

La determinación de la CMC puede realizarse mediante diferentes técnicas, aunque en todas ellas se calcula utilizando unas condiciones experimentales determinadas, en las cuales sólo se varía la concentración de la molécula. Las técnicas empleadas para determinar la CMC experimentalmente se basan en los cambios de las propiedades fisicoquímicas del medio al formarse las micelas. Estos cambios pueden ser en la tensión superficial (γ), en la conductividad (k) o en la turbidancia (τ). La CMC también puede ser calculada empleando sondas fluorescentes sensibles a la formación de las micelas, un ejemplo de ello se muestra en la figura 25, empleando la sonda, ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS). La CMC viene definida por los cambios en la pendiente de las curvas obtenidas y corresponde al punto en el cual aparecen las primeras micelas en la solución. El valor de la CMC puede variar ligeramente en función de la técnica empleada para determinarla.

La determinación de la CMC es indispensable para la utilización de surfactantes en la incorporación de proteínas en bicapas lipídicas para dar lugar a proteoliposomas. A concentraciones superiores a la CMC, los surfactantes presentan una actividad de disrupción de la vesícula lipídica, mientras que por debajo de la misma, no presentan esta actividad, permitiendo mantener la estabilidad de la bicapa.

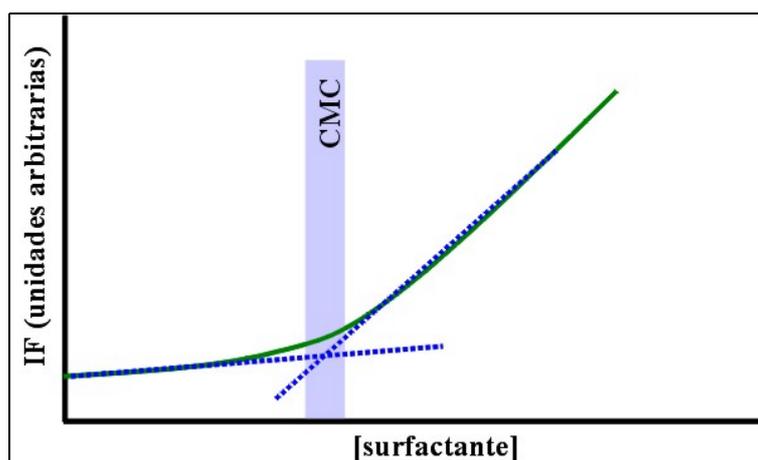


Figura 25. Variación de la intensidad de fluorescencia de una sonda fluorescente en función de la concentración de surfactante.

Los surfactantes utilizados para la incorporación de proteínas en modelos de membrana fueron el DDM y el OG, cuyas propiedades fisicoquímicas se incluyen en tabla 3 y cuya CMC fue corroborada experimentalmente por fluorimetría.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los surfactantes OG y DDM (le Maire et al., 2000).

	M (g/mol)	CMC	Nº Agregación
OG	292	19 – 25 mM (0,55 – 0,73 %)	~ 90
DDM	511	0,18 mM (0,009 %)	110-140

2.3.4. Micelas mixtas

Las micelas pueden estar constituidas por moléculas anfipáticas de diferente tipo, denominándose micelas mixtas. Como se puede apreciar en la figura 26, se pueden distinguir dos tipos principales de micelas mixtas:

- Micelas mixtas fosfolípido-surfactante: Formadas a partir de la combinación de moléculas de fosfolípido y surfactante.
- Micelas mixtas surfactante-proteína: Formadas por la envoltura de moléculas de surfactante alrededor de los dominios hidrofóbicos de las proteínas dando lugar

a un cinturón de surfactante alrededor de la región hidrofóbica de la proteína (le Maire et al., 2000).

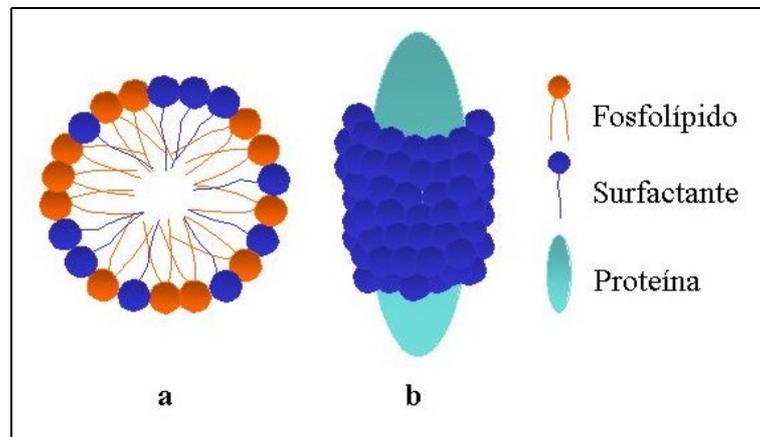


Figura 26. Micelas mixtas: (a) Fosfolípido-surfactante. (b) Surfactante-proteína.

La combinación de estas micelas mixtas da lugar a una nueva micela formada por una molécula de proteína rodeada de un cinturón de moléculas de surfactante y moléculas de fosfolípido. Estas micelas ternarias pueden ser denominadas como *micelas lípido-proteicas*. A partir de las micelas lípido-proteicas y mediante reducción progresiva de las moléculas de surfactante se forman los proteoliposomas y, eventualmente, los cristales bidimensionales.

2.3.4.i. Micelas formadas por surfactante y fosfolípido

La obtención de micelas mixtas constituidas por surfactante y fosfolípido se consigue mediante la acción disruptora de los surfactantes sobre la estructura de los liposomas preformados.

Se acepta que la solubilización de las bicapas lipídicas por parte de los surfactantes se produce siguiendo un modelo que consta de tres etapas (Lichtenberg et al., 1983; Csúcs y Ramsden, 1998; le Maire et al., 2000):

- I. Distribución de las moléculas de surfactante entre el solvente acuoso y la bicapa lipídica, provocando un aumento de tamaño de las vesículas.

- II. Coexistencia, en equilibrio termodinámico, de las bicapas saturadas de surfactante con las micelas mixtas fosfolípido-surfactante.
- III. Total solubilización y combinación de las moléculas de fosfolípido con las moléculas de surfactante en forma de micelas mixtas.

El proceso de formación de estas micelas mixtas, esquematizado en la figura 27, puede ser estudiado mediante las variaciones de dispersión de la luz producidas por las estructuras presentes en las diferentes etapas del proceso.

