



ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE DOMINIOS LIPÍDICOS EN BIOMEMBRANAS

PABLO MARCELO RODI
Autor

DRA. ANA MARÍA GENNARO
Directora

Trabajo de Tesis para acceder
al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Biológicas
de la Universidad Nacional del Litoral

2010



FBCB



UNL

Departamento de Física
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

There are more things in heaven and earth, Horatio,
than are dreamt of in your philosophy.

William Shakespeare (c. 1600) "The Tragedy of Hamlet, Prince of Denmark (scene V)".

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Ana María Gennaro, no sólo por la invaluable tarea realizada en mi formación profesional, sino también por su incondicional apoyo y confianza en mí. Pero sobre todo por ser buena gente.

Un especial agradecimiento:

A Virginia Gonzalez Polo por su colaboración en gran parte de este trabajo y en la redacción del manuscrito.

A Alcides Nicastro (Niki) por el fundamental aporte en mi trabajo y por las amenas discusiones.

A toda la gente del departamento de Física de la FBCB que me han acompañado en este tiempo.

A la gente macanuda del INIBIOLP (UNLP) (Tati, Sabina, Vanesa, Laura, Horacio) por su ayuda.

Agradezco al CONICET por haber financiado mi trabajo. También deseo agradecer a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL y al INTEC (CONICET) en donde he desarrollado este trabajo.

Quiero agradecer a toda mi familia y a mis amigos, que no han tenido nada que ver en este trabajo, pero tienen que ver en todo lo demás.

Y finalmente, un agradecimiento muy especial a Candela, la responsable de mantener mi ánimo en alto, mi pancita llena, y mi corazón contento. Y la responsable del diseño gráfico de este manuscrito. Por su paciencia, por su cariño, por su comprensión y por estar al lado de mí, siempre.

A mis viejos,
mis únicos héroes en este lío.

Resumen

Hace algunos años se propuso que en las biomembranas existen microdominios segregados lateralmente denominados rafts (balsas) con una composición lipídica y proteica diferente a la del resto de la membrana. Se cree que estos microdominios están enriquecidos en esfingolípidos y colesterol y que presentan un mayor ordenamiento lipídico que la membrana que los rodea. A pesar de los numerosos esfuerzos dirigidos a dilucidar la naturaleza y función de los rafts, aún existe un intenso debate acerca de sus propiedades y características, y todavía no resulta totalmente claro qué papel cumplen los lípidos de la bicapa y cuál las proteínas. En este trabajo nos planteamos dos estrategias diferentes para abordar el estudio de los rafts.

Por una parte utilizamos un sistema biológico sencillo (la membrana eritrocitaria) para investigar las propiedades de los rafts mediante la obtención de DRMs (Membranas Resistentes al Detergente) con detergentes no-iónicos en frío. Analizamos la influencia de la composición lipídica y del ordenamiento de la membrana en la capacidad del detergente de extraer material a partir de la membrana. Observamos una fuerte dependencia de la susceptibilidad a la solubilización con detergente tanto con la composición lipídica original de la membrana, principalmente los contenidos relativos de esfingomielina y colesterol, como con el ordenamiento lipídico de la misma. Encontramos que las DRMs están enriquecidas en esfingomielina y colesterol, y presentan un mayor ordenamiento lipídico que la membrana original. También detectamos fuertes vinculaciones entre el citoesqueleto y las vesículas de lípidos insolubles

Por otro lado llevamos a cabo un estudio de las interacciones de la proteína GAP-43 (reportada como perteneciente a rafts de neuronas e involucrada en el crecimiento neuronal) con sistemas modelo de membrana. Aquí estudiamos la relevancia de las interacciones proteína-lípido. Mediante ensayos de interacción de GAP-43 con sistemas modelo de membrana encontramos que la interacción de la proteína con la bicapa lipídica depende tanto de interacciones hidrofóbicas como electrostáticas y detectamos una mayor afinidad de GAP-43 por los sistemas lipídicos ordenados en comparación con los sistemas fluidos

Abstract

A few years ago it was suggested that laterally segregated microdomains, called rafts, exist at biomembranes, with a lipid and protein composition different from the rest of the membrane. It is believed that these microdomains are enriched in sphingolipids and cholesterol, and have a higher lipid order than the membrane surrounding them. Despite numerous efforts to elucidate the nature and function of rafts, there is still much debate about their properties and characteristics, and it is not yet entirely clear which is the role of the lipids and proteins. In this work we propose two different strategies to address the study of rafts.

