

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de las proteínas de membrana

Existen algunas proteínas y péptidos que interaccionan sobre las biomembranas y que pueden ser obtenidas de forma comercial. Éste es el caso de las moléculas utilizadas como referencia en el presente trabajo: la proteína Cyt c y el péptido MLT. Por otra parte, proteínas de membrana de gran interés biológico, como pueden ser las implicadas en la resistencia a determinados fármacos o las proteínas politópicas implicadas en el transporte de nutrientes, no se encuentran comercialmente y deben ser obtenidas a partir de cultivo celular y posterior purificación, utilizando para ello protocolos específicos. La comprobación de la purificación se hace, rutinariamente, mediante SDS-PAGE. En general, se obtiene una única banda, como en el caso de la porina Omp1, aunque en otros casos, dependiendo de la proteína y de las condiciones de purificación empleadas, entre otros factores, se puede obtener más de una banda, debida posiblemente a la polimerización de la proteína (Wang et al., 2003). Tras la extracción y purificación de la LacY, los geles desarrollados revelaron la presencia de monómeros y dímeros de la proteína en solución. La observación de bandas correspondientes al dímero de la LacY ha sido estudiada y discutida por diversos autores (Patzlaff et al., 1998; Engel et al., 2002). La presencia de los dímeros es un factor que puede condicionar la futura integración de la proteína en la bicapa lipídica, ya sea en forma de proteoliposoma o de cristal bidimensional.

Actualmente, el estudio de moléculas aisladas (macromoléculas), y en particular proteínas, puede llevarse a cabo aplicando técnicas de nanotecnología, como la AFM. La convolución de las puntas de AFM hace que las proteínas aisladas puedan presentar una apariencia globular, aunque ésta no sea su estructura nativa (Weisenhorn et al., 1990). Éste es el caso del péptido MLT, el cual aparece en forma globular cuando es conocida su estructura en forma de bastón (Ladokhin y White, 1999). Este efecto de convolución de punta puede dar lugar a una cierta sobreestimación de las dimensiones medidas en el plano xy , mientras que no producirían alteraciones significativas en z .

En general, las proteínas de membrana presentan una adhesión superior sobre un soporte hidrofílico (mica muscovita) que sobre uno hidrofóbico (HOPG). En todas las proteínas estudiadas (apartado 5.1.2. de *Resultados*), se observaron un mayor número de estructuras sobre mica que sobre grafito.

La proteína soluble Cyt c y el péptido MLT, se disponen sobre el sustrato según su lipofilidad, la cual refleja el balance entre los aminoácidos hidrófilos y los lipófilos. Por otra parte, las proteínas que requieren de la presencia de surfactantes para mantener su estabilidad en solución (Omp1 y LacY), se encuentran en forma de micela mixta, emulando el ambiente biomimético (Voss et al., 1997; Zhao et al., 1999). La adhesión de estas micelas sobre el sustrato depende de las propiedades fisicoquímicas de las mismas. En el caso del Cyt c, se observó una mayor agregación sobre mica que sobre grafito. Sobre el soporte hidrofílico, se pudieron apreciar estructuras irregulares constituidas por múltiples monómeros dispuestos de forma aleatoria. La mica, en medio líquido y en presencia de cationes divalentes, presenta carga positiva (Müller et al., 1997), pudiendo dar lugar a la agrupación de los monómeros de Cyt c debido a una cierta repulsión del sustrato, ya que ésta es una proteína catiónica. Sobre HOPG, el Cyt c se adsorbe con dificultad debido a la hidrofilia de la proteína (ver estructura del Cyt c en el apartado de *Introducción*), lo que se traduce en la formación de oligómeros ($n_m = 2,13$). Este fenómeno podría ser debido a que el Cyt c requiere de un cambio conformacional para exponer los aminoácidos hidrofóbicos a la superficie del sustrato. Por otra parte, la MLT, presenta una mayor tendencia a la agregación sobre HOPG que sobre mica. Los agregados se formarían debido a la unión de diferentes monómeros, dispuestos de tal forma que los aminoácidos hidrofóbicos se adherirían al sustrato, mientras que los aminoácidos hidrofílicos quedarían expuestos a la solución. Sobre mica, los monómeros del péptido quedarían dispuestos en forma de pequeños agregados que protegerían en sus regiones internas los aminoácidos hidrofóbicos, de manera similar a como lo haría una micela.

Las proteínas que se encuentran en forma de micela mixta (Omp1 y LacY) demostraron una gran uniformidad sobre mica, en la que se dispusieron en forma globular y homogénea, mientras que sobre grafito se observó la formación de agregados micelares. Las micelas mixtas constituidas por un surfactante (en concentraciones

superiores a su CMC) y la proteína, presentan, como es sabido, una región exterior hidrofílica y una región interior hidrofóbica. De forma similar a lo que ocurre con las proteínas solubles, la Omp1 y la LacY se adhieren con facilidad sobre la mica, debido a su región hidrofílica. Esta adhesión sobre la mica se produce de forma aislada, o dando lugar a oligómeros, menores a 4 monómeros.

Estas micelas mixtas cambian sus propiedades estructurales cuando se reduce la concentración de surfactante por debajo de su CMC. En estas condiciones, se produce la agregación de las proteínas Omp1 y LacY, como se interpreta a partir de las observaciones realizadas sobre el soporte de mica (figuras 59 y 61 de *Resultados*). Estas agregaciones de proteína se originarían debido al marcado carácter hidrofóbico de la LacY (Foster et al., 1983). Los monómeros de LacY se agruparían para dar lugar a un núcleo de tipo hidrofóbico, protegido por regiones hidrofílicas de la propia proteína y por moléculas de surfactante residual. Este efecto de agregación de las micelas Omp1-OG y LacY-DDM en un medio hidrofílico podría ser interpretado como el inicio del despliegue y posible desnaturalización de las proteínas. Este fenómeno requeriría un importante cambio en su estructura, que puede llegar a ser irreversible y que se podría poner de manifiesto por la presencia de precipitados en solución.

Las estructuras largas y con forma cilíndrica halladas sobre HOPG, tanto para la Omp1 como para la LacY, pueden ser atribuidas a la formación de micelas tubulares similares a las observadas en otros tipos de proteínas (Rigaud et al., 1997) y péptidos (Kogan et al, 2001 y 2002). Mediante TEM, algunos autores observaron filamentos de LacY, aunque la interpretación que se realizó podría ser errónea debido a las condiciones empleadas en la extracción del surfactante (Li y Tooth, 1987). Las micelas observadas estarían formadas por la presencia de agregaciones lineales de proteína y surfactante, en las cuales, algunas regiones de la proteína se adherirían al sustrato de HOPG, mientras que otras se expondrían hacia la solución acuosa. Estas micelas tubulares se formarían cuando la concentración de surfactante es inferior a su CMC, de forma que no se obtendrían micelas aisladas. La ordenación de las micelas mixtas en HOPG, podría ser debida a la presencia de una orientación concreta del plano del mismo.

