

PRESENTACIÓN

Las proteínas de membrana representan entre un 25 y un 30 % de las proteínas totales presentes en una célula y constituyen junto con los fosfolípidos, los componentes principales de la misma. La investigación óptima, tanto estructural como funcional, de las proteínas de membrana debería realizarse en su ambiente natural, la membrana celular, aunque éste es un sistema muy complejo condicionado por multitud de factores, como puede ser la gran variedad de proteínas y fosfolípidos, entre otras moléculas, presentes en su estructura.

Algunos de los modelos de membrana que mejor mimetizan la membrana celular son las monocapas, las bicapas planas, los liposomas y los proteoliposomas. Estas últimas vesículas (liposomas y proteoliposomas) se forman a partir de fosfolípidos adecuados, dando lugar a una bicapa esférica que se autoensambla y que presenta propiedades fisicoquímicas similares a las de las membranas biológicas. Una de las mayores ventajas de los liposomas es su capacidad para integrar proteínas de membrana extraídas y purificadas a partir de células vivas, empleando para ello diferentes mecanismos de reconstitución. Los proteoliposomas permiten llevar a cabo estudios estructurales y funcionales de proteínas aisladas, en un medio biomimético, en ausencia de otras moléculas.

Los proteoliposomas pueden incorporar proteínas periféricas o integrales. Estas últimas, en la mayoría de casos, necesitan de surfactantes para ser purificadas y para mantener su estabilidad en solución. Las proteínas integrales, no se integran en la estructura del liposoma de forma espontánea, sino que debe realizarse un proceso de disrupción lipídica, dando lugar a micelas mixtas fosfolípido-surfactante, para integrar a las proteínas. La estructura de bicapa esférica del proteoliposoma se reconstituye mediante la reducción de la concentración del surfactante en solución, hasta su práctica eliminación. Para la realización de este proceso de disrupción y posterior reconstitución de las vesículas, es necesario establecer parámetros tales como el tipo y concentración de surfactante a utilizar, la proporción óptima de proteína a incorporar (LPR, *lipid-to-protein ratio*), la velocidad de extracción del surfactante, o el proceso a seguir para reconstituir el proteoliposoma.

El proceso por el cual las vesículas lipídicas pasan a formar micelas mixtas por acción de los surfactantes puede ser estudiado mediante dispersión de la luz y espectrofotometría visible, mientras que el proceso de reconstitución de las mismas, puede ser seguido mediante la utilización de sondas fluorescentes y la técnica de polarización de la fluorescencia.

El estudio de las proteínas reconstituidas en proteoliposomas puede llevarse a cabo empleando técnicas indirectas (fluorescencia de determinadas sondas fluorescentes) y directas (microscopía de fuerza atómica).

Algunas sondas fluorescentes, tales como HHC, permiten estudiar las variaciones de potencial electrostático de superficie debidas a la composición lipídica o a la integración de proteínas en la membrana. Otras sondas, como TMA-DPH o DPH, permiten el estudio de la reconstitución de las proteínas de membrana, dando lugar a los proteoliposomas.

La microscopía de fuerza atómica (AFM), permite la realización de estudios estructurales detallados, debido a su elevada resolución. Además, presenta la ventaja, frente a otras nanotecnologías, que permite hacer estudios biológicos en medio líquido, e incluso el seguimiento y observación de procesos dinámicos en tiempo real. Una de las principales aplicaciones biológicas de esta microscopía es la observación y eventual manipulación de proteínas de membrana cristalizadas en dos dimensiones.

La cristalización 2D es una alternativa ampliamente utilizada a la cristalización 3D, ya que permite solventar algunos de los grandes problemas que se presentan al cristalizar en tres dimensiones una proteína de membrana, especialmente, si se pretende la cristalización de una proteína integral. Las proteínas cristalizadas en 2D se encuentran en un ambiente biomimético al reconstituirse en bicapas lipídicas, por tanto su conformación puede considerarse más próxima a la realidad, que cuando éstas cristalizan en tres dimensiones.

En el presente trabajo, se plantea el estudio del proceso de reconstitución de diferentes proteínas de membrana en vesículas lipídicas dando lugar a proteoliposomas,

empleando para ello técnicas de fluorescencia y nanométricas, fundamentalmente. Las proteínas de membrana estudiadas fueron: citocromo c (Cyt c), como modelo de proteína periférica, melitina (MLT), como modelo de péptido integral parcial, la porina Omp1 de *Serratia marcescens* y la proteína lactosa permeasa de *Escherichia coli* (LacY), como ejemplos de proteínas integrales totales. Las composiciones lipídicas empleadas fueron: POPC, DMPC:POPC (1:1, mol:mol), POPE:POPG (3:1, mol:mol) y el extracto lipídico total de *Escherichia coli*. Además, se cristalizó en dos dimensiones la proteína politópica LacY, de la que se hizo una aproximación a su estructura en un ambiente biomimético, mediante AFM.

Los resultados obtenidos de la reconstitución de las proteínas ensayadas, junto con las diferentes composiciones lipídicas empleadas permiten la generalización del estudio realizado, a la reconstitución de la mayoría de proteínas en membranas biológicas.