On the one hand we use a simple biological system (the erythrocyte membrane) to investigate the properties of rafts by obtaining DRMs (Detergent Resistant Membranes) with cold non-ionic detergent. We analyze the influence of lipid composition and membrane ordering on the ability of detergent to extract material from the membrane. We observed a strong dependence of the susceptibility to detergent solubilization with both the lipid composition of the original membrane, mainly the relative contents of sphingomyelin and cholesterol, and with the membrane lipid ordering. We found that DRMs are enriched in sphingomyelin and cholesterol, and their lipid order is larger than that of the original membrane. Also we found strong linkages between the cytoskeleton and the insoluble lipid vesicles.

In addition we conducted a study of interactions of the protein GAP-43 (reported as belonging to neuron rafts and involved in neuronal growth) with model membrane systems. Here we studied the relevance of protein-lipid interactions. By testing the interaction of GAP-43 with model membrane systems we found that the protein interaction with the lipid bilayer depends on both hydrophobic and electrostatic interactions, and we detected a greater affinity of GAP-43 by ordered lipid systems compared to fluid ones.

Publicaciones

Parte de los contenidos de esta tesis han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

1. RODI, P.M., TRUCCO V.M., GENNARO, A.M. (2008) *Factors determining detergent resistance of erythrocyte membranes*. Biophys. Chem. 135(1-3):14-8
2. RODI, P.M., CABEZA, M.S., GENNARO, A.M. (2006) *Detergent solubilization of bovine erythrocytes. Comparison between the insoluble material and the intact membrane*. Biophys. Chem. 122(2):114-22

También han sido presentados en forma de posters en congresos nacionales e internacionales:

1. *Interaction between GAP-43 and model membranes through electrostatic and hydrophobic interactions*. RODI, P.M.; GONZALEZ-POLO, V.; PATTERSON, S.I.; GENNARO, A.M.. VII Iberoamerican Congress of Biophysics 2009. Buzios (Rio de Janeiro), Brasil. 30 de Septiembre al 3 de Octubre de 2009.
2. *Influence of Cytoskeleton and temperature on the interaction between detergents and the erythrocyte membrane*. TRUCCO, V.M.; RODI, P.M.; GENNARO, A.M.. VII Iberoamerican Congress of Biophysics 2009. Buzios (Rio de Janeiro), Brasil. 30 de Septiembre al 3 de Octubre de 2009.
3. *In vitro and insitu systems to evaluate the role of S-palmitoylation in neuronal signal transduction*. GONZALEZ POLO, V.; RODI, P.M.; GENNARO, A.M.; PATTERSON, S.I. WORKSHOP. Neuronal Signalling and Plasticity. Universidad de Chile. Santiago de Chile, Chile. 2008.
4. *Interacción de GAP-43 con sistemas modelo de membrana*. P.M. RODI, V. GONZALEZ POLO, A.M. GENNARO. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. La Plata, Buenos Aires, 6 al 8 de Diciembre de 2008.
5. *Sistemas in vitro e in situ para la evaluación del rol de la S-palmitoilación en la transducción de señales*. GONZALEZ Polo, V.; RODI, P.M.; GENNARO, A.M.; PATTERSON, S.I. Workshop: From Light Perception to Vision. Seeking for Retinal Function and Evolution. Sociedad Argentina de Neurociencias (SAN). Córdoba, Argentina, 2007.