6.2. Caracterización de las matrices lipídicas

En la reconstitución de proteínas, no solo se requiere caracterizar sus propiedades, sino que hay que conocer las características de las matrices lipídicas de soporte, así como los procesos que conducen a la formación del proteoliposoma o, en su caso, del cristal bidimensional.

Se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de cuatro composiciones lipídicas: POPC, DMPC:POPC (1:1), POPE:POPG (3:1) y extracto lipídico de *E. coli*. Estas composiciones pueden ser distribuidas en dos grupos, según su carga superficial. Por una parte, POPC y DMPC:POPC (1:1) presentan carga superficial neta cero, mientras que POPE:POPG (3:1) y el extracto lipídico de *E. coli* presentan carga neta negativa (tabla 14). Esta carga negativa es conferida mayoritariamente por determinados fosfolípidos como PG o CL, entre otros. Todas estas composiciones formaron liposomas multilaminares cuyo diámetro fue comprobado mediante dispersión de la luz. Las vesículas mostraron un comportamiento similar frente al proceso de sonicación, a la adición de surfactantes y a variaciones de pH de la solución. Según los resultados obtenidos, se estableció que el tiempo de sonicación máximo a aplicar para estos liposomas sería de 30 minutos. La concentración necesaria de surfactante para iniciar la solubilización de los liposomas en un proceso *in situ* fue $> 0,50$ % (p/v) (~ 17 mM) para el OG y $\geq 0,05$ % (p/v) (~ 1 mM) para el DDM. Por último, los liposomas mantienen su estabilidad física en solución a valores de pH comprendidos entre 3 y 12.

Las características topográficas de las SPB formadas por estos liposomas fueron estudiadas mediante extensión de los mismos sobre un sustrato de mica muscovita. El mecanismo del proceso de extensión de las SPB puede considerarse igual para cualquier composición (McConnell et al., 1986; Reviakine y Brisson, 2000; Jass et al, 2000), pero su cinética de extensión es diferente. El extracto lipídico de *E. coli* (White et al., 2000) mostró una extensión más lenta que la mezcla formada por DMPC:POPC (1:1). Los liposomas formados por extracto lipídico de *E. coli* presentan, probablemente debido a su compleja composición lipídica y particularmente debido a la presencia de PE y PG, la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno (Hauser et al., 1981; Söderlund et al., 1999) que proporcionan cohesión y estabilidad a su estructura, como pudo

apreciarse también por el menor diámetro observado. De acuerdo con los valores de anisotropía obtenidos (0,2936 y 0,2488 para DMPC:POPC y extracto lipídico de *E. coli*, respectivamente) (tabla 27) se puede concluir que los liposomas negativos presentan una menor microviscosidad que los zwitteriónicos. Estas características, así como la presencia de carga neta negativa en la superficie de los liposomas, dificultaría el proceso de fusión previo a la extensión de la SPB. Los liposomas formados por DMPC:POPC (1:1) no tienen carga superficial neta negativa y presentaron una mayor capacidad para extenderse sobre el sustrato hidrofílico y fusionarse entre ellos. Los aspectos teóricos de la extensión de liposomas (adsorción, ruptura, fusión y coalescencia), para dar lugar a la SPB han sido discutidos ampliamente por diversos autores (Egawa y Furosawa, 1999; Reviakine y Brisson, 2000 y las referencias del mismo).

La SPB formada por DMPC:POPC (1:1) fue más erosionable por la punta del AFM que la de extracto lipídico de *E. coli*, como puede apreciarse en las figuras 65 y 66, respectivamente. Esta acción mecánica de la punta (You et al., 2000) puede dar lugar a una cierta deformación lateral (esfuerzo) de los fosfolípidos que facilitaría la coalescencia entre bicapas planas aisladas.

A partir de la observación de la topografía de todas las SPB estudiadas por AFM en medio líquido, pudo comprobarse la presencia o ausencia de dominios lipídicos, ya sean debidos a la transición de los fosfolípidos o a diferencias estructurales de los mismos (tamaño molecular). En ninguna de ellas se pudo concluir que existieran dominios originados por la segregación lipídica, aunque sí se comprobó la existencia de dominios dependientes de la temperatura en las composiciones con carga neta negativa (figuras 71 y 73).

Las SPB de POPC mostraron una topografía uniforme, sin dominios, como podía esperarse de un fosfolípido puro, cuya T_m es muy inferior a la temperatura de visualización. Algunos autores han observado dominios lipídicos mediante AFM, al estudiar una SPB de DMPC puro en un intervalo de temperaturas, por encima y por debajo de su T_m (~ 23 °C) (Tokumasu et al., 2003a). En el caso de la POPC ($T_m \sim -2$ °C), a la temperatura de visualización, los fosfolípidos se encuentran en estado de

cristal-líquido, por lo que sólo se observó una fase. En la mezcla formada por DMPC:POPC (1:1), a pesar de que sus fosfolípidos presentan cadenas hidrocarbonadas distintas, tampoco se apreciaron dominios que pudieran atribuirse a su diferente estructura molecular. Se observó una mezcla uniforme de ambos fosfolípidos para la proporción molar estudiada. Los cambios de temperatura a los que fue sometida la SPB tampoco permitieron observar la presencia de dominios dependientes de la temperatura, ya que la T_m de esta mezcla, determinada experimentalmente en este trabajo mediante anisotropía de fluorescencia, es de $\sim 11,5$ °C.

En las composiciones con carga neta negativa, se hallaron dominios dependientes de la temperatura, aunque con características diferentes. En la mezcla POPE:POPG (3:1), los dominios fueron visibles a 4, 23 y 40 °C, temperatura a partir de la cual los dominios desaparecen. En el extracto lipídico de *E. coli*, inicialmente, los dominios no siempre están presentes y desaparecen con facilidad frente a pequeñas variaciones de la temperatura, tanto al enfriar como al calentar la muestra. En todos los casos observados, los dominios formados por POPE:POPG (3:1) fueron extensos, claramente visibles y estables en el tiempo, indicando una cierta heterogeneidad de la mezcla. El extracto de *E. coli* presentó dominios pequeños, respecto a la superficie total de la SPB y no siempre fueron evidentes. Estos pequeños dominios podrían deberse al cambio de estado (gel a cristal-líquido, o inversa) de alguno, o algunos de los fosfolípidos que constituyen esta mezcla compleja.