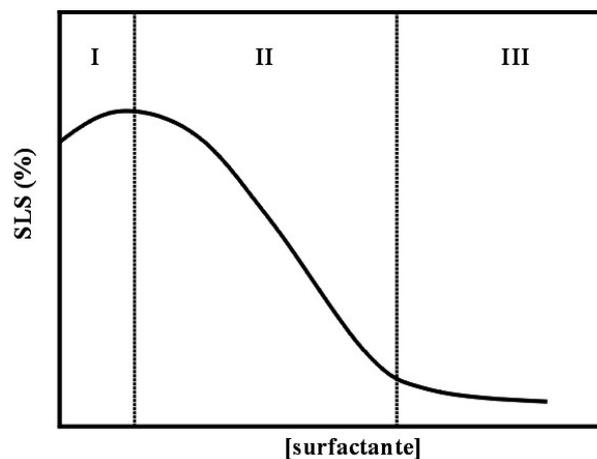


Figura 27. Proceso de solubilización de vesículas lipídicas por adición de surfactantes.

Las micelas mixtas de fosfolípido y surfactante presentan características diferentes dependiendo de la concentración de cada uno de sus componentes. A bajas concentraciones de surfactante se encuentran vesículas en solución, mientras que a altas concentraciones de surfactante se obtienen las micelas mixtas. Durante la transición de vesículas a micelas mixtas existe un rango de coexistencia entre ellas. Las concentraciones a las que se produce cada etapa dependen del fosfolípido y del surfactante utilizados (Lichtenberg et al., 2000). Del estudio detallado del proceso de disrupción de liposomas mediante surfactantes, se obtienen los parámetros de solubilización que es necesario conocer para realizar la reconstitución de proteínas de membrana en liposomas (Ollivon et al, 2000).

2.3.4.ii. Micelas formadas por surfactante y proteína

Las propiedades anfipáticas de las proteínas vienen determinadas por los aminoácidos que forman su estructura. Estos aminoácidos pueden condicionar también la conformación y estabilidad de la proteína en su estado nativo (Bigelow, 1967).

La utilización de surfactantes para la extracción de proteínas de las membranas biológicas presenta dos importantes ventajas, por una parte, permite la extracción poco agresiva de las proteínas mediante solubilización de la membrana, y por otra parte mantiene las propiedades estructurales de las proteínas protegiendo las regiones hidrofóbicas de las mismas del medio acuoso (le Maire et al., 2000). Los surfactantes a utilizar en el proceso de extracción de las proteínas y en el proceso de reconstitución de las mismas, no deben provocar su desnaturalización, por esta razón, suelen emplearse surfactantes no iónicos.

La estructura que adoptan las proteínas en presencia de surfactantes es de difícil estudio, aunque se han propuesto diversos modelos (Jones y Chapman, 1995):

- Modelo de “complejo micelar” (*micellar complex*): La proteína se ensambla con las moléculas de surfactante para dar lugar a una micela de tamaño definido.
- Modelo de “filamento” (*rod-like particle*): La cadena polipeptídica de la proteína constituye el núcleo de un filamento de aproximadamente 3,6 nm de diámetro, rodeado por el surfactante.
- Modelo de “pajarita” (*pearl-necklace*): La cadena polipeptídica de la proteína se asemeja al cordón de una pajarita, en el que las partículas del surfactante se encuentran formando agrupaciones en las regiones constituidas por hélices α .
- Modelo de “ovillo de hélices α ” (*α -helix-random coil*): El surfactante envuelve las hélices α de la proteína, pero altera las regiones constituidas por hojas β .
- Modelo de “hélice flexible” (*flexible helix*): Las moléculas de surfactante forman una micela cilíndrica y flexible en la que se envuelve la cadena polipeptídica de la proteína y se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno, por ejemplo.

2.3.5. Proteoliposomas

El proceso de reconstitución de proteínas de membrana en liposomas da lugar a la formación de los proteoliposomas. Los proteoliposomas, se pueden definir como liposomas en los que se encuentran incorporadas proteínas en su estructura.

2.3.5.i. Formación

La formación de los proteoliposomas es más compleja que la formación de los liposomas, ya que las proteínas se deben incorporar correctamente en la estructura de la bicapa. La inserción de las proteínas en la bicapa se realiza mediante la utilización de surfactantes como agentes solubilizadores de la misma.

El proceso por el cual se forman los proteoliposomas se puede resumir en cuatro etapas (Rigaud y Levy, 2003), esquematizadas en la figura 28:

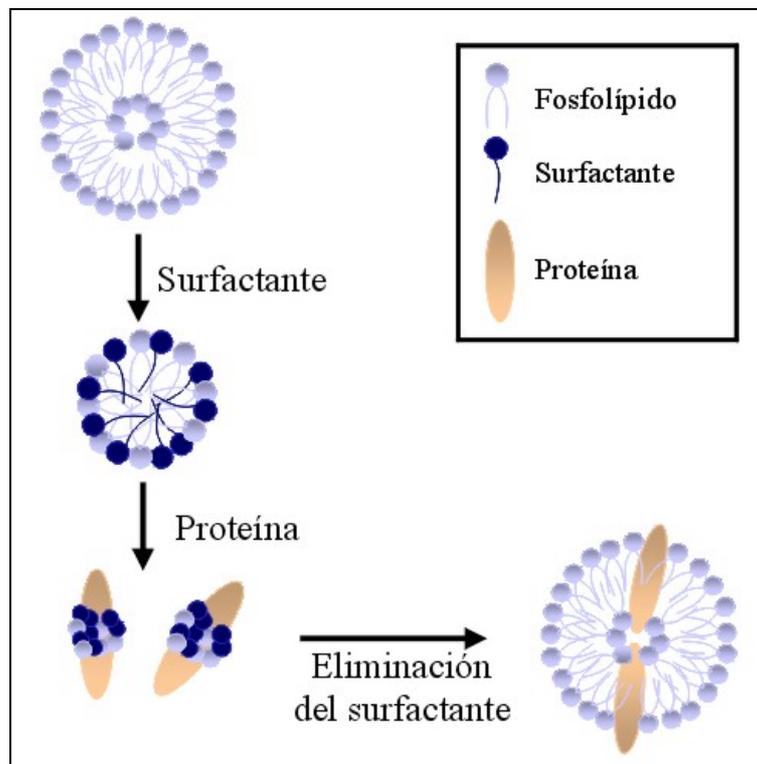


Figura 28. Esquema del proceso de formación de proteoliposomas.

1. Preparación de liposomas de composición lipídica determinada.
2. Solubilización de los liposomas mediante surfactantes para dar lugar a la total formación de micelas mixtas fosfolípido-surfactante.
3. Adición de las micelas mixtas proteína-surfactante para obtener una determinada LPR (relación lípido-proteica).
4. Eliminación selectiva del surfactante.

La incorporación de la proteína en la estructura del proteoliposoma puede producirse por dos mecanismos (Paternostre et al., 1988):

- La proteína participa desde el principio en el proceso de formación de la membrana.
- Los liposomas se forman inicialmente, tras la eliminación parcial del surfactante, y la proteína se incorpora en su estructura preformada.

