

## ***RESULTADOS***



## 5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Las proteínas de membrana utilizadas en el presente trabajo fueron caracterizadas mediante dos técnicas diferentes: la electroforesis en gel de poliacrilamida y la microscopía de fuerza atómica.

### 5.1.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La SDS-PAGE es una técnica habitual y ampliamente utilizada para la identificación cualitativa y cuantificación aproximada de proteínas de membrana recién purificadas. Las proteínas de membrana obtenidas tras un proceso de cultivo, extracción y purificación de las mismas, pueden identificarse mediante este tipo de geles (Li et al., 2001). Éste fue el caso de la Omp1 y de la LacY.

La proteína Omp1 fue sobreexpresada en una cepa de *E. coli* deficiente en porinas (UH302), facilitando su aislamiento y evitando posibles contaminantes durante el proceso de purificación. Como puede apreciarse en la figura 54, la Omp1 presentó una única banda intensa correspondiente a ~ 42 kDa.

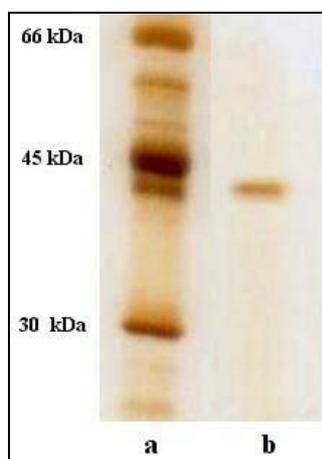


Figura 54. SDS-PAGE realizada como control de purificación de la proteína Omp1 y teñido con nitrato de plata: (a) Bandas de los marcadores de referencia. (b) Omp1 desnaturalizada térmicamente.

Por otra parte, la LacY también fue sobreexpresada en *E. coli* aunque en este caso se empleó la cepa T184. El proceso de aislamiento y purificación de la LacY es más complejo que en el caso de la Omp1, por lo que puede presentar un mayor riesgo de contaminación.

En la figura 55 puede apreciarse la presencia de dos bandas intensas correspondientes a la LacY. La banda de mayor intensidad puede ser atribuida a monómeros ya que corresponde a una M de ~ 47 kDa. La segunda de las bandas, de menor intensidad, corresponde a una M cercana a 97 kDa y se puede atribuir a la presencia de dímeros de la proteína (Houssin et al., 1985; Engel et al., 2002).

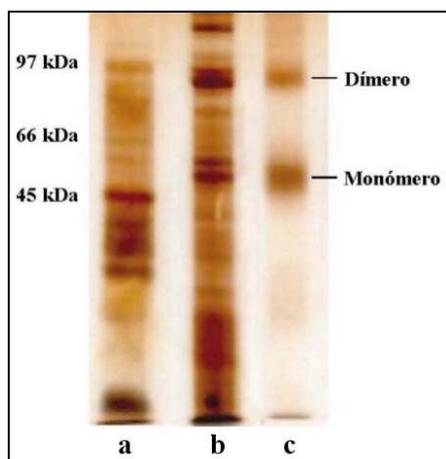


Figura 55. SDS-PAGE (tinción con nitrato de plata) para control de purificación de la LacY: (a) Bandas de los marcadores de referencia. (b) Mezcla total de proteínas extraídas de la membrana. (c) LacY.

La realización de geles SDS-PAGE permitieron, en ambos casos, Omp1 y LacY, garantizar la ausencia de proteínas contaminantes en las muestras purificadas.

### 5.1.2. Visualización de proteínas de membrana por AFM

La alta resolución del AFM, debida a la elevada relación señal:ruido, permite el estudio de moléculas aisladas, así como de las propiedades y variaciones que puedan presentar estas moléculas sobre diferentes tipos de soporte (Scheuring et al., 2001).

La visualización de moléculas simples mediante AFM se encuentra condicionada por las propiedades fisicoquímicas del medio de visualización (fuerza iónica, temperatura, pH ...) (Müller y Engel, 1997) y por el tipo de punta empleada. La punta de AFM presenta un diámetro final de tamaño variable, generalmente de unos 20-40 nm iniciales, que da lugar a un incremento del tamaño aparente de las estructuras visualizadas de un 30 % aproximadamente, respecto al tamaño esperado, debido precisamente a esta convolución de la punta. El diámetro final de la punta, así como su estructura pueden variar debido a la fricción producida durante el rastreo de la muestra,

pudiendo dar lugar a un aumento del tamaño aparente de las moléculas así como distorsiones en las imágenes (Weisenhorn et al., 1990). Estos efectos pueden ser minimizados cambiando de punta regularmente.

Las proteínas de membrana presentan un comportamiento diferente en su adsorción sobre un soporte plano, dependiendo del medio en el que se encuentren. Con el fin de determinar qué cambios estructurales provoca el soporte utilizado en AFM para adherir las proteínas, se realizó un estudio del Cyt c, la MLT, la LacY y la Omp1 sobre mica y sobre HOPG, bajo las mismas condiciones experimentales. Se determinaron parámetros tales como la altura y el diámetro medios de las estructuras observadas y se calculó el volumen molecular de las mismas.

#### **5.1.2.i. Citocromo c**

El citocromo c es una proteína altamente hidrofílica y estable en solución acuosa a pH fisiológico.

El Cyt c ha sido observado por AFM sobre bicapas lipídicas formando diferentes estructuras de tipo esférico, en función del tipo de fosfolípidos que constituyen la bicapa (Mueller et al., 2000). Las estructuras observadas de esta proteína sobre mica (figura 56a) y sobre grafito (figura 56b) mostraron aspectos diferentes.

Sobre mica, el Cyt c presentó agrupaciones poliméricas de la proteína, dando lugar a la formación de estructuras características como la mostrada en la figura 56a. A partir de las partículas individuales que pudieron ser observadas, se realizó el cálculo de la altura y el diámetro aparentes de la proteína, siendo éstos de  $1,6 \pm 0,4$  nm ( $n = 25$ ) y de  $12 \pm 4$  nm ( $n = 25$ ), respectivamente. Se observó que los valores de altura de las agrupaciones de proteína eran muy dispersos, encontrándose entre un mínimo de 2 nm y un máximo de 10 nm. El diámetro de las agrupaciones de Cyt c también fue muy disperso, con valores de entre 5 y 50 nm. Un ejemplo visual de la dispersión que presenta el Cyt c sobre mica se puede apreciar en la sección transversal realizada en la figura 56a (línea negra) y mostrada en la figura 56c. En esta sección se pueden observar tres alturas diferentes en una misma agrupación de la proteína.

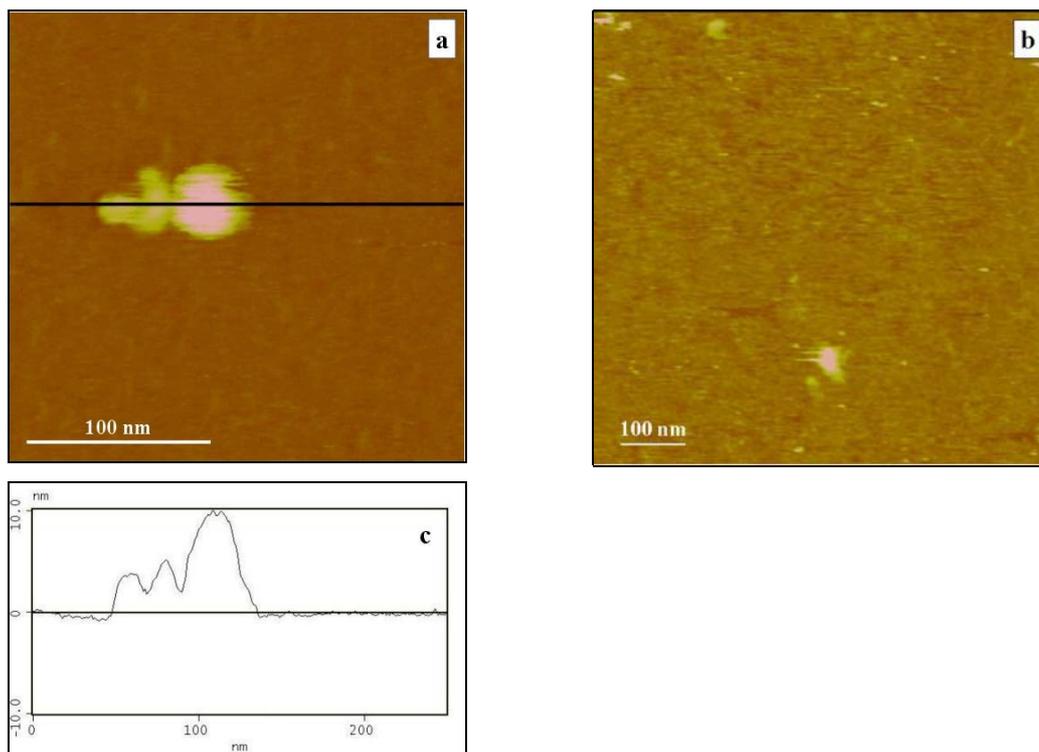


Figura 56. Imágenes de la topografía del Cyt c ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) sobre: **(a)** Mica muscovita. **(b)** Grafito. **(c)** Sección realizada al Cyt c sobre mica.  $Z = 20 \text{ nm}$ . Ambas imágenes se realizaron en líquido ( $10 \text{ mM Tris-HCl pH } 7,40$ ;  $150 \text{ mM NaCl}$ ).

Sobre un sustrato hidrofóbico, HOPG, la polidispersidad de la proteína fue menor que sobre mica, observándose una población agrupada tanto en referencia a la altura como al diámetro. Asimismo, fueron observadas algunas partículas de mayor tamaño dispersas en la superficie del HOPG, como se aprecia en la figura 56b. Los valores medios de altura y diámetro obtenidos fueron  $1,30 \pm 0,17 \text{ nm}$  ( $n = 35$ ) y  $10 \pm 2 \text{ nm}$  ( $n = 35$ ), respectivamente.

A partir de la ecuación (15) de *Material y Métodos*, se procedió al cálculo del volumen aparente del Cyt c, tomando para ello las dimensiones aparentes calculadas (altura y diámetro) y resumidas en la tabla 7. El valor de  $V_{prot}$  (volumen molecular teórico de la proteína) calculado según la ecuación (18) fue de  $23,47 \text{ nm}^3$ .

Tabla 7. Valores medios de las dimensiones aparentes de la proteína Cyt c sobre mica muscovita y sobre HOPG. Estimación del número de monómeros ( $n_m$ ) presentes en las estructuras medias según  $V_{prot}$ .

	Altura (nm)	Diámetro (nm)	$V$ (nm <sup>3</sup> )	$n_m$
<b>Mica</b>	$1,6 \pm 0,4$	$12 \pm 4$	$90 \pm 60$	$\sim 4$
<b>HOPG</b>	$1,30 \pm 0,17$	$10 \pm 2$	$50 \pm 20$	$\sim 2$

A partir de los valores de volumen aparente presentados en la tabla 7 se calculó el número de monómeros que se encontrarían en cada estructura, pudiéndose deducir que tanto sobre mica como sobre HOPG, el Cyt c presenta estructuras de mayor volumen que el teórico. Esto indicaría una cierta tendencia de esta proteína, a formar agregados de diferente tamaño. Sobre mica muscovita las agrupaciones de proteína corresponderían 4 monómeros, mientras que sobre HOPG, se encontrarían predominantemente dímeros de Cyt c.

### 5.1.2.ii. Melitina

La MLT es un péptido moderadamente soluble en solución acuosa que fue depositado sobre mica y HOPG en las mismas condiciones experimentales que el Cyt c.

En la figura 57 se muestra la imagen topográfica de la MLT sobre mica (figura 57a) y sobre HOPG (figura 57b). Contrariamente a lo que ocurre con el Cyt c, la MLT mostró una morfología muy similar sobre mica y HOPG, aunque la cantidad de muestra adherida fue diferente, como puede apreciarse en las imágenes de la figura 57. La MLT presentó una mayor adsorción sobre mica que sobre HOPG.

Las dimensiones aparentes de la MLT fueron obtenidas a partir de las imágenes topográficas y mediante análisis estadístico. Los resultados de las medidas realizadas en la muestra sobre mica fueron: una altura de  $1,19 \pm 0,10$  nm ( $n = 35$ ) y un diámetro de  $8,2 \pm 0,8$  nm ( $n = 35$ ). De las medidas realizadas en la muestra adherida sobre HOPG, se obtuvo una altura de  $1,6 \pm 0,6$  nm ( $n = 35$ ) y un diámetro de  $11 \pm 3$  nm ( $n = 35$ ).

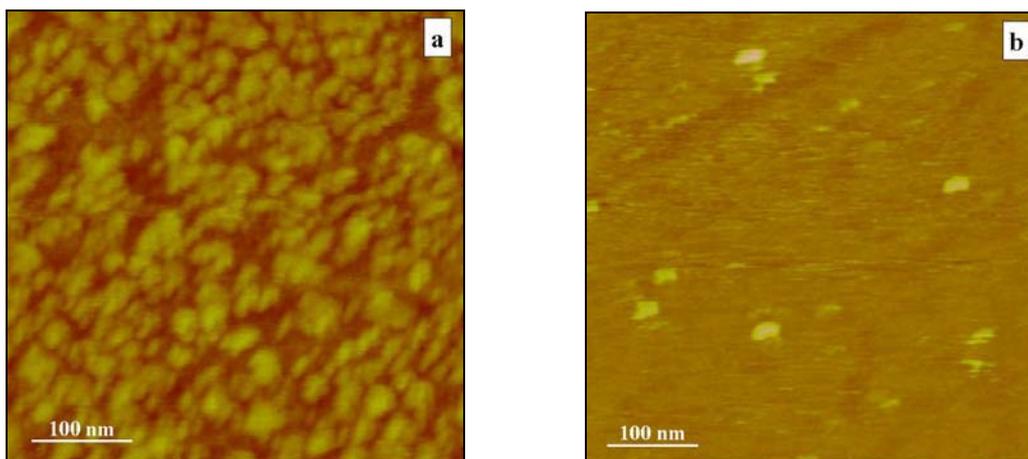


Figura 57. Imágenes topograficas de la MLT (10 µg/mL) sobre: **(a)** Mica muscovita. **(b)** Grafito.  $Z = 10$  nm. Ambas imágenes fueron realizadas en líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl).

La MLT presentó una mayor dispersión de valores de altura, cuando ésta fue extendida sobre HOPG que cuando se extendió sobre mica, pudiendo deberse a la presencia de oligómeros del péptido. El diámetro de estos oligómeros podría estar sobreestimado, debido a que el diámetro de la punta del AFM supera ampliamente el diámetro real de la MLT. La convolución propia de la punta sería responsable, por tanto, de esta posible sobreestimación.

A partir de los valores de altura y diámetro aparentes se procedió a calcular el volumen aparente de la MLT (tabla 8). El volumen calculado ( $V_{prot}$ ) de la MLT fue de  $5,38 \text{ nm}^3$ .

Tabla 8. Valores medios de las dimensiones aparentes del péptido MLT sobre mica muscovita y sobre HOPG. Estimación del número de monómeros ( $n_m$ ) presentes en las estructuras medias según  $V_{prot}$ .

	Altura (nm)	Diámetro (nm)	$V$ (nm <sup>3</sup> )	$n_m$
<b>Mica</b>	$1,19 \pm 0,10$	$8,2 \pm 0,8$	$32 \pm 7$	$\sim 6$
<b>HOPG</b>	$1,6 \pm 0,6$	$11 \pm 3 \text{ nm}$	$80 \pm 50$	$\sim 15$

En la tabla 8 se presentan los valores calculados a partir de las imágenes de AFM sobre mica y HOPG, de la MLT. Estos valores de volumen aparente fueron superiores al teórico, evidenciando la presencia de agrupaciones de diferentes

monómeros tanto en un sustrato hidrofílico como en uno hidrofóbico. Cabe considerar que la MLT no es globular, aunque su apariencia por AFM lo es, por ello se empleó la ecuación de cálculo del volumen de un casquete esférico (ecuación (15) de *Material y Métodos*). Esta aproximación del volumen puede dar lugar a una sobreestimación del volumen real del péptido, pudiéndose considerar, pues, una agrupación tetramérica del mismo sobre mica, mientras que esta agrupación sería irregular y polimérica sobre HOPG.

### 5.1.2.iii. Porina Omp1 de *Serratia marcescens*

Como todas las proteínas integrales de membrana, la Omp1 debe mantenerse en presencia de un surfactante adecuado, con el fin de evitar su agregación espontánea y/o posible desnaturalización. El surfactante OG, proporciona el ambiente adecuado para que la proteína permanezca en su estado nativo.

En la figura 58 puede observarse la imagen obtenida al depositar sobre mica y HOPG el extracto de la porina Omp1, en presencia de un 2 % (p/v) de surfactante OG. Las moléculas de surfactante se colocan rodeando las regiones hidrofóbicas de la proteína, dando lugar a la formación de una micela mixta de surfactante y proteína, cuya morfología es diferente dependiendo de la proteína y del surfactante empleados (le Maire et al., 2000). La apariencia de las micelas formadas por Omp1 y OG, observada por AFM, fue esférica. Estas estructuras se distribuyeron aislada y homogéneamente sobre la mica (figura 58a), mientras que se apreciaron agrupaciones irregulares de diferente tamaño sobre el HOPG (figura 58b).

De las imágenes de la topografía mostradas en las figuras 58a y 58b, se calcularon las dimensiones aparentes de las micelas mixtas Omp1-OG, obteniéndose una altura media de  $2,16 \pm 0,12$  nm ( $n = 35$ ) y un diámetro medio de  $16,8 \pm 1,1$  nm ( $n = 35$ ) en las micelas depositadas sobre mica. Sobre HOPG, la altura media de éstas fue de  $4 \pm 2$  nm ( $n = 35$ ), observándose una dispersión elevada en los valores recogidos. En los valores del diámetro se observaron tres poblaciones claramente diferenciadas, con unos valores medios de  $20 \pm 3$  nm ( $n = 17$ ),  $42 \pm 4$  nm ( $n = 9$ ) y  $81 \pm 9$  nm ( $n = 9$ ).

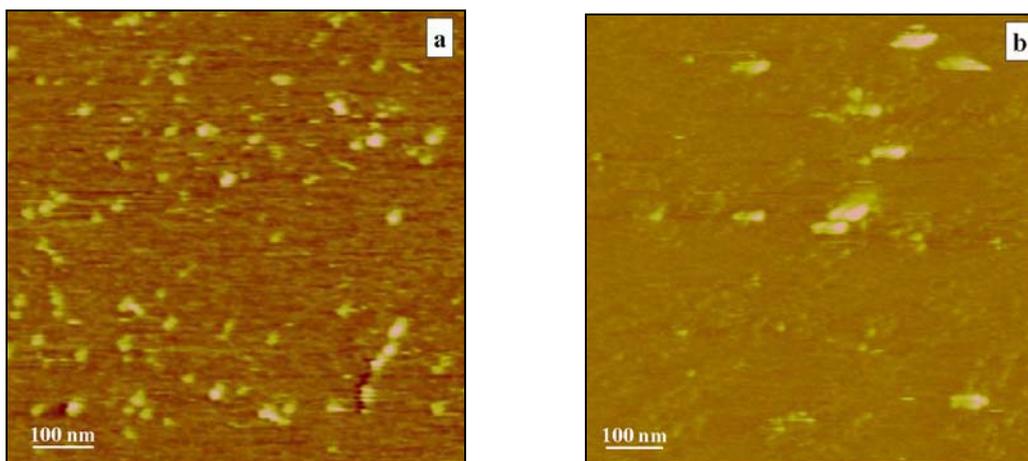


Figura 58. Imágenes topográficas de la Omp1 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) con OG 2 % (p/v) sobre: **(a)** Mica muscovita. **(b)** Grafito.  $Z = 10$  nm. Ambas imágenes fueron realizadas en líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl).

De cada una de las estructuras observadas, tanto sobre mica como sobre HOPG, se calculó el volumen aparente a partir de la altura y el diámetro medios (tabla 9). El volumen teórico calculado para la Omp1 fue de  $79,50 \text{ nm}^3$ .

Tabla 9. Valores medios de las dimensiones aparentes de la porina Omp1 con un 2 % (p/v) de OG sobre mica muscovita y sobre HOPG. Estimación del número de monómeros ( $n_m$ ) presentes en las estructuras medias según  $V_{prot}$ .

	Altura (nm)	Diámetro (nm)	$V$ ( $\text{nm}^3$ )	$n_m$
<b>Mica</b>	$2,16 \pm 0,12$	$16,8 \pm 1,1$	$240 \pm 30$	$\sim 3$
		$20 \pm 3$	$700 \pm 400$	$\sim 9$
<b>HOPG</b>	$4 \pm 2$	$42 \pm 4$	$2800 \pm 1500$	$\sim 35$
		$81 \pm 9$	$10000 \pm 6000$	$\sim 126$

En la tabla 9 se muestran los valores de las dimensiones aparentes de la porina Omp1 en presencia de un 2 % de OG. De los valores de volumen aparente observados se puede apreciar la presencia de oligómeros, concretamente trímeros, sobre el soporte de mica, mientras que sobre HOPG, esta proteína se estructura dando lugar a agrupaciones de múltiples monómeros, con una dispersión muy superior a la encontrada sobre mica.

La estabilidad de las proteínas de membrana, en lo que se refiere a su estructura terciaria, se encuentra comprometida por la presencia o ausencia de moléculas anfipáticas, en este caso surfactantes, en el medio en el que se encuentran. Se realizó una aproximación para determinar posibles cambios en la morfología del complejo Omp1-OG, debidos a la reducción de la concentración del surfactante por debajo de su CMC (ver apartado 4.6.2. de *Material y Métodos*).

En la figura 59 se muestran las imágenes topográficas (a y b) obtenidas para Omp1-OG sobre mica y HOPG, respectivamente, en presencia de un 0,5 % (p/v) de OG. Se pueden apreciar importantes diferencias en cuanto a la morfología adoptada por la porina según el sustrato sobre el que se encuentre. Sobre mica, la Omp1 se presenta formando agregados globulares de diferentes tamaños, mientras que sobre HOPG, la Omp1 se dispone de forma ordenada dando lugar a lo que podrían ser micelas tubulares. Sobre HOPG, se encontraron también algunas formas globulares de la proteína más o menos regulares, de tamaño similar al observado en presencia de un 2 % de OG.

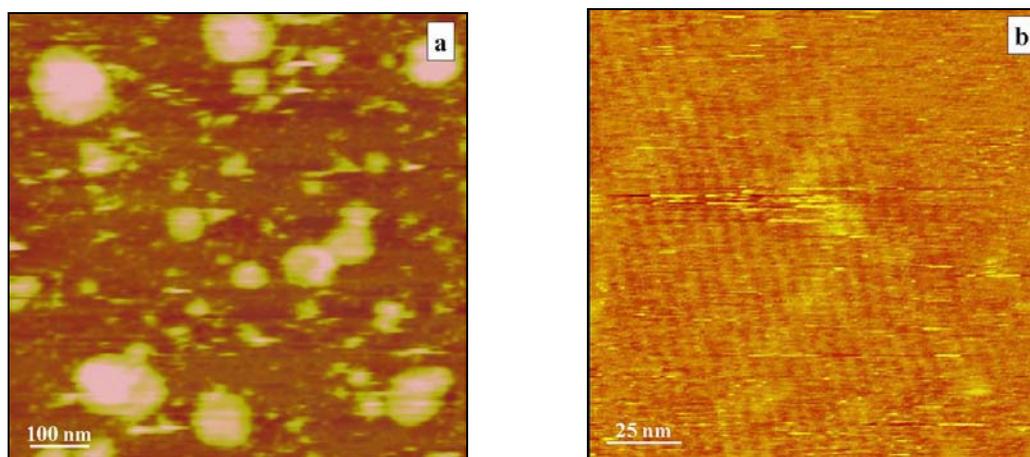


Figura 59. Imágenes topográficas de la Omp1 (10 µg/mL) con OG 0,5 % (p/v) sobre: **(a)** Mica muscovita, Z = 10 nm. **(b)** Grafito, Z = 5 nm. Ambas imágenes fueron realizadas en líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl).

De las imágenes topográficas de las micelas de Omp1 sobre mica y sobre HOPG se realizó la medida de sus dimensiones aparentes en nm. Sobre el sustrato hidrofílico, la altura media que presenta la porina a concentraciones de OG inferiores a su CMC fue de  $5,2 \pm 0,2$  nm (n = 35) y su diámetro medio fue de  $20 \pm 4$  nm (n = 35). Sobre HOPG la Omp1 presentó dos tipos de estructuras, unas globulares con una altura media de 3,0

$\pm 0,2$  nm ( $n = 35$ ) y un diámetro medio de  $19 \pm 4$  nm ( $n = 35$ ) y estructuras de tipo tubular de  $\sim 3$  nm de diámetro. A partir de las dimensiones aparentes de las estructuras globulares halladas sobre mica y sobre HOPG, y resumidas en la tabla 10, se calculó el volumen aparente de la Omp1 en estas condiciones. El volumen teórico calculado para la porina Omp1 fue de  $79,50$  nm<sup>3</sup>.

Tabla 10. Valores medios de las dimensiones aparentes de la porina Omp1 con un 0,5 % (p/v) de OG sobre mica muscovita y sobre HOPG. Estimación del número de monómeros ( $n_m$ ) presentes en las estructuras medias según  $V_{prot.}$

	Altura (nm)	Diámetro (nm)	$V$ (nm <sup>3</sup> )	$n_m$
<b>Mica</b>	$5,2 \pm 0,2$	$20 \pm 4$	$900 \pm 300$	$\sim 11$
<b>HOPG</b>	$3,0 \pm 0,2$	$19 \pm 4$	$440 \pm 180$	$\sim 6$
	Estructuras tubulares de $\sim 3$ nm de diámetro.			

La distribución de las dimensiones aparentes de la Omp1 sobre mica, cuando tiene una concentración de surfactante inferior a su CMC, presenta una dispersión muy superior a la observada cuando la concentración es mayor a la CMC del surfactante. Sobre HOPG, la porina presenta una mayor homogeneidad con un 0,5 % de OG que con un 2 %, y puede disponerse en forma de agregados tubulares. Asimismo, se aprecia una mayor tendencia a la agregación en presencia de un sustrato hidrofílico que de uno lipofílico.

#### 5.1.2.iv. Lactosa permeasa de *Escherichia coli*

La LacY, de la misma forma que la Omp1, también requiere de la presencia de surfactantes para mantener su estabilidad en solución y minimizar su gran tendencia a agregarse. El surfactante empleado para esta proteína fue el DDM, el cual presenta una CMC inferior a la del OG.

El aspecto de las micelas de LacY con un 0,02 % de DDM fue observado por AFM sobre un sustrato de mica y de HOPG, obteniéndose las imágenes de topografía que se muestran en las figuras 60a y b, respectivamente.

Las micelas de LacY en presencia de 0,02 % de DDM muestran una estructura globular altamente homogénea tanto sobre mica como sobre HOPG, aunque diferente en lo que a dimensiones se refiere. Las dimensiones aparentes de las micelas de LacY con DDM 0,02 % (p/v) obtenidas, presentaron una altura de  $1,97 \pm 0,05$  nm ( $n = 35$ ) y un diámetro de  $12,6 \pm 0,3$  nm ( $n = 35$ ), sobre mica, y una altura de  $1,30 \pm 0,08$  nm ( $n = 35$ ) y un diámetro de  $25,5 \pm 1,8$  nm ( $n = 35$ ), sobre HOPG. Se puede observar, de forma similar a lo ocurrido con las micelas Omp1-OG, que existe una mayor uniformidad estructural de las micelas LacY-DDM sobre mica que sobre HOPG, debido a su uniformidad de tamaño y a la hidrofilia de las mismas.