A partir de los análisis de altura realizados, los dominios observados en la mezcla POPE:POPG (3:1) se originarían por regiones enriquecidas en POPE (dominios superiores) y regiones enriquecidas en POPG (dominios inferiores). Por una parte, la molécula de POPE es algo mayor que la de POPG, debido a la diferencia de tamaño y orientación en la interfase, de la cabeza polar de PE y PG (Tocanne y Teissié, 1990; Langner y Kubica, 1999). Por otra parte, los dos fosfolípidos presentan una T_m diferente. La T_m del POPE es de 25 °C y los dominios superiores se redujeron de forma significativa cuando la temperatura de la muestra superó los 23 °C, es decir, cuando se produciría la transición de este fosfolípido a la fase de cristal-líquido.

Los dominios encontrados en el extracto lipídico de *E. coli* pueden también ser interpretados como regiones enriquecidas en alguno de los fosfolípidos presentes en mayor proporción (PE o PG), debido a la capacidad de formar enlaces de hidrógeno en el caso de la PE (Hauser et al., 1981) y a la formación de *clusters* en el caso del PG (Söderlund et al., 1999). La gran complejidad de esta mezcla lipídica hace difícil una definición exacta de la naturaleza de estos dominios.

El estudio de los liposomas formados por diferentes composiciones lipídicas permite conocer las características de la superficie de las vesículas. La incorporación de las proteínas de transmembrana requiere de la disrupción de los liposomas, mediante surfactantes, para dar lugar a micelas mixtas fosfolípido-surfactante (Rigaud y Levy, 2003; Viitanen et al., 1986). A partir de la combinación de estas micelas mixtas con micelas proteína-surfactante se inicia el proceso de formación de proteoliposomas y cristales 2D. El proceso por el cual los liposomas se transforman en micelas mixtas, y las concentraciones de surfactante necesarias para ello, son dos aspectos críticos que deben conocerse con detalle. El mecanismo por el cual, un surfactante produce la solubilización de las vesículas lipídicas está bien establecido (Lichtenberg et al., 1983). Los parámetros que caracterizan el proceso de solubilización dependen de la composición lipídica y el surfactante empleado, así como de otros factores, como podría ser la presencia de los dominios observados en las composiciones negativas, de forma similar a lo que ocurriría en las DRM (Brown y London, 1998).

Las micelas mixtas fosfolípido-surfactante utilizadas en este trabajo, se formaron a partir de dos surfactantes con diferentes propiedades fisicoquímicas, OG y DDM. El proceso de solubilización de los liposomas con estos surfactantes permitió obtener diferencias significativas entre ambos, en los parámetros característicos de este proceso. En la etapa que da lugar a la coexistencia entre vesículas y micelas mixtas se pudieron apreciar diferencias en la denominada “inducción micelar” (López et al, 1998) entre ambos surfactantes, siendo mayor para el OG que para el DDM. Esto podría indicar que la solubilización inducida por el DDM es más rápida que la inducida por el OG (figuras 74 y 78). Teniendo en cuenta que la CMC del surfactante OG es más de 100 veces superior a la del DDM, se debe considerar que el OG requeriría un mayor número de moléculas que el DDM para iniciar la micelización. Este mayor número de monómeros

que interaccionarían con la bicapa lipídica, podría explicar el diferente proceso de inducción micelar entre ambos surfactantes, así como que los valores de Re sean superiores para el OG que para el DDM.

El efecto que producen ambos surfactantes sobre los liposomas, fue diferente entre las composiciones lipídicas zwitteriónicas y las negativas. Las composiciones negativas presentaron valores residuales de SLS al final del proceso, mientras que las composiciones zwitteriónicas finalizaron con un 0 % de SLS, mostrando así su completa solubilización. Los valores de SLS residual para el DDM fueron superiores a los hallados para el OG, concretamente, se observó ~ 50 % en POPE:POPG (3:1) y ~ 7 % en el extracto lipídico de *E. coli*, mientras que para el OG, ambas composiciones negativas presentaron valores de ~ 5 %. Estos valores de SLS residuales indican una disrupción incompleta de las vesículas, pudiendo ser interpretada como la posible presencia de regiones lipídicas con una cierta resistencia a la acción de estos surfactantes, las cuales no habrían sido solubilizadas. Este efecto ha sido ampliamente estudiado en composiciones lipídicas formadoras de *rafts* (Brown y London, 1998; Patra et al., 1998; Rinia et al., 2001; Giocondi et al., 2000). En este caso, no se produce una resistencia constante a la acción de los surfactantes, sino una lenta disminución de los valores de SLS, que, a las concentraciones estudiadas no llega a ser 0. La mezcla formada por POPE:POPG (3:1) es la que presenta una mayor resistencia frente a estos surfactantes no iónicos, debida probablemente a la presencia de dominios enriquecidos en POPE. Los derivados del PE que presentan insaturaciones en sus cadenas, son más difíciles de solubilizar mediante surfactantes no iónicos (Shaikh et al., 2003).

Los valores de Re , presentaron una variación diferente para el OG y el DDM en función del porcentaje de SLS. Conforme se produce el paso de vesículas a micelas mixtas, el OG presentó valores decrecientes de Re (figura 76b), mientras que el DDM los mostró crecientes (figura 80b). Este comportamiento diferente entre surfactantes podría ser explicado por su diferente hidrofobicidad. Aunque el balance hidrofilia/lipofilia de los surfactantes no se considera un parámetro relevante para medir su penetración en las bicapas, algunos autores relacionaron la hidrofobicidad de los surfactantes con una mayor tendencia de las moléculas a migrar del exterior al interior de la bicapa (“flip-flop”) (Kragh-Hansen et al., 1998). El mecanismo de “flip-

flip-flop” se refiere al movimiento de las moléculas de surfactante, desde la monocapa externa a la interna de la bicapa. Se trata de un proceso lento, ya que el surfactante debe atravesar regiones totalmente hidrófilas para acceder al segundo nivel laminar o a la segunda capa del liposoma. Este balance hidrofilia/lipofilia presenta un valor de 12,6 para el OG (López et al., 2001), mientras que es de 14,1 para el DDM (Cócera et al., 2002). La mayor hidrofobicidad del OG hace que este surfactante pueda atravesar la bicapa y llegar a saturar completamente el liposoma, mientras que el surfactante DDM, produciría un efecto disruptivo progresivo, atacando primero a la monocapa externa y solubilizando el liposoma capa a capa.

El mecanismo descrito, para la acción del DDM sobre liposomas unilaminares de POPC (de la Maza y Parra, 1997), concuerda con el observado en este trabajo, en liposomas multilaminares. El DDM presentó unos valores de K iniciales (SLS > 60 %) muy superiores a los de las otras composiciones lipídicas estudiadas y a los obtenidos con OG. Además, tras la saturación (SLS = 100 %), se observó un aumento del valor de K a valores de $\sim 111 \text{ mM}^{-1}$, seguido de un descenso brusco (figura 81). El aumento de K se debería a que las moléculas del surfactante sólo pueden interaccionar sobre la monocapa externa del liposoma. Conforme aumenta la concentración de surfactante, podría acceder a las monocapas más internas mediante el mecanismo de “flip-flop”, observándose el descenso de los valores de K .