La incorporación de las proteínas en los proteoliposomas depende tanto de la velocidad de eliminación del surfactante como del proceso empleado en sí mismo (Rigaud et al., 1988). La eliminación de los surfactantes para dar lugar a la formación de los proteoliposomas puede realizarse por diversos métodos, que dependen, generalmente, de las características del propio surfactante a eliminar. Las principales técnicas a seguir para la eliminación del surfactante son (Rigaud et al., 1998):

- Diálisis: Es uno de los mecanismos habitualmente empleados para la eliminación de surfactantes con una CMC alta. La diálisis consiste en la eliminación del surfactante mediante difusión de sus formas monoméricas hacia el exterior de la membrana de diálisis. Este proceso presenta la ventaja que no se modifica la concentración de lípido ni de proteína, mientras que se reduce de forma selectiva la concentración de surfactante. Uno de los principales inconvenientes es la necesidad de cambiar regularmente la solución de diálisis y la duración del proceso.
- Cromatografía en gel: Los surfactantes con una CMC elevada forman micelas pequeñas que pueden ser fácilmente eliminadas mediante técnicas de cromatografía en gel. Conforme se reduce la cantidad de surfactante presente en

la muestra se forman los proteoliposomas, que presentan mayor tamaño que las micelas, de forma que son eluidos más rápidamente, quedando éstas retenidas en el gel. La principal ventaja de esta técnica es la rapidez en la formación de los proteoliposomas, aunque esta ventaja puede dar lugar a un inconveniente y es la poca uniformidad en el tamaño de las vesículas resultantes. Otro de los principales inconvenientes de esta técnica es la dilución de la muestra que se produce durante el proceso.

- Dilución: El método de dilución consiste en la reducción de la concentración del surfactante por un proceso de dilución y posterior centrifugación de la muestra. La principal ventaja de esta técnica es la rapidez en la formación de las vesículas y su posterior recuperación en un volumen reducido. El grado de dilución aplicado influye directamente en la homogeneidad y distribución de las moléculas de la proteína en la bicapa, siendo esto un inconveniente de la técnica. En algunas ocasiones, si el proceso es demasiado rápido puede darse el caso de la formación de fragmentos de proteoliposomas y no de vesículas.
- Adsorción hidrofóbica en esferas de poliestireno: La eliminación más indicada para surfactantes con una CMC baja es la utilización de esferas recubiertas de un material adsorbente, generalmente resinas hidrofóbicas. Este método no produce efecto de dilución de la muestra y se considera un método rápido de eliminación del surfactante. Uno de los inconvenientes que presenta esta técnica es la posibilidad de adsorción de pequeñas cantidades de lípido e incluso de proteína, aunque se ha demostrado que esta adsorción es negligible respecto a la adsorción que se produce del surfactante.

2.3.5.ii. Estructura

La presencia de proteínas integradas en la bicapa determina la estructura de los proteoliposomas. La integración de las proteínas en el seno de la membrana debe ser tal, que en su interacción con los lípidos circundantes que forman la bicapa produzcan una adaptación máxima, con el fin de evitar la salida o entrada de sustancias. Según la forma y el tamaño de las proteínas, la integración puede dar lugar a situaciones como las esquematizadas en la figura 29 (Shinitzky, 1993; Dumas et al., 1999; Dan y Safran, 1998; Lee, 2003). Los fosfolípidos que rodean inmediatamente a la proteína deben

adaptarse, ser suficientemente compresibles y/o extensibles, para que la membrana quede perfectamente sellada. Son los denominados *fosfolípidos anulares* (Lee, 2003).

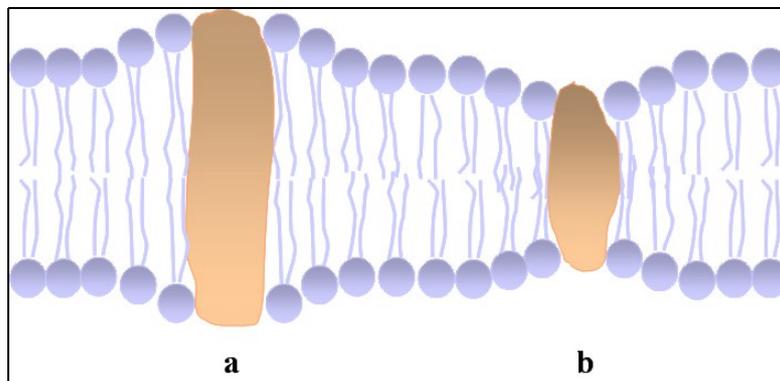


Figura 29. Sección de la bicapa de un proteoliposoma (Shinitzky, 1993): **(a)** Proteína de mayor tamaño que la bicapa. **(b)** Proteína de menor tamaño que la bicapa.

Los proteoliposomas, aunque son los modelos de membrana más adecuados para el estudio de proteínas, presentan una limitación importante y es que las proteínas integradas en su estructura pueden no presentar la orientación correcta, contrariamente a lo que ocurre en una membrana natural (Vance y Vance, 1996). La orientación que adopten las proteínas en el proteoliposoma puede estar condicionada por el surfactante empleado y por el estado de disrupción de los liposomas (Rigaud y Levy, 2003).

Existen determinados fosfolípidos, considerados como “cofactores”, que interaccionan específicamente con algunas proteínas de membrana y condicionan su actividad, la ausencia de los mismos hace que la proteína no sea activa (Robl et al., 2000; Bogdanov y Dowhan, 1995; Bogdanov et al., 2002). La gran variedad de fosfolípidos presentes en una membrana biológica puede ser explicada teniendo en cuenta la gran cantidad de proteínas presentes en la misma y los diferentes requerimientos de cada una de ellas.

2.3.5.iii. Aplicaciones

La información que se obtiene de la reconstitución de proteínas en proteoliposomas está relacionada con las diversas propiedades de la membrana (Jones y Chapman, 1995):

- Estructura de las proteínas de membrana en el ambiente lipídico: disposición que adoptan las cadenas polipeptídicas en la bicapa y ordenación de las posibles subunidades proteicas.
- Función de las proteínas en la membrana, particularmente en el caso de receptores y transportadores.
- Influencia de la composición y el estado físico del ambiente lipídico en la estructura y función de las proteínas de membrana.
- Contribución particular de las proteínas en las propiedades de superficie de las membranas celulares y cómo estas propiedades pueden afectar a la naturaleza de la interacción entre células.

Existen unas limitaciones muy importantes en el estudio de proteoliposomas con proteínas integrales (Robl et al., 2000):

- Proteínas específicas, tales como las permeasas, se encuentran presentes en las membranas plasmáticas en cantidades demasiado pequeñas para estudios de reconstitución. El acceso a proteínas recombinantes ha permitido solventar, en muchos casos, esta limitación.
- Durante los procesos de solubilización y purificación, las proteínas integrales de membrana pueden ser inactivadas.
- Cuando la actividad de la proteína reconstituida depende de una fuente de energía, se requiere de un sistema generador independiente. Este sistema generador puede depender directamente de la composición lipídica de la membrana.