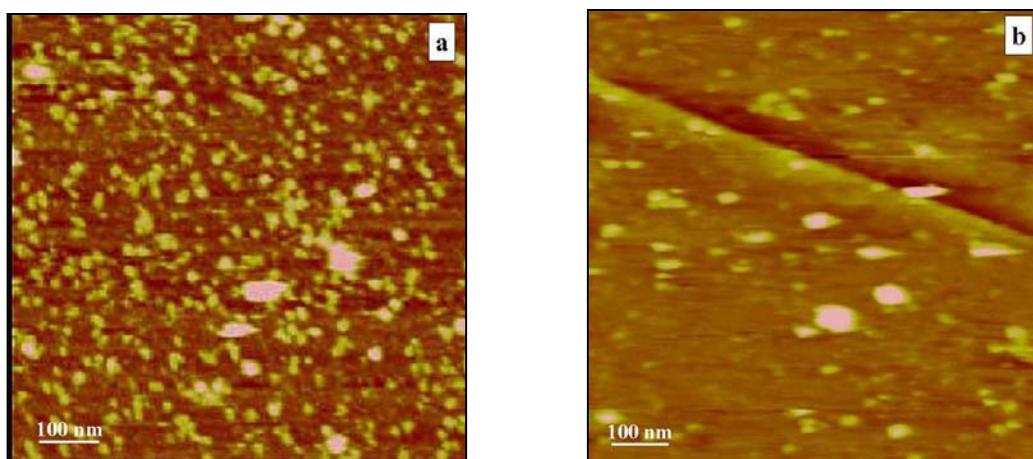


Figura 60. Imágenes topográficas de la LacY (10 µg/mL) con DDM 0,02 % (p/v) sobre: **(a)** Mica muscovita. **(b)** Grafito.  $Z = 10$  nm. Ambas imágenes fueron realizadas en líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl).

A partir de las dimensiones aparentes, resumidas en la tabla 11, se procedió al cálculo del volumen aparente de la proteína, en las condiciones utilizadas. El volumen teórico estimado para la LacY fue de  $88,96$  nm<sup>3</sup>.

Tabla 11. Valores medios de las dimensiones aparentes de la proteína LacY con un 0,02 % (p/v) de DDM sobre mica muscovita y sobre HOPG. Estimación del número de monómeros ( $n_m$ ) presentes en las estructuras medias según  $V_{prot}$ .

	Altura (nm)	Diámetro (nm)	$V$ (nm <sup>3</sup> )	$n_m$
<b>Mica</b>	$1,97 \pm 0,05$	$12,6 \pm 0,3$	$127 \pm 7$	$\sim 1$
<b>HOPG</b>	$1,30 \pm 0,08$	$25,5 \pm 1,8$	$330 \pm 50$	$\sim 4$

Los valores obtenidos del volumen aparente de esta proteína después de su purificación (tabla 11), sugieren que se trata mayoritariamente de monómeros de la proteína, aunque con la posible presencia de dímeros, ya que el valor obtenido de  $n_m$  fue de 1,42. Sobre HOPG puede observarse una cierta agregación de la proteína obteniéndose un valor de  $n_m$  cercano a 4. La interpretación de las dimensiones aparentes de las proteínas que se encuentran en forma de micela mixta es complicada, ya que las moléculas de surfactante que envuelven a la proteína dan lugar a un cierto incremento del valor  $V_{prot}$ .

Se llevó a cabo un experimento de reducción de la concentración de surfactante con la LacY, similar al realizado con la porina Omp1, aunque en este caso, al ser el DDM el mismo surfactante, tanto para el proceso de extracción de la proteína como para la solubilización de la misma, se redujo de la concentración del DDM mediante el empleo de Bio-Beads<sup>®</sup> SM-2 durante 18 horas a 4 °C. El surfactante residual calculado experimentalmente tras el proceso de extracción resultó ser < 0,01 % (p/v).

La proteína mantenida en solución con DDM en cantidad inferior a 0,01 % (p/v), se extendió sobre mica y sobre HOPG de igual forma que para el resto de proteínas ensayadas, observándose las imágenes topográficas presentadas en las figuras 61a y 61b. En estas imágenes (a y b) se aprecian importantes diferencias en cuanto a dimensiones (altura y diámetro) y morfología, entre ellas. Asimismo, las diferencias fueron notables respecto a las imágenes obtenidas de la LacY en presencia de DDM 0,02 % (p/v). Sobre HOPG se pudieron apreciar micelas tubulares, presentadas en la figura 61b, y algunas estructuras de tipo globular, muy irregulares, en otras regiones no mostradas. Las micelas tubulares formadas por el complejo LacY-DDM, fueron muy similares a las observadas con Omp1-OG.

A partir de las medidas realizadas en las imágenes de mica y HOPG, resumidas en tabla 12, se obtuvieron las dimensiones medias aparentes de las micelas de LacY en condiciones de baja concentración de surfactante. Sobre el soporte de mica, la altura obtenida fue de  $3,6 \pm 0,2$  nm ( $n = 35$ ) y el diámetro fue de  $21,7 \pm 0,7$  nm ( $n = 35$ ), mientras que sobre el soporte de HOPG las estructuras tubulares presentaron un diámetro de  $\sim 3$  nm.

Las estructuras globulares que se observaron sobre HOPG fueron pocas y altamente heterogéneas, impidiendo una medida estadística fiable de las mismas.

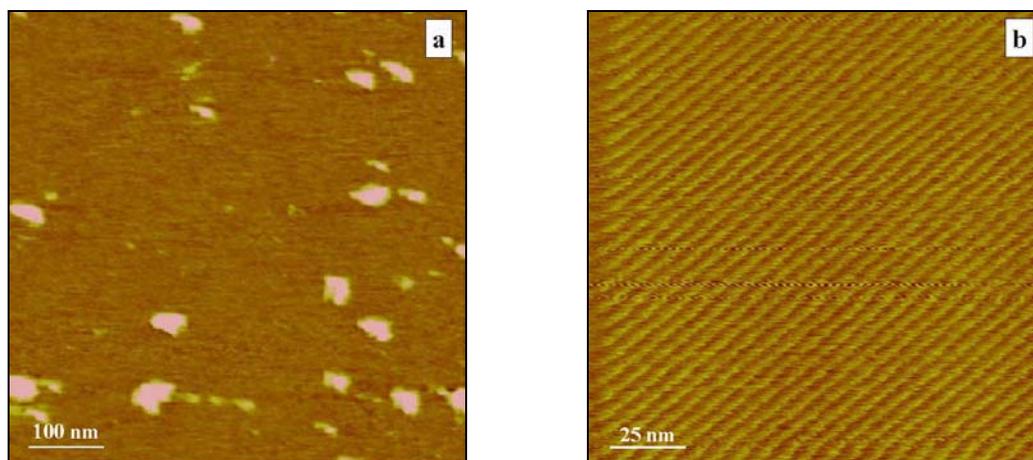


Figura 61. Imágenes topográficas de la LacY (10 µg/mL) con DDM < 0,01 % (p/v) sobre: **(a)** Mica muscovita,  $Z = 10$  nm. **(b)** Grafito,  $Z = 5$  nm. Ambas imágenes fueron realizadas en líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl).

En una situación de concentración de surfactante inferior a su CMC, se aprecia una mayor tendencia a la agregación de la proteína, tanto sobre mica como sobre HOPG.

Tabla 12. Valores medios de las dimensiones aparentes de la proteína LacY con una concentración de DDM < 0,01 % (p/v) sobre mica muscovita y HOPG. Estimación del número de monómeros ( $n_m$ ) presentes en las estructuras medias según  $V_{prot}$ .

	Altura (nm)	Diámetro (nm)	$V$ (nm <sup>3</sup> )	$n_m$
<b>Mica</b>	$3,6 \pm 0,2$	$21,7 \pm 0,7$	$690 \pm 60$	$\sim 8$
<b>HOPG</b>	Estructuras tubulares de $\sim 3$ nm de diámetro.			

De los valores presentados en la tabla 12 se deduce que las estructuras oligoméricas depositadas sobre mica a concentraciones de DDM inferiores a 0,01 % (p/v) presentan aproximadamente 8 monómeros cada una. Sobre HOPG, la LacY presenta estructuras parecidas a las observadas para la Omp1, en condiciones similares (concentración de surfactante inferior a su CMC), pudiendo ser interpretadas como micelas tubulares de la proteína con su correspondiente cinturón de surfactante.

## **5.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES LIPÍDICAS**

Las matrices lipídicas constituyen el soporte en el que se incorporarán las proteínas de membrana. Las matrices que han sido objeto de estudio, se han caracterizado según diferentes aspectos físicoquímicos: estabilidad física de los liposomas, potencial electrostático de superficie, formación de dominios, solubilización mediante surfactantes y fluidez de la bicapa lipídica.

### **5.2.1. Estabilidad de los liposomas**

Los liposomas y proteoliposomas que se han utilizado en este trabajo, han sido sometidos a diferentes procesos, con el fin de provocar su disrupción y/o su disminución de tamaño.

#### **5.2.1.i. Sonicación**

La sonicación es un proceso por el cual se forman liposomas unilaminares a partir de liposomas multilaminares (Lasic y Martin, 1991; Basu y Basu, 2002). Este proceso consiste en someter a la muestra de liposomas a ultrasonidos, produciendo una disminución del tamaño y la formación de bicapas unilaminares.

Se realizó un estudio de la variación de tamaño y polidispersidad de liposomas de diferente composición lipídica en función del tiempo de sonicación, utilizando la técnica de dispersión de la luz.

En el diagrama de barras de la figura 62 se presentan los diámetros medios obtenidos a cada tiempo de sonicación aplicado. En esta representación se aprecia una disminución general del tamaño de los liposomas conforme se incrementa el tiempo de sonicación.

Se realizó asimismo un seguimiento de los valores obtenidos de polidispersidad de cada una de las medidas realizadas (datos no presentados), observándose valores inferiores a 0,5 para un tiempo de sonicación máximo de ~ 45 minutos. A partir de este

tiempo de sonicación los valores obtenidos de este parámetro presentaron valores superiores a 0,5, llegándose a observar polidispersidad de 1 para POPC tras 90 minutos de sonicación.

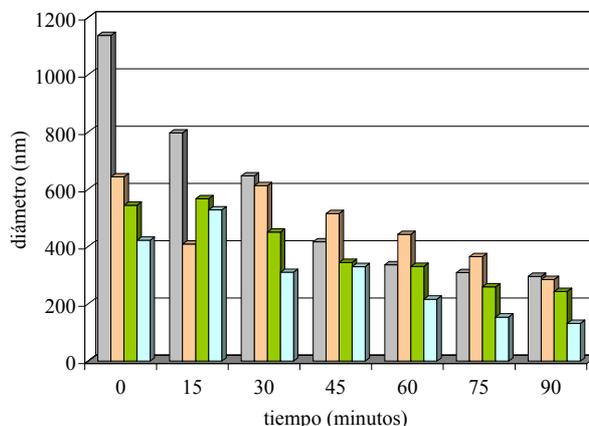


Figura 62. Diámetro de los liposomas de diferente composición lipídica: (■) POPC, (■) DMPC:POPC (1:1), (■) POPE:POPG (3:1), (■) Extracto lipídico de *E. coli*, respecto al tiempo de sonicación al que fueron sometidos.

Los resultados obtenidos llevaron a considerar como adecuado un tiempo de sonicación máximo de 30 minutos, tiempo suficiente para obtener una correcta disminución de tamaño de los liposomas originales con un valor de polidispersidad aceptable ( $< 0,5$ ).

### 5.2.1.ii. Adición de surfactantes

La formación de proteoliposomas requiere, en muchos casos, de la utilización de surfactantes para la incorporación de las moléculas de proteína en la estructura lipídica. La función que tiene el surfactante en este proceso, es la de disrupción de la bicapa lipídica dando lugar a la formación de micelas mixtas. Durante la extracción del surfactante, las micelas mixtas se reestructuran incorporando las moléculas de proteína, para dar lugar a la formación de proteoliposomas cuando la concentración de surfactante se reduce por debajo de su CMC (Dolder et al., 1996).

Se estudiaron las variaciones, tanto en el tamaño como en la polidispersidad de liposomas, para diferentes composiciones lipídicas, mediante la adición de surfactante (OG y DDM).

En la figura 63 se muestran las medidas del diámetro de los liposomas tras la adición de cantidades crecientes de surfactante. En la figura 63a se muestran los resultados obtenidos para OG, en los que se observa un incremento inicial del tamaño de los liposomas formados por fosfolípidos neutros, mientras que se aprecia como el tamaño de los liposomas con carga neta negativa se mantiene. En todos los casos, los valores del diámetro de las vesículas no se pudieron determinar a partir de la adición de un 0,75 % (p/v) de OG. Teniendo en cuenta los valores de polidispersidad observados (datos no presentados), se determinó que la concentración de OG, sin efecto disruptivo para los liposomas, no podía ser superior a 0,50 % (p/v) (~ 17 mM).

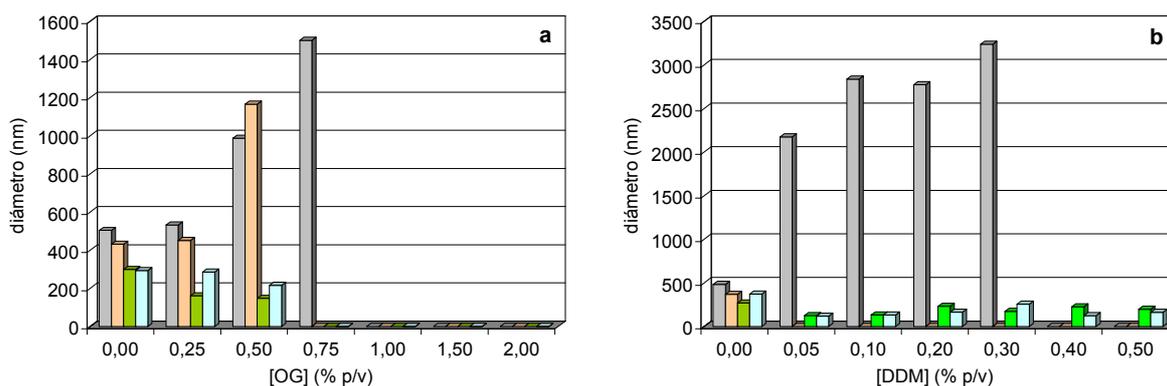


Figura 63. Variación del diámetro de los liposomas de diferente composición lipídica: (■) POPC, (■) DMPC:POPC (1:1), (■) POPE:POPG (3:1) y (■) Extracto lipídico de *E. coli*, respecto a la adición de surfactante: (a) OG y (b) DDM.

En la figura 63b se muestran los resultados obtenidos tras el tratamiento de los liposomas con cantidades crecientes de DDM. A concentraciones bajas, el surfactante afecta el diámetro de los liposomas neutros, mientras que los liposomas cargados negativamente mantienen su diámetro durante todo el proceso de adición de surfactante. Junto con los resultados obtenidos del diámetro de los liposomas, deben ser considerados los valores de polidispersidad de los mismos (datos no mostrados), que fueron ~ 1 ya a concentraciones bajas de DDM (< 0,05 % p/v). De la comparación de los valores obtenidos de diámetro y polidispersidad se concluyó que los liposomas

únicamente eran estables a concentraciones inferiores a un 0,05 % (p/v) de DDM (~ 1 mM).

### 5.2.1.iii. Variación del pH de la solución

Los liposomas pueden sufrir cambios estructurales en función de cómo varían las propiedades fisicoquímicas del medio en el que se encuentran. Por ejemplo, los liposomas que contienen PE son sensibles al pH y en determinadas condiciones, pueden dar lugar a la formación de otras estructuras laminares (Litzinger y Huang, 1992). Debido a que, para llevar a cabo este trabajo, los liposomas serían sometidos a variaciones de pH, se comprobó su estabilidad a valores comprendidos entre 3 y 12 mediante la técnica de dispersión de la luz.

En la figura 64 se muestran los diámetros obtenidos de los LUV formados con las diferentes composiciones lipídicas ensayadas a diferentes valores de pH. Estos liposomas fueron estables frente a las variaciones de pH de la solución, debidas a la progresiva adición de KOH 2M. Los valores de polidispersidad nunca fueron superiores a 0,5 y generalmente oscilaron alrededor de 0,3. El diámetro de los liposomas frente al pH mostró una ligera pendiente positiva en todos los casos.

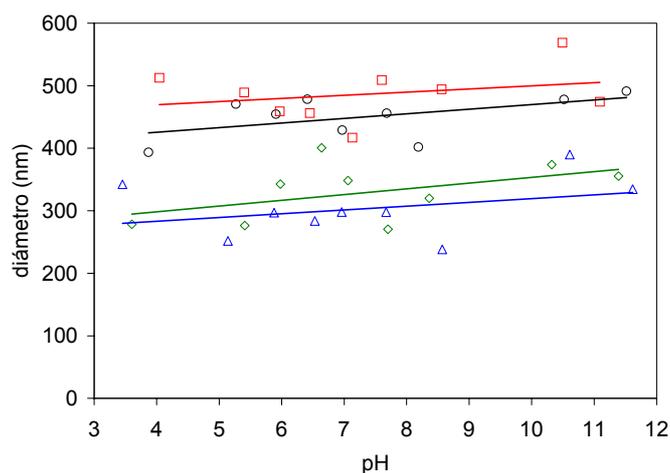


Figura 64. Variación del diámetro de los liposomas de diferente composición lipídica: (○) POPC, (◻) DMPC:POPC (1:1), (◊) POPE:POPG (3:1) y (△) Extracto lipídico de *E. coli*, frente a las variaciones del valor del pH de la solución.

En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos tras el ajuste lineal del diámetro de los liposomas frente al pH, así como los valores obtenidos a tres valores diferentes de pH (3, 7 y 12). De los resultados obtenidos se aprecia una población estable en todos los casos, presentándose un aumento del diámetro de los liposomas conforme se incrementa el pH. La mayor diferencia de tamaño de los liposomas se aprecia en la composición lipídica POPE:POPG (3:1) cuya pendiente es ligeramente superior en relación con el resto de composiciones lipídicas estudiadas.

Tabla 13. Valores obtenidos del diámetro medio de los liposomas. Del ajuste lineal de estos valores, se presenta la pendiente y el diámetro estimado a pH ácido, neutro y básico.

	POPC	DMPC:POPC (1:1)	POPE:POPG (3:1)	Ext. lip. de <i>E. coli</i>
<b><i>d</i> (nm) (n = 9)</b>	450 ± 30	490 ± 40	330 ± 50	300 ± 50
<b>Pendiente (nm)</b>	7,37	5,05	9,16	6,04
<b><i>d</i> (pH 3) (nm)</b>	420	460	290	280
<b><i>d</i> (pH 7) (nm)</b>	450	480	330	300
<b><i>d</i> (pH 12) (nm)</b>	480	510	370	330

Conforme a los resultados obtenidos, se estableció que en el intervalo de pH estudiado, entre 3 y 12, los liposomas de las diferentes composiciones lipídicas, tanto neutras como negativas, fueron estables para la realización de posteriores ensayos.

### **5.2.2. Potencial electrostático de superficie de los liposomas**

Las medidas del potencial electrostático de superficie se llevaron a cabo a partir de las medidas de fluorescencia obtenidas en los experimentos descritos en el apartado 4.15.1 de *Material y Métodos*. Se calculó, mediante ajuste no lineal, el p*K* aparente de la molécula HHC a partir del cual, y mediante aplicación de la ecuación (7), se obtuvo el incremento de potencial electrostático de superficie de cada una de las membranas modelo utilizadas.

El marcador HHC presenta un valor de p*K* en solución de 7,75 (Fernández y Fromherz, 1977).

Como composición de referencia se utilizó POPC, al que se le asignó un valor de potencial electrostático de superficie de 0 mV. El cálculo del p*K* aparente se realizó a partir de la representación gráfica de los valores obtenidos de  $\alpha$  respecto al pH y del posterior ajuste matemático de la curva sigmoide obtenida.

Para determinar la diferencia de potencial electrostático de superficie, se utilizaron LUV de referencia (POPC) y se calculó el  $\Delta\psi$  para las mezclas lipídicas: DMPC:POPC (1:1), POPE:POPG (3:1) y extracto lipídico total de *E. coli*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Valores del incremento de potencial electrostático de superficie en LUV de diferente composición.

	p <i>K</i>	$\Delta\psi$ (mV)
<b>POPC</b>	8,13 ± 0,07	0
<b>DMPC:POPC (1:1)</b>	8,15 ± 0,12	-1 ± 9
<b>POPE:POPG (3:1)</b>	8,59 ± 0,19	- 28 ± 12
<b>Ext. lip. de <i>E. coli</i></b>	8,56 ± 0,07	- 26 ± 6

A partir de los valores observados en la tabla 14, se pueden dividir las composiciones lipídicas empleadas en dos grupos, zwitteriónicos y con carga neta negativa. Así, POPC y DMPC:POPC (1:1) presentan carga neta cero (el valor de - 1 mV observado en DMPC:POPC queda incluido en la desviación estándar), mientras que POPE:POPG (3:1) y extracto lipídico de *E. coli*, presentan carga neta negativa.

### **5.2.3. Estudio por AFM de la extensión de liposomas sobre mica**

La observación de la extensión de liposomas sobre mica es fundamental para poder establecer, posteriormente, diferencias en la visualización de bicapas en las cuales se incorpore la proteína a estudiar, y se pueda dilucidar el efecto que ésta produzca. Con este fin se extendieron los liposomas formados con diferentes mezclas lipídicas sobre mica y se analizaron las SPB formadas por AFM.

Las SPB se estudiaron utilizando el modo de contacto intermitente, ya que en todos los casos las temperaturas de transición fueron inferiores a la temperatura de visualización, induciendo una elevada viscosidad de los lípidos, que puede dificultar la nitidez de imagen en modo de contacto.

El proceso de extensión de los liposomas sobre mica es similar para todo tipo de lípidos, aunque el tiempo que se tarda en recubrir el soporte presenta algunas diferencias, según sea la composición.

### **5.2.3.i. Formación de una SPB con lípidos zwitteriónicos**

Se escogió como modelo de lípido zwitteriónico la mezcla DMPC:POPC (1:1), ya que presentó una resistencia suficiente al modo de contacto intermitente. El POPC puro, fue fácilmente erosionado por la punta del AFM (ver figura 68a). En la secuencia de la figura 65 se muestra la evolución seguida durante la extensión de la mezcla neutra en función del tiempo. Bajo cada imagen topográfica se presenta la correspondiente sección transversal realizada.

La extensión de la SPB formada por DMPC:POPC (1:1) se consideró completa a partir de un tiempo  $\geq$  a 10 minutos, en presencia del catión divalente  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución. El seguimiento de la extensión de la bicapa lipídica puede estimarse por el porcentaje de recubrimiento de la mica y por la altura media de la SPB medida a partir de la realización de secciones de las imágenes topográficas.

En la tabla 15 se aprecia la evolución del recubrimiento de la SPB sobre el sustrato de mica muscovita en función del tiempo. La altura media de la bicapa se mantuvo constante durante todo el proceso, encontrándose una pequeña variación en la altura a los 9 minutos de extensión. Esta variación puede ser debida, a una cierta dificultad en la medida de la altura, producida por la elevada movilidad de las moléculas de fosfolípido y el rápido recubrimiento de los defectos. Este efecto puede apreciarse en la figura 65d, en la que se observan importantes líneas de escaneo derivadas de la erosión producida por la punta sobre la superficie lipídica, y el recubrimiento de algunos de los defectos.

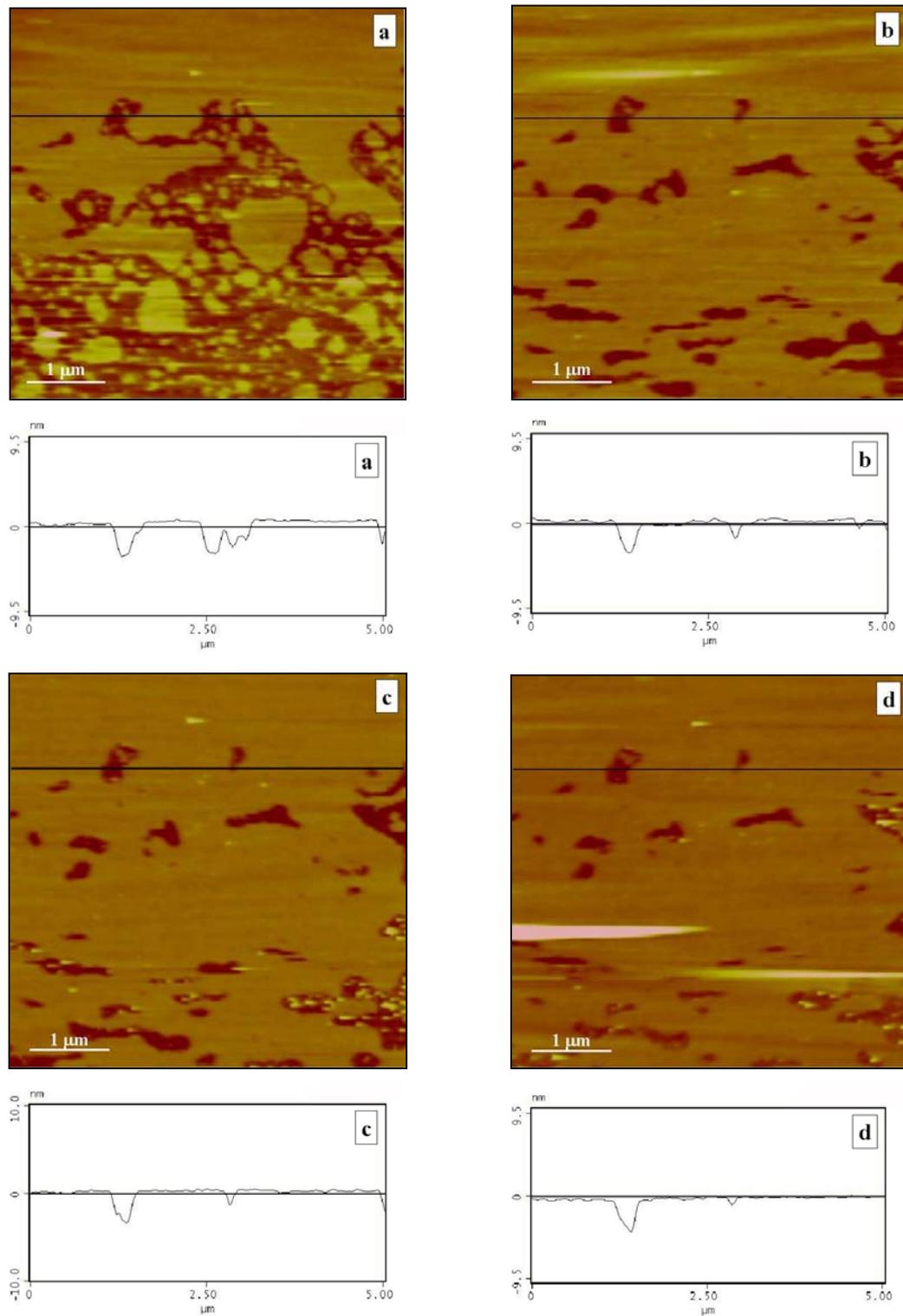


Figura 65. Topografía y secciones del proceso de extensión de una SPB formada por liposomas de DMPC:POPC (1:1) sobre mica, en medio líquido (Hepes 10 mM, 150 mM NaCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,40) a diferentes tiempos: **(a)**  $t = 0$  minutos. **(b)**  $t = 3$  minutos. **(c)**  $t = 6$  minutos. **(d)**  $t = 9$  minutos.  $Z = 20$  nm.