El OG se mostró como un buen agente disruptor de todas las composiciones lipídicas estudiadas. En todos los casos se observó una elevada incorporación de moléculas de OG (valores de Re comprendidos entre 4 y 12, mol/mol) y una elevada capacidad de formación de micelas mixtas (valores de $K < 0,10 \text{ mM}^{-1}$) (López et al., 2002). Las composiciones lipídicas zwitteriónicas incorporaron un mayor número de moléculas de surfactante en su estructura, durante el proceso de micelización. En las composiciones lipídicas negativas se observó una cierta resistencia a la incorporación de OG en su estructura de bicapa (menores valores de Re), aunque presentaron una progresiva formación de micelas mixtas (menores valores de K).

El DDM mostró diferencias en su acción dependiendo de la composición lipídica. El POPE:POPG (3:1) presentó la mayor diferencia entre los valores de Re_{SAT} y

Re_{SOL} (tabla 22), lo que indica una cierta dificultad de incorporación del DDM en la estructura de esta composición lipídica. Esta composición negativa presentó un valor calculado de la región de coexistencia claramente superior al resto de composiciones estudiadas (tabla 21), lo que podría indicar una cierta resistencia a la solubilización por DDM. Un efecto similar, aunque menos importante, fue observado en el caso del extracto lipídico de *E. coli*, al presentar una región de coexistencia superior a la observada en las composiciones lipídicas zwitteriónicas.

Con el DDM se observó una clara dependencia frente a la concentración de surfactante entre las diferentes concentraciones de lípido ensayadas, mientras que el OG presentó un efecto de disrupción similar, en todos los casos, a una concentración de ~ 20 mM. Este factor es crítico, ya que, generalmente, es necesaria la completa solubilización de los lípidos previa a la incorporación de la proteína, para la realización de experimentos de reconstitución de proteínas de membrana. La presencia de vesículas no solubilizadas, puede dar lugar a una incorrecta reconstitución de la proteína o incluso llegar a impedirlo (Rigaud y Levy, 2003). Las concentraciones utilizadas de ambos surfactantes, producen una completa solubilización de las vesículas en todas las composiciones lipídicas empleadas, permitiendo la formación adecuada de proteoliposomas y en su caso, de cristales 2D.

El estudio de reconstitución con los liposomas, realizado mediante anisotropía de fluorescencia, permitió estudiar el proceso de solubilización de los liposomas, por ambos surfactantes y su posterior reconstitución mediante Bio-Beads[®] SM-2 (Rigaud et al., 1997; Vázquez-Ibar et al., 2002).

El proceso de reconstitución de los liposomas presenta etapas a dos temperaturas diferentes, 4 y 23 °C. El aumento de la temperatura conlleva a una disminución de la anisotropía. En las composiciones lipídicas estudiadas, la reconstitución de liposomas, mediante el uso de surfactantes, dio lugar a una cierta rigidificación de las bicapas; algo mayor en el caso de las composiciones zwitteriónicas que en el caso de las negativas. Si se realiza una comparación entre surfactantes, el OG presenta una mayor incorporación de moléculas en los liposomas reconstituidos, que da lugar a valores de anisotropía algo superiores a los obtenidos con el DDM. En los liposomas con carga neta negativa, el

tratamiento con OG produce una mayor rigidificación de la bicapa que con el DDM. Estas variaciones de anisotropía en los liposomas, están de acuerdo con las variaciones de SLS obtenidas tras la adición de surfactantes, en las que se apreciaban valores residuales de SLS superiores para el OG que para el DDM, en las composiciones cargadas negativamente, y especialmente para la mezcla POPE:POPG (3:1) (~ 50 %). A partir de estos datos, se puede afirmar que las composiciones lipídicas ricas en PE presentan una cierta resistencia frente a surfactantes no iónicos (especialmente DDM), que podría ser determinante para la incorporación de proteínas de membrana.

6.3. Incorporación de proteínas en matrices lipídicas

La incorporación de las proteínas de membrana en liposomas fue estudiada mediante técnicas de fluorescencia y AFM. Los métodos de fluorescencia empleados permitieron determinar las variaciones del potencial electrostático de superficie y las variaciones de la fluidez de la bicapa, causadas por la incorporación de las moléculas de proteína. A partir de los resultados obtenidos con ambos métodos fluorescentes, se aplicó la AFM para visualizar, en tiempo real, el comportamiento de las proteínas de membrana sobre una SPB, concretamente de extracto lipídico de *E. coli*.

Las proteínas incorporadas a los proteoliposomas producen variaciones significativas del potencial electrostático de superficie de las bicapas (figura 85). Las diferencias observadas en los valores de $\Delta\psi$, permiten establecer que existe una mayor afinidad de las proteínas de membrana por las bicapas cargadas negativamente que por las zwitteriónicas. El aumento del potencial electrostático de superficie puede ser debido a la diferente disposición de las proteínas en la membrana. En el caso de las bicapas formadas por lípidos cargados negativamente, las proteínas se ubicarían de manera que dejarían expuestas sus cargas, orientadas hacia la región hidrofílica. Por otra parte, en las composiciones lipídicas zwitteriónicas, las proteínas se dispondrían más internamente. Este comportamiento ha sido discutido por algunos autores (Bechinger, 2000; Dimitrova et al., 2002).

Considerando los resultados de potencial electrostático de superficie (apartado 5.3.1), se puede deducir que el Cyt c interacciona a dos niveles diferentes en la región

hidrofílica de la bicapa, según la carga neta de los fosfolípidos que la constituyen. En las composiciones zwitteriónicas ($\sim + 44$ mV), el Cyt c se incorpora entre las cabezas polares de la bicapa (Salamon y Tollin, 1997). Por otra parte, en lípidos con carga neta negativa, la unión principal del Cyt c es predominantemente electrostática (el 67 % de sus aminoácidos cargados son de tipo catiónico), quedando situada la proteína en la región más externa de la bicapa. La diferencia de $\Delta\psi$ observada entre las dos composiciones lipídicas negativas (+ 83 mV en POPE:POPG y + 110 mV en el extracto lipídico de *E. coli*) puede ser atribuida a la diferente composición lipídica de las mismas (de Jongh et al., 1995). Si bien es cierto que en ambos casos se encuentra PE y PG en su estructura, el extracto lipídico de *E. coli* presenta, entre otros fosfolípidos, cardiolipina (9,8 %). La cardiolipina se caracteriza por presentar dos cargas negativas en la cabeza polar, lo que podría favorecer la unión del Cyt c en las regiones ricas en este fosfolípido (Gorbenko y Domanov, 2003), provocando una gran alteración de las cargas superficiales de la vesícula lipídica y por tanto en el $\Delta\psi$.