2.3.6. Bicapas planas

Las bicapas planas (SPB, *Surface Planar Bilayers*) son bicapas lipídicas extendidas en un soporte plano. La formación de las SPB puede realizarse a partir tanto de liposomas como de proteoliposomas.

2.3.6.i. Formación

Las bicapas planas pueden obtenerse mediante diferentes técnicas:

- Películas de Langmuir-Blodgett: Extracción consecutiva de dos monocapas que dan lugar a una bicapa sobre un soporte plano (Singh y Keller, 1990; Hui et al., 1995).
- Black Lipid Bilayer: Formación de una bicapa lipídica en un agujero de aproximadamente $0,4 \text{ mm}^2$ situado entre dos compartimentos de teflón (Benz et al., 1978, 1985).
- Extensión de liposomas: Formación de una bicapa plana por ruptura y extensión de vesículas lipídicas sobre un soporte plano (McConnell et al., 1986).

El método más empleado para la formación de una SPB es la extensión de vesículas, generalmente unilaminares, sobre un soporte plano hidrofílico como puede ser la mica muscovita o hidrofóbico, como el grafito. Al entrar en contacto con el soporte, las vesículas se rompen y se forman regiones lipídicas dinámicas, en forma de bicapa si el soporte es hidrofílico y en forma de monocapa si éste es hidrofóbico (Kalb et al., 1992; Nollert et al., 1995; Puu y Gustafson, 1997). La extensión de estas regiones se produce en función de la movilidad de las moléculas de fosfolípido que forman las vesículas. La formación de la SPB se consigue mediante un proceso de fusión de las bicapas cercanas y una posterior relajación de sus moléculas dando lugar al “crecimiento” de la SPB sobre la superficie del sustrato (McConnell et al., 1986; Jass et al., 2000; Muresan y Lee, 2001).

Las etapas de las que consta el proceso de extensión de una SPB se presentan en forma de esquema en la figura 30 y se resumen en (Reviakine y Brisson, 2000):

1. Adsorción: Transición entre la vesícula en solución (vesícula libre) y la vesícula unida a la superficie del sustrato.
2. Ruptura: Transición entre la vesícula adsorbida y la formación de un “disco” constituido por una bicapa.

3. Fusión: Formación de vesículas de mayor tamaño a partir de las vesículas en fase de extensión.
4. Coalescencia: Unión entre bicapas extendidas para dar lugar a una bicapa de mayor tamaño.

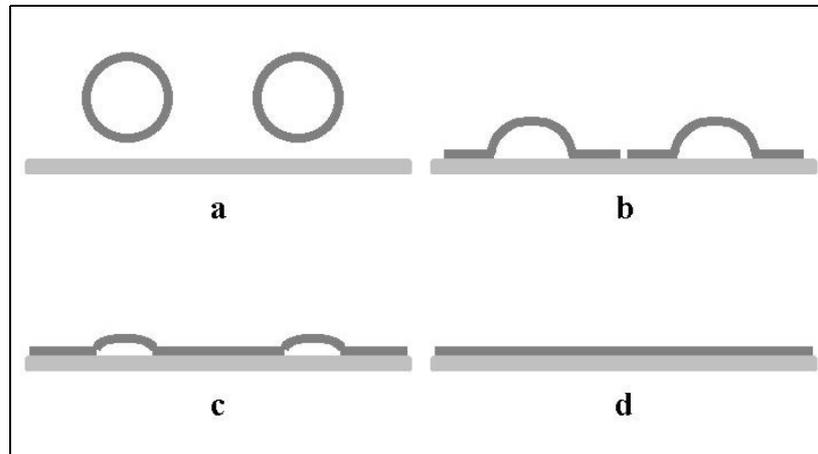


Figura 30. Proceso de formación de una SPB: **(a)** Deposición de vesículas lipídicas sobre el soporte. **(b)** Ruptura de las vesículas. **(c)** Fusión entre las vesículas. **(d)** Completa extensión de la SPB.

El proceso por el cual se produce la ruptura de los liposomas para dar lugar a una bicapa simple es poco conocido (Zhdanov y Kasemo, 2001). Se ha propuesto un mecanismo por el cual tras la adhesión de los liposomas sobre el sustrato, éstos se extienden, aplanándose desde su región periférica hacia el centro de los mismos constituyendo una bicapa plana doble. El paso de bicapa doble a simple se produciría mediante deslizamiento de una bicapa sobre la otra (Jass et al., 2000).

La extensión de las SPB depende de múltiples factores como pueden ser: la composición lipídica, la temperatura, la fuerza iónica del medio o la presencia de cationes divalentes, entre otros. La presencia de cationes Ca^{2+} en solución favorece la formación de la SPB, tanto en lo que respecta a la adsorción de las vesículas sobre el soporte, como a la fusión entre las mismas (Reviakine y Brisson, 2000).

2.3.6.ii. Aplicaciones

La extensión de bicapas planas permite el estudio detallado de las mismas, tanto de su superficie, como de sus propiedades fisicoquímicas o de la acción que produce la interacción con otras moléculas. Algunas de las principales aplicaciones de las bicapas planas son:

- Estudio de la estructura superficial de una SPB constituida por una mezcla de lípidos, así como las posibles variaciones en las propiedades fisicoquímicas de los lípidos que la forman (Beckmann et al., 1998; Giocondi et al., 2001; Tokumasu et al., 2003a).
- Estudios de la actividad de determinadas moléculas sobre la estructura de las bicapas (Santos et al., 1998; Merino et al., 2003, Berquand et al., 2004).
- Realización de estudios de conductancia con proteínas formadoras de canales reconstituidas en bicapas (Ruiz et al., 2004a).
- Estudios de las posibles variaciones estructurales producidas en la superficie de las bicapas por péptidos y/o proteínas (Mou et al., 1996; Merino et al., 2005a, 2005b).

En algunos casos, las proteínas o enzimas presentan una orientación o localización específica en la bicapa tras la reconstitución. El conocimiento de esta orientación o localización de la molécula en la SPB, así como la actividad que presente la proteína, es fundamental para determinadas aplicaciones, como puede ser el diseño y construcción de biosensores (Nikolelis et al., 1999).

2.3.7. Cristalización 2D de proteínas de membrana

La cristalización bidimensional de proteínas de membrana es el método por el cual se obtienen cristales 2D formados en un ambiente biomimético, en presencia de moléculas de fosfolípido que rodean y confieren estabilidad a las moléculas de proteína (Kühlbrandt, 1992).

2.3.7.i. Formación de cristales 2D

Algunas proteínas se encuentran cristalizadas en 2D *in vivo*. El caso más conocido es la bacteriorodopsina, aunque no es la única (Kessel et al., 1988; Rachel et al., 1990; Reviakine et al., 1998). La cristalización *in vivo*, no es frecuente, de manera que se suele proceder a la reconstitución artificial de las proteínas por diferentes métodos.