Tabla 15. Parámetros del proceso de formación de una SPB de DMPC:POPC (1:1) en función del tiempo: altura de la bicapa y porcentaje de recubrimiento de la mica.

	Tiempo (minutos)	Altura (nm) (n = 10)	Recubrimiento (%)
<b>Figura 65a</b>	0	3,5 ± 0,3	60
<b>Figura 65b</b>	3	3,6 ± 0,2	89
<b>Figura 65c</b>	6	3,6 ± 0,2	92
<b>Figura 65d</b>	9	3,3 ± 0,2	97

### 5.2.3.ii. Formación de una SPB con lípidos negativos

La extensión de las SPB está directamente relacionada con el tipo de fosfolípidos que constituyen la bicapa, así como con las condiciones de extensión de la misma. De forma comparativa a la bicapa formada con DMPC:POPC (1:1), se realizó una extensión de LUV formados por una mezcla lipídica negativa (extracto lipídico de *E. coli*) sobre mica muscovita en las mismas condiciones experimentales que las empleadas para la mezcla zwitteriónica.

En la figura 66, se muestran cuatro imágenes topográficas de la extensión de liposomas, preparados por el método de extrusión con un diámetro medio de 400 nm, de extracto lipídico de *E. coli*. Bajo cada imagen topográfica se muestra alguna de las secciones realizadas, a partir de las cuales se procedió al cálculo estadístico de la altura media de la bicapa.

La extensión de la SPB de extracto lipídico de *E. coli* se consideró completa a partir de 25-30 minutos en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . El proceso de extensión de esta SPB fue más irregular en el tiempo que el observado en la mezcla de lípidos neutros, como puede apreciarse en las figuras c y d, por el brusco recubrimiento de la superficie de mica a partir de los 15 minutos.

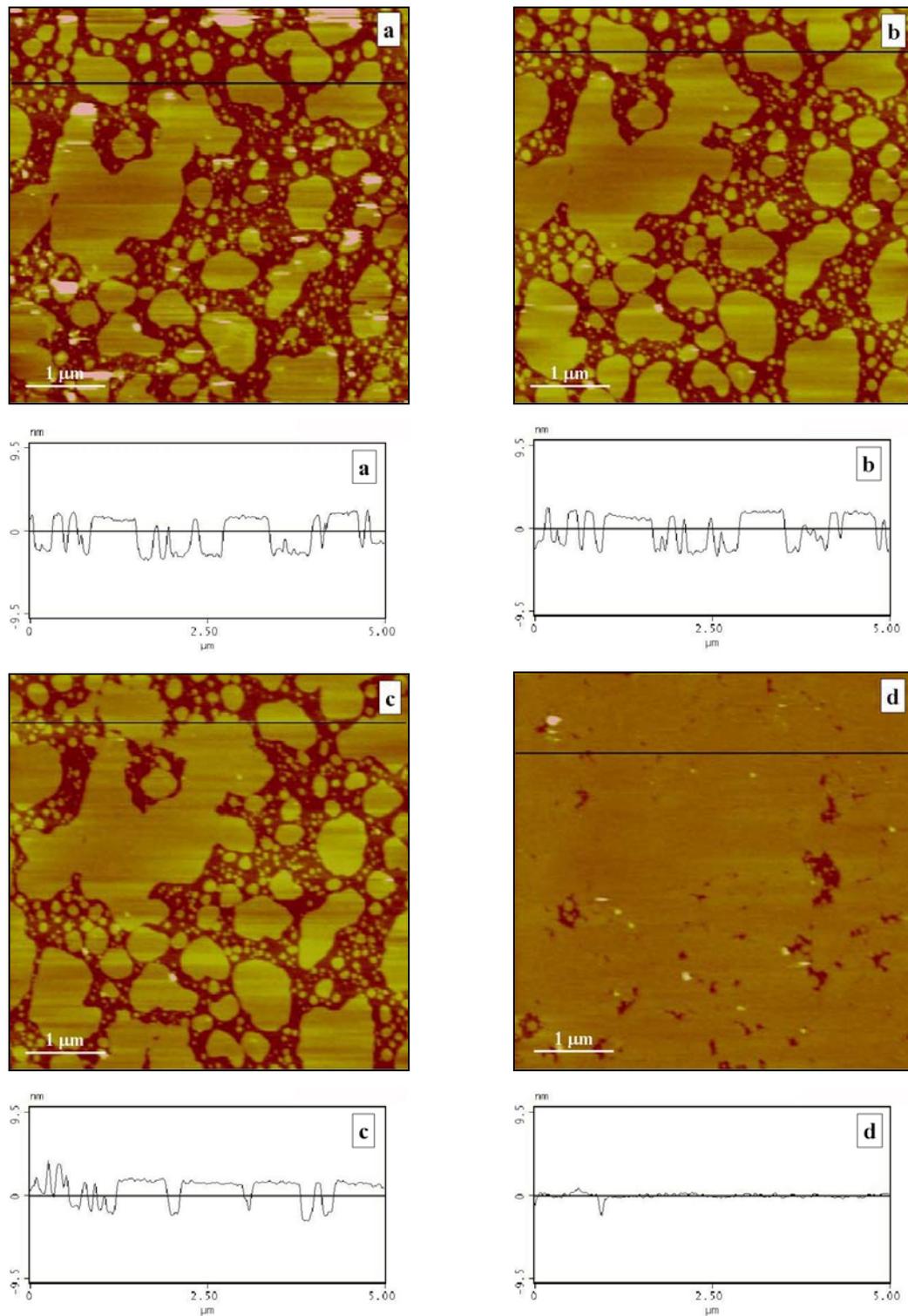


Figura 66. Topografía y secciones del proceso de extensión de una SPB formada por liposomas de extracto lipídico de *E. coli* sobre mica muscovita en medio líquido (Hepes 10 mM, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,40) a diferentes tiempos: **(a)** t = 0 minutos. **(b)** t = 6 minutos. **(c)** t = 15 minutos. **(d)** t = 20 minutos. Z = 20 nm.

En la tabla 16 se muestran los valores de la altura media calculada de la bicapa extendida en función del tiempo, así como el porcentaje de recubrimiento del sustrato hidrofílico.

Tabla 16. Parámetros del proceso de formación de una SPB de extracto lipídico de *E. coli* en función del tiempo: altura de la bicapa y porcentaje de recubrimiento de la mica.

	Tiempo (minutos)	Altura (nm) (n = 10)	Recubrimiento (%)
<b>Figura 66a</b>	0	4,2 ± 0,3	66
<b>Figura 66b</b>	6	4,4 ± 0,2	69
<b>Figura 66c</b>	15	4,1 ± 0,3	70
<b>Figura 66d</b>	20	3,2 ± 0,4	97

La altura observada para la bicapa de extracto lipídico de *E. coli* fue constante hasta un recubrimiento de ~ 97 %, a partir del cual, las medidas realizadas pueden presentar un error considerable al no observarse bastantes defectos, o agujeros de diámetro suficiente, para que la punta entre en contacto con la mica. Si la punta no alcanza la mica, la altura detectada es inferior a la real.

En la figura 67 se muestra una comparación de la extensión de SPB de lípidos neutros y cargados negativamente, como son DMPC:POPC (1:1) y extracto lipídico de *E. coli*.

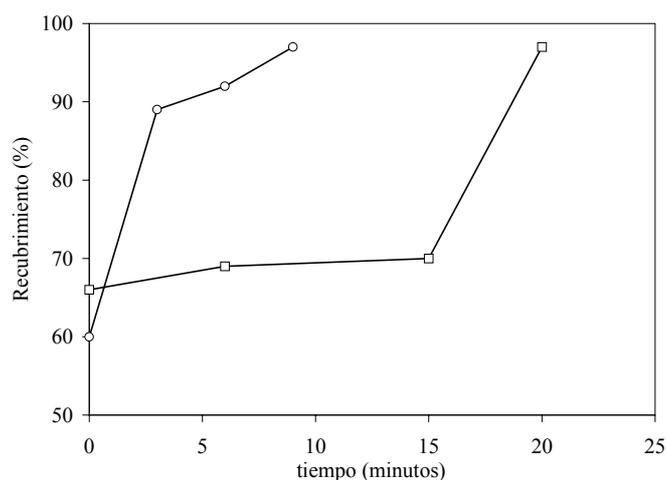


Figura 67. Porcentaje de recubrimiento de la mica respecto al tiempo, de una SPB formada con diferentes composiciones lipídicas: (○) DMPC:POPC (1:1). (□) Extracto lipídico de *E. coli*.

En la figura 67 puede observarse un comportamiento diferente de los lípidos sobre mica muscovita, en iguales condiciones experimentales. La mezcla formada por DMPC:POPC (1:1) presentó una extensión más rápida que la del extracto lipídico de *E. coli*.

#### **5.2.4. Dominios lipídicos**

Las imágenes obtenidas por AFM de las composiciones lipídicas formadas por más de un tipo de lípido, pueden presentar una topografía diferente dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los lípidos que constituyen la bicapa. Se estudió por AFM la superficie de SPB formadas con diferentes composiciones lipídicas: POPC, DMPC:POPC (1:1), POPE:POPG (3:1) y extracto lipídico de *E. coli*.

Una de las principales propiedades fisicoquímicas de los fosfolípidos es la transición entre el estado de gel y cristal líquido, que tiene lugar a una temperatura característica ( $T_m$ ). Según la temperatura a la cual se encuentre la SPB, ésta puede mostrar dominios o regiones diferenciadas, que representan estados de equilibrio entre las fases cristal-líquido y gel durante el cambio de estado del fosfolípido (Tokumasu et al., 2003a). En el caso de mezclas lipídicas, la presencia de dominios puede ser debida tanto al cambio de estado de los diferentes fosfolípidos como a una heterogeneidad en su distribución (Giocondi et al., 2001; Shaikh et al., 2001). En ambos casos, se podrían apreciar diferencias significativas en la altura de las moléculas que constituyen la SPB (Tokumasu et al., 2003b).

##### **5.2.4.i. POPC**

Las SPB formadas por extensión de liposomas de POPC, fueron difíciles de visualizar por AFM en las condiciones empleadas para este trabajo. El POPC, presenta un valor de  $T_m$  de - 2 °C, por tanto, a temperatura ambiente se encuentra en estado fluido. La movilidad que presenta este fosfolípido a la temperatura de visualización es la causante de la elevada adhesión del mismo a la punta del AFM. En la figura 68a se puede apreciar el efecto de erosión causado en la SPB por la punta, así como la ausencia de dominios en la superficie del fosfolípido.

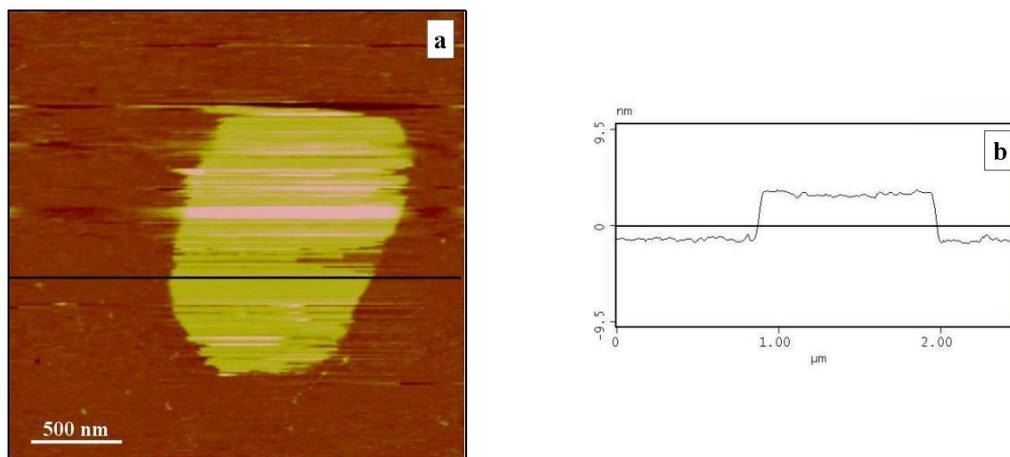


Figura 68. Topografía de la superficie de una SPB de POPC visualizada en modo de contacto intermitente. Solución de visualización: 10 mM Hepes pH 7,40; 150 mM NaCl.  $Z = 20$  nm. **(a)** Imagen topográfica por AFM. **(b)** Sección realizada a la imagen de topografía.

Teniendo en cuenta el efecto de erosión de la bicapa por la punta del AFM, se procedió al cálculo estadístico de la altura media de la bicapa de POPC a partir del trazado de diferentes secciones de la misma en regiones no dañadas (figura 68b). El valor medio obtenido fue de  $4,3 \pm 0,2$  nm ( $n = 10$ ). Las diferentes secciones de las bicapas de POPC no pusieron de manifiesto en ningún caso la presencia de alteraciones superficiales atribuibles a la presencia de dominios.

#### 5.2.4.ii. DMPC:POPC (1:1, mol:mol)

Los fosfolípidos zwitteriónicos DMPC y POPC, presentan una cabeza polar común de PC, y se diferencian por sus cadenas hidrocarbonadas. La DMPC presenta dos cadenas hidrocarbonadas iguales y saturadas, constituidas por 14 átomos de carbono, mientras que la POPC presenta dos cadenas diferentes, una saturada formada por 16 átomos de carbono y una formada por 18 átomos de carbono, con una insaturación. Estos fosfolípidos presentan asimismo valores de  $T_m$  muy diferentes,  $23$  °C la DMPC y  $-2$  °C la POPC. Las diferencias que presentan estos dos fosfolípidos, sugieren la posibilidad de que se formen dominios estructurales, y fue por esta razón por la que se procedió al estudio de su topografía por AFM. Un ejemplo se muestra en la figura 69.

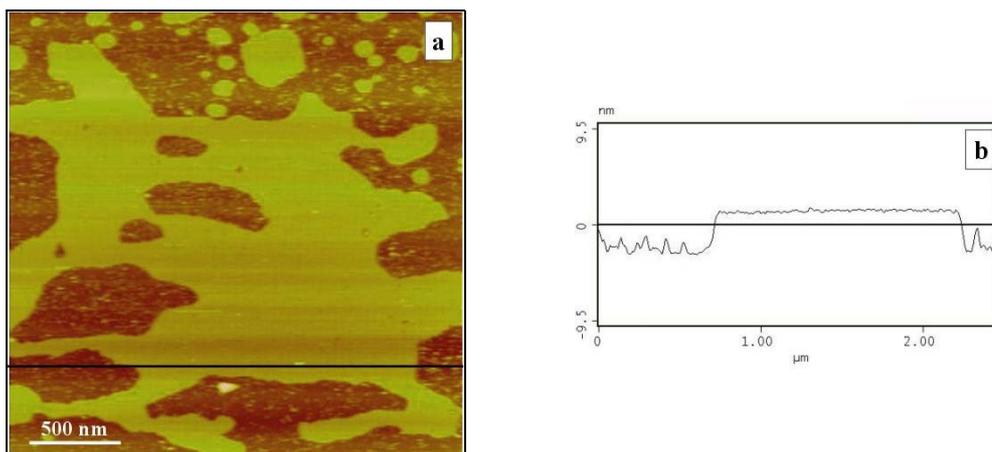


Figura 69. Topografía de la superficie de una SPB de DMPC:POPC (1:1) visualizada en modo de contacto intermitente. Solución de visualización: 10 mM HEPES pH 7,40; 150 mM NaCl. Z = 20 nm. (a) Imagen topográfica por AFM. (b) Sección realizada a la imagen de topografía.

La visualización de la superficie de las SPB de esta mezcla de PC no reveló la existencia de ningún tipo de dominio, como puede apreciarse en la imagen de topografía de la figura 69a. Se observa una superficie plana y homogénea con una altura de  $3,7 \pm 0,2$  nm ( $n = 10$ ). La sección transversal de estas SPB (figura 69b) tampoco puso de manifiesto ninguna diferencia de altura significativa, atribuible a la presencia de dominios, lo que indica una mezcla homogénea de estos dos fosfolípidos.

La ausencia de dominios fue corroborada mediante variaciones de la temperatura durante la visualización, de entre 4 °C y 40 °C, que evidenciaron variaciones significativas en la altura de la bicapa, pero en ningún momento dieron lugar a la observación de dominios lipídicos. Desde 4 °C a 40 °C la altura de la bicapa disminuyó su altura en  $\sim 1$  nm.

#### 5.2.4.iii. POPE:POPG (3:1, mol:mol)

Los fosfolípidos POPE y POPG presentan cadenas hidrocarbonadas idénticas y situadas en las mismas posiciones del glicerol, una saturada formada por 16 átomos de carbono y otra, constituida por 18 átomos de carbono con una insaturación. Estos fosfolípidos se diferencian en la cabeza polar, formada por PE y PG, respectivamente. El fosfolípido POPE es un lípido zwitteriónico capaz de formar enlaces de hidrógeno entre las cabezas polares. El POPG es un fosfolípido con carga neta superficial negativa,

que también tiene capacidad de formar enlaces de hidrógeno (Hauser et al., 1981; Söderlund et al., 1999). Estos dos fosfolípidos presentan diferencias en su  $T_m$ , siendo ésta de 25 °C para el POPE y de - 2 °C para el POPG. La mezcla formada por estos dos fosfolípidos fue estudiada por AFM en modo de contacto intermitente y en medio líquido, con el fin de observar posibles dominios. En la figura 70 se muestra la imagen obtenida de la topografía de una SPB formada por la extensión de LUV de esta mezcla lipídica, así como una sección transversal realizada en la misma.

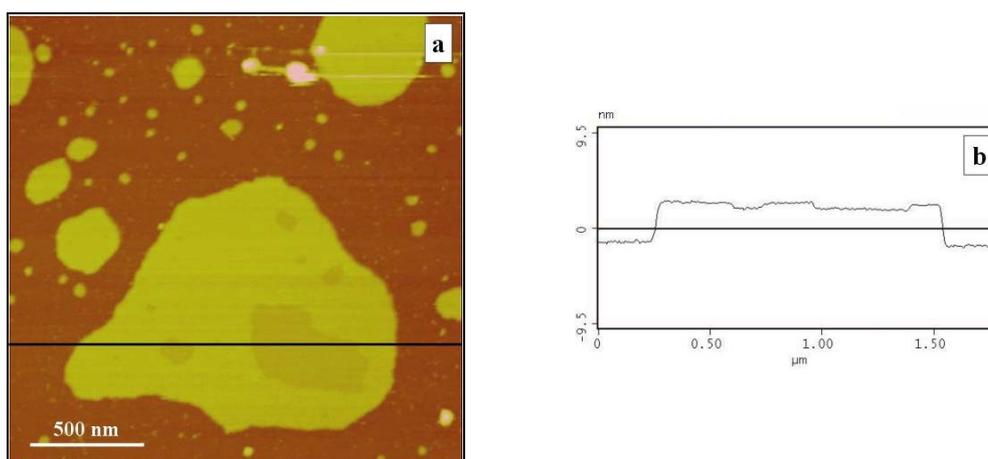


Figura 70. Topografía de la superficie de una SPB de POPE:POPG (3:1) visualizada en modo de contacto intermitente. Solución de visualización: 10 mM Hepes pH 7,40; 150 mM NaCl. Z = 20 nm. (a) Imagen topográfica por AFM. (b) Sección realizada a la imagen de topografía.

La mezcla formada por POPE:POPG (3:1) presentó dominios en su superficie, siendo éstos claramente visibles en las imágenes de topografía de AFM (figura 70a). La bicapa extendida sobre mica presentó dos alturas:  $4,16 \pm 0,09$  nm ( $n = 10$ ) y  $3,58 \pm 0,15$  nm ( $n = 10$ ), correspondientes al dominio superior e inferior, respectivamente. La diferencia de altura entre ambos dominios, presentada en la sección de la figura 70b, fue de  $0,63 \pm 0,07$  nm ( $n = 10$ ). La presencia de estos dominios en las SPB de POPE:POPG (3:1) podrían tener su origen en la heterogeneidad de esta mezcla lipídica.

Para establecer la posible dependencia de los dominios observados con la temperatura, se realizaron variaciones de ésta durante la visualización de la superficie de una SPB. En la figura 71 se presentan las variaciones topográficas de los dominios a tres temperaturas, mientras que las diferencias en su superficie se presentan en la tabla 17.

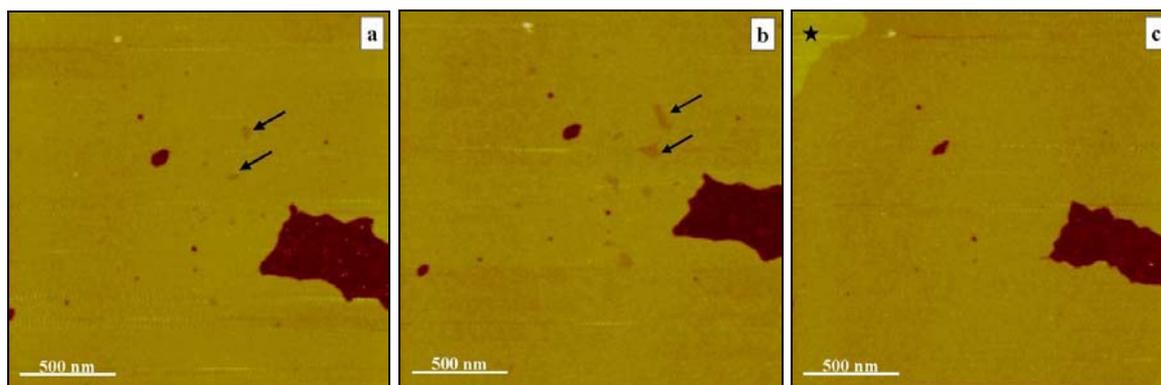


Figura 71. Topografía de una SPB formada por extensión de liposomas de POPE:POPG (3:1) visualizada en modo de contacto intermitente.  $Z = 20$  nm. Solución de visualización: 10 mM Hepes pH 7,40; 150 mM NaCl a: **(a)**  $\sim 4$  °C. **(b)** Temperatura ambiente ( $\sim 23$  °C). **(c)**  $\sim 40$  °C. Las flechas negras indican la presencia de dominios inferiores, mientras que la estrella negra indica el dominio superior.

Los cambios observados en la extensión de los dominios (figura 71) indicaron la dependencia de los mismos con la temperatura. Al añadir solución a 4 °C, se apreció un claro predominio del dominio superior, con algunas regiones aisladas de dominios inferiores indicadas por flechas negras en la figura 71a. Conforme se incrementó la temperatura, estos dominios inferiores aumentaron su área, llegando a ser el dominio predominante a 40 °C (figura 71c). En la figura 71c, se realizó una modificación digital del contraste con el fin de favorecer la visualización del dominio superior indicado por una estrella negra.

La mezcla POPE:POPG (3:1) tiene una  $T_m$ , calculada experimentalmente por anisotropía de la fluorescencia y corroborada por microcalorimetría, de  $19,2 \pm 0,5$  °C. La secuencia de imágenes presentadas en la figura 71, muestran, a grandes rasgos, el proceso de cambio de fase, desde estado gel (figura 71a) a cristal-líquido (figura 71c). Los dominios inferiores, marcados con flechas negras, representan pequeñas agrupaciones de moléculas, probablemente enriquecidas en el fosfolípido de menor  $T_m$  (POPG), que iniciarían la transición. Los dominios superiores serían debidos a regiones enriquecidas en el fosfolípido de mayor  $T_m$ , POPE en este caso. Al completarse la transición, la proporción de los dominios entre ambas regiones se invertiría. Los dominios finalmente desaparecieron, observándose una superficie completamente

homogénea a temperaturas superiores a 40 °C, en las que la totalidad de moléculas fosfolipídicas se encontrarían en estado fluido.

En la tabla 17 se muestran los porcentajes calculados de la superficie ocupada por el dominio superior en la SPB, en los que se aprecia la reducción de los dominios superiores con respecto a la temperatura.

Tabla 17. Porcentaje de la superficie de los dominios superiores respecto a la superficie de la SPB de POPE:POPG (3:1).

	4 °C	23 °C	40 °C
Dominio superior (%)	99,36	98,05	3,05

La bicapa de POPE:POPG (3:1), por tanto, estaría formada por regiones ricas en POPE (dominios superiores) y regiones ricas en POPG (dominios inferiores).

#### 5.2.4.iv. Extracto lipídico de *Escherichia coli*

El extracto lipídico de *E. coli* está constituido por una mezcla de diferentes lípidos que constituyen la membrana plasmática de este microorganismo. La composición lipídica total (p/p) está formada por un 57,5 % de PE, un 15,1 % de PG, un 9,8 % de CL y un 17,6 % de otros lípidos minoritarios. La elevada heterogeneidad fosfolipídica de este extracto natural hace que esta mezcla pueda presentar dominios lipídicos en su superficie.

En la figura 72a se muestra una imagen obtenida por AFM de la topografía de superficie del extracto lipídico, en la que se aprecian algunos dominios discretos y aislados más elevados que el resto de la SPB. Las alturas observadas fueron de  $3,75 \pm 0,11$  nm ( $n = 10$ ) y de  $3,12 \pm 0,11$  nm ( $n = 10$ ). La altura medida para los dominios lipídicos fue de  $0,70 \pm 0,08$  nm ( $n = 10$ ).

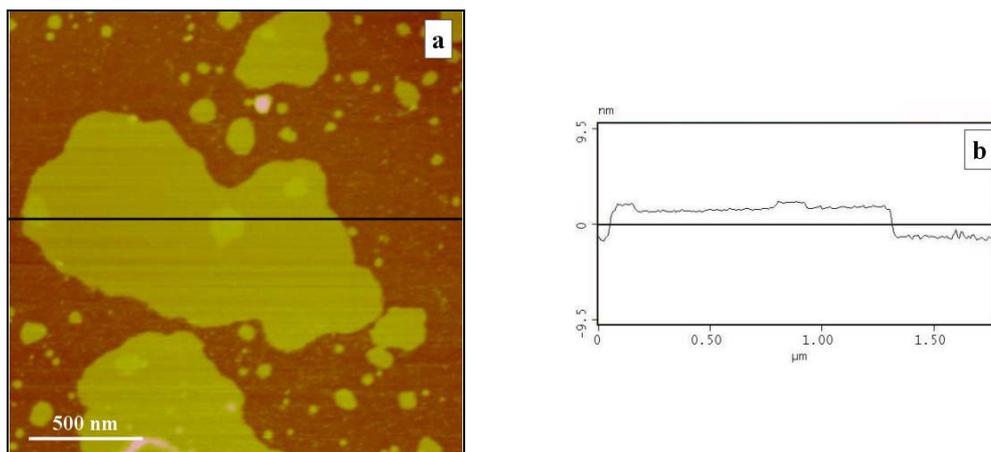


Figura 72. Topografía de la superficie de una SPB de extracto lipídico de *E. coli* visualizada en modo de contacto intermitente. Solución de visualización: 10 mM Hepes pH 7,40; 150 mM NaCl.  $Z = 20$  nm. **(a)** Imagen topográfica por AFM. **(b)** Sección realizada a la imagen de topografía.