Los valores de anisotropía de fluorescencia calculados, corroboran que el citocromo c se localizaría de forma diferente en la bicapa, según la composición lipídica de la misma (Salamon y Tollin, 1997). En las composiciones lipídicas zwitteriónicas la proteína alcanzaría niveles más internos, aumentando la rigidez de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. En composiciones lipídicas con carga neta negativa, el Cyt c interacciona de manera probablemente electrostática, sin llegar a penetrar en la membrana y provocando un efecto nulo (POPE:POPG, 3:1) o de ligera fluidificación (extracto lipídico de *E. coli*) de la bicapa.

La adsorción del Cyt c, la MLT y micelas mixtas proteína-surfactante, sobre bicapas planas, se visualizó mediante AFM (Mueller et al., 2000; Steinem et al., 2000). La observación de las imágenes obtenidas, sugiere la unión superficial del Cyt c en las bicapas negativas. Es conocido que el Cyt c se adsorbe sobre bicapas lipídicas negativas dando lugar a extensiones proteicas (Mueller et al., 2000), aunque en el caso de la SPB formada por extracto lipídico de *E. coli*, la adición de Cyt c dio lugar a pequeñas agrupaciones de proteína (figura 93). La formación de estas agregaciones podría ser debida a una unión preferente de la proteína por algún tipo de lípido cargado negativamente, como podría ser la cardiolipina o el PG. La distribución uniforme de

estos fosfolípidos en la SPB condicionaría la interacción de la proteína con la superficie de la bicapa, por lo que no se observan agrupaciones extensas de Cyt c.

El péptido MLT también presentó un comportamiento diferente frente a las bicapas neutras y las cargadas negativamente. En el caso de membranas con carga neta cero, la MLT es capaz de formar poros o canales de diferente diámetro en las bicapas lipídicas (Jung-Hsin y Baumgaertner, 2000). La diferencia de potencial observada entre la mezcla lipídica y el fosfolípido puro (+ 3 mV), podría ser atribuida a la diferente disposición del péptido en la bicapa. A pesar de ser ambas neutras, las bicapas formadas por DMPC:POPC (1:1) serían más susceptibles al efecto de la MLT que las de POPC. Esto podría ser debido a la presencia de moléculas de DMPC, las cuales ocupan una menor área por molécula (Gaboriaud et al., 2001) que el POPC (Domènech et al., 2005), de forma similar a lo que ocurre tras la incorporación de MLT en bicapas de DOPC y POPC (Rex, 1996).

En las membranas constituidas por lípidos con carga neta negativa la disposición de la MLT en la bicapa sería esencialmente superficial, debido a los aminoácidos catiónicos del péptido. La presencia de los aminoácidos serina y treonina en la MLT (ver figura 14 de *Introducción*) podría dar lugar, además, a la formación de enlaces de hidrógeno con lípidos tales como PE y sus derivados (Hincha y Crowe, 1996).

A partir de los resultados obtenidos de anisotropía de fluorescencia, se observa que la MLT provoca un aumento de la rigidez de todas las bicapas lipídicas, excepto la formada por POPC. La variación de la rigidez de la membrana es el resultado del proceso de formación de poros causados por el péptido (Rex, 1996; Jung-Hsin y Baumgaertner, 2000; Pramanik et al., 2000). Los resultados obtenidos de $\Delta\psi$ presentan valores similares entre composiciones neutras y negativas, lo que sugiere una diferente disposición de las moléculas de MLT en la vesícula lipídica. La incorporación de la MLT en las bicapas lipídicas dependería, tanto de la carga eléctrica de su superficie, como de las propiedades físicas de las mismas (hidrofobicidad, por ejemplo).

La MLT se depositó sobre una SPB de extracto lipídico de *E. coli*, donde se pudieron observar por AFM dos tipos de estructuras: unas pequeñas protuberancias con

forma de tetrámero y unas agrupaciones irregulares y de mayor tamaño, similares a las observadas sobre POPC (Steinem et al., 2000). La visualización sobre la bicapa de estos dos tipos de estructuras de MLT, sugirió que los tetrámeros podrían inducir la formación del llamado poro citolítico (Pramanik et al., 2000). Estos tetrámeros podrían ser los precursores de las protuberancias de mayor tamaño. Esta observación fue corroborada al realizar un cambio de zona de visualización y un acercamiento a estas áreas de mayor tamaño (figura 92b). En estas áreas pueden apreciarse agrupaciones irregulares de MLT que dieron lugar a alteraciones topográficas en la SPB. La acción lítica de la MLT, en las bicapas cargadas negativamente, pudo observarse tras la incorporación de un gran número de moléculas del péptido que dan lugar a la disrupción de la bicapa lipídica, de manera similar a la acción que presentan los surfactantes (Ladokhin y White, 2001).

Los valores del potencial electrostático de superficie en las bicapas fueron diferentes para las dos proteínas integrales estudiadas (Omp1 y LacY). Estas proteínas, por su estructura e incorporación en la membrana, dejan expuestas regiones hidrofílicas hacia el interior y el exterior del liposoma, causantes de las variaciones en $\Delta\psi$; aunque la manera en la que se incorporan, y por tanto, la perturbación superficial que producen, depende de sus propiedades fisicoquímicas. Los proteoliposomas de Omp1 presentaron valores idénticos de $\Delta\psi$ (+ 16 mV) en las composiciones lipídicas neutras, mientras que los valores de potencial electrostático difirieron en las dos composiciones lipídicas negativas. El mismo tipo de efecto fue observado en los proteoliposomas formados con Cyt c. En la composición POPE:POPG (3:1), la diferencia de potencial electrostático de superficie fue de + 61 mV, mientras que en el extracto lipídico de *E. coli* la diferencia fue de + 98 mV. A partir de la estructura primaria de la Omp1, con un 57 % de aminoácidos aniónicos, frente a un 43 % de catiónicos, podría parecer paradójico que los valores obtenidos de $\Delta\psi$ fueran positivos. Las porinas son proteínas hidrofílicas, debido a la función que desempeñan. Los aminoácidos cargados de Omp1 representan el 22 % de los aminoácidos totales (ver figura 16 en *Introducción*). La mayoría de estos aminoácidos se encuentran ubicados en la parte interna del canal que forma la porina, sin interactuar directamente con los fosfolípidos de la bicapa. La Omp1 es una proteína que presenta un canal con una cierta selectividad al paso de cationes (Ruiz, 2002). Esta selectividad estaría condicionada por la localización preferente de los

aminoácidos aniónicos de la proteína en el interior del canal. La Omp1 se integraría en la membrana lipídica adoptando su conformación mediante exposición de sus aminoácidos catiónicos hacia el exterior de la bicapa, mientras que los aminoácidos aniónicos formarían parte del canal hidrofílico (Ruiz et al, 2004a). La interacción de la porina con la bicapa lipídica dependería, tanto de las cargas de los fosfolípidos que la rodean, como de la composición y estructura que los fosfolípidos presenten.