El proceso de cristalización 2D de una proteína de membrana es muy similar al proceso de integración de la proteína en una bicapa lipídica para dar lugar a un proteoliposoma. La principal diferencia entre ambos procedimientos es la velocidad de extracción del surfactante, que durante el proceso de cristalización debe ser más lenta y progresiva que en el caso de la formación de proteoliposomas (Dolder et al., 1996; Rigaud et al., 1997).

La formación de cristales bidimensionales se fundamenta en un alto grado de ordenación de la proteína en una matriz lipídica modelo, preferentemente biomimética. El grado de ordenación y agrupación necesario para la formación de este tipo de cristales, requiere una relación lípido-proteica muy baja ($LPR < 2$), así como la adición y lenta eliminación del surfactante adecuado, como se puede apreciar en el esquema presentado en la figura 31.

El método mediante el cual una proteína cristaliza en dos dimensiones depende muy estrechamente de sus características fisicoquímicas, aunque se pueden establecer, en general, dos etapas comunes en el proceso de cristalización 2D (Mosser, 2001; Hasler et al., 1998):

- Formación de micelas ternarias proteína-surfactante-fosfolípido.
- Eliminación del surfactante.

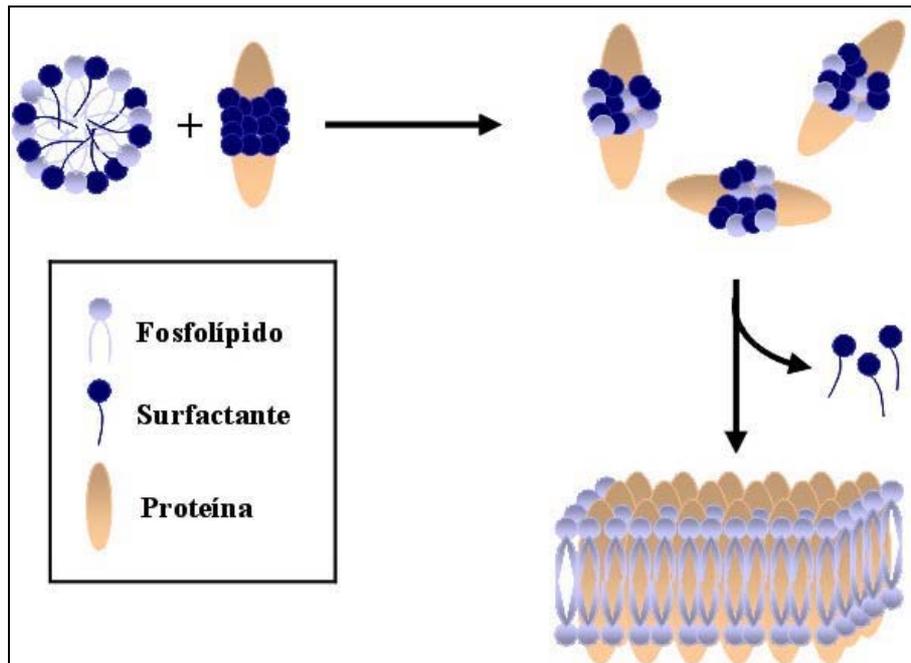


Figura 31. Proceso de reconstitución en forma de cristal 2D de una proteína de membrana mediante el uso de surfactantes.

➤ **Formación de micelas ternarias proteína-surfactante-fosfolípido**

Las proteínas de membrana presentan una elevada hidrofobicidad como característica común, limitando su estabilidad en solución acuosa. La adición de surfactante, en condiciones no desnaturantes, aumenta la estabilidad de las proteínas en medio acuoso. Las moléculas de proteína se encuentran en forma de pequeñas micelas mixtas de surfactante en solución. Estas micelas se ponen en contacto con micelas mixtas preformadas de fosfolípido-surfactante a una LPR adecuada al proceso de cristalización a realizar.

El fundamento de la cristalización es la sustitución de las moléculas de surfactante por moléculas de fosfolípido que darán lugar al cristal bidimensional.

➤ **Eliminación del surfactante**

Existen descritos tres mecanismos principales para la eliminación del surfactante en el proceso de cristalización 2D (Mosser, 2001):

- Dilución: El proceso consiste en la eliminación del surfactante mediante varios ciclos de dilución y centrifugación de la muestra. La muestra debe ser diluida en un volumen 40 veces superior al inicial y posteriormente recuperada mediante ultracentrifugación. Este proceso debe ser repetido un mínimo de 3 veces, aunque el número de ciclos varía en función del surfactante utilizado. El método de dilución es bastante rápido, aunque conlleva a una pérdida considerable de muestra y a un elevado riesgo de fragmentación de los cristales formados.
- Diálisis: La eliminación del surfactante se produce sin variar el volumen de la muestra. El método consiste en la introducción de la muestra mediante una jeringuilla en un *cassette* de diálisis (Slide-A-Lyzer[®]), como el mostrado en la figura 32, que será introducido en un recipiente con la solución de diálisis adecuada. El proceso de diálisis dura entre 5 y 7 días y la solución de diálisis debe ser renovada cada 24 horas. El método de diálisis es el más ampliamente utilizado, ya que ha demostrado ser el más eficaz para cualquier tipo de surfactante y presenta poca pérdida de muestra. El principal inconveniente de éste método es su lentitud.



Figura 32. *Cassettes* de diálisis Slide-A-Lyzer[®].

- Adsorción: Esta técnica se basa en la eliminación del surfactante por adsorción del mismo sobre la superficie de unas pequeñas esferas porosas de poliestireno denominadas Bio-Beads[®] SM-2. Este método presenta una elevada eficacia en aquellos surfactantes para los cuales ha sido preparada la superficie de las Bio-Beads[®], por tanto, no es válido para cualquier tipo de muestra. Una ventaja importante es la poca pérdida de muestra, la cual es debida principalmente a una

posible adhesión del lípido sobre la superficie de las esferas, así como a la rapidez del método (< 72 horas).

2.3.7.ii. Cristalización con lípidos funcionalizados

En algunos casos, si la proteína a cristalizar presenta características de afinidad con la matriz lipídica se puede llegar a obtener una cristalización 2D completamente selectiva. Éste sería el caso de la afinidad existente entre fosfolípidos biotinilados y la estreptavidina (Reviakine y Brisson, 2001) o entre lípidos que presenten NTA-Ni en su región superficial y proteínas con una cola de histidinas terminal.

Se han utilizado lípidos funcionalizados con NTA-Ni para dar lugar a monocapas, formadas en una cubeta de teflón de dimensiones reducidas, en las que anclar selectivamente las moléculas de proteína en la subfase y posteriormente realizar la cristalización 2D, también en la subfase (Lévy et al, 1999; Lebeau et al., 2001). Este tipo de cristalización permite obtener cristales con todas las moléculas de proteína orientadas hacia la misma región de la bicapa.