El área de los dominios encontrados en estas SPB también presentó variaciones en función de la temperatura, como puede apreciarse en la figura 73. Las variaciones observadas en estos dominios indicaron, de la misma forma que en el caso de la mezcla formada por POPE:POPG (3:1), una importante dependencia con la temperatura. En estas SPB, las variaciones en la proporción de los dominios no fueron paulatinas, sino que se produjeron de forma brusca al variar las condiciones de visualización (figura 73).

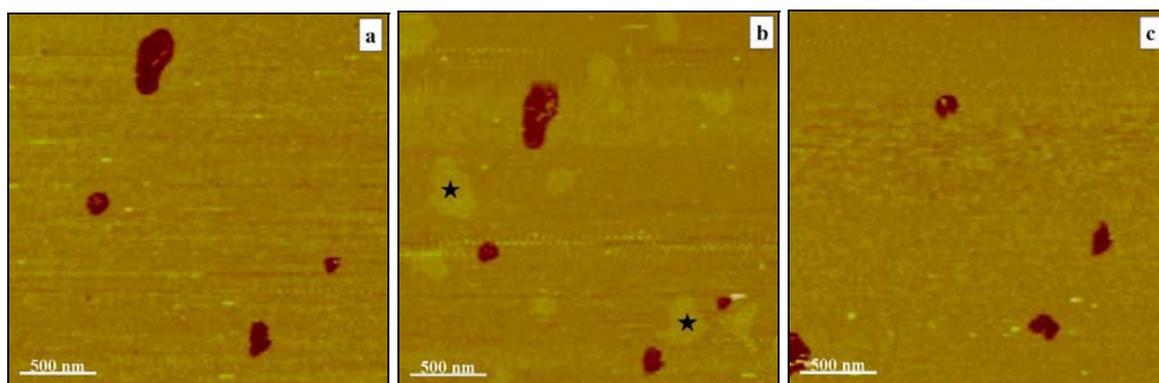


Figura 73. Topografía de una SPB formada por extensión de liposomas de extracto lipídico de *E. coli* visualizada en modo de contacto intermitente.  $Z = 20$  nm. Solución de visualización: 10 mM Hepes pH 7,40; 150 mM NaCl a: **(a)**  $\sim 4$  °C. **(b)** Temperatura ambiente ( $\sim 23$  °C). **(c)**  $\sim 40$  °C. Las estrellas negras indican la presencia de dominios superiores.

Los dominios aislados observados en la superficie de la SPB formada por extracto lipídico de *E. coli*, podrían ser debidos al cambio de fase de alguno de los fosfolípidos que se encuentran en esta compleja mezcla lipídica. Al añadir a la muestra, solución de visualización a una temperatura de 4 °C, se observó una superficie plana y ausente de dominios (figura 73a). Al aumentar la temperatura de la muestra se pudieron apreciar algunos dominios que rápidamente desaparecieron. Cuando la temperatura se incrementó hasta 40 °C, se pudo observar un aumento de la erosión realizada por la punta en la superficie de la SPB, indicando un aumento de fluidez de la misma, que puede apreciarse por la progresiva desaparición de defectos en la bicapa.

En las SPB observadas de extracto lipídico de *E. coli* no siempre se apreciaron estos dominios lipídicos, y cuando fueron visualizados desaparecieron con rapidez al variar las condiciones experimentales. En la tabla 18 se muestra el porcentaje de dominio superior observado en la figura 73.

Tabla 18. Porcentaje de la superficie de los dominios superiores respecto a la superficie de la SPB de extracto lipídico de *E. coli*.

	4 °C	23 °C	40 °C
Dominio superior (%)	100,00	19,57	-

### **5.2.5. Proceso de disrupción de liposomas con surfactantes**

Las diferentes etapas del proceso de solubilización de los liposomas por acción de surfactantes, pueden establecerse a partir de las variaciones que se observan en la dispersión estática de la radiación (SLS) (Urbaneja et al., 1990). La máxima dispersión corresponde a la etapa inicial del proceso, en las etapas siguientes, la dispersión disminuye progresivamente, hasta obtener valores constantes, e incluso cercanos a cero, al final del proceso.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos a diferentes concentraciones de lípido (0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM y 0,5 mM) y en función de las concentraciones de surfactante, se obtuvieron los parámetros que caracterizan el proceso

de solubilización. Los datos obtenidos permitieron la preparación óptima de micelas mixtas fosfolípido-surfactante, necesarias para la formación de proteoliposomas y cristales 2D.

#### **5.2.5.i. n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido**

El OG está considerado como surfactante de cadena corta, de elevada CMC, estimándose ésta entre 19 y 25 mM en solución, a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C y a pH neutro ( $\sim 7$ ) (le Maire et al., 2000). En presencia de fosfolípidos, este valor puede verse alterado debido a la interacción que se produce entre las moléculas de surfactante y la bicapa lipídica.

En la figura 74 se presenta la variación de la dispersión de la luz observada a concentraciones crecientes del OG en presencia de liposomas de diferente composición lipídica. En todas las composiciones ensayadas se pudieron apreciar las tres etapas de las que consta el proceso de solubilización de los liposomas.

En la primera etapa se presenta un ligero aumento de los valores de SLS, indicando un incremento del tamaño de las vesículas lipídicas, debido a la inserción de moléculas de surfactante en su estructura.

La segunda etapa del proceso de disrupción fue uniforme en todos los casos estudiados, pudiendo apreciarse descensos de SLS a concentraciones similares de OG y concordantes con su CMC, de aproximadamente 20 mM.

En la tercera etapa, el descenso de SLS concluyó, en el caso de las composiciones lipídicas neutras, en valores constantes y negligibles de SLS, demostrando una completa solubilización de las vesículas lipídicas. En el caso de las composiciones lipídicas negativas, se observó la presencia de valores residuales constantes de aproximadamente un 5 %.

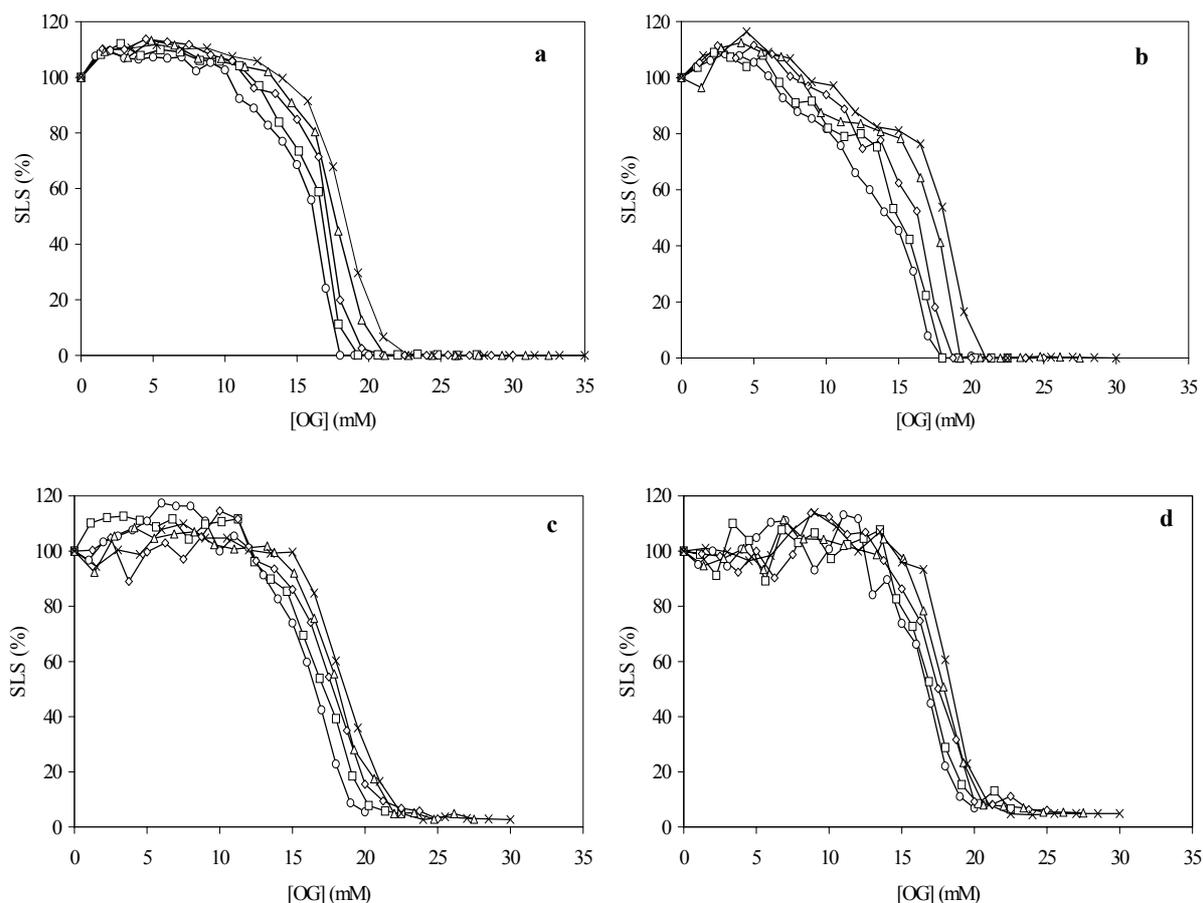


Figura 74. Variación de la dispersión de la luz (SLS) frente a OG a diferentes concentraciones de lípido: (○) 0,1 mM, (□) 0,2 mM, (◇) 0,3 mM, (△) 0,4 mM y (×) 0,5 mM. Las composiciones lipídicas ensayadas fueron: **(a)** POPC. **(b)** DMPC:POPC (1:1). **(c)** POPE:POPG (3:1). **(d)** Extracto lipídico de *E. coli*.

En la figura 75 se muestran los procesos de saturación (figura 75a) y de solubilización (figura 75b) de liposomas formados por diferentes composiciones lipídicas. En ambos procesos, saturación y solubilización, se aprecia una dependencia lineal de la concentración de OG frente a la concentración de lípido, en todos los casos de tipo creciente. A mayor concentración de lípido, mayor fue la concentración de surfactante añadida en la solución para dar lugar a la formación de micelas mixtas.

Se pueden apreciar ciertas diferencias en los procesos de saturación y solubilización asociadas a la composición lipídica de los liposomas. La composición neutra formada por DMPC:POPC (1:1) fue la más susceptible a la incorporación del surfactante, ya que requiere para su saturación, valores de OG inferiores que el resto de

composiciones estudiadas. Asimismo, es la composición que presenta unos valores de solubilización menores, indicando una menor resistencia a la disrupción que las demás composiciones. Por otra parte, la mezcla POPE:POPG (3:1) presenta unos valores de saturación similares a los mostrados por POPC y por el extracto lipídico de *E. coli*, pero superiores al resto de composiciones estudiadas en el proceso de solubilización. Esta composición negativa presentaría una mayor resistencia al proceso de disrupción por OG que el resto de composiciones lipídicas estudiadas.

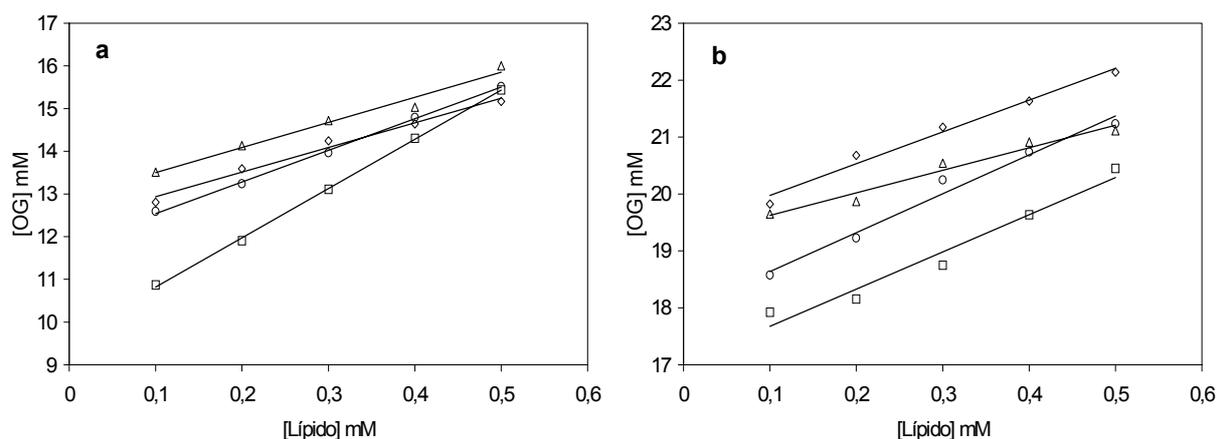


Figura 75. Concentración de OG necesaria para: (a) Saturar ( $S_{SAT}$ ) y para (b) Solubilizar ( $S_{SOL}$ ) diferentes bicapas lipídicas a concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,5 mM. Las composiciones lipídicas ensayadas fueron: (○) POPC, (□) DMPC:POPC (1:1), (◇) POPE:POPG (3:1) y (△) Extracto lipídico de *E. coli*.

Todas las composiciones lipídicas ensayadas mostraron, en el proceso de solubilización, un punto correspondiente a la concentración de OG en ausencia de lípido (figura 75b), que corresponde al intervalo de CMC del OG en las condiciones de trabajo utilizadas (De la Maza y Parra, 1994).

Una vez determinados los procesos de saturación y de solubilización, se puede estudiar el intervalo que existe entre los mismos, el cual rige la transición entre liposoma y micela, en la denominada área o región de coexistencia (López et al., 2001). Esta región puede ser calculada como el área existente entre las rectas  $S_{SAT}$  y  $S_{SOL}$ . Los valores obtenidos se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Valores calculados de la región de coexistencia entre las rectas  $S_{SAT}$  y  $S_{SOL}$  de las diferentes composiciones lipídicas estudiadas con el surfactante OG.

	POPC	DMPC:POPC (1:1)	POPE:POPG (3:1)	Extracto lipídico de <i>E. coli</i>
Región de coexistencia (mM <sup>2</sup> )	2,39	2,34	2,80	2,30

Los valores calculados para las regiones de coexistencia de las diferentes composiciones lipídicas (tabla 19), permiten afirmar que tan solo la mezcla formada por POPE y POPG presenta una variación significativa frente al resto de composiciones estudiadas. En este caso, se aprecia un área mayor que en el resto de composiciones lipídicas, indicando un mayor requerimiento de surfactante desde la saturación de las vesículas hasta su completa solubilización.

A partir del ajuste lineal de las rectas obtenidas para  $S_{SAT}$  y  $S_{SOL}$ , se obtuvieron los valores de  $S_W$  y  $Re$ , según la ecuación (4) del apartado *Material y Métodos*. De los valores calculados y resumidos en la tabla 20, se aprecia una mayor afinidad de las moléculas de surfactante por los liposomas zwitteriónicos que por los negativos. Estos últimos presentan valores de surfactante libre en el medio acuoso ( $S_W$ ) mayores, por tanto, existe una cantidad de surfactante menor, incluida en su estructura. Los valores de  $S_W$  son plenamente concordantes con los valores obtenidos de  $Re$ . El parámetro  $Re_{SAT}$  es interpretado como la relación molar efectiva entre surfactante y fosfolípido, necesaria para la completa saturación de los liposomas y el inicio de la solubilización de la bicapa lipídica hasta concluir en la formación de micelas mixtas, caracterizado por el parámetro  $Re_{SOL}$  (De la Maza y Parra, 1994). Se puede apreciar una disminución de los valores de  $Re_{SAT}$  a  $Re_{SOL}$ , en todos los casos, debido al reparto de las moléculas de surfactante y fosfolípido y a la rápida formación de micelas mixtas. La diferencia más significativa entre estos dos parámetros es observada en el caso de DMPC:POPC (1:1) en que la diferencia entre  $Re_{SAT}$  y  $Re_{SOL}$  es de 5,00 mM, indicando una elevada reorganización molecular en presencia de OG.

Tabla 20. Valores de  $S_w$ ,  $Re$  y  $K$ , obtenidos de la interacción entre OG y liposomas de diferente composición lipídica.

	$S_{wSAT}$ (mM)	$S_{wSOL}$ (mM)	$Re_{SAT}$ (mol/mol)	$Re_{SOL}$ (mol/mol)	$K_{SAT}$ (mM <sup>-1</sup> )	$K_{SOL}$ (mM <sup>-1</sup> )
POPC	11,80	17,96	7,40	6,83	0,08	0,05
DMPC:POPC (1:1)	9,67	17,02	11,53	6,53	0,10	0,05
POPE:POPG (3:1)	12,36	19,41	5,77	5,59	0,07	0,04
Ext. lip. de <i>E. coli</i>	12,91	19,23	5,88	3,96	0,07	0,04

El OG, en presencia de los liposomas estudiados, presentó una gran capacidad de formación de micelas mixtas, como se deduce de los bajos valores de las constantes de distribución ( $K$ ), que fueron ligeramente superiores en el caso de las composiciones neutras, que en el caso de las composiciones cargadas negativamente.

En la figura 76 se muestra la representación gráfica de  $S_w$  (figura 76a) y de  $Re$  (figura 76b) frente a SLS durante todo el proceso de coexistencia entre liposomas (100 % de SLS) y micelas mixtas (0 % de SLS). En ambos casos se puede apreciar un comportamiento lineal, creciente para  $S_w$  y decreciente para  $Re$ .

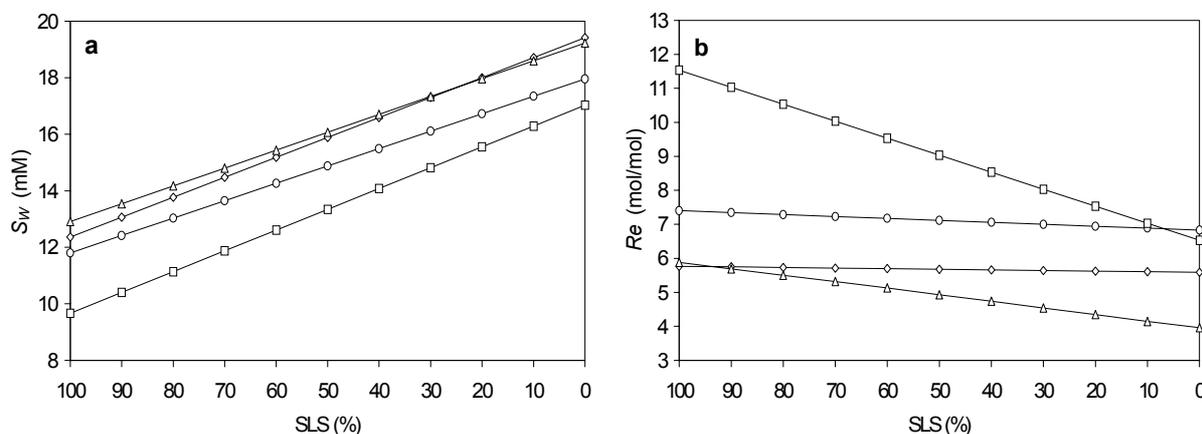


Figura 76. Comparación de las composiciones lipídicas: (○) POPC, (□) DMPC:POPC (1:1), (◇) POPE:POPG (3:1) y (△) Extracto lipídico de *E. coli*, de dos parámetros: (a)  $S_w$  y (b)  $Re$  frente a SLS.

Las composiciones lipídicas neutras, POPC y DMPC:POPC (1:1) se vieron más afectadas por la incorporación de moléculas de surfactante en su bicapa, que las

composiciones lipídicas con carga negativa. En la figura 76a se puede apreciar como las composiciones neutras presentan una concentración de surfactante libre ( $S_w$ ) menor que el resto, durante todo el proceso de disrupción de los liposomas. En concordancia, tanto para POPC como para DMPC:POPC (1:1), la relación de surfactante insertado en la bicapa con respecto a la concentración de fosfolípido ( $Re$ ) fue superior a la observada en las composiciones lipídicas negativas (figura 76b).

Todas las composiciones lipídicas estudiadas formaron micelas mixtas desde el inicio del proceso de disrupción, como indican los bajos valores de las constantes de distribución ( $K$ ), representados en la figura 77 frente a SLS (figura 77a) y frente a  $Re$  (figura 77b).

La composición lipídica que presentó los valores de  $K$  mayores durante todo el proceso de disrupción fue la constituida por DMPC:POPC (1:1) (figura 77), la cual, presentó una menor capacidad de formación de micelas mixtas que el resto de composiciones lipídicas estudiadas, así como una mayor capacidad de incorporación de OG en su bicapa (figura 77b). Contrariamente, la composición lipídica que mostró una mayor facilidad de formación de micelas mixtas, así como una menor proporción de OG en su estructura fue el extracto lipídico de *E. coli*.

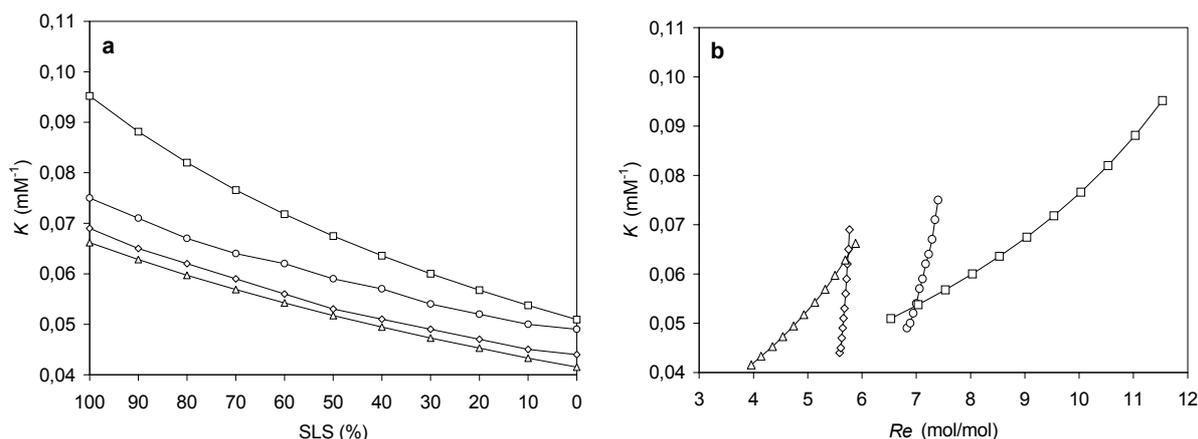


Figura 77. Variaciones de la constante de distribución ( $K$ ) frente a: (a) Porcentaje de SLS durante el proceso de disrupción de los liposomas y (b) Relación molar efectiva ( $Re$ ). Las composiciones lipídicas ensayadas fueron: (O) POPC, (□) DMPC:POPC (1:1), (◇) POPE:POPG (3:1) y (△) Extracto lipídico de *E. coli*.

### 5.2.5.ii. n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido

El DDM está considerado como un surfactante de cadena media. Su CMC en solución es de aproximadamente 0,18 mM (le Maire et al., 2000). Presenta una cadena formada por 12 átomos de carbono que le confiere una mayor similitud con los fosfolípidos que constituyen una bicapa lipídica y tiene un número de agregación más elevado que el OG (ver tabla 3 de *Introducción*).

El proceso de solubilización de liposomas formados con diferentes composiciones lipídicas mediante progresiva adición de DDM fue observado por dispersión de la luz, obteniéndose los gráficos presentados en la figura 78.

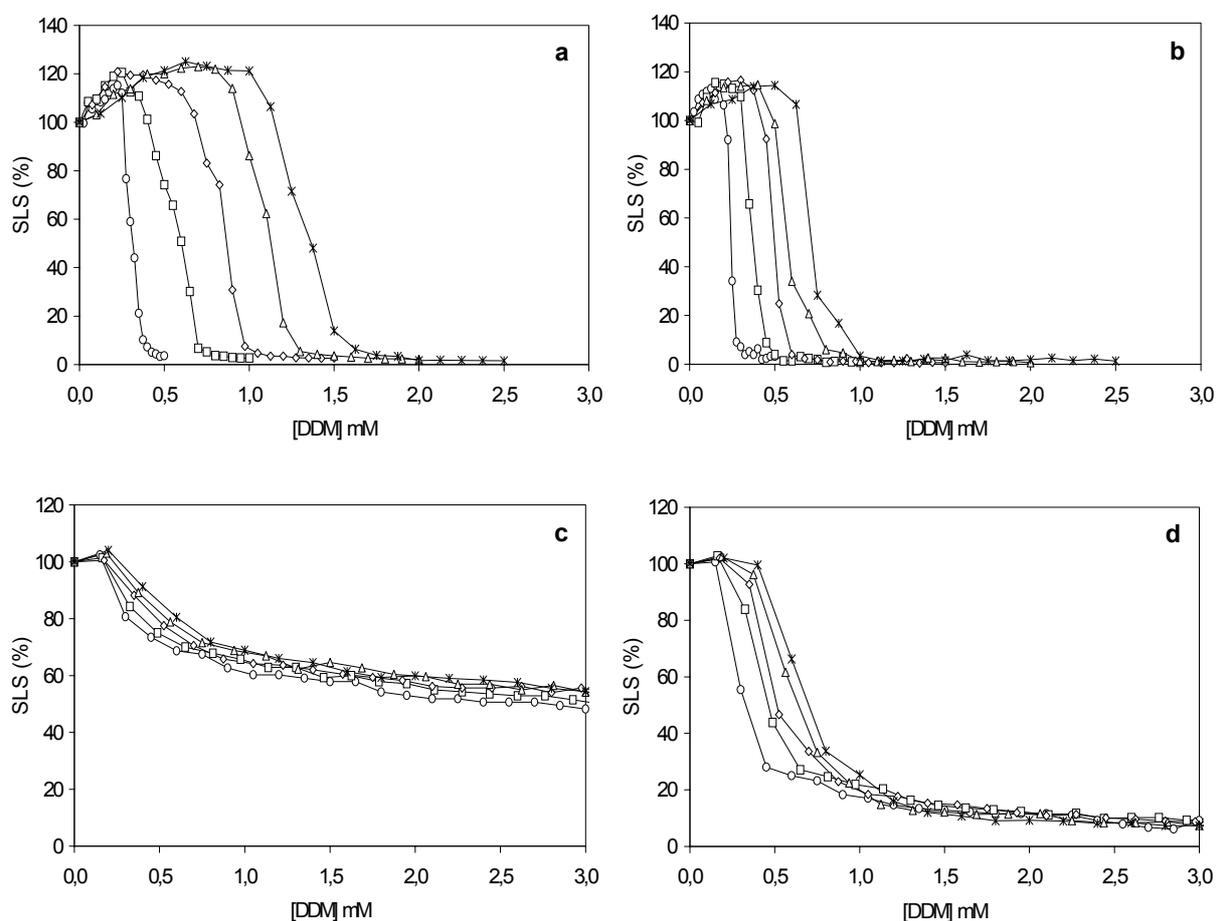


Figura 78. Variación de la dispersión de la luz (SLS) frente a DDM, a diferentes concentraciones de lípido: (○) 0,1 mM, (□) 0,2 mM, (◇) 0,3 mM, (△) 0,4 mM y (×) 0,5 mM, estudiada en diferentes composiciones lipídicas: **(a)** POPC. **(b)** DMPC:POPC (1:1). **(c)** POPE:POPG (3:1). **(d)** Extracto lipídico de *E. coli*.