La LacY, en las bicapas formadas por POPC, presentó importantes diferencias con respecto a la Omp1, en las superficies lipídicas. Esta proteína provocó un mayor efecto sobre las bicapas formadas por POPC, que en las formadas por la mezcla neutra DMPC:POPC (1:1), con un $\Delta\psi$ de + 62 y + 49 mV, respectivamente, valores superiores a los calculados con las otras proteínas. Este fenómeno podría deberse a que la proteína requiere de la presencia de un fosfolípido en estado fluido durante todo el proceso de reconstitución (Zhuang et al., 1999). La presencia de DMPC aportaría una cierta rigidez a la bicapa debido a que sus dos cadenas hidrocarbonadas están saturadas. Considerando que la primera etapa del proceso de reconstitución se realiza a 4 °C, el DMPC se encontraría en fase gel. La POPC se adaptaría mejor a los requisitos como fosfolípido anular de LacY, al estar en fase fluida, presentar una menor microviscosidad y tener una mayor compresibilidad lateral que la DMPC. Con esto se confirma que, en general, la LacY requiere de la presencia de POPC para su correcta reconstitución (Merino et al., 2005a). En ambas composiciones lipídicas negativas, la LacY presentó valores de $\Delta\psi$ similares ($\sim + 100$ mV), sin mostrar preferencia por ninguna de ellas. La LacY, de su total de aminoácidos, presenta un 11 % cargados, de los cuales un 62 % son de tipo catiónico (ver figura 18 en *Introducción*). Esta mayor proporción de aminoácidos catiónicos, sumado a que la mayoría de ellos se encuentran en las regiones hidrofílicas (periplásmica y citoplásmica) de la proteína (Wolin y Kaback, 1999), explicarían la mayor perturbación superficial producida por la LacY en los proteoliposomas formados por composiciones lipídicas con carga neta negativa.

Los resultados de potencial obtenidos sugieren que la proteína LacY se incorpora y produce un efecto sobre el potencial electrostático de superficie en todas las bicapas estudiadas, aunque presentó un comportamiento muy similar en las bicapas formadas por POPE:POPG (3:1) y extracto lipídico de *E. coli*. En ambas membranas se

encuentra el fosfolípido PE, relacionado con la actividad e inserción *in vivo* de la proteína (Bogdanov y Dowhan, 1995 y 1998) y uno de los principales condicionantes de la estructura y empaquetamiento adoptados por la LacY en la bicapa lipídica (Wang et al., 2002; Bogdanov et al., 2002; Merino et al., 2005b). Los efectos producidos en la superficie de la membrana, pueden ser atribuidos a una diferente incorporación de la LacY en función de la composición lipídica, estando ésta facilitada por la carga eléctrica de la bicapa. Se ha demostrado, en diferentes trabajos, que la proteína LacY es funcional en membranas naturales de *E. coli* (Viitanen et al., 1986; Jung et al., 1993, 1994) y en composiciones binarias de PE y PG (Le Coutre et al., 1997). En nuestro caso, y como indicación indirecta de su actividad, se realizó un estudio de la variación del potencial electrostático de superficie, añadiendo lactosa o TDG en la solución de proteoliposomas, observándose variaciones de + 132 mV en los proteoliposomas formados por POPE:POPG (3:1) y de + 116 mV en los formados por el extracto lipídico de *E. coli*. En presencia de sacarosa, no se observó ninguna variación significativa del potencial electrostático de superficie.

El estudio del proceso de incorporación de la LacY en diferentes matrices lipídicas, se realizó por anisotropía de fluorescencia, empleando dos sondas fluorescentes, TMA-DPH y DPH (ver apartado 4.15.2 de *Material y Métodos*). La incorporación de la proteína en la bicapa produjo diferentes variaciones según la composición lipídica. El aumento de anisotropía observado con las composiciones lipídicas neutras (POPC y DMPC:POPC), en ambas sondas fluorescentes, es indicativo de que la proteína se incorpora en la bicapa alterando la anisotropía, tanto de la región polar, como de la apolar. En las composiciones neutras, la LacY se dispondría dando lugar a agrupaciones o dominios proteicos quasi-cristalinos, repartidos por la totalidad de la bicapa lipídica, de la misma manera que lo demuestran las observaciones realizadas por AFM (Merino et al., 2005a). Estas agrupaciones de proteína provocarían una alteración de las propiedades fisicoquímicas de la membrana, traduciéndose en este caso como una rigidificación de la región polar y apolar de la bicapa. Cabe resaltar que las composiciones lipídicas neutras han sido las únicas empleadas con éxito para la reconstitución bidimensional de LacY (Zhuang et al., 1999; Merino et al., 2005a).

Las composiciones lipídicas con carga neta negativa presentaron valores de anisotropía de fluorescencia diferentes frente a la inserción de la LacY. POPE:POPG (3:1) presentó una rigidificación de la región polar que no mostró el extracto lipídico de *E. coli*; aunque en ambas composiciones lipídicas, se observó un efecto similar en la región hidrofóbica de la bicapa. Según los resultados obtenidos para el potencial electrostático de superficie, las variaciones del potencial producidas, fueron muy parecidas en ambas composiciones lipídicas, indicando un efecto similar de la proteína. Las diferencias observadas en la superficie de las bicapas, se deberían a una diferente localización o disposición de las moléculas de proteína. En el caso de la mezcla POPE:POPG (3:1), la LacY se dispondría en la bicapa formando pequeñas agrupaciones de proteína, que se ha demostrado que tienen que ver con la presencia de dominios lipídicos (Lehtonen y Kinnunen, 1997), como se vió por AFM (Merino et al., 2005b). En el caso del extracto lipídico de *E. coli* las proteínas podrían localizarse de manera más aislada produciendo una menor alteración de la movilidad de la sonda fluorescente.