2.3.7.iii. Parámetros de cristalización

La cristalización bidimensional es un proceso que requiere del conocimiento y control de múltiples parámetros, en la mayoría de los casos críticos, para la correcta obtención de un cristal ordenado. Asimismo, la cristalización se puede encontrar afectada por diversos factores que dependen en cada caso de la proteína a cristalizar y que deben ser ensayados detenidamente con el fin de establecer las condiciones idóneas para la obtención de cristales 2D de suficiente calidad y resolución.

Los principales factores que deben tenerse en cuenta son (Kühlbrandt, 1992; Mosser, 2001; Hunte et al., 2003):

- Proteína: La pureza y cantidad de la proteína a cristalizar son algunos de los parámetros limitantes del proceso de cristalización. Cuanto mayor es la pureza de la proteína, mayor es la calidad del cristal obtenido. La cantidad de proteína

requerida para el proceso de cristalización oscila entre 0,5 y 1,0 mg/mL, concentraciones inferiores son consideradas insuficientes para dar lugar a la correcta formación de cristales 2D por los métodos tradicionales, aunque es cierto que se han desarrollado nuevos métodos de cristalización en los que se requieren cantidades de proteína muy inferiores (Lévy et al., 1999, 2001). La proteína asimismo debe encontrarse preferiblemente en forma oligomérica, y debe presentar una elevada estabilidad en solución, estabilidad que en muchos casos es proporcionada por la presencia de surfactantes.

- Surfactante: El surfactante utilizado para la purificación de la proteína y para su posterior incorporación en la matriz lipídica debe garantizar la estabilidad de la proteína durante todo el proceso tanto de extracción como de reincorporación en la bicapa lipídica. La elección del surfactante dependerá tanto de las características de la proteína como de las características del propio surfactante, que a su vez condicionarán la elección del método de extracción del mismo. En general, los surfactantes más empleados son los no iónicos, concretamente los que presentan cadenas hidrocarbonadas de longitud media (baja CMC) y corta (elevada CMC).
- Lípido: La correcta elección del lípido es fundamental para la cristalización 2D ya que es la matriz en la que se deben disponer las moléculas de proteína. Los lípidos más comúnmente utilizados son aquellos que semejan las condiciones naturales en las que se encuentra la proteína, presentando cadenas hidrocarbonadas de entre 16 y 18 átomos de carbono y que se encuentran en estado fluido a la temperatura de trabajo. Así, los fosfolípidos mayoritariamente empleados son: DMPC, POPC, DOPC, DOPG y el extracto lipídico de *E. coli*.
- LPR: La relación entre lípido y proteína, tradicionalmente expresada en peso, que se requiere para la obtención de cristales bidimensionales suele ser muy baja, debido a la diferencia de tamaño existente entre una molécula de fosfolípido y una molécula de proteína. Generalmente, los valores de LPR suelen oscilar entre 0,3 y 0,5. A estas proporciones se presentan unas 30 moléculas de fosfolípido por cada molécula de proteína, aproximadamente, valor que dependerá del peso molecular de la proteína y del fosfolípido empleado. El valor concreto de la LPR debe ser cuidadosamente ajustado en cada caso para dar lugar a la completa ordenación de las proteínas en la bicapa lipídica.

- pH: El valor de pH de la solución empleada es determinante para la reconstitución de la proteína ya que condiciona la carga neta de la misma. Generalmente, se utilizan valores de pH cercanos a los fisiológicos y comprendidos entre 6,5 y 8,0.
- Fuerza iónica: Junto con el valor de pH, es también un factor determinante, la fuerza iónica presente en el medio, ya que puede condicionar la morfología adoptada por el cristal. Los valores habituales para la cristalización 2D oscilan entre 100 y 200 mM de ión monovalente y entre 2 y 50 mM de ión divalente.
- Temperatura: La temperatura influye en diversos puntos del proceso de cristalización, por una parte está directamente relacionada con la extracción del surfactante y por otra parte condiciona el crecimiento del cristal. En algunos casos, se emplean protocolos de cristalización con ciclos de temperatura y en muchos de ellos se incuban las muestras a 37 °C. En los ciclos de temperatura empleados se debe considerar la estabilidad de la proteína, ya que en algunos casos, el proceso de cristalización tan solo puede ser realizado a 4 °C.
- Método de cristalización: La utilización de uno u otro método de cristalización depende directamente del tipo de surfactante a extraer y del tipo de proteína a purificar. Los métodos comúnmente empleados son la diálisis y la adsorción.

2.3.7.iv. Tipos de cristales 2D

Aunque todos los cristales bidimensionales están formados por una bicapa lipídica que envuelve y sirve de matriz a un elevado número de moléculas de proteína ordenada en dos direcciones, éstos pueden presentar formas diferentes. Los cristales 2D pueden clasificarse según la morfología que presenten (Mosser, 2001) en cristales planos, tubulares, multicapa o vesiculares, cuya estructura se muestra en la figura 33.

- Cristales planos o láminas (*sheets*): Las láminas (figura 33a) son los cristales 2D más difíciles de obtener, aunque son también los que permiten realizar imágenes de microscopía a mayor resolución. Son cristales formados por una bicapa lipídica completamente plana que puede llegar a presentar hasta 30 μm de diámetro.

- Cristales tubulares: Los cristales tubulares (figura 33b) presentan una estructura cilíndrica. La inserción de la proteína no da lugar a estructuras planas y por tanto su orientación puede diferir a lo largo del cristal. Las dimensiones de este tipo de cristales oscilan entre 60 y 90 nm de diámetro y entre 300 y 1500 nm de largo. Su observación, debido a su curvatura, suele ser deficiente por microscopía de fuerza atómica (AFM).
- Cristales multicapa: Los cristales multicapa (figura 33c) son cristales planos formados por diversas capas. Son, de la misma forma que los cristales planos, adecuados para la realización de imágenes de elevada resolución por AFM, debido a la ausencia de curvatura.
- Cristales vesiculares: Los cristales vesiculares (figura 33d) son los que se obtienen frecuentemente, pueden ser comparados a la estructura de un liposoma, que, al entrar en contacto con el sustrato no se extiende, sino que se aplana ligeramente. Los cristales vesiculares presentan una ligera curvatura en su superficie que dificulta su observación por AFM, aunque permite la obtención de imágenes de buena calidad pero no de elevada resolución.