La solubilización de liposomas en presencia de DDM presentó diferencias según la composición lipídica de las vesículas. Los liposomas formados con lípidos zwitteriónicos fueron completamente solubilizados por el DDM a concentraciones menores a 2,0 mM (~ 0,10 %, p/v) para el POPC y a 1 mM (~ 0,05 %, p/v) para el DMPC:POPC (1:1). Los liposomas formados por fosfolípidos negativos no mostraron, aparentemente, una completa solubilización, sino que presentaron una cierta resistencia a la disrupción por DDM. Concretamente, en el caso de los liposomas formados por POPE:POPG (3:1), se observaron valores residuales de ~ 50 % de SLS, y en el extracto lipídico de *E. coli* se observaron unos valores residuales de ~ 7 % de SLS. Los valores residuales observados, sobretudo en el caso de POPE:POPG, pueden dar lugar a la obtención de valores poco significativos de  $S_w$ ,  $Re$  y  $K$ , debido a que las vesículas no serían completamente solubilizadas por el DDM.

En la figura 79 se muestran las representaciones gráficas obtenidas a partir de los valores de  $S_{SAT}$  (figura 79a) y de  $S_{SOL}$  (figura 79b) calculados tras la adición de cantidades crecientes de DDM a liposomas formados por diferentes composiciones lipídicas y a diferentes concentraciones, comprendidas entre 0,1 y 0,5 mM.

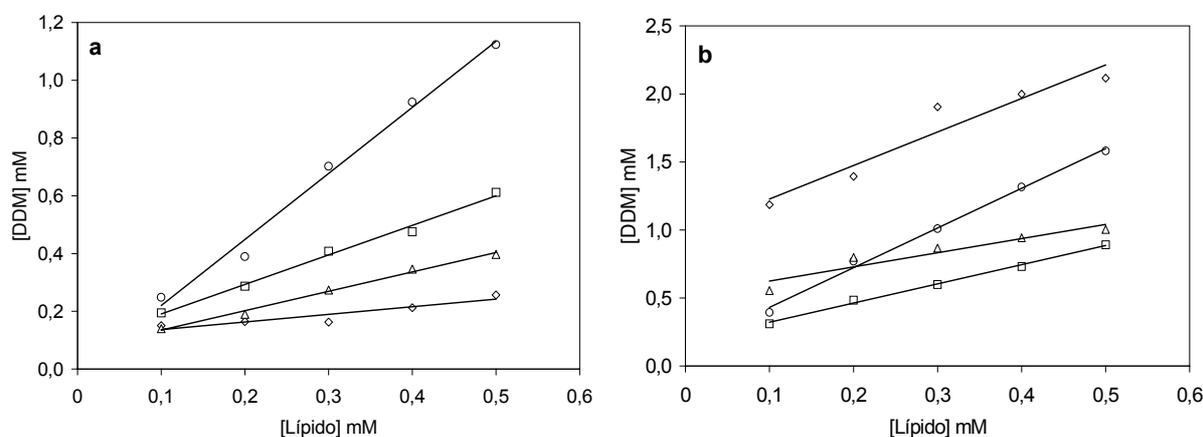


Figura 79. Concentración de DDM necesaria para (a) Saturar ( $S_{SAT}$ ) y (b) Solubilizar ( $S_{SOL}$ ) diferentes bicapas lipídicas. Las composiciones ensayadas fueron: (○) POPC, (□) DMPC:POPC (1:1), (◇) POPE:POPG (3:1) y (△) Extracto lipídico de *E. coli*.

Las composiciones lipídicas estudiadas mostraron comportamientos muy dispares entre sí frente a la acción del DDM. Todas las composiciones lipídicas, de igual forma que en el caso del OG, presentaron un comportamiento lineal y con

pendiente positiva, de la concentración de DDM necesaria para el proceso de saturación (figura 79a) y de solubilización (figura 79b) a concentraciones crecientes de lípido. Las composiciones zwitterónicas, POPC y DMPC:POPC (1:1), necesitan concentraciones superiores de DDM, en comparación con las composiciones lipídicas negativas, para llegar a la saturación de sus bicapas (figura 79a). Estos valores de saturación indican una mayor inserción de moléculas de surfactante en la estructura del liposoma sin llegar a su disrupción, respecto a los liposomas formados por POPE:POPG (3:1) y por extracto lipídico de *E. coli*.

La solubilización de las vesículas lipídicas se produjo a concentraciones similares en el caso de DMPC:POPC (1:1) y extracto lipídico de *E. coli*, siendo las composiciones más susceptibles a la disrupción por este surfactante. La composición lipídica POPE:POPG (3:1) fue la más resistente a este proceso, presentando los valores de  $S_{SOL}$  más elevados.

El efecto del DDM en los liposomas de diferente composición lipídica se puede apreciar a partir de la región o área de coexistencia entre  $S_{SAT}$  y  $S_{SOL}$ , cuyos valores se presentan en la tabla 21.

Tabla 21. Valores calculados de la región de coexistencia entre las rectas  $S_{SAT}$  y  $S_{SOL}$  de las diferentes composiciones lipídicas estudiadas con DDM.

	POPC	DMPC:POPC (1:1)	POPE:POPG (3:1)	Extracto lipídico de <i>E. coli</i>
Región de coexistencia (mM <sup>2</sup> )	0,14	0,08	0,61	0,22

Las composiciones lipídicas neutras presentaron áreas de coexistencia menores que las composiciones con carga neta negativa indicando una acción disruptora superior del surfactante en estas composiciones. Por otra parte, las composiciones lipídicas con carga neta negativa presentaron una región de coexistencia superior, siendo especialmente elevada en el caso del POPE:POPG (3:1), de forma similar a lo observado en el caso de la adición de OG. Estas composiciones lipídicas mostraron un proceso progresivo de disrupción por DDM con una notable separación entre los procesos de saturación y de solubilización.

Los parámetros  $S_w$ ,  $Re$  y  $K$  obtenidos a partir del ajuste lineal de las rectas presentadas en la figura 79, se presentan en la tabla 22.

Tabla 22. Valores de  $S_w$ ,  $Re$  y  $K$ , obtenidas de la interacción entre el DDM y liposomas de diferente composición lipídica.

	$S_{wSAT}$ (mM)	$S_{wSOL}$ (mM)	$Re_{SAT}$ (mol/mol)	$Re_{SOL}$ (mol/mol)	$K_{SAT}$ (mM <sup>-1</sup> )	$K_{SOL}$ (mM <sup>-1</sup> )
<b>POPC</b>	0,008	0,14	2,29	2,92	83,81	5,41
<b>DMPC:POPC (1:1)</b>	0,089	0,18	1,02	1,41	5,69	3,24
<b>POPE:POPG (3:1)</b>	0,111	0,98	0,26	2,47	1,89	0,73
<b>Ext. lip. de <i>E. coli</i></b>	0,068	0,52	0,67	1,04	5,87	0,98

Los liposomas formados por POPE:POPG (3:1) mostraron una mayor incorporación de DDM en sus bicapas, como se aprecia por el incremento de  $Re$ , desde el proceso de saturación hasta la solubilización ( $\Delta Re = 2,21$ ), así como una elevada capacidad de formación de micelas mixtas. De manera similar, los liposomas de POPC presentaron una gran capacidad de incorporación de DDM (valores mayores de  $Re$ ) sin dar lugar a la formación de micelas mixtas, lo que se deduce por los elevados valores de  $K$ .

Los valores observados del parámetro  $S_{wSOL}$  en las composiciones lipídicas con carga neta negativa no se corresponden con el valor esperado de CMC del DDM en las condiciones de trabajo utilizadas, mientras que sí lo hacen los valores obtenidos para las composiciones lipídicas neutras. Esta diferencia se debe a que los liposomas formados por POPE:POPG (3:1) y extracto lipídico de *E. coli* no son completamente solubilizados por el surfactante, dificultando la formación de micelas mixtas, reflejado por un aumento de la CMC aparente ( $S_{wSOL}$ ).

En la figura 80 se muestra la representación gráfica de los valores obtenidos de  $S_w$  (figura 80a) y de  $Re$  (figura 80b) frente a los valores de SLS, desde el proceso de saturación (100 % SLS) hasta el proceso de solubilización (0 % SLS) para las diferentes composiciones lipídicas estudiadas.

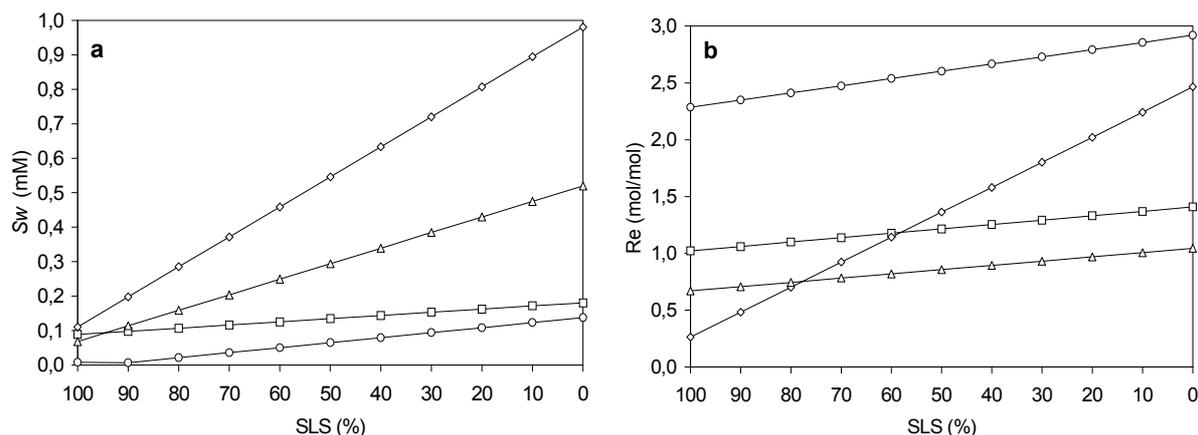


Figura 80. Comparación de las composiciones lipídicas: (○) POPC, (□) DMPC:POPC (1:1), (◇) POPE:POPG (3:1) y (△) Extracto lipídico de *E. coli*, de dos parámetros: (a)  $S_w$  y (b)  $Re$  frente a SLS.

En ambos casos (figuras 80a y 80b), se aprecia una tendencia lineal creciente en todas las composiciones lipídicas estudiadas, indicando una progresiva adición de surfactante en el medio acuoso, así como una progresiva incorporación del mismo en las bicapas lipídicas durante el proceso de formación de micelas mixtas.

Las composiciones lipídicas neutras presentaron las concentraciones más bajas de DDM libre en el medio acuoso ( $S_w$ ). Las composiciones lipídicas negativas, pese a presentar valores bajos de  $S_w$  en el momento de la saturación, mostraron un gran aumento del mismo conforme se avanzaba hacia la solubilización de las vesículas lipídicas. Este aumento de  $S_w$  durante el proceso de disrupción, fue más evidente en el caso de la mezcla POPE:POPG (3:1) que para el caso del extracto lipídico de *E. coli* (figura 80a). Los valores de  $Re$  obtenidos para las diferentes composiciones lipídicas, no pudieron ser agrupados según las características eléctricas de las bicapas, ya que, POPC y DMPC:POPC (1:1) presentaron comportamientos diferentes, así como POPE:POPG (3:1) y el extracto lipídico de *E. coli* (figura 80b). Fue particularmente destacable el caso de la POPC, en la que se produjo una gran incorporación de DDM en su bicapa, como puede apreciarse por los elevados valores de  $Re$ . Por otra parte, la composición lipídica POPE:POPG (3:1) mostró un gran incremento de los valores de  $Re$  durante el proceso de disrupción de los liposomas, indicando una cierta resistencia inicial al efecto del DDM y una gran incorporación posterior del mismo en su estructura.

La capacidad de formación de micelas mixtas de las composiciones lipídicas, se estudió, observando las variaciones experimentadas por la constante de distribución ( $K$ ) durante el proceso de disrupción de los liposomas. Estas variaciones se muestran en la figura 81.

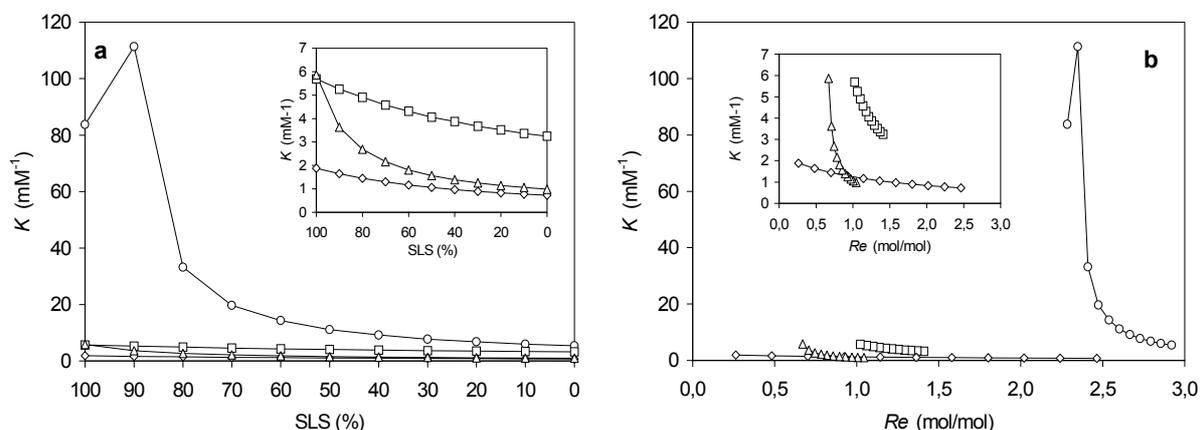


Figura 81. Variaciones de  $K$  frente a: **(a)** Porcentaje de SLS durante el proceso de disrupción de los liposomas y **(b)** Relación molar efectiva ( $Re$ ). Las composiciones lipídicas ensayadas fueron: (O) POPC, (□) DMPC:POPC (1:1), (◇) POPE:POPG (3:1) y (△) Extracto lipídico de *E. coli*.

Los liposomas formados por POPC presentaron un comportamiento frente a la acción del DDM distinta a la del resto de composiciones estudiadas, con unos valores de  $K$  significativamente superiores (figura 81). En esta composición zwitteriónica se puede apreciar un aumento inicial de  $K$  hasta un valor de  $\sim 111 \text{ mM}^{-1}$  a una  $Re$  de  $\sim 2,3$  mol/mol, seguido de un importante descenso de los valores de  $K$  hasta  $\sim 5,4 \text{ mM}^{-1}$  a una  $Re$  de  $\sim 2,9$  mol/mol. Este descenso fue mucho más pronunciado en su inicio, que conforme se aproxima al valor final de  $Re$ . Esta tendencia de los valores de  $K$ , junto con los elevados valores de  $Re$ , indican una cierta dificultad inicial a la disrupción de la bicapa lipídica de POPC, seguido por un rápido proceso de formación de micelas mixtas y la completa disrupción de las vesículas (de la Maza y Parra, 1997).

En las figuras 81a y 81b (incluidas) se muestran las curvas de las composiciones lipídicas DMPC:POPC (1:1), POPE:POPG (3:1) y extracto lipídico de *E. coli*. La composición lipídica POPE:POPG (3:1) fue la que mostró una mayor tendencia a la formación de micelas mixtas (valores menores de  $K$ ) durante el proceso de disrupción

lipídica (figura 81a). En esta composición lipídica, el que no se produzca una brusca disminución de los valores de  $K$  puede ser debido a una lenta y progresiva formación de las micelas. En la figura 81b se aprecia, asimismo, un comportamiento diferente al resto, de esta mezcla negativa. La mezcla POPE:POPG, presenta un gran intervalo de valores de  $Re$  conforme avanza el proceso de disrupción y la consiguiente formación de micelas mixtas. Este intervalo de valores de  $Re$  puede ser debido a una progresiva incorporación de moléculas de DDM en las bicapas, de forma más rápida que el proceso de disrupción y formación de micelas.

### **5.2.6. Efecto de los surfactantes en la rigidez de la bicapa lipídica**

Durante el proceso de formación de proteoliposomas, en general, se requiere de la utilización de surfactantes. Se ha mostrado, en el apartado 5.2.5 del presente trabajo, cómo la acción de los surfactantes OG y DDM sobre las bicapas lipídicas empleadas, depende de su concentración, produciéndose la incorporación de moléculas de surfactante en la bicapa a concentraciones inferiores a  $S_{SAT}$ , coexistencia entre liposomas y micelas mixtas a valores de surfactante, comprendidos entre  $S_{SAT}$  y  $S_{SOL}$ , y finalmente, formación de micelas mixtas a concentraciones de surfactante superiores a  $S_{SOL}$ . En la formación de proteoliposomas se añade surfactante a concentraciones superiores a  $S_{SOL}$  y posteriormente se reduce su concentración por diferentes métodos. La reducción de la concentración del surfactante no es total, se asume que quedan moléculas del mismo que se mantendrán insertadas en la bicapa juntamente con el lípido y la proteína.

Las moléculas de surfactante unidas a la bicapa lipídica mimetizan la función de los fosfolípidos, pudiendo producir alteraciones en la rigidez de la bicapa. Con el fin de analizar la extensión de estas alteraciones, se realizó el seguimiento del proceso de disrupción y posterior reconstitución de liposomas de diferente composición lipídica mediante anisotropía de fluorescencia de las sondas TMA-DPH y DPH, empleando OG y DDM, y eliminando el surfactante mediante el método de adsorción con Bio-Beads<sup>®</sup> SM-2.

En la figura 82 se muestran las representaciones gráficas del valor de la anisotropía de fluorescencia normalizada de ambas sondas (ver apartado 4.15.2.), respecto al tiempo de duración del proceso de adición y posterior eliminación del surfactante.

El proceso consta de dos etapas, en la primera de ellas, se produce la disrupción de las vesículas a 4 °C y en la segunda tiene lugar la reconstitución de los liposomas a 23 °C.

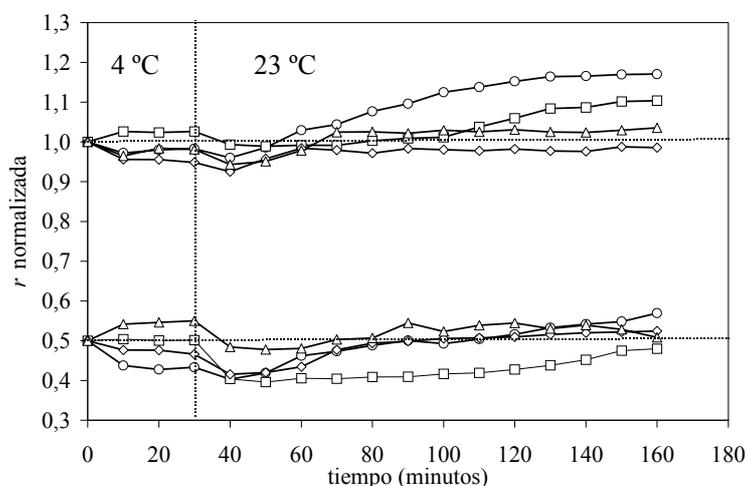


Figura 82. Anisotropía de fluorescencia normalizada frente al tiempo, durante el proceso de reconstitución de liposomas con OG. Se normalizan a 1,0 los valores correspondientes a la sonda TMA-DPH, y a 0,5 los valores correspondientes a la sonda DPH. (○) POPC. (□) DMPC:POPC (1:1). (◇) POPE:POPG (3:1). (△) Extracto lipídico de *E. coli*.

En la figura 82 se observa que al incorporar el OG a la solución se producían alteraciones de la anisotropía de la bicapa lipídica, tanto en su región polar como apolar. Estas variaciones de  $r$  pueden ser interpretadas como una reordenación de la sonda fluorescente entre las diferentes estructuras lipídicas. Tras 30 minutos de incubación de la muestra con el surfactante a 4 °C, se adicionaron las Bio-Beads<sup>®</sup>, y se incrementó la temperatura a 23 °C. La disminución inicial de los valores de  $r$  (40 minutos) podría ser debida al aumento de movilidad de los fosfolípidos producida por el incremento de la temperatura, por encima de la  $T_m$  de todas las composiciones lipídicas estudiadas. Tras la disminución de  $r$  debida a la temperatura, se apreció un aumento de la anisotropía con el tiempo de incubación en presencia de Bio-Beads<sup>®</sup>. Este aumento de  $r$  fue más

destacado en el TMA-DPH que en el DPH, ya que, mientras que se produjo una recuperación de la rigidez inicial en la zona apolar, en la región polar de la bicapa se alcanzaron valores superiores a los iniciales, en el caso de las composiciones lipídicas neutras.

Las composiciones lipídicas POPE:POPG (3:1) y extracto lipídico de *E. coli* presentaron una recuperación de  $r$  a los valores iniciales para ambas sondas. Esto podría ser debido a que la disrupción de los liposomas iniciales no es completa y podrían existir regiones de la bicapa lipídica que no serían totalmente solubilizadas por el surfactante. Estas regiones, experimentarían una menor interacción con las moléculas de surfactante y una menor perturbación de la bicapa lipídica, ya que los valores de anisotropía de fluorescencia retornaron a los valores iniciales.

El proceso de formación de los liposomas concluye a una temperatura de 23 °C. A esta temperatura, los fosfolípidos se encontrarían en fase fluida, que se caracteriza, como se ha comentado, por una mayor movilidad de los fosfolípidos que constituyen la bicapa, y por tanto, por una menor anisotropía de fluorescencia. En el caso de la adición y posterior eliminación de OG, el retorno a valores de anisotropía similares o superiores a los iniciales, es indicativo de la incorporación de moléculas residuales de OG en la estructura de la bicapa confiriendo una cierta rigidez a la misma.

De la misma forma que para el OG, se realizó un ensayo de formación de liposomas por adición y posterior eliminación del DDM mediante la utilización de esferas de superficie adsorbente, Bio-Beads<sup>®</sup> SM-2.

En la figura 83 se presenta la variación de la anisotropía de fluorescencia observada tras la adición y posterior eliminación del DDM en las cuatro composiciones lipídicas estudiadas. La adición del DDM a los liposomas zwitteriónicos a 4 °C produjo un efecto de leve rigidificación en la región polar de la bicapa, mientras que su efecto fue nulo en la región hidrofóbica. El descenso de  $r$  observado a los 40 minutos del proceso (23 °C) fue más notable en la región apolar de la bicapa que en la región polar.

La eliminación de DDM de la bicapa lipídica se aprecia por un incremento de los valores de  $r$  con TMA-DPH, en el caso de las composiciones lipídicas neutras, y con DPH en todas las composiciones lipídicas estudiadas, en mayor o menor grado.

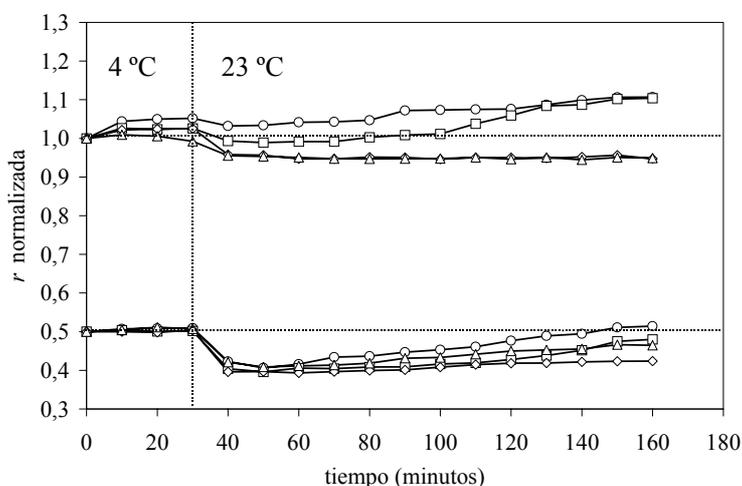


Figura 83. Anisotropía de fluorescencia normalizada frente al tiempo, durante el proceso de reconstitución de liposomas con DDM. Se normalizan a 1,0 los valores correspondientes a la sonda TMA-DPH, y a 0,5 los valores correspondientes a la sonda DPH. (○) POPC. (□) DMPC:POPC (1:1). (◇) POPE:POPG (3:1). (△) Extracto lipídico de *E. coli*.

Para las composiciones lipídicas POPC y DMPC:POPC (1:1), se observó una cierta incorporación de moléculas de DDM en la estructura del liposoma a partir de 40 minutos, ya que los valores de  $r$  finales aumentaron con ambas sondas fluorescentes. Las composiciones lipídicas con carga neta negativa presentaron valores finales de  $r$  prácticamente constantes a partir del aumento de temperatura a 23 °C, indicando una correcta formación de liposomas, sin signos evidentes de incorporación de moléculas adicionales en su bicapa.

### 5.3. INCORPORACIÓN DE PROTEÍNAS EN MATRICES LIPÍDICAS

#### 5.3.1. Potencial electrostático de superficie de los proteoliposomas

Las proteínas son moléculas cargadas, que provocan alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de las bicapas lipídicas en las que se incorporan, dando lugar a proteoliposomas. La incorporación de una proteína de membrana en la bicapa, da lugar a una alteración de sus propiedades eléctricas, que puede ser investigada mediante el estudio de las propiedades fluorescentes de la sonda HHC. Los cambios observados en el valor de  $pK$  de HHC para diferentes composiciones lipídicas, en presencia de las proteínas estudiadas, se presentan en la figura 84.

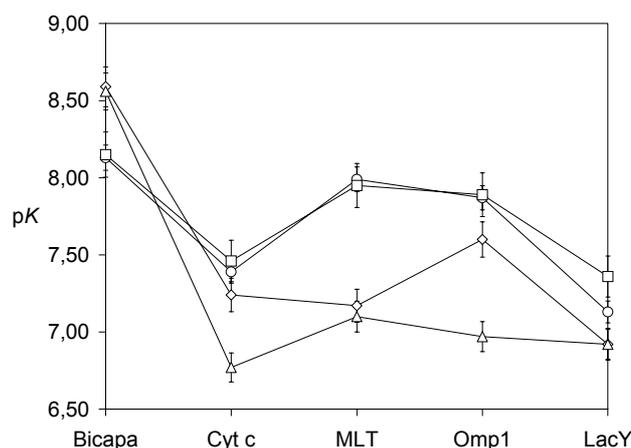


Figura 84. Valores de  $pK$  obtenidos para las diferentes proteínas reconstituidas en diferentes composiciones lipídicas: (o) POPC; (□) DMPC:POPC (1:1); (◇) POPE:POPG (3:1) y (Δ) Extracto lipídico de *E. coli*. Cada punto corresponde al promedio de tres medidas independientes.

En todos los casos, se observó una disminución de los valores de  $pK$  obtenidos para los diferentes proteoliposomas analizados, con respecto a sus correspondientes liposomas de referencia. Asimismo, se puede apreciar una clara similitud entre los valores de  $pK$  obtenidos en los proteoliposomas formados con lípidos zwitteriónicos, mientras que existe una diferencia significativa de los valores obtenidos para los proteoliposomas formados por composiciones lipídicas cargadas negativamente. Estas

diferencias de los valores de  $pK$  permiten el cálculo de los valores de potencial electrostático de superficie ( $\Delta\psi$ ) aplicando la ecuación (7) de *Material y Métodos*.