Las micelas mixtas formadas por DDM y LacY fueron añadidas en tiempo real, en la superficie de una SPB de extracto lipídico de *E. coli*. Estas micelas presentaron una mayor preferencia para su adhesión a la superficie de la mica que a la superficie de la SPB. La LacY que presenta una región de 6 histidinas terminales se unió específicamente y de manera independiente al fosfolípido funcionalizado DOGS-NTA-Ni, el cual fue mezclado con el extracto lipídico de *E. coli*. La superficie de la micela mixta se adheriría primero a la mica para iniciar posteriormente la extensión y fusión con otras micelas. Las micelas mixtas de LacY-DDM, presentan el efecto de adhesión, pero son incapaces de extenderse o de fusionarse, debido a la presencia de la proteína que constituye su núcleo. Por esta razón, en el caso de proteínas politópicas, se debe realizar la disrupción previa de los liposomas con el surfactante adecuado, dando lugar a las micelas mixtas lípido-surfactante y posterior reconstitución de las mismas, en contacto con la proteína.

6.4. Cristalización 2D de proteínas de membrana

Con el fin de estudiar la cristalización 2D se realizó el seguimiento de las variaciones de la anisotropía de fluorescencia durante el proceso de incorporación de

una proteína integral de membrana en una bicapa lipídica. Se observó que el incremento de la anisotropía normalizada de las dos sondas fluorescentes, TMA-DPH y DPH, fue de $\sim 0,3$ unidades, en ambos casos. Respecto al proceso de formación de proteoliposomas, no se observaron diferencias significativas respecto a la sonda fluorescente TMA-DPH; pero en la sonda DPH, se produjo un aumento de $\sim 0,15$ unidades de anisotropía en los proteoliposomas y de $\sim 0,3$ unidades en el proceso de cristalización. Durante la cristalización, este mayor grado de rigidez en la región polar de la bicapa, hace pensar en una mayor agrupación de las moléculas de proteína que, eventualmente, podría dar lugar a la cristalización bidimensional de la misma. Las variaciones de r observadas durante el proceso de cristalización, pueden ser atribuidas a la incorporación de la proteína en la bicapa, ya que el fosfolípido POPC se mantiene en estado fluido durante todo el proceso ($T_m = -2$ °C).

La cristalización 2D de proteínas de membrana no consiste únicamente en la incorporación de las moléculas de proteína en la bicapa lipídica, sino que requiere de la ordenación de las mismas para dar lugar al cristal 2D (Kühlbrandt, 1992). Existen algunas proteínas de membrana que, *in vivo*, se encuentran en forma de cristales 2D, el ejemplo más conocido es la bacteriorodopsina de la “membrana púrpura” de *Halobacterium* (Grigorieff et al., 1996; Heymann et al., 2000). Los cristales 2D más habituales se obtienen, sin embargo, tras la reconstitución de la proteína en una matriz lipídica. En la mayoría de casos, la obtención de cristales 2D se presenta como una buena alternativa a la cristalización 3D. Éste es el caso de la LacY, cuya cristalización en 3D sólo se ha conseguido recientemente, tras años de investigación, y sólo en el caso de un mutante de la proteína (Kaback y Wu, 1999; Abramson et al., 2003). Las condiciones óptimas de cristalización y visualización, en el caso de la técnica de AFM, deben ser establecidas mediante la determinación de diferentes variables, entre las que se encuentran la matriz lipídica, el surfactante, la LPR, las diferentes soluciones reguladoras de pH a utilizar y la fuerza iónica del medio (Mosser, 2001).

La cristalización bidimensional es un proceso completamente empírico y diferente para cada proteína. En general, el surfactante empleado para la extracción y purificación de la proteína debería ser el de elección para cristalizar en 2D, ya que así se evitan manipulaciones innecesarias (Rigaud et al, 2000). En el caso de la LacY fue

utilizado el DDM para ambas acciones (purificación y cristalización). En el caso de la Omp1 no pudo ser así. La purificación de la porina Omp1 fue realizada con Genapol[®], un surfactante de tipo polietilenglicol, de cadena media, que presenta una CMC de 0,05 mM en agua (Quina y Hinze, 1999). Este surfactante fue ensayado en primera instancia para realizar la reconstitución y cristalización de la porina, aunque con mal resultado. El Genapol[®] resultó ser un surfactante de difícil eliminación tanto por diálisis como por adsorción con Bio-Beads[®] SM-2, por lo que el proceso de formación de proteolipasomas o de cristales 2D fue muy largo y poco reproducible. De los ensayos realizados, se seleccionó el OG como surfactante idóneo para la reconstitución de la Omp1, realizándose una sustitución del Genapol[®] por OG, mediante diálisis.

La porina Omp1 fue reconstituida en diferentes matrices lipídicas dando lugar a diversas estructuras, entre ellas, algunas formas tubulares (Rigaud et al., 1997; Lyon, 1998; Ruiz et al., 2004b). Las láminas lípido-proteicas de mayor calidad fueron observadas en POPC utilizando una LPR de 0,5. Fue característico de estas láminas la presencia de bicapas dobles que podrían ser interpretadas como posibles cristales multicapa, ya que su altura fue de ~ 10 nm. La visualización de la superficie de las capas más altas por AFM, en modo de contacto, mostró una cierta ordenación de la Omp1, en la que se pueden distinguir formas triméricas de la porina de 1,3 nm de diámetro de poro, de forma concordante con los datos obtenidos empleando la técnica *Black lipid bilayer* (Benz et al., 1978, 1985; Ruiz et al., 2004a). Se realizó una extensa búsqueda experimental de las condiciones de reconstitución y visualización de esta porina, sin llegar a obtenerse cristales 2D de suficiente calidad, aunque sí se observaron regiones parcialmente ordenadas (Ruiz et al., 2004b). Una de las principales causas limitantes para la cristalización de esta porina podría ser, precisamente, la sustitución de surfactante realizada, que no llegaría a ser total. La presencia de restos de Genapol[®] podría ser la causa de la incorrecta reconstitución de la Omp1.

La proteína LacY, a diferencia de Omp1, es una proteína situada en la membrana citoplasmática de la bacteria *E. coli* y presenta una estructura altamente flexible e hidrofóbica que dificulta en gran medida su cristalización (Engel, A., comunicación personal). Actualmente existe cristalizado en 2D un mutante de LacY, concretamente, la proteína de fusión *LacY/L6cytb₅₆₂/417H6* (Zhuang et al., 1999), y

recientemente se ha conseguido cristalizar en 3D un mutante de LacY, concretamente, *LacY/C154G* (Abramson et al., 2003). En ningún caso se había conseguido cristalizar, ni en 2D, ni en 3D, ni en fases cúbicas (Landau y Rosenbusch, 1996), hasta el momento, la proteína salvaje.