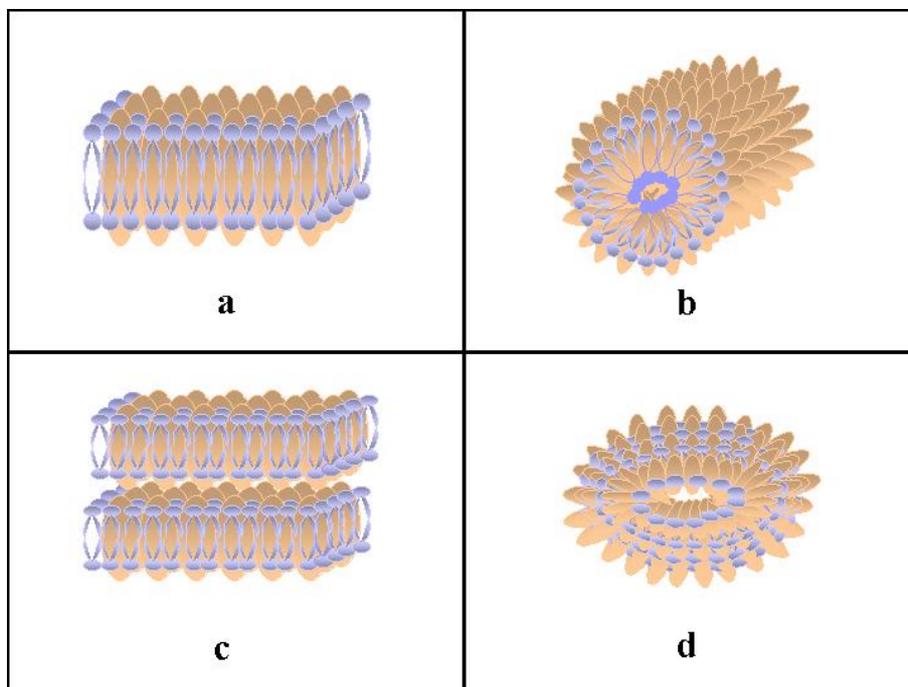


Figura 33. Tipos de cristales bidimensionales: **(a)** Cristal plano. **(b)** Cristal tubular. **(c)** Cristal multicapa. **(d)** Cristal vesicular.

2.4. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

Históricamente, los microscopios han sido instrumentos ampliamente utilizados en ciencias biológicas, desde los más sencillos microscopios ópticos hasta los más modernos microscopios de resolución atómica. El microscopio de fuerza atómica se incluye en un amplio grupo de técnicas denominadas “microscopías de sonda próxima” (SPM). Todas las técnicas de SPM se basan en el rastreo de la superficie de la muestra por una palanca en la que se encuentra acoplada una sonda, generalmente en forma de punta, que se desplaza sobre la muestra siguiendo líneas paralelas. Las alteraciones de la posición de esta sonda proporcionan información de las propiedades de la superficie de la muestra y dan lugar a la imagen.

En 1986, G. Binnig y H. Rohrer fueron galardonados con el Premio Nobel de Física por idear el microscopio de efecto túnel (Binnig et al., 1982). Ese mismo año, G. Binnig, C.F. Quate y Ch. Gerber, desarrollaron el primer microscopio de fuerza atómica (AFM) (Binnig et al., 1986) basado en modificaciones del microscopio de efecto túnel. El AFM es muy similar al microscopio de efecto túnel, pero en lugar de detectar una señal de diferencia de potencial, la sonda del AFM detecta la topografía de la superficie por diferencias en la fuerza atómica (atracción y repulsión). La resolución entre ambos microscopios es parecida (resolución atómica), pero el AFM tiene la ventaja de poder ser utilizado para observar muestras no conductoras, como las biológicas.

La microscopía de fuerza atómica se empezó a aplicar a muestras biológicas dos años después de ser desarrollada, en 1988 (Worcester et al., 1988), aunque debido a las dificultades observadas en la manipulación y observación de este tipo de muestras, no fue hasta 1992 cuando se estableció su uso biológico (Bustamante et al., 1992). A diferencia de otros microscopios de elevada resolución, el AFM permite la visualización de muestras sin necesidad de tinción previa y en solución, permitiendo la observación de muestras en tiempo real y la realización de variaciones de la solución y de la muestra *in situ*. Por ejemplo, pueden visualizarse células vivas con una resolución elevada, dando lugar a imágenes reproducibles en condiciones biomiméticas.

De forma similar a otras microscopías, la muestra para AFM debe encontrarse fijada sobre un soporte sólido y de manera óptima, éste debe ser atómicamente plano. La adhesión de la muestra al sustrato se produce debido, en general, a fuerzas de tipo electrostático o van der Waals.

2.4.1. Microscopio de fuerza atómica

Esta técnica se fundamenta en la medida de las fuerzas de interacción entre una punta muy afilada dispuesta en el extremo de una palanca flexible y la superficie de la muestra, mediante realización de una serie de rastreos horizontales. La muestra se deposita en un soporte sólido, que debe tener una elevada afinidad por la muestra.

En el AFM, un haz láser incide sobre la superficie de la palanca, en el extremo de la cual se encuentra la punta. Las deflexiones de la palanca, producidas por la interacción entre la punta y la muestra, son detectadas por un detector óptico (fotodiodo) (Meyer y Amer, 1988; Alexander et al., 1989), mediante la variación del ángulo de reflexión del láser. La señal recibida por el fotodiodo es utilizada para regular y minimizar la fuerza aplicada sobre la superficie, mediante un sistema piezoeléctrico capaz de regular el movimiento de la muestra. En la figura 34 se presenta un esquema del funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica.

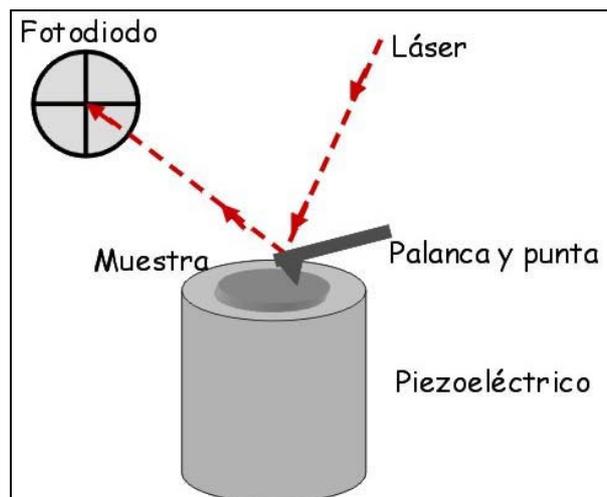


Figura 34. Esquema del funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica.

El rastreo de la superficie por la punta da lugar a la obtención de imágenes topográficas tridimensionales de alta resolución, tanto lateral (x, y) como vertical (z), derivadas del movimiento del piezoeléctrico. El rastreo lateral puede realizarse desde unos pocos nm hasta más de un centenar de μm , pudiendo conseguir una resolución lateral de alrededor de 1 Å. La resolución vertical puede llegar a ser inferior al Å. Además de imágenes topográficas, el AFM permite obtener información de diferentes propiedades de la muestra, tales como adhesión, dureza, viscoelasticidad o fricción.

La técnica de AFM, debido a la posibilidad de trabajar en presencia de electrolitos, requiere de una serie de experimentos previos para poder establecer las condiciones experimentales óptimas a aplicar (fuerza mínima de rastreo) y el balance electrostático idóneo. Durante la visualización de muestras biológicas, para prevenir la deformación de las mismas, la fuerza vertical aplicada por la palanca se ajusta a fuerza mínima (50-100 pN). A fuerzas aplicadas de entre 100 y 1000 pN, la muestra se deforma de manera reversible, mientras que a fuerzas superiores a 1000 pN, la muestra biológica es deformada de manera irreversible (Fotiadis et al, 2002).