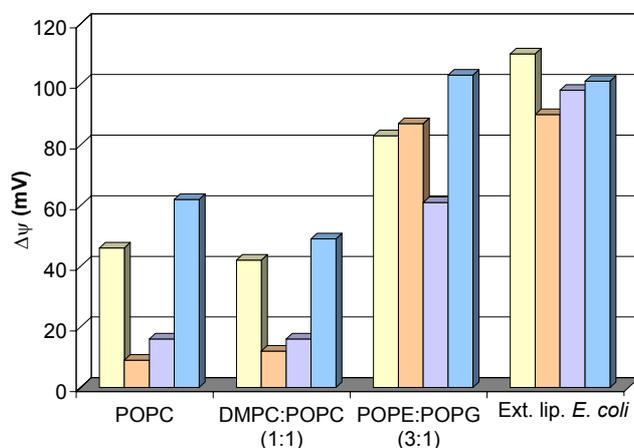


Figura 85. Diagrama de barras de los valores calculados de  $\Delta\psi$  para las diferentes composiciones lipídicas en función de las proteínas: (■) Cyt c, (■) MLT, (■) Omp1, (■) LacY.

En la figura 85 se presentan los valores de  $\Delta\psi$  obtenidos en los proteoliposomas formados con las composiciones lipídicas neutras fueron muy similares entre sí, no pudiendo apreciarse variaciones significativas entre POPC y DMPC:POPC (1:1) para las diferentes proteínas ensayadas (excepto en el caso de LacY). En cambio, fueron observadas variaciones significativas entre las mezclas neutras y las negativas, así como entre POPE:POPG (3:1) y el extracto lipídico de *E. coli*. Para todas las proteínas analizadas, se observó un aumento del valor de  $\Delta\psi$  en las mezclas con carga neta negativa respecto a las mezclas neutras. Este aumento en los valores de  $\Delta\psi$  fue superior en la mezcla formada por el extracto lipídico de *E. coli* que para POPE:POPG (3:1), con la excepción de LacY, en la que ambos valores fueron muy similares.

Cada una de las proteínas fue estudiada y analizada por separado, para disponer de un análisis más detallado de los datos obtenidos.

### 5.3.1.i. Citocromo c

El citocromo c es una proteína periférica globular de tipo catiónico capaz de unirse de forma electrostática a las cargas negativas expuestas por los fosfolípidos en la

superficie de la membrana (Mueller et al., 2000). Se realizó un estudio mediante la sonda fluorescente HHC del efecto que esta proteína producía, en función de la composición lipídica de la membrana, tomando como referencia los valores obtenidos para los liposomas correspondientes a cada composición. Se calcularon los  $\Delta\psi$  de los proteoliposomas formados con Cyt c, obteniendo los resultados indicados en la tabla 23.

Tabla 23. Variaciones de  $\Delta\psi$  en bicapas lipídicas de diferente composición lipídica con Cyt c (LPR = 50).

	<b>pK</b>	<b><math>\Delta\psi</math> (mV)</b>
<b>POPC + Cyt c</b>	7,39 ± 0,05	+ 46 ± 5
<b>DMPC:POPC (1:1) + Cyt c</b>	7,46 ± 0,14	+ 42 ± 11
<b>POPE:POPG (3:1) + Cyt c</b>	7,24 ± 0,07	+ 83 ± 12
<b>Ext. lip. de <i>E. coli</i> + Cyt c</b>	6,77 ± 0,13	+ 110 ± 9

En la figura 86 se muestran los valores de potencial obtenidos en función de la composición lipídica, en forma de histograma.

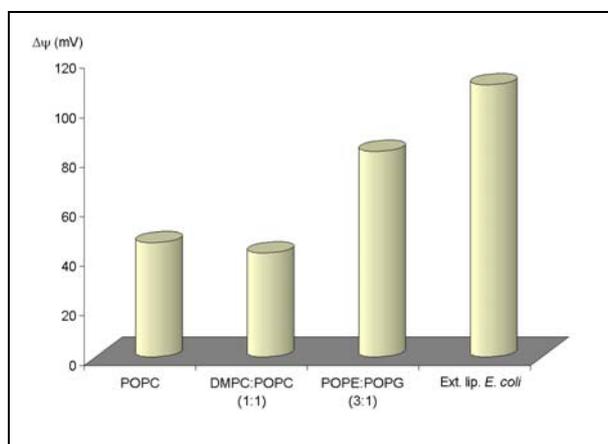


Figura 86. Histograma de la variación de  $\Delta\psi$  en función de la composición lipídica de los proteoliposomas formados con Cyt c.

El Cyt c mostró un comportamiento diferente según la composición de la bicapa lipídica. En todas las composiciones lipídicas estudiadas, el Cyt c produjo variaciones positivas de  $\Delta\psi$ . Los proteoliposomas formados por fosfolípidos zwitteriónicos presentaron variaciones de  $\sim 40$  mV, mientras que los proteoliposomas con carga neta

negativa presentaron variaciones de  $\Delta\psi$  superiores a 80 mV. Se observó que el valor de potencial obtenido en los proteoliposomas formados por POPE:POPG (3:1) fue 1,8 veces superior respecto al potencial observado para POPC, mientras que en el caso del extracto lipídico de *E. coli* fue 2,4 veces mayor.

### 5.3.1.ii. Melitina

La MLT es un péptido capaz de penetrar e integrarse en la bicapa lipídica. De forma similar a lo que ocurre con el Cyt c, se observó que la MLT presentó una mayor afinidad por las membranas cargadas negativamente que por las membranas neutras. En la tabla 24 se muestran los valores obtenidos de potencial electrostático de superficie en los diferentes proteoliposomas analizados.

Tabla 24. Variaciones de  $\Delta\psi$  en bicapas lipídicas de diferente composición lipídica con MLT (LPR = 50).

	<b>pK</b>	<b><math>\Delta\psi</math> (mV)</b>
<b>POPC + MLT</b>	7,99 ± 0,15	+ 9 ± 10
<b>DMPC:POPC (1:1) + MLT</b>	7,95 ± 0,24	+ 12 ± 17
<b>POPE:POPG (3:1) + MLT</b>	7,17 ± 0,15	+ 87 ± 15
<b>Ext. lip. de <i>E. coli</i> + MLT</b>	7,10 ± 0,14	+ 90 ± 10

En el caso de los proteoliposomas con MLT se observaron claras diferencias entre las membranas neutras y las cargadas negativamente. De forma diferente al caso del Cyt c, no se apreciaron diferencias significativas entre los proteoliposomas formados por POPE:POPG (3:1) y los formados con el extracto lipídico de *E. coli*, como puede apreciarse en la figura 87.

Las membranas formadas por lípidos zwitteriónicos mostraron valores de potencial electrostático de superficie de + 9 y + 12 mV para POPC y DMPC:POPC (1:1), respectivamente (tabla 24). Estos valores sugieren que la MLT produce poca perturbación en la superficie de estos proteoliposomas. Por otra parte, en los proteoliposomas formados por lípidos con carga neta negativa, se observó una alteración significativa de la superficie de las vesículas, mostrando éstas un valor de  $\Delta\psi$

muy próximo entre sí (+ 87 y + 90 mV para POPE:POPG, 3:1 y extracto lipídico de *E. coli*, respectivamente). Tomando como referencia el valor de potencial calculado para los proteoliposomas formados por POPC e indicado en la tabla 24, se realizó el cálculo para comparar el aumento de  $\Delta\psi$  con el resto de las composiciones ensayadas. Los proteoliposomas formados por la mezcla neutra DMPC:POPC (1:1) aumentaron 1,3 veces el valor de  $\Delta\psi$  del POPC, mientras que los proteoliposomas formados por POPE:POPG (3:1) y por extracto lipídico de *E. coli*, mostraron aumentos de 9,7 y 10,0 veces, respectivamente. A partir de estos datos, puede apreciarse un importante efecto de la MLT en las composiciones cargadas negativamente, mientras que en las membranas neutras este efecto es mucho más discreto.

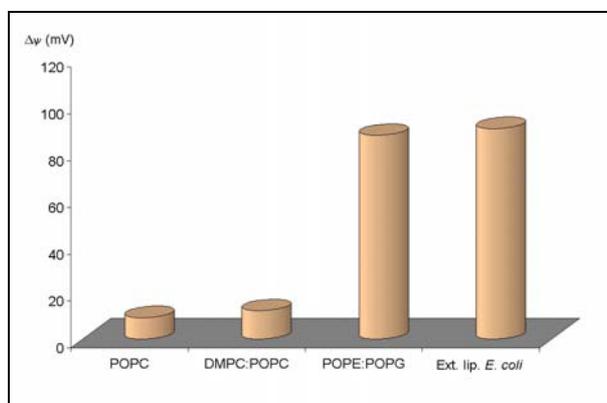


Figura 87. Histograma de la variación de  $\Delta\psi$  en función de la composición lipídica de los proteoliposomas formados con MLT.

La composición lipídica de la membrana determina, asimismo, la conformación adoptada por la MLT en el seno de la misma. Esta conformación depende de diversos factores como puede ser la composición lipídica, la concentración de péptido o la fuerza iónica del medio. En igualdad de condiciones, las variaciones de potencial observadas fueron atribuidas principalmente a la composición lipídica, en concreto, a la presencia de lípidos cargados negativamente.

### 5.3.1.iii. Porina Omp1 de *Serratia marcescens*

Las porinas son proteínas integrales de membrana, caracterizadas por presentar dominios estructurales constituidos por hojas  $\beta$  que se encuentran integradas en la membrana, y con pocas regiones expuestas hacia el exterior.

En la tabla 25 se presentan los valores de potencial electrostático de superficie, calculados para los diferentes proteoliposomas formados con esta proteína.

Tabla 25. Variaciones de  $\Delta\psi$  en bicapas lipídicas de diferente composición lipídica con Omp1 (LPR = 50).

	<b>pK</b>	<b><math>\Delta\psi</math> (mV)</b>
<b>POPC + Omp1</b>	7,87 $\pm$ 0,15	+ 16 $\pm$ 10
<b>DMPC:POPC (1:1) + Omp1</b>	7,89 $\pm$ 0,14	+ 16 $\pm$ 11
<b>POPE:POPG (3:1) + Omp1</b>	7,60 $\pm$ 0,07	+ 61 $\pm$ 12
<b>Ext. lip. de <i>E. coli</i> + Omp1</b>	6,97 $\pm$ 0,15	+ 98 $\pm$ 10

Los proteoliposomas formados con la Omp1, de forma similar a lo observado con el Cyt c, no presentan variaciones significativas del valor calculado de  $\Delta\psi$  entre POPC y DMPC:POPC (1:1). En las composiciones lipídicas con carga neta negativa, se obtuvieron variaciones del potencial electrostático más elevadas. Estas variaciones fueron superiores en el caso del extracto lipídico de *E. coli*, que en caso de la mezcla formada por POPE:POPG (3:1), como puede apreciarse en el histograma de la figura 88.

El valor de incremento de potencial observado en POPE:POPG (3:1) aumentó 3,8 veces, con respecto al  $\Delta\psi$  observado en POPC. Este incremento fue de 6,1 veces, en los proteoliposomas formados con el extracto lipídico de *E. coli*.

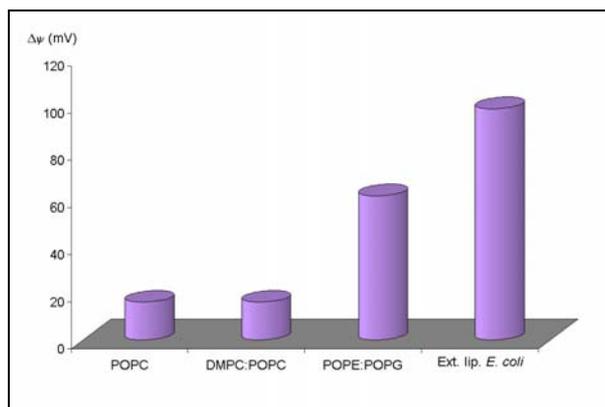


Figura 88. Histograma de la variación de  $\Delta\psi$  en función de la composición lipídica de los proteoliposomas formados con Omp1.

Es conocida la estructura de la Omp1 en forma de barril constituido por 16 hojas  $\beta$  antiparalelas (Ruiz, 2002). Esta porina forma un canal hidrofílico en la membrana, similar al formado por otras porinas de microorganismos Gram negativos, y al igual que ellas, la Omp1 se presenta formando trímeros. La estructura adoptada por este tipo de proteínas, así como su orientación, puede ser facilitada o dificultada por la composición lipídica de la membrana (Schirmer, 1998). Los valores de  $\Delta\psi$  observados sugieren que la integración de la porina Omp1, depende tanto de las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que componen su estructura, como de la composición lipídica de la membrana.

#### 5.3.1.iv. Lactosa permeasa de *Escherichia coli*

La LacY es una proteína politópica situada en la membrana interna de *E. coli* encargada del transporte de lactosa al interior de la célula. Es conocido que LacY experimenta un cambio conformacional durante la translocación del sustrato y del protón.

En la tabla 26 se muestran los valores de  $\Delta\psi$  obtenidos para proteoliposomas de diferente composición lipídica formados con esta proteína.

Tabla 26. Variaciones de  $\Delta\psi$  en bicapas lipídicas de diferente composición lipídica con LacY (LPR = 50).

	<b>pK</b>	<b><math>\Delta\psi</math> (mV)</b>
<b>POPC + LacY</b>	7,13 ± 0,07	+ 62 ± 6
<b>DMPC:POPC (1:1) + LacY</b>	7,36 ± 0,06	+ 49 ± 8
<b>POPE:POPG (3:1) + LacY</b>	6,92 ± 0,18	+ 103 ± 16
<b>Ext. lip. de <i>E. coli</i> + LacY</b>	6,92 ± 0,21	+ 101 ± 14

Los valores de  $\Delta\psi$  calculados para los diferentes proteoliposomas, mostraron algunas diferencias en comparación con el resto de proteínas estudiadas, sobretudo con la otra proteína integral, Omp1. La LacY produjo una mayor perturbación superficial en los proteoliposomas formados por POPC, en comparación con los formados por DMPC:POPC (1:1), como se muestra en la tabla 26 y en la figura 89. Concretamente, se obtuvo un valor de potencial 0,8 veces inferior en la mezcla zwitteriónica que en el POPC. Estos datos inducen a pensar en una mayor facilidad para la incorporación de la LacY en POPC que en DMPC:POPC (1:1).

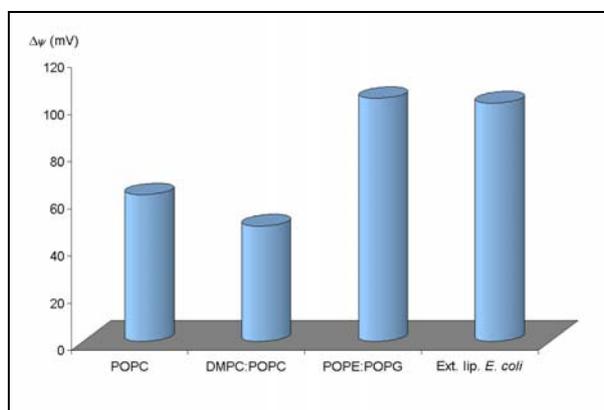


Figura 89. Histograma de la variación de  $\Delta\psi$  en función de la composición lipídica de los proteoliposomas formados con LacY.

La incorporación de la LacY en membranas cargadas negativamente, según los valores de  $\Delta\psi$ , fue superior a la observada en membranas neutras. El valor de potencial electrostático de superficie aumentó 1,7 veces, en los proteoliposomas de POPE:POPG (3:1), mientras que este aumento fue de 1,6 veces en los de extracto lipídico de *E. coli*, en referencia a los proteoliposomas formados con POPC. La LacY no presentó

diferencias significativas en cuanto a las perturbaciones superficiales producidas en las membranas con carga neta negativa. El aumento de potencial electrostático de superficie observado, entre las bicapas cargadas negativamente y las bicapas neutras fue, porcentualmente, menor que las variaciones de potencial observadas para el resto de proteínas estudiadas.

### 5.3.2. Variaciones de la anisotropía

Se realizó un primer estudio de la incorporación de proteínas en la bicapa lipídica empleando para ello Cyt c y el péptido MLT, que fueron utilizadas como referencia para interpretar las variaciones de anisotropía obtenidas en presencia de LacY. En la tabla 27 se presentan los valores de  $r$  obtenidos para TMA-DPH y DPH.

Tabla 27. Valores de anisotropía de fluorescencia ( $r$ ) obtenidos tras la adición de Cyt c y MLT a liposomas de diferente composición lipídica en presencia de TMA-DPH y DPH a 23 °C.

	SONDA	Cyt c		MLT	
		Referencia	LPR = 0,5	Referencia	LPR = 0,5
POPC	TMA-DPH	0,2446	0,2471	0,2387	0,1870
	DPH	0,1194	0,1310	0,1183	0,1254
DMPC:POPC (1:1)	TMA-DPH	0,2820	0,2811	0,2936	0,4047
	DPH	0,1279	0,1316	0,1387	0,1858
POPE:POPG (3:1)	TMA-DPH	0,2458	0,2459	0,2472	0,2904
	DPH	0,1506	0,1524	0,1530	0,1941
Ext. lip. de <i>E. coli</i>	TMA-DPH	0,2355	0,2187	0,2488	0,2521
	DPH	0,1467	0,1439	0,1362	0,2000

Se puede apreciar que las variaciones producidas por una proteína periférica como el Cyt c, en general, son poco significativas, destacando únicamente el efecto de rigidificación observado en las composiciones con carga neta cero y el efecto de fluidificación superficial en el extracto lipídico de *E. coli*.

El efecto producido por la MLT en las bicapas, depende también de la composición lipídica de las mismas. En la tabla 27 puede observarse un efecto de

rigidificación generalizado en todas las composiciones estudiadas, excepto en una, POPC, en la que se observó un efecto de fluidificación con el TMA-DPH, debido a la incorporación de la MLT.

Se realizó un estudio *in situ* mediante anisotropía de fluorescencia, en el cual, se hizo un seguimiento en función del tiempo de las diferentes etapas que conducen a la incorporación de una proteína de membrana en la bicapa lipídica. Concretamente, se utilizó para la realización de este estudio la proteína LacY a una LPR de 0,5.

En la figura 90 se presentan las curvas de la anisotropía de fluorescencia normalizada frente al tiempo, durante el proceso de incorporación de la proteína LacY en bicapas de diferente composición lipídica. Se observó un aumento general del valor de  $r$  normalizado, conforme se redujo la concentración del surfactante en la muestra, tras los 30 minutos de incubación a 4 °C. El incremento de la rigidez de las bicapas lipídicas, es apreciable para la LacY, tanto en su región polar (curvas normalizadas a 1,0), como en su región hidrofóbica (curvas normalizadas a 0,5).

En las figuras 90a y 90b se observó un incremento de la rigidez de la bicapa similar, tanto con TMA-DPH como con DPH, interpretándose como una compactación de los fosfolípidos que constituyen la bicapa, debido a la incorporación de las moléculas de proteína.

En la figura 90c, correspondiente a la mezcla formada por POPE:POPG (3:1), se observó un aumento de la rigidez de la bicapa, superior para TMA-DPH que para DPH. En el caso de la mezcla formada por extracto lipídico de *E. coli* (figura 90d), el aumento en la rigidez de la bicapa fue claramente inferior en la región polar, en comparación con el resto de composiciones lipídicas ensayadas. Por otra parte, en su región apolar, el incremento de la rigidez fue similar al observado para la composición lipídica POPE:POPG (3:1), aunque inferior al observado en las composiciones lipídicas zwitteriónicas.

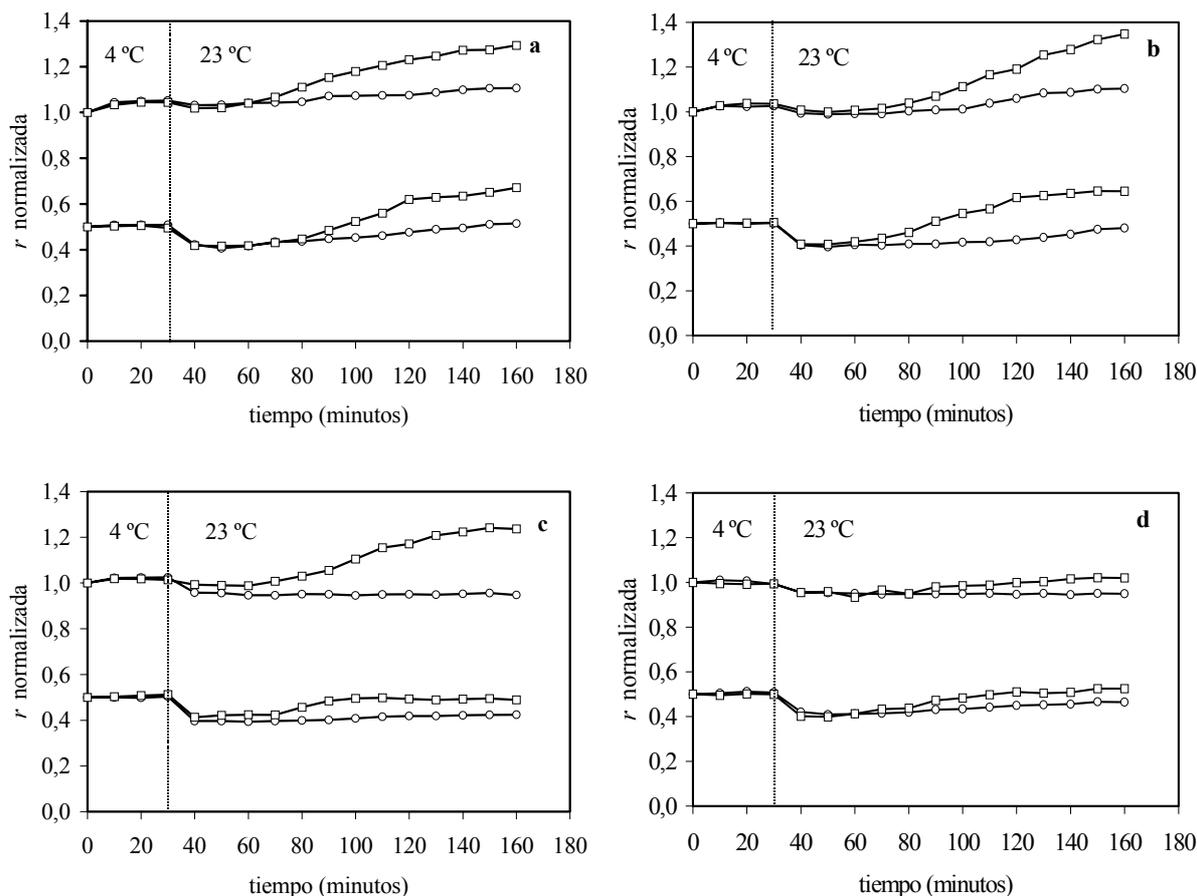


Figura 90. Anisotropía de fluorescencia normalizada en función del tiempo durante el proceso de incorporación de LacY. Se normaliza a la unidad la sonda TMA-DPH y a 0,5 la sonda DPH. (○) Liposomas sin proteína. (□) Liposomas con LacY a una LPR de 0,5. (a) POPC. (b) DMPC:POPC (1:1). (c) POPE:POPG (3:1). (d) Extracto lipídico de *E. coli*.

### 5.3.3. Adhesión *in situ* de proteínas de membrana sobre una SPB

La incorporación de proteínas de membrana a una bicapa lipídica, no siempre requiere de la presencia de surfactantes para su incorporación. El Cyt c y la MLT pueden ser incorporadas directamente sobre una SPB previamente formada. La adsorción de las proteínas en la bicapa lipídica, depende de las propiedades fisicoquímicas de las mismas, principalmente de su estabilidad en medio acuoso.

El estudio de la interacción de proteínas de membrana sobre una bicapa lipídica, se llevó a cabo mediante incorporación *in situ* de las proteínas en una SPB de extracto

lipídico de *E. coli*, extendida sobre mica muscovita. Todos los experimentos se realizaron en medio líquido, empleando el modo de contacto intermitente.

### 5.3.3.i. Citocromo c

Para la visualización *in situ*, el Cyt c se añadió sobre la bicapa lipídica previamente formada, de extracto lipídico de *E. coli*, observándose la aparición de pequeñas protuberancias sobre la SPB, debidas a la deposición de las moléculas de proteína sobre los lípidos que constituyen la bicapa. En la figura 91 se indican, con flechas negras, algunas de las protuberancias causadas por la adhesión de la proteína. La unión del Cyt c sobre la bicapa fue altamente estable, ya que permitió su observación en modo de contacto, aunque la proteína fue erosionada por a la punta del AFM debido a la fricción.

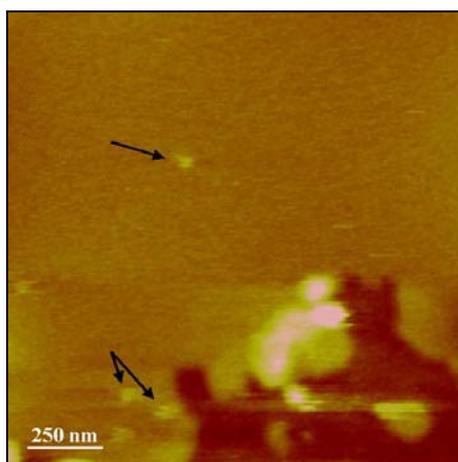


Figura 91. Citocromo c adherido sobre una bicapa de extracto lipídico de *E. coli*. Las flechas negras señalan algunas protuberancias debidas a la proteína. Imagen obtenida en modo de contacto intermitente en líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40, 150 mM NaCl). Z = 20 nm.

Las protuberancias observadas sobre la bicapa de extracto lipídico de *E. coli* eran entidades independientes, aisladas unas de otras, a pesar del exceso de proteína inyectado sobre la muestra, con un diámetro medio de  $36 \pm 6$  nm ( $n = 20$ ) y una altura sobre la bicapa de  $2,7 \pm 0,6$  nm ( $n = 20$ ).

### 5.3.3.ii. Melitina

La MLT es un péptido con actividad citolítica que actúa sobretodo en bicapas que presentan carga neta superficial negativa, donde es capaz de formar estructuras tetraméricas que, una vez situadas en la membrana, dan lugar a la apertura del canal o poro citolítico.

Se preparó una SPB de extracto lipídico de *E. coli* sobre mica y se procedió a inyectar una solución de MLT sobre la misma. En la figura 92a se aprecian los efectos iniciales tras la inyección de MLT sobre la bicapa lipídica, donde se observan algunas agrupaciones del péptido en forma de protuberancias, así como algunas agrupaciones más sencillas (círculos negros) con una longitud lateral de  $21 \pm 3$  nm ( $n = 12$ ).

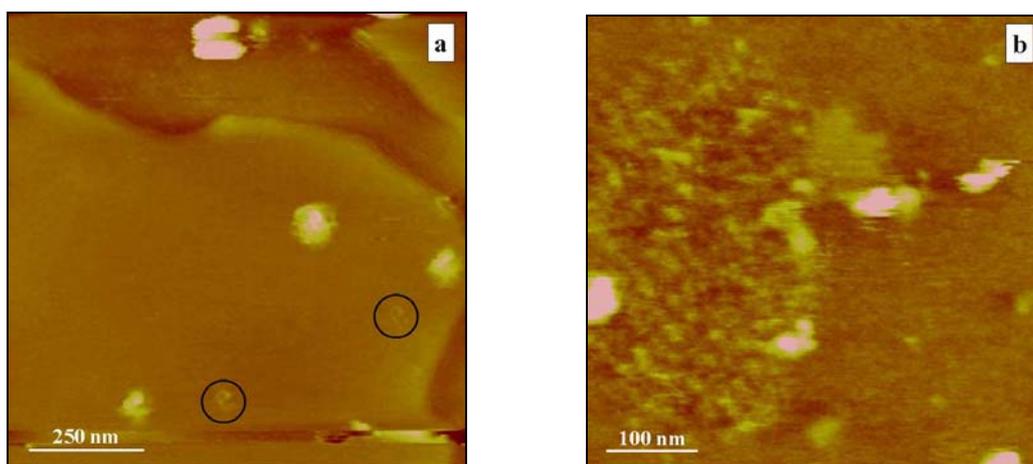


Figura 92. Topografía de la melitina sobre una bicapa lipídica de extracto lipídico de *E. coli*. Imágenes obtenidas en modo de contacto intermitente en líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl). (a) Imagen obtenida inmediatamente tras la inyección de MLT ( $Z = 20$  nm). (b) Imagen obtenida 20 minutos después de la inyección de MLT ( $Z = 10$  nm).