La reconstitución de LacY a bajas LPR dio lugar a la formación de diferentes estructuras, incluidas también las tubulares, de forma similar a la Omp1. La reconstitución de LacY en forma de láminas lípido-proteicas fue estudiada por AFM tanto en aire como en medio líquido, observándose estructuras similares en ambas formas de visualización, aunque el estudio detallado de la topografía de las láminas se realizó en medio líquido, debido a que es el modo de visualización que mejor reproduce el ambiente biomimético. En este medio, la POPC sobre mica es poco estable y fácilmente erosionable por la acción mecánica de la punta de AFM. Las SPB extendidas a partir de liposomas formados con DDM presentan una mayor resistencia frente a la acción de la punta de AFM, como ya se podía intuir a partir de los resultados obtenidos de anisotropía de fluorescencia, aunque todavía son erosionables en modo de contacto. Las láminas lípido-proteicas, tanto las formadas con Omp1, como las formadas con LacY, soportaron sin deformarse la acción de la punta de AFM en modo de contacto, en concordancia con los datos obtenidos de anisotropía de la fluorescencia.

En la imagen topográfica de las láminas lípido-proteicas formadas por POPC, la LacY mostró diferentes estructuras. En algunos casos se observaron formas circulares de ~ 25 nm. Habitualmente, la LacY se presentó en forma de agregados de proteína que dan lugar a protuberancias en la bicapa de 15 nm de diámetro y 0,55 nm de altura sobre la lámina. Estos agregados de proteína podrían ser interpretados como posibles puntos de nucleación para la formación de un cristal 2D, ya que la disminución de la LPR da lugar a la aparición de dominios proteicos sobre la bicapa (figuras 100 y 101). Esto pone de manifiesto que la relación entre lípido y proteína es crucial para el proceso de cristalización 2D. En la superficie de estos dominios se observaron estructuras circulares parcialmente ordenadas, de ~ 14 nm de diámetro. Las diferentes estructuras visualizadas en las láminas lípido-proteicas podrían ser indicativas de la elevada flexibilidad y tendencia a la agregación (Engel et al., 2002; Patzlaff et al., 1998) de

LacY, que da a esta proteína la capacidad de adoptar diferentes estructuras dependiendo de las condiciones experimentales empleadas para la reconstitución.

Se observaron láminas lípido-proteicas altamente ordenadas con dos composiciones lipídicas diferentes, POPC y POPE:POPG (3:1), aunque únicamente con POPC se obtuvieron cristales 2D. La composición lipídica neutra mostró ordenación en gran parte de su estructura, mientras que la mezcla negativa POPE:POPG (3:1) presentó ordenación proteica en sus dominios superiores, presumiblemente enriquecidos en POPE. La LacY requiere, para ser activa y realizar el transporte de lactosa, del fosfolípido PE (Bogdanov y Dowhan, 1995, 1998); pero, según los resultados obtenidos de potencial electrostático de superficie, parece que su incorporación se encuentra favorecida por los lípidos cargados negativamente. Teniendo en cuenta, que los dominios lipídicos de la mezcla POPE:POPG (3:1) podrían ser ricos en POPE, con presencia de moléculas de POPG, no sería casual la inserción de la LacY en estas regiones. Además, para realizar su actividad fisiológica, la LacY requiere de la presencia de un protón que podría ser proporcionado tanto por el POPE (Tocanne y Teissié, 1990), como por las moléculas circundantes de POPG (Boggs, 1987), debido a la capacidad de ambos fosfolípidos para formar enlaces de hidrógeno.

En ambas composiciones lipídicas se apreciaron estructuras de LacY circulares, aunque de tamaños diferentes. En POPC, los anillos de LacY presentaron un diámetro de $\sim 4,4$ nm, mientras que en POPE:POPG (3:1) su diámetro fue de $\sim 7,5$ nm. Esta diferencia de tamaño puede ser debida a la diferente incorporación de la proteína en la matriz lipídica, ya que la POPC presenta una menor microviscosidad y es más compresible lateralmente que la mezcla negativa. En esta última composición, la proteína se dispondría entre los fosfolípidos dependiendo de la presencia del POPG, mientras que en POPC, la proteína podría integrarse libremente en la bicapa dando lugar a un mayor empaquetamiento.

Las propiedades fisicoquímicas de la POPC, conocidas y ensayadas, podrían ser las responsables de la idoneidad de este fosfolípido para dar lugar a la formación de cristales 2D de LacY. La reproducibilidad de estos cristales presentó una gran dificultad

debido a factores experimentales relacionados con la extracción, purificación y reconstitución de la proteína.

La LacY presentó una celda unidad que correspondería a una simetría de tipo $p2$ ($a = 13,15$ nm, $b = 16,74$ nm y $\gamma = 116^\circ$) y un motivo dimérico, identificable a partir de la celda de Wigner-Seitz (figura 107c). Los parámetros de celda fueron obtenidos tras aplicar la transformada rápida de Fourier (FFT) a la imagen topográfica del cristal obtenido por AFM, en modo de contacto y en medio líquido, condiciones nunca antes utilizadas con éxito para esta proteína.

El motivo del cristal 2D de LacY puede interpretarse como un dímero de la proteína, dato que se encuentra en plena concordancia con los datos estructurales del mutante de LacY cristalizado en 3D (Abramson et al., 2003). La superficie calculada en algunas secciones transversales del motivo fue de 45 nm², valor que corresponde al área ocupada por un dímero de esta proteína, ya que el monómero de LacY se estima en 22 nm² (Abramson et al., 2003). La presencia de estos dímeros de la proteína ya en solución, como mostraron las SDS-PAGE realizadas, puede ser un factor condicionante de la obtención de este motivo.

Cada una de las moléculas de LacY que da lugar al cristal se traduce en la presencia de protrusiones en la superficie de la lámina con un diámetro de $\sim 6,2$ nm. En algunos casos, se observaron algunas protrusiones de menor tamaño ($\sim 5,4$ nm) que podrían ser interpretadas como moléculas de proteína que se habrían incorporado a la bicapa adoptando una orientación diferente. Para orientar y fijar las proteínas en una superficie se pueden utilizar monocapas funcionalizadas (Levy et al., 2001). Se realizaron algunos experimentos de reconstitución utilizando monocapas de DOGS-NTA-Ni para intentar cristalizar la LacY con una orientación definida, aunque los resultados obtenidos fueron negativos.

El hallazgo del cristal 2D de LacY representa un importante avance en el estudio de proteínas de membrana por AFM ya que permitirá la manipulación y estudio directo de moléculas simples. El estudio estructural de las proteínas de membrana es tan solo el primer paso hacia su conocimiento pleno, la nanotecnología permite el estudio directo

de sus propiedades fisicoquímicas en un ambiente biomimético. Algunos ejemplos de aplicación de la nanotecnología a proteínas de membrana podrían ser el estudio de cambios conformacionales de las proteínas o la realización de medidas de fuerza de diferentes procesos (Müller y Engel, 1999, 2001; Allison et al., 2002; Dufrêne, 2003).