2.4.2. Aplicaciones del microscopio de fuerza atómica

El AFM se ha utilizado en diversos estudios con materiales biológicos. Los principales ejemplos incluyen ácidos nucleicos, proteínas en solución, membranas, proteínas unidas a membranas, cristales bidimensionales de proteínas, células vivas y secciones de tejidos, entre otros.

Las importantes ventajas que presenta el AFM frente a otros tipos de microscopios (Firtel y Beveridge, 1995; Dufrêne y Lee, 2000), son:

- Relación señal-ruido muy elevada que permite la visualización de superficies a una resolución inferior al nm.
- Capacidad de estudiar la nanoestructura de la superficie de películas de lípido y cambios conformacionales de biomoléculas en medio acuoso y en tiempo real.
- Posibilidad de manipulación de la muestra durante el proceso de visualización de la misma.

- Posibilidad de medir directamente propiedades físicas de la muestra.

2.4.2.i. Visualización de moléculas aisladas

Una de las primeras moléculas de tipo biológico que fue visualizada por AFM fue el ADN (Bustamante et al., 1992). La visualización se realizó en aire, aunque posteriormente se inició su estudio en medio líquido. La posibilidad de observar estructuras moleculares como el ADN en medio líquido, permitió la visualización de procesos biológicos sencillos con esta molécula, como puede ser su degradación enzimática (Benzanilla et al., 1994), cambios conformacionales (Rivetti et al., 1998) o incluso la observación y manipulación de los cromosomas (de Groot y Putman, 1992; Fritzche y Henderson, 1996; Thalhammer et al., 1997; Engel y Müller, 2000).

Además del ADN, otras moléculas han sido estudiadas mediante AFM, como es el caso de las proteínas, de las que se ha estudiado su estructura tanto de manera aislada como sobre soportes lipídicos. Algunos ejemplos de proteínas estudiadas por esta técnica son: filamentos de actina (Weisenhorn et al., 1990), miosina (Hallett et al., 1995) o algunas proteínas globulares (Henderson et al., 1996; Kiselyova et al., 1999). La elevada resolución del AFM ha permitido su empleo para realizar estudios comparativos con proteínas en diferentes condiciones del medio en el que se encuentran (Ikeda y Morris, 2002).

2.4.2.ii. Topografía de superficie

Los estudios de topografía mediante esta técnica pueden ser aplicados a muestras de diverso tipo, que, en muchos casos son frágiles y deben ser rastreadas aplicando fuerzas inferiores a 50 pN (Le Grimallec et al., 2000). Estos estudios permiten visualizar a elevada resolución superficies biológicas tales como virus, células, fragmentos de membrana, monocapas, bicapas planas y cristales bidimensionales.

La formación de monocapas mediante la técnica de Langmuir-Blodgett (Singh y Keller, 1990) y de bicapas mediante extensión de liposomas (Jass et al., 2000) presentan una elevada reproducibilidad, haciendo que sean las técnicas más empleadas para el

estudio de superficies lipídicas. Estas superficies pueden ser utilizadas para el estudio topográfico de composiciones lipídicas concretas (Sikes y Schwartz, 1997), o como matriz para otras moléculas (Taylor et al., 2000). Actualmente, el AFM no se limita a la observación de superficies, sino que, en muchos casos, permite la realización de estudios de las propiedades fisicoquímicas de los fosfolípidos (altura, distribución, viscosidad...).

Una de las principales aplicaciones de las bicapas lipídicas es su utilización como matriz para proteínas de membrana, dando lugar a proteoliposomas o a cristales bidimensionales que pueden ser estudiados por AFM. Los cristales 2D corresponden a la elevada organización de las moléculas de proteína, agrupadas de tal forma que dan lugar a una topografía típicamente cristalina (Kühlbrandt, 1992; Mosser, 2001).

2.4.2.iii. Estudios dinámicos en muestras biológicas

Además del gran potencial que ofrece el AFM en cuanto a visualización en alta resolución de muestras biológicas, este microscopio permite monitorizar cambios conformacionales y procesos biomoleculares en tiempo real bajo condiciones biomiméticas.

Algunos de los estudios dinámicos que pueden realizarse empleando el AFM son las variaciones producidas en una bicapa debido a la incorporación de moléculas tales como antibióticos (Merino et al., 2003) o péptidos (Mou et al., 1996; Santos et al., 1998), la formación de cristales bidimensionales *in situ* (Reviakine et al., 1998), visualización de cambios conformacionales de proteínas integradas en una matriz lipídica (Müller y Engel, 1999), etc.

2.4.2.iv. Medidas físicas moleculares

El AFM, además de las aplicaciones topográficas, permite realizar estudios en los que se pueden manipular moléculas aisladas y medir, por ejemplo, la fuerza de sus interacciones, con una sensibilidad del orden de pN. Las principales aplicaciones no topográficas del AFM se podrían resumir en: medidas de fuerzas de superficie,

elasticidad, adhesión, rigidez, fricción o viscosidad. El estudio de la mayoría de estas propiedades se realiza a través de la representación de curvas de fuerza en función de la distancia.

Las puntas empleadas en AFM pueden funcionalizarse con determinadas moléculas, permitiendo su interacción con la muestra situada en el soporte. Esta muestra puede ser una proteína, un ácido nucleico, o la superficie de una célula, por ejemplo. Quizás, una de las mejores demostraciones del potencial del AFM es la medida de las interacciones biomoleculares, como son el estiramiento físico y despliegue de proteínas. El método por el cual se realiza este estiramiento de las moléculas recibe el nombre de SMFS (*single-molecule force spectroscopy*). Este método permite el estudio de las propiedades mecánicas de proteínas simples con una sensibilidad de ~ 1 pN y una resolución espacial inferior al nm (Gimzewski y Joachim, 1999).

El método de SMFS permite realizar una determinación directa de la fuerza que se requiere, por ejemplo, para romper enlaces covalentes, interacciones antígeno-anticuerpo, interacciones moleculares de diverso tipo, separación entre cadenas de ADN o incluso medidas de la fuerza a realizar para desnaturalizar una proteína, entre otras aplicaciones (Dufrêne, 2001; Fotiadis et al., 2002).

2.4.2.v. Futuras aplicaciones

La estrecha colaboración entre investigadores de diferentes áreas científicas ha permitido la rápida evolución de las técnicas nanométricas hacia aplicaciones del ámbito biomédico. Los estudios realizados con el AFM en cuanto a manipulación molecular permiten un mayor conocimiento de las moléculas aisladas y el control de las mismas, pudiendo dar lugar a nanosensores específicos de aplicación biológica directa (Pereira, 2001).