La actividad citolítica de la MLT se puede apreciar en la figura 92b, al realizar un acercamiento a una de las protuberancias observadas en la figura 92a, en la que se distingue una región muy rugosa en la topografía de la bicapa, que podría ser debida a la acción lítica del péptido.

### 5.3.3.iii. Lactosa permeasa de *Escherichia coli*

Las micelas mixtas formadas por LacY y DDM, obtenidas tras la purificación, fueron también inyectadas sobre la superficie de una SPB formada por extracto lipídico de *E. coli*.

La LacY que presenta una cola de 6 histidinas en su región carboxilo terminal, tiene una unión selectiva al grupo NTA-Ni del fosfolípido DOGS. Se preparó una SPB formada por extracto lipídico de *E. coli* y una SPB formada por una mezcla de extracto lipídico de *E. coli* y DOGS-NTA-Ni en una proporción molar 3:1, estimando una M del extracto lipídico de *E. coli* de  $\sim 900$  g/mol. Sobre ambas bicapas extendidas sobre mica, se inyectó la proteína en presencia de DDM, de forma que al inyectar ésta, el surfactante quedara diluido hasta alcanzar una concentración inferior a su CMC. De esta manera se minimizó el posible efecto de disrupción sobre la bicapa.

En la figura 93 se muestra la imagen topográfica de una SPB formada por liposomas extruidos de extracto lipídico de *E. coli* (figura 93a), así como una sección transversal de la misma (figura 93b). La altura media observada en esta bicapa fue de  $4,07 \pm 0,16$  nm ( $n = 10$ ). En este caso no se apreció presencia de dominios lipídicos en ninguna de las zonas observadas de la SPB. La topografía de la bicapa mostró una superficie plana, de la misma forma que la mica muscovita.

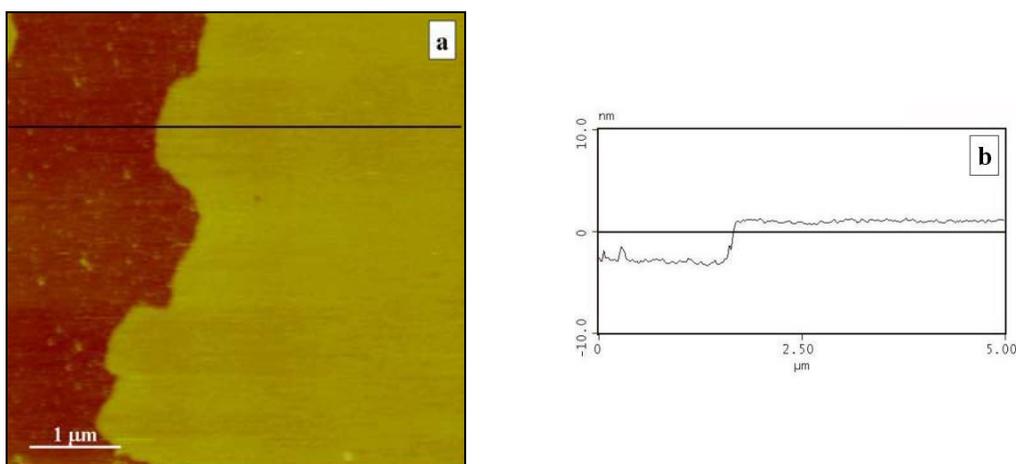


Figura 93. SPB formada de extracto lipídico de *E. coli* extendida sobre mica. Imagen obtenida en modo de contacto intermitente, en medio líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl).  $Z = 20$  nm. **(a)** Topografía de la SPB. **(b)** Sección realizada a la imagen topográfica de la SPB.

La adición de la LacY sobre la bicapa de extracto lipídico de *E. coli*, mostró comportamientos diferentes, dependiendo de la presencia o ausencia de lípidos funcionalizados en la misma. Se observó en ambos casos, la disrupción parcial de los márgenes de la bicapa. En la SPB de la figura 93a se pueden apreciar unos márgenes uniformes y bien definidos.

En la figura 94 se muestran las imágenes de la topografía de SPB formadas con las dos composiciones del extracto lipídico de *E. coli*, después de la inyección de la LacY en solución.

Tras la incorporación de la LacY a la muestra, parece ser que la tensión de línea se reduce y los márgenes de la bicapa se observan claramente irregulares. Este efecto podría ser debido a la presencia del surfactante que acompaña a la proteína, un 0,02 % de DDM. Aunque el surfactante presenta un efecto de dilución al ser incorporado en la muestra, podría ser suficiente para producir una cierta disrupción de la bicapa.

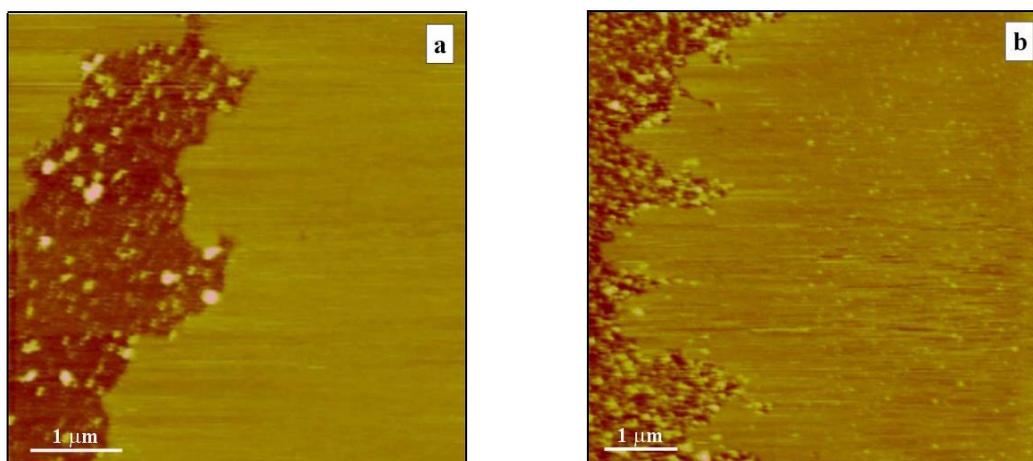


Figura 94. Topografía de la SPB tras la inyección *in situ* de LacY. Imágenes obtenidas en modo de contacto intermitente en líquido (10 mM Tris-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl). Z = 20 nm. (a) Extracto lipídico de *E. coli* tras la inyección de LacY. (b) Extracto lipídico de *E. coli* y DOGS-NTA-Ni (3:1, mol:mol) tras la inyección de LacY.

En la SPB formada por el extracto lipídico de *E. coli*, la LacY no se adhirió a la superficie de la bicapa, sino que se fue depositando sobre la superficie de la mica (figura 94a). En la bicapa formada por la mezcla de extracto lipídico de *E. coli* y DOGS-NTA-Ni (3:1, mol:mol), las moléculas de proteína se depositaron, tanto sobre la bicapa, como

sobre la superficie de la mica (figura 94b). El DOGS-NTA-Ni sería el responsable de la unión selectiva de la LacY a la superficie de la bicapa, debido a la afinidad de las histidinas terminales de la proteína por el  $\text{Ni}^{2+}$ .

## 5.4. CRISTALIZACIÓN 2D DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

### 5.4.1. Variaciones de la fluidez de la bicapa durante la cristalización

El proceso de cristalización 2D de una proteína de membrana, al igual que el proceso de reconstitución de un proteoliposoma, puede ser seguido y estudiado mediante la anisotropía de fluorescencia. Una de las principales diferencias entre el proceso de cristalización y el de reconstitución de un proteoliposoma, es la duración del mismo, siendo el proceso de formación de un cristal 2D más largo.

Se realizó un seguimiento del proceso de incorporación de LacY en una matriz lipídica de POPC, mediante la representación de la anisotropía de fluorescencia frente al tiempo total del proceso (figura 95). El POPC fue seleccionado como referencia para este estudio, por estar en estado fluido tanto a 4 °C como a 23 °C. Las sondas fluorescentes utilizadas fueron TMA-DPH y DPH.

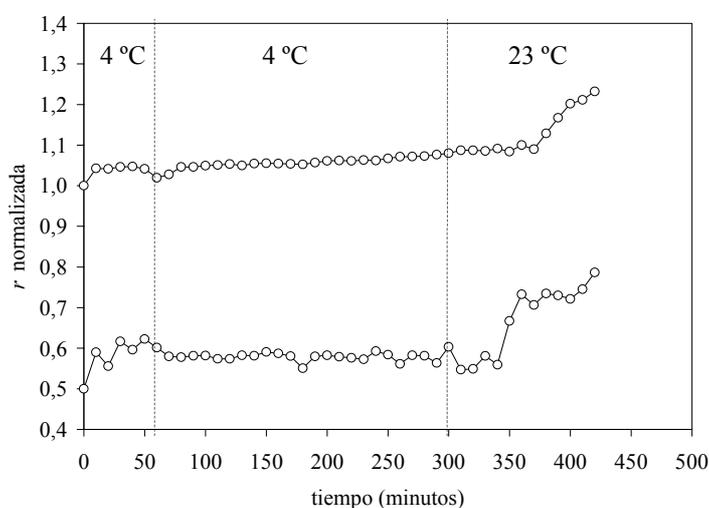


Figura 95. Anisotropía de fluorescencia normalizada en relación con tiempo del proceso de cristalización 2D de LacY en una matriz de POPC y a una LPR de 0,5. Se presenta normalizada a 1,0 la sonda fluorescente TMA-DPH, y a 0,5 la sonda fluorescente DPH.

En la figura 95, se observa un incremento en la rigidez de la bicapa lipídica conforme se reduce la concentración del DDM, por adsorción en las Bio-Beads<sup>®</sup>. Este incremento se acentúa al aumentar la temperatura de 4 °C a 23 °C. El aumento de la

rigidez de la bicapa lipídica se puede apreciar tanto en la región polar de la bicapa, como en la región apolar, siendo ambos incrementos muy similares. Se siguieron tomando valores de  $r$  hasta transcurridas 24 horas desde el inicio del experimento (1440 minutos). Estos valores de  $r$ , una vez normalizados, fueron de  $\sim 1,27$  y  $\sim 0,79$  para TMA-DPH y DPH, respectivamente. Las variaciones de  $r$  desde 420 minutos hasta 1440 minutos fueron mínimas.

#### **5.4.2. Estudio de cristales 2D mediante AFM**

La cristalización 2D de proteínas de membrana es un proceso complejo, debido a que, en la mayoría de casos, la forma cristalina no es el estado fisiológico de la proteína, sino que debe forzarse su obtención optimizando las condiciones fisicoquímicas del sistema. El proceso de cristalización 2D de una proteína de membrana, es un proceso muy lento en el que no existe un protocolo establecido de trabajo, sino que cada proteína es diferente y requiere de una metodología distinta.

En general, se realiza una amplia búsqueda de las condiciones óptimas del proceso de cristalización. En este trabajo, las condiciones ensayadas fueron:

- Tipo de lípido: LPS de *E. coli*, DMPC, POPC, DMPC:POPC (1:1, mol:mol), POPE:POPG (3:1, mol:mol) y extracto lipídico de *E. coli*.
- Tipo de surfactante: Los surfactantes empleados dependen de cada tipo de proteína ya que pueden alterar gravemente su estructura. Para la porina Omp1 fueron ensayados los surfactantes Genapol<sup>®</sup>, OG, OTG y DDM y para la LacY, OG, OTG y DDM.
- LPR: Se realizó una búsqueda de la LPR adecuada mediante preparación de láminas lípido-proteicas con valores de LPR (p/p) comprendidos entre 0,15 y 1,50.
- Intervalo de pH: Fueron ensayados diferentes valores de pH, tanto en las soluciones de diálisis, como en las soluciones de resuspensión y visualización. El rango de pH estudiado fue de 6,20 a 8,80.
- Tipo de catión monovalente: Fueron ensayados fundamentalmente los iones  $K^+$  y  $Na^+$ .

- Tipo de catión divalente: Se realizó un estudio de adsorción empleando  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ .
- Fuerza iónica: Su efecto se ensayó con el fin de optimizar la adsorción de las láminas lípido-proteicas sobre la mica. Tras la realización de curvas de fuerza, para minimizar la repulsión en la solución de visualización, se establecieron los valores óptimos en cada caso. Dos ejemplos de curvas de fuerza se presentan en la figura 96. En la figura 96a se puede observar un efecto de repulsión sobre la palanca debido a la elevada fuerza iónica (0,3 m). Este efecto puede apreciarse por la deflexión experimentada por la palanca antes de alcanzar la superficie. Al reducir esta fuerza iónica a un valor de 0,1 m (figura 96b), la repulsión se minimiza, poniéndose de manifiesto por la linealidad de la etapa libre de la palanca, cuando no está en contacto con la superficie.

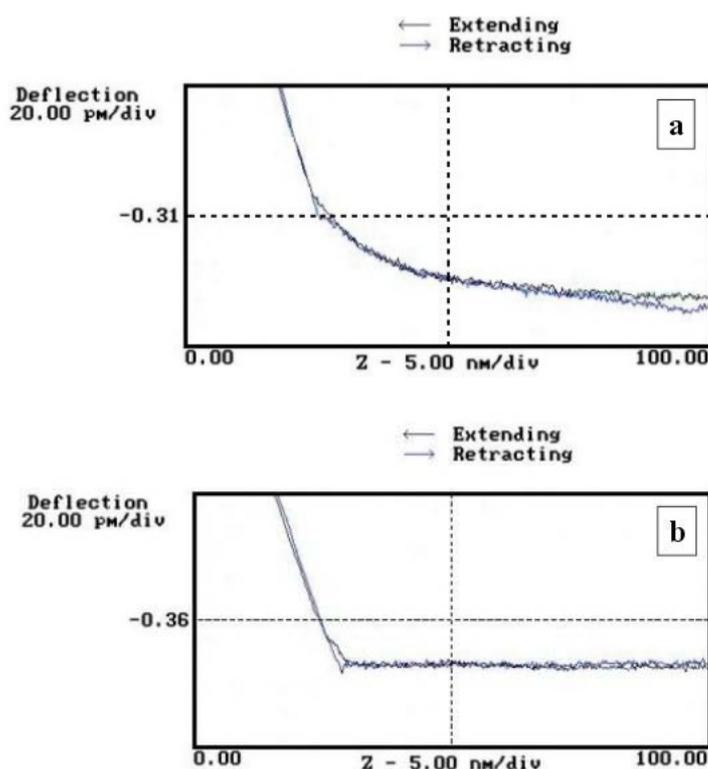


Figura 96. Curvas de fuerza hechas en medio líquido con KCl, con una palanca de  $k = 0,12$  N/m, a diferente fuerza iónica: (a) 0,3 m. (b) 0,1 m.

De todas las condiciones ensayadas se determinó que las condiciones óptimas de cristalización fueron las resumidas en la tabla 28.

Tabla 28. Condiciones óptimas de cristalización establecidas para las proteínas Omp1 y LacY.

	Omp1	LacY
<b>LÍPIDO</b>	POPC	POPC
<b>SURFACTANTE</b>	OG	DDM
<b>LPR (p/p)</b>	0,5	0,5
<b>pH</b>	6,40	7,40
<b>CACIÓN MONOVALENTE</b>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>
<b>CACIÓN DIVALENTE</b>	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
<b>FUERZA IÓNICA</b>	0,36 m y 0,10 m	0,25 m y 0,15 m

#### 5.4.2.i. Omp1 de *Serratia marcescens*

Para la cristalización 2D de la porina Omp1, se realizaron diferentes búsquedas (*screenings*) de las condiciones experimentales adecuadas para dar lugar a láminas lípido-proteicas, suficientemente estables como para ser rastreadas en modo de contacto en el AFM, con el fin de estudiar su disposición superficial y su estructura (Ruiz, 2002; Ruiz et al., 2004b). En la tabla 29 se resumen las principales condiciones ensayadas, así como el resultado obtenido para cada una de ellas.

Para la porina Omp1 de *S. marcescens* se estableció el proceso de diálisis como el óptimo para la extracción del surfactante seleccionado (OG). Asimismo, se determinó como matriz lipídica de cristalización, el fosfolípido POPC, el único de los lípidos ensayados que demostró una superficie suficientemente plana y rígida, para poder realizar un rastreo adecuado en modo de contacto, y uno de los pocos lípidos en los que se observó una estructura repetitiva en su superficie.

En general, la Omp1 fue reconstituida en diferentes matrices lipídicas, observándose estructuras superficiales diferentes (Ruiz et al., 2004b) y pudiéndose apreciar, en algunas composiciones, estructuras que podrían ser cristales tubulares (tabla 29), similares a las descritas para otras proteínas (Rigaud et al., 1997). En la figura 97 se muestra un ejemplo de lámina lípido-proteica de Omp1 reconstituida en POPC.

Tabla 29. Resumen de las principales variables estudiadas y resultados obtenidos para la reconstitución y observación de Omp1 por AFM.

<b>Matriz lipídica</b>	<b>LPR (p/p)</b>	<b>Características</b>
<b>POPC</b>	1,00	Vesículas y láminas con protrusiones.
	0,70	Láminas con doble capa.
	0,50	Láminas con doble capa.
	0,30	Láminas fragmentadas.
	0,20	Láminas fragmentadas.
<b>DMPC</b>	0,20	Láminas no estructuradas y formas tubulares.
<b>DMPC: POPC</b>	0,20	Láminas fragmentadas y vesículas.
<b>(1:1, mol:mol)</b>	0,30	Láminas de superficie irregular y con protrusiones.
<b>Extracto lipídico de <i>E. coli</i></b>	1,00	Vesículas.
	0,50	Vesículas y láminas pequeñas.
	0,20	Láminas con protrusiones y formas tubulares.
<b>LPS de <i>E. coli</i></b>	0,30	Láminas con doble capa y formas tubulares.

Las láminas lípido-proteicas observadas con la porina Omp1, mostraron una estructura característica de doble capa, apreciable sobretudo en las imágenes de deflexión (figura 97b). Estas láminas presentan una altura media de  $10,0 \pm 0,3$  nm ( $n = 10$ ). Asumiendo que una bicapa simple puede medir  $\sim 5$  nm, la estructura formada por estas láminas correspondería a una bicapa doble, en la superficie de la cual se encontraría la proteína. Láminas de este tipo han sido observadas en otras porinas (Scheuring et al., 1999). En la superficie de la doble capa de las láminas lípido-proteicas es donde se encontró la mayor ordenación de las moléculas de proteína. En la figura 98 se muestra la topografía de una de estas láminas ordenadas, visualizada en modo de contacto.

En las imágenes obtenidas de la superficie de las láminas lípido-proteicas, se observó una cierta estructura repetitiva de la porina, aunque no se consiguió cristalizar en 2D, debido probablemente a la presencia de restos del surfactante Genapol<sup>®</sup>, junto con el OG. La estructura observada (figura 98, ampliación) presentó forma de trímero, más o menos regular, con un diámetro de poro monomérico de  $1,3 \pm 0,2$  nm ( $n = 40$ ). El

tamaño de poro observado por AFM fue plenamente concordante con el tamaño de poro estimado mediante aplicación de la técnica de *Black lipid bilayer* (Ruiz et al, 2004a).

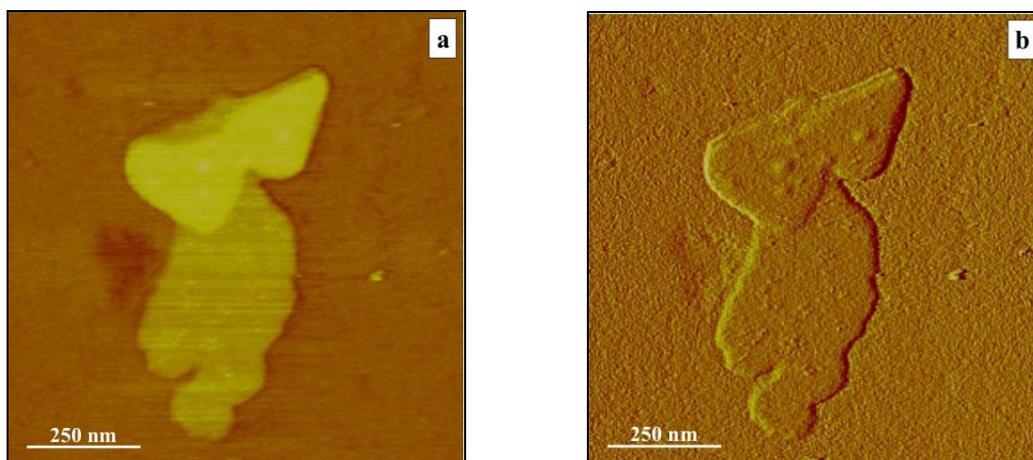


Figura 97. Lámina lípido-proteica formada por POPC como matriz lipídica y Omp1 a una LPR de 0,5 (p/p). Imagen realizada en modo de contacto, en medio líquido, con solución 20 mM Hepes (pH 6,40), 100 mM KCl. **(a)** Imagen de topografía ( $Z = 30$  nm). **(b)** Imagen de la deflexión.

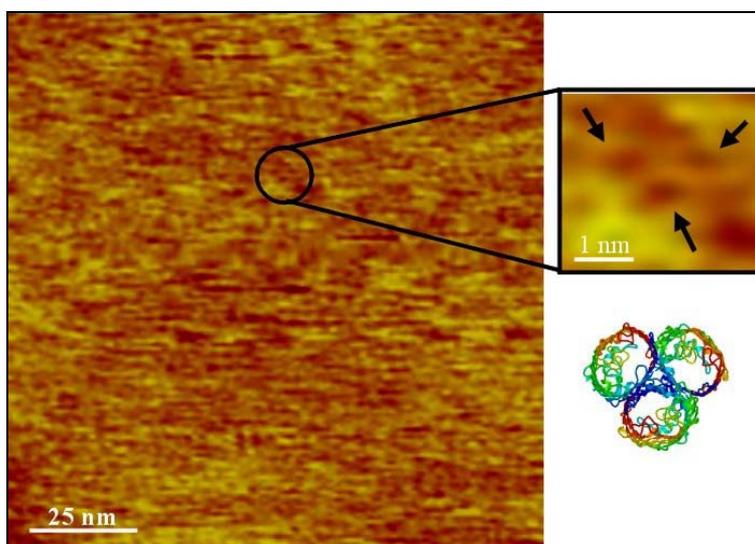


Figura 98. Superficie de una lámina lípido-proteica constituida por POPC y Omp1 (LPR = 0,5) visualizada en modo de contacto y en medio líquido: 20 mM Hepes (pH 6,40), 100 mM KCl.  $Z = 3$  nm. En el margen inferior derecho se muestra el modelo de trímero que forma la Omp1 (RasMol).

Las estructuras triméricas observadas para Omp1 se corresponden al modelo previo obtenido (Ruiz, 2002) y representado mediante el programa RasMol.

#### 5.4.2.ii. Lactosa permeasa de *Escherichia coli*

Se evaluaron las condiciones óptimas de cristalización de la proteína salvaje LacY, únicamente modificada en su región terminal, con una cola de histidinas, con el fin de purificarla correctamente y con alto rendimiento. La actividad de la proteína fue ensayada indirectamente, mediante la utilización de técnicas de fluorescencia (Merino et al., 2005b).

Con este fin, se realizó una extensa investigación de las principales variables que conducen a la cristalización bidimensional de la proteína de membrana. De esta forma, se estableció que el protocolo óptimo para la obtención de láminas lípido-proteicas de LacY, requería de la presencia de DDM como agente disruptor y de reconstitución de la matriz lipídica, y de la aplicación de Bio-Beads<sup>®</sup> SM-2 como sistema de eliminación de dicho surfactante. Se realizó, asimismo, un amplio estudio de las condiciones experimentales idóneas de adsorción de las láminas sobre mica, en cuanto a fuerza iónica requerida y a tiempo y temperatura de incubación de la muestra. Una vez fueron determinadas las condiciones de adsorción de las láminas lípido-proteicas sobre la mica, se procedió a estudiar las condiciones de visualización y la posibilidad de obtener imágenes de alta resolución. En la tabla 30 se muestra un resumen de los ensayos realizados con la LacY, así como los principales resultados obtenidos.

La reconstitución de la LacY en las diferentes matrices lipídicas dio lugar a la formación de diferentes estructuras, como láminas, vesículas o estructuras tubulares, aunque sólo en las láminas lípido-proteicas se observaron estructuras atribuibles a la proteína incorporada en la matriz lipídica, de forma similar a la Omp1 y otras proteínas (Scheuring et al., 1999; Zhuang et al., 1999)

Tabla 30. Resumen de las principales variables estudiadas y resultados obtenidos para la reconstitución y observación de LacY por AFM.

<b>Matriz lipídica</b>	<b>LPR (p/p)</b>	<b>Características</b>
<b>POPC</b>	1,50	Láminas con algunas protrusiones aisladas.
	1,00	Láminas con protrusiones homogéneas.
	0,50	Láminas con evidencia de doble capa.
	0,25	Láminas fragmentadas.
	0,10	Láminas fragmentadas.
<b>DMPC</b>	1,50	Vesículas.
	1,00	Vesículas.
	0,50	Vesículas.
	0,25	Vesículas pequeñas.
	0,10	Vesículas pequeñas.
<b>DMPC:POPC (1:1, mol:mol)</b>	1,50	Vesículas.
	1,00	Láminas con protrusiones agregadas.
	0,50	Láminas pequeñas.
	0,25	Láminas fragmentadas.
	0,10	Láminas fragmentadas.
<b>POPE:POPG (3:1, mol:mol)</b>	1,50	Vesículas y estructuras tubulares.
	1,00	Vesículas.
	0,80	Láminas fragmentadas y vesículas.
	0,50	Láminas con presencia de dominios.
<b>Extracto lipídico de <i>E. coli</i></b>	1,00	Bicapas extendidas sin estructura.
	0,80	Láminas fragmentadas.
	0,50	Láminas fragmentadas.
<b>Monocapa DOGS-NTA-Ni</b>	0,50	Láminas fragmentadas y estructuras tubulares.

En las láminas lípido-proteicas observadas, se apreciaron diferentes estructuras probablemente relacionadas con el elevado grado de flexibilidad y forma de incorporación de la LacY. En la figura 99 se presenta la superficie de una lámina lípido-proteica visualizada en aire (figura 99a) y una lámina visualizada en líquido (figura 99b), en las que se aprecian estructuras similares de morfología más o menos circular y

con un diámetro de  $24 \pm 3$  nm ( $n = 30$ ) y  $25 \pm 3$  nm ( $n = 15$ ), respectivamente. Estas estructuras podrían ser debidas a las regiones externas de la LacY con sus correspondientes lípidos anulares, con la consideración que, al ser estructuras aisladas entre sí, puede existir un efecto de magnificación del tamaño debido a la convolución de la punta.