6. *¿Qué propiedades de las membranas determinan su resistencia al detergente?* V.M. TRUCCO, P.M. RODI, A. M. GENNARO. Taller: “Biofísica de Macromoléculas: aspectos estructurales e implicancias biológicas y biotecnológicas”, organizado por la Sociedad Argentina de Biofísica, Quilmes, 14 al 16 de noviembre de 2007
7. *Efecto de la rigidez de las cadenas lipídicas en la resistencia al detergente de las membranas de glóbulos rojos.* V.M. TRUCCO, P.M. RODI, A. M. GENNARO. 92º Reunión Anual de la Asociación Física Argentina, Salta, Salta, 24 al 28 de Septiembre de 2007.
8. *Which membrane properties determine detergent resistance?* V.M. TRUCCO, P.M. RODI, A. M. GENNARO. 6th International Conference on Biological Physics, XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica and 5th Southern Cone Biophysics Congress”, Montevideo, Uruguay. 27 al 31 de agosto de 2007.
9. *Detergent solubilization as a tool to investigate coexistence of lipid domains in erythrocyte membranes.* P.M. RODI, V.M. TRUCCO, A.M. GENNARO. XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Rosario, Santa Fe, 8 al 10 de Noviembre de 2006.
10. *Detección de interacciones selectivas entre lípidos de membranas celulares.* P.M. RODI, A. M. GENNARO. 91ª. Reunión Anual de la Asociación Física Argentina, Merlo, San Luis, 25 al 29 de septiembre de 2006.
11. *Rol de la esfingomielina en el ordenamiento lipídico de membranas biológicas.* P.M. RODI y A.M. GENNARO. XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Villa Carlos Paz (Córdoba), 24 al 26 de Noviembre de 2005.
12. *Membranas celulares: papel de distintos componentes en la resistencia a la acción de detergentes.* P.M. RODI, M.S. CABEZA y A.M. GENNARO. 90º Reunión Anual de la Asociación Física Argentina. La Plata, 26 al 29 de Septiembre de 2005.
13. *Efecto ordenador de la esfingomielina en membranas plasmáticas y dominios resistentes a detergente. Comparación entre eritrocitos bovinos y humanos.* P.M. RODI, M. CABEZA, A. M. GENNARO. III Encuentro Bioquímico del Litoral y VI Jornadas de Comunicación Técnico Científicas, Santa Fe, 16 al 18 de Junio de 2005.

Índice

Capítulo 1: *Introducción General*

1.1 Membranas biológicas	14
1.1.1 La Bicapa Lipídica	15
1.1.2 Proteínas de membrana. Funciones básicas.	23
1.1.3 Glicocálix	26
1.1.4 Principales funciones de las membranas celulares.	27
1.2 Modelo de la estructura de las membranas biológicas.....	29
1.2.1 Antecedentes históricos de los modelos de la membrana	29
1.2.2 Organización de las biomembranas en dominios.....	31
1.2.3 Rafts lipídicos	34
1.3 Técnicas de estudio de dominios lipídicos.....	39
1.3.1 Insolubilidad frente a detergentes.....	39
1.3.2 Sistemas modelo de membrana	44
1.3.3 Métodos biofísicos	45

Capítulo 2: *Estudio de la interacción entre la membrana eritrocitaria y el detergente no-iónico Triton X-100*

2.1 Introducción.....	59
2.1.1 Biología Celular del Eritrocito	59
2.1.2 La membrana eritrocitaria.....	60
2.1.3 Dominios de membrana en el eritrocito.....	64
2.1.4 Objetivos	65
2.2 Materiales y Métodos.....	67
2.2.1 Materiales	67
2.2.2 Separación de los eritrocitos.....	67
2.2.3 Obtención de ghosts a partir de eritrocitos humanos.	67
2.2.4 Reducción del contenido de colesterol en membranas de eritrocitos con metilciclodextrina	68
2.2.5 Obtención de membranas resistentes a detergente de eritrocitos.	68
2.2.6 Cuantificación de lípidos	70
2.2.7 Determinación de la concentración de proteínas totales en DRM.....	71
2.2.8 Caracterización del patrón proteico por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	72
2.2.9 Experimentos de EPR y análisis de datos	72
2.3 Resultados	74

