

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existe un conocimiento limitado sobre los fenómenos implicados en el proceso de reconstitución de proteínas transmembranarias en liposomas. Dicho proceso es fundamentalmente empírico, e implica la utilización de liposomas y surfactantes, así como proteínas con un alto grado de pureza. Estas condiciones son un requisito imprescindible para poder realizar estudios de integración de las proteínas, de su disposición en la bicapa y de su función biológica.

La posibilidad de aplicar técnicas nanométricas, como la microscopía de fuerza atómica, al estudio del proceso de reconstitución de proteínas, puede permitir conocer el tipo de interacción molecular.

Con el fin de aportar información sobre estos aspectos, se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

- Las propiedades fisicoquímicas de los fosfolípidos (fluidez, carga electrostática, existencia de dominios, etc.) tienen influencia en la integración de las proteínas en las bicapas y eventualmente en su actividad biológica.
- La integración de las proteínas en la membrana, puede estudiarse mediante métodos fluorescentes, que permiten medir los cambios de potencial electrostático de la superficie y la fluidez de la bicapa.
- La integración de las proteínas en la membrana biológica, puede visualizarse mediante la técnica nanométrica de microscopía de fuerza atómica.
- La microscopía de fuerza atómica permitirá resolver cristales bidimensionales de proteínas transmembranarias.

3.2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis, es investigar la incorporación de proteínas de membrana en bicapas de fosfolípidos mediante métodos de fluorescencia, y evaluar las posibilidades de la microscopía de fuerza atómica (AFM) para visualizar este fenómeno, así como obtener, eventualmente, información estructural a nivel molecular. Se escogieron dos composiciones lipídicas neutras: POPC, DMPC:POPC (1:1, mol:mol), y dos cargadas: POPE:POPG (3:1, mol:mol) y extracto lipídico total de *Escherichia coli*. El citocromo c y la melitina se escogieron como referencia para interpretar los resultados obtenidos con las proteínas transmembranarias Omp1 y LacY.

Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Aislar, identificar y caracterizar las proteínas transmembranarias a partir de cultivos celulares.
- Visualizar por AFM las proteínas purificadas y las utilizadas como proteínas de referencia.
- Obtener y posteriormente caracterizar las matrices lipídicas mediante medidas de potencial electrostático de superficie, anisotropía de la fluorescencia y AFM.
- Investigar, con las mismas técnicas, las alteraciones producidas por la incorporación de las proteínas a las matrices lipídicas.
- Optimizar las condiciones experimentales para cristalizar en dos dimensiones una proteína integral de membrana.
- Visualizar mediante AFM cristales 2D y obtener información estructural.