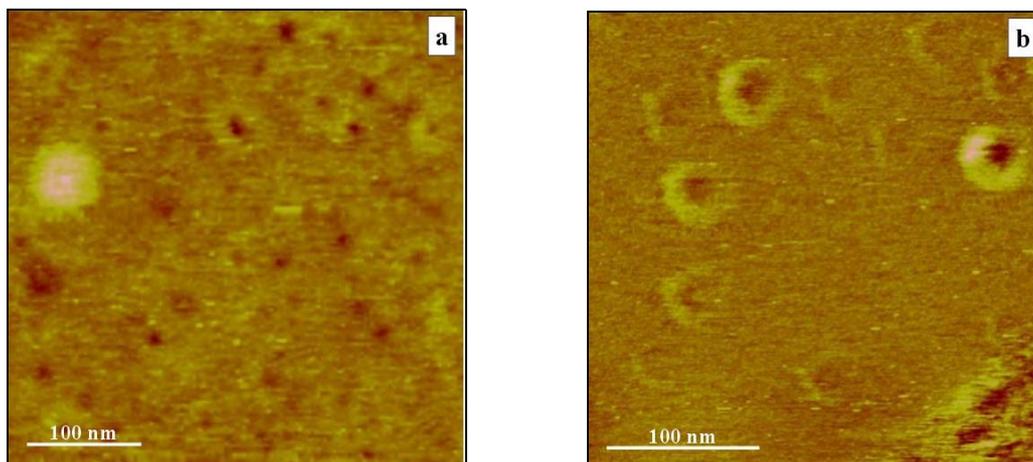


Figura 99. Imagen topográfica de la superficie de dos láminas lípido-proteicas.  $Z = 5$  nm. (a) Lámina formada por DMPC:POPC (1:1) y LacY a una LPR de 0,5, visualizada en modo de contacto intermitente en aire. (b) Lámina formada por POPC y LacY a una LPR de 1,5 visualizada en modo de contacto intermitente en líquido.

La LacY presentó una elevada capacidad de agregación cuando la concentración de surfactante disminuye por debajo de su CMC, que es lo que sucede en el proceso de cristalización 2D. La presencia de estas agregaciones de la proteína se puede apreciar por AFM como protuberancias en la superficie de la lámina lípido-proteica (figura 100).

Una de las condiciones investigadas para la LacY fue la del valor óptimo de la LPR, con el fin de conseguir láminas estables y rígidas, para la obtención de imágenes de alta resolución. Algunas de las láminas halladas durante estos ensayos se muestran en la figura 100, donde se puede apreciar la aparición de estructuras esféricas sobresalientes, en mayor número, cuanto mayor es la proporción de LacY en la lámina. La SPB de referencia se realizó a partir de la extensión de liposomas, formados por adición de DDM y posterior eliminación con Bio-Beads<sup>®</sup>. Las protuberancias encontradas presentaron unas dimensiones de  $15 \pm 3$  nm ( $n = 30$ ) de diámetro y  $0,55 \pm 0,12$  ( $n = 30$ ) de altura sobre la bicapa.

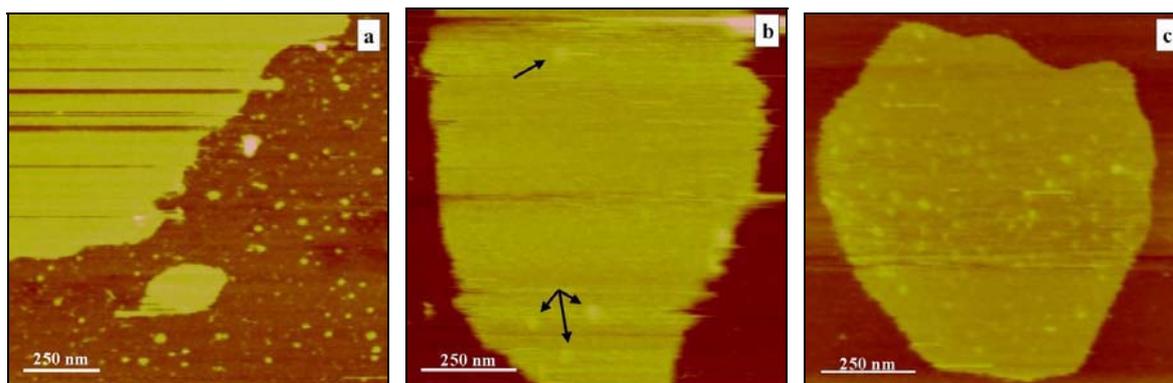


Figura 100. Imágenes topográficas de láminas formadas por POPC y LacY a diferentes valores de LPR. **(a)** SPB de referencia. **(b)** LPR = 1,5. **(c)** LPR = 1,0. Las imágenes fueron realizadas en modo de contacto intermitente en líquido utilizando la solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40); 150 mM NaCl. Z = 20 nm.

En la búsqueda de la LPR se halló un efecto de agregación progresiva de estas protuberancias, dando lugar a la formación de una capa más o menos homogénea sobre la bicapa de POPC a una LPR de 0,5, como se muestra en la figura 101a. El acercamiento a esta capa encontrada en la superficie de la lámina, permitió observar la presencia de una estructura más o menos ordenada de la LacY (figura 101b), con una altura sobre la bicapa de  $1,01 \pm 0,13$  nm ( $n = 10$ ). El diámetro de estas estructuras (figura 101c) fue de  $14 \pm 3$  nm ( $n = 30$ ), tamaño similar al observado en las estructuras aisladas de LacY.

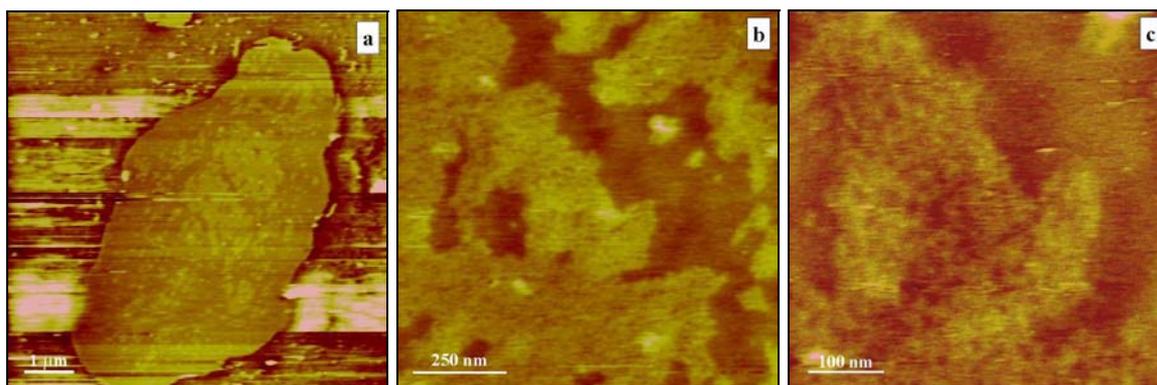


Figura 101. Imágenes topográficas de una lámina lípido-proteica de POPC y LacY a una LPR de 0,5, visualizada en modo de contacto intermitente en solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40); 150 mM NaCl. **(a)** Lámina lípido-proteica completa (Z = 20 nm). **(b)** Ampliación de una región de la superficie de la lámina con un tamaño de 1  $\mu$ m x 1  $\mu$ m (Z = 5 nm). **(c)** Ampliación de una región de la superficie de la lámina de 500 nm x 500 nm (Z = 5 nm).

A pesar de la ordenación mostrada en la figura 101c, no puede describirse esta estructura como un cristal 2D, debido a su falta de homogeneidad y a la ausencia de un patrón de repetición (*pattern*) bien definido.

Las láminas lípido-proteicas de mayor ordenación se obtuvieron en POPC, aunque, en algunas ocasiones también se ha observado una ordenación similar en POPE:POPG (3:1, mol:mol).

En la figura 102 se muestra la superficie de dos láminas lípido-proteicas constituidas por POPC y LacY a una LPR de 0,5. En estas láminas se aprecia una clara repetición de una estructura circular de  $4,4 \pm 0,8$  nm ( $n = 30$ ) de diámetro, enturbiada por la presencia de algunas protrusiones en la superficie.

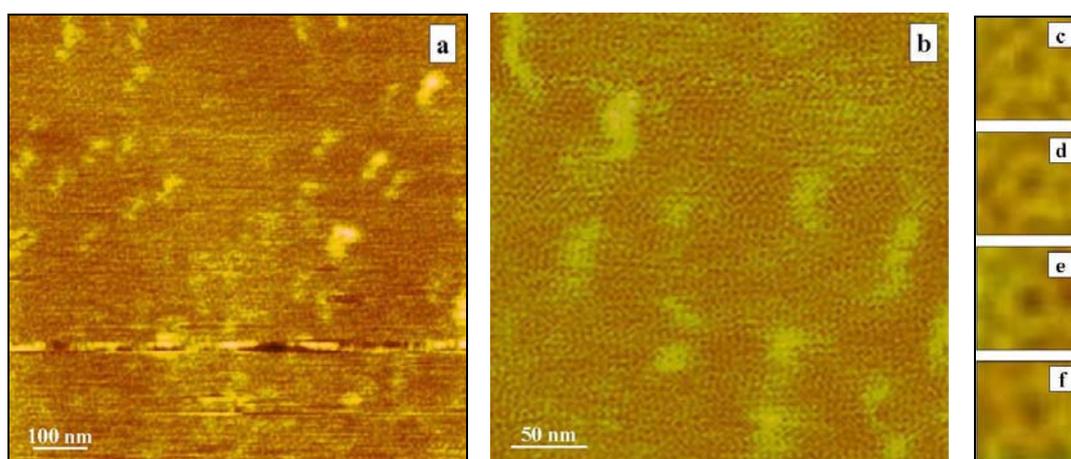


Figura 102. Imagen topográfica de la superficie de dos láminas lípido-proteicas de POPC y LacY (LPR 0,5) (**a** y **b**) visualizadas en modo de contacto en solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40); 150 mM NaCl.  $Z = 1,5$  nm. En las figuras **c**, **d**, **e** y **f** se presentan ampliaciones de las estructuras circulares.

Se aprecia mejor la estructura de la LacY en la figura 102b, en la que se puede observar claramente la repetición de estructuras de tipo circular. Algunas de estas estructuras circulares se muestran en las figuras 102c, d, e y f, en las que se puede apreciar la presencia de cinco protrusiones que son las que dan lugar a la forma de círculo. Estas láminas lípido-proteicas obtenidas mediante la reconstitución con la LacY no mostraron suficiente ordenación como para ser consideradas un cristal 2D, pero sí que presentaron suficiente resolución como para apreciar su estructura y poder realizar

un posible ensayo de actividad con el objeto de diseñar un biosensor de lactosa (Merino et al., 2005a, 2005b).

En la figura 103 se puede observar una imagen tridimensional de la lámina lípido-proteica presentada en la figura 102b, en la que se destacan mediante círculos negros, las estructuras correspondientes a las unidades de LacY.

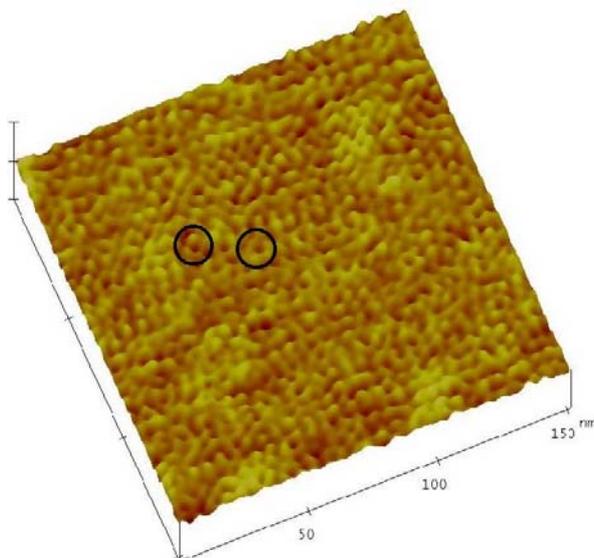


Figura 103. Imagen tridimensional de la topografía de una lámina lípido-proteica de POPC y LacY (LPR 0,5) visualizada en modo de contacto en solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40); 150 mM NaCl. Los círculos negros señalan algunas de las estructuras repetitivas de la proteína.

La inserción de la LacY fue homogénea en POPC (figura 103), mientras que en POPE:POPG (3:1) se distribuyó específicamente, en unos dominios lipídicos, en detrimento de otros. En la figura 104 se puede observar la presencia de dominios en la bicapa de la misma forma que se podían observar en la matriz lipídica aislada (figura 70 del apartado 5.2.4). Con una flecha blanca se indica el soporte de mica sobre el que se encuentra la lámina, mientras que con asteriscos se presentan los dominios (asterisco blanco para el dominio inferior y asterisco negro para el superior).

Las alturas de estas láminas fueron  $4,8 \pm 0,2$  nm ( $n = 10$ ) para el dominio superior y  $3,82 \pm 0,16$  nm ( $n = 10$ ) para el dominio inferior. La diferencia entre los dominios de las láminas lípido-proteicas ( $\sim 1$  nm) fue superior a la de los dominios lipídicos observados en las SPB ( $\sim 0,6$  nm). Esta mayor altura del dominio superior en

las láminas, puede ser debida a la presencia de la proteína y de sus correspondientes lípidos anulares. La topografía de estas láminas fue altamente irregular, como puede apreciarse de la sección realizada en la misma (figura 104c). En la figura 104b se observa una ampliación realizada sobre la lámina, en la que se pueden apreciar detalles de su superficie, como la presencia de pequeñas protuberancias circulares en el dominio superior, similares a las observadas en la lámina de POPC aunque de mayor tamaño, siendo éste de  $7,5 \pm 0,4$  nm ( $n = 30$ ) de diámetro.

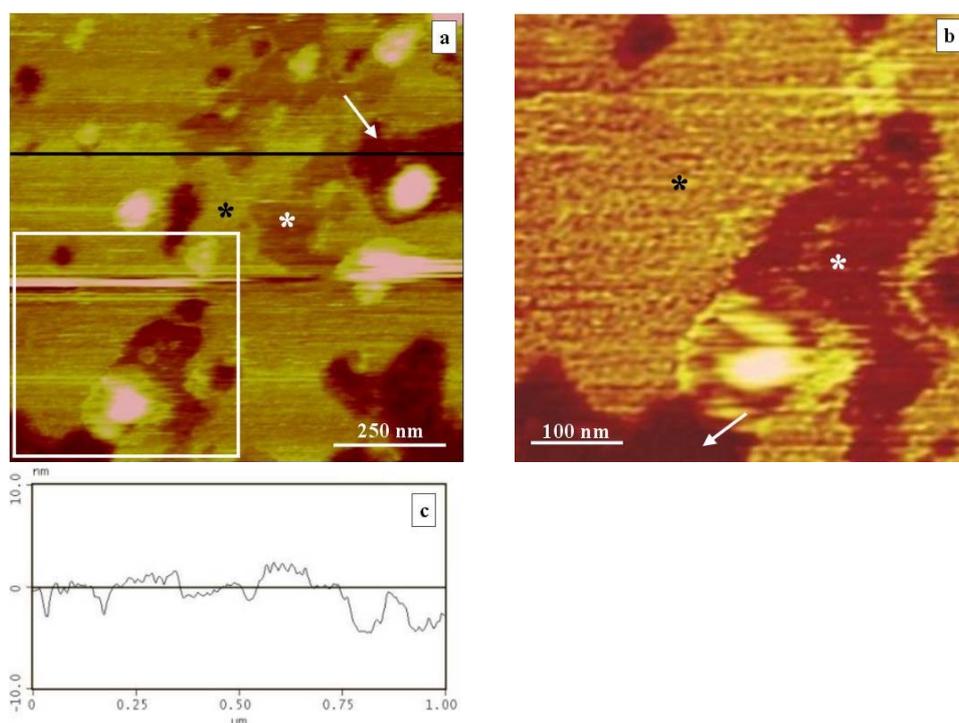


Figura 104. Topografía de una lámina lípido-proteica de POPE:POPG (3:1) y LacY (LPR 0,5) visualizada en modo de contacto, en solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40), 150 mM NaCl. La flecha blanca señala el soporte de mica muscovita, el asterisco blanco marca un dominio inferior y el asterisco negro marca un dominio superior. (a) Superficie de la lámina lípido-proteica. El recuadro blanco indica la región de la lámina ampliada.  $Z = 20$  nm. (b) Ampliación de la lámina lípido-proteica.  $Z = 10$  nm. (c) Sección transversal realizada a la superficie de la lámina (a).

En la figura 105 se muestra la imagen topográfica tridimensional de la figura 104b, donde pueden apreciarse las estructuras formadas por la proteína reconstituida en el dominio superior (círculos negros). En el dominio inferior, estas estructuras no se observaron, lo que podría interpretarse como una cierta preferencia de incorporación de

la proteína por los dominios altos, que, como ya se comentó en el apartado 5.2.4 serían debidos a regiones ricas en POPE (Lehtonen y Kinnunen, 1997; Merino et al., 2005b).

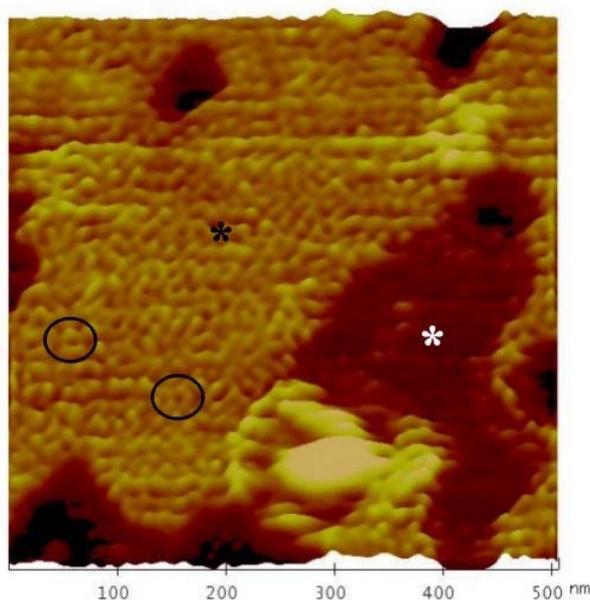


Figura 105. Imagen tridimensional de la topografía de la superficie de una lámina lípido-proteica de POPE:POPG (3:1) y LacY (LPR 0,5) visualizada en modo de contacto en solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40); 150 mM NaCl. El asterisco blanco indica el dominio inferior, mientras que el asterisco negro marca el dominio superior. Los círculos negros señalan dos de las protuberancias causadas por LacY.

El estudio sistemático y las variaciones en las condiciones de visualización, permitieron observar cristales bidimensionales de suficiente calidad como para poder realizar estudios estructurales de la LacY y obtener sus parámetros de celda. Los cristales 2D únicamente aparecieron en POPC. En la figura 106 se muestra la superficie del cristal 2D obtenido a una LPR de 0,5 en POPC.

En la superficie del cristal se apreciaron algunos defectos, indicados con flechas blancas en la figura 106a, característicos de este tipo de estructuras, probablemente debidos a la elevada flexibilidad de la proteína en un medio líquido. El estudio detallado de la estructura cristalina se realizó mediante la aplicación de la Transformada Rápida de Fourier (FFT) (figura 106b) a la imagen topográfica, a partir de la cual, se dedujo que la celda unidad estaba formada por dímeros de LacY, como motivo.

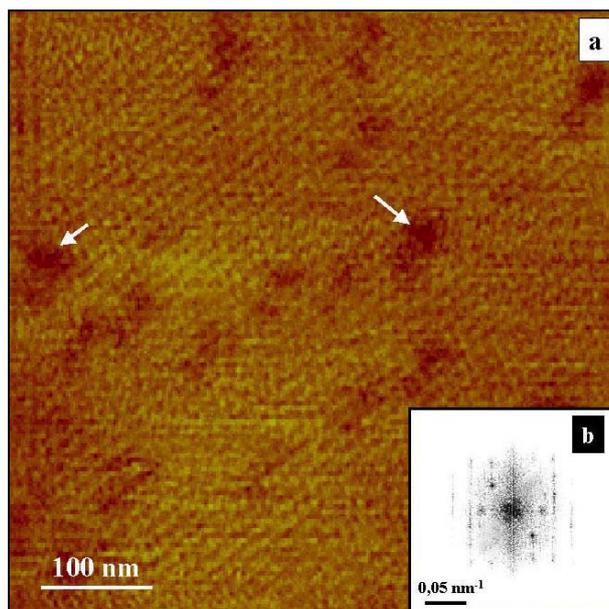


Figura 106. Cristal bidimensional de lactosa permeasa de *E. coli* reconstituida en POPC a un LPR de 0,5. (a) Topografía de la superficie del cristal visualizada en modo de contacto.  $Z = 1,5$  nm. (b) Transformada rápida de Fourier del cristal (FFT).

El empleo de la FFT para la realización de una imagen de proyección y filtrado de la topografía del cristal 2D, permitió un estudio detallado de las características del mismo, ya que se eliminan los defectos que alteran sus parámetros. La superficie del cristal 2D tras la realización de la FFT se presenta en la figura 107a. De esta forma se pudo calcular el valor de los parámetros que constituyen la celda unidad del cristal:  $a = 13,15$  nm  $b = 16,74$  nm y  $\gamma = 116^\circ$ . Los parámetros de celda obtenidos indican una simetría cristalina de tipo  $p2$  (cristal monoclinico).

En la figura 107b se presenta una ampliación del mapa de proyección obtenido donde se indica la estructura de la celda unidad, y la celda de Wigner-Seitz (figura 107c) que engloba el motivo del cristal 2D, en este caso un dímero de LacY, como puede apreciarse en el modelo tridimensional presentado en la figura 107d. La celda de Wigner-Seitz es la región del espacio más cercana a un nudo de red. Esta celda se forma uniendo cada nudo de red con todos sus vecinos, bisectando las líneas y tomando el espacio geométrico que queda dentro (Kittel, 1995; Gil et al., 1998). La superficie estimada (en sección longitudinal) que ocupa cada uno de estos dímeros fue de  $45 \pm 3$  nm<sup>2</sup>. Cada una de las subunidades que constituye el dímero de LacY está formada por dos monómeros, de  $6,2 \pm 0,2$  nm ( $n = 30$ ) de diámetro.

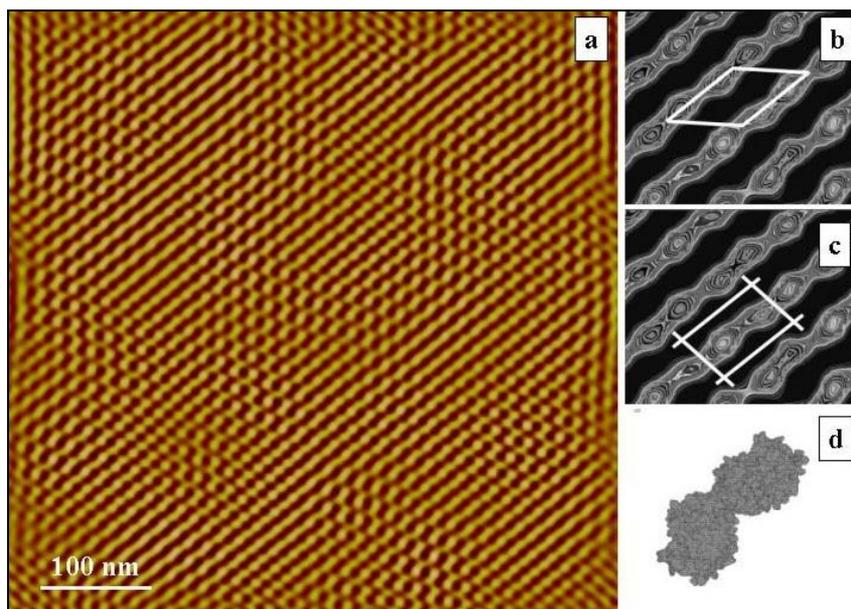


Figura 107. Imagen de proyección del cristal 2D de LacY realizada mediante filtrado con la Transformada de Fourier. (a) Superficie del cristal 2D. (b) Celda unidad. (c) Celda de Wigner-Seitz. (d) Modelo tridimensional del motivo, obtenido utilizando Protein Explorer.

El cristal 2D de LacY presentaría un aspecto como el expuesto en la figura 108, donde cada una de las moléculas de LacY se encontraría rodeada por algunas moléculas de fosfolípido, como si de un anillo se tratase.

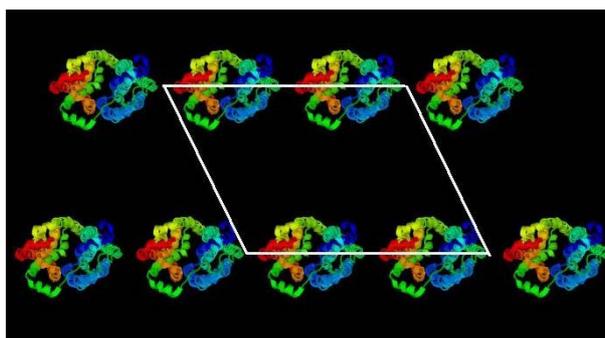


Figura 108. Modelo de la estructura del cristal 2D de LacY según los parámetros de celda obtenidos. El modelo de LacY fue obtenido de PDB y dispuesto en visión zenital mediante RasMol.

Fueron observados, en algunos casos, monómeros de diámetro significativamente menor,  $5,4 \pm 0,2$  nm ( $n = 30$ ). Ambos valores de diámetro son plenamente concordantes con los encontrados por difracción, en el mutante C154G de

LacY (Abramson et al., 2003). Estos valores podrían indicar que los monómeros de menor tamaño se encuentran invertidos frente al resto, de manera que la punta del AFM detectaría el diámetro de la región citoplasmática de la LacY y de la región periplasmática a la vez, como se muestra en el esquema representado en la figura 109.

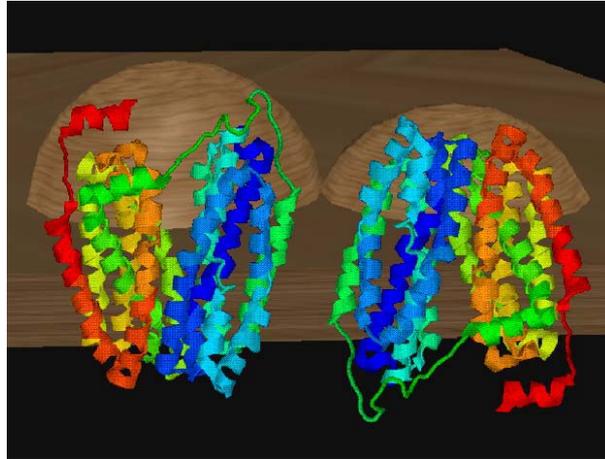


Figura 109. Estructura tridimensional del dímero de LacY cristalizado en dos dimensiones. Imágenes de LacY obtenidas de PDB.

El modelo de la LacY depositado en PDB por Abramson y colaboradores en 2003, ha permitido realizar una estimación de la disposición de la proteína en un cristal bidimensional. Las dimensiones calculadas por estos autores permiten plantear que algunas de las moléculas de LacY se encuentran invertidas al resto, ya que las dimensiones de las protuberancias detectadas por AFM e indicadas por semiesferas en la figura 109, así lo sugieren.

La presencia de una cola de histidinas terminales en LacY, permitiría utilizar lípidos funcionalizados para reconstituir esta proteína de manera orientada, así como la posibilidad de medir sus fuerzas de interacción mediante la aplicación de puntas de AFM funcionalizadas.