2.3.1 Tratamiento de eritrocitos humanos con Triton X-100	74
2.3.2 Efecto de la reducción del contenido de colesterol en la solubilización de eritrocitos humanos	79
2.3.3 Papel de la esfingomielina en la insolubilidad al detergente.....	82
2.3.4 Rol del colesterol en la solubilización de la membrana del eritrocito bovino.....	86
2.3.5 ¿Cuál es la relación entre la susceptibilidad al detergente de una membrana con su composición lipídica?.....	88
2.3.6 ¿Cuál es la relación entre el ordenamiento lipídico de la membrana y su composición lipídica?.....	91
2.3.7 ¿Están relacionados el ordenamiento de la bicapa lipídica y la resistencia al Triton?.....	93
2.3.8 ¿Cuál es la naturaleza de las DRMs?.....	94
2.4 Discusión.....	101
2.4.1 Composición y ordenamiento lipídico de las DRMs de eritrocitos humanos.....	101
2.4.2 Rol del Colesterol en la solubilidad de las membranas.....	102
2.4.3 Rol de la Esfingomielina en la solubilidad de las membranas	102
2.4.4 Cuantificación de los procesos de solubilización.....	103
2.4.5 ¿Cuál es la relación entre la susceptibilidad al detergente de una membrana con su composición lipídica?.....	103
2.4.6 ¿Cuál es la relación entre el ordenamiento lipídico de la membrana y su composición lipídica?.....	105
2.4.7 ¿Están relacionados el ordenamiento de la bicapa lipídica y la resistencia al Triton?...	106
2.4.8 ¿Cuál es la naturaleza de las DRMs?.....	107
2.4.9 Acerca de los protocolos de obtención de DRMs	108
2.4.10 DRMs y rafts lipídicos	112

Capítulo 3: Estudio de la interacción de GAP con sistemas modelo de membrana

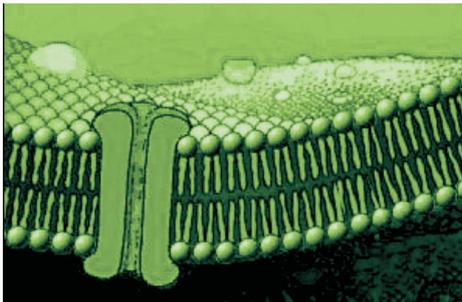
3.1 Introducción.....	115
3.1.1 Biosíntesis y asociación a membrana de GAP-43	115
3.1.2 GAP-43 y su vinculación con dominios de membrana.....	119
3.1.3 Mecanismo de acción y funciones de GAP-43.	120
3.1.4 Objetivos.....	121
3.2 Materiales y Métodos.....	122
3.2.1 Preparación de liposomas.....	122
3.2.2 Obtención de GAP-43.....	122
3.2.3 Obtención de GAP-43 palmitoilada.	122
3.2.4 Ensayo de asociación de GAP-43 a LUVs.	123
3.2.5 Marcación de GAP-43 con el marcador de espín Maleimido-Tempo.....	124

3.2.6 Ensayos de EPR (Resonancia Paramagnética electrónica).....	124
3.3 Resultados	126
3.3.1 Caracterización por EPR de los liposomas utilizados en los ensayos de asociación.....	126
3.3.2 Ensayo de asociación de GAP-43 a Liposomas. Cuantificación del porcentaje de asociación de la proteína.	128
3.3.3 Ensayos de detección de la unión de GAP-43 a liposomas por alteración en el ordenamiento lipídico.....	129
3.3.4 Estudio de la dinámica y la interacción específica del extremo N-terminal de GAP-43 con la bicapa lipídica de LUVs.....	131
3.3.5 Ensayo de asociación de GAP-43 palmitoilada a Liposomas. Cuantificación del porcentaje de asociación de la proteína.	137
3.3.6 Ensayos de detección de la unión de GAP-43 palmitoilada a liposomas por alteración en el ordenamiento lipídico.	138
3.4 Discusión.....	140
3.4.1 Unión de GAP sin palmitoilar.	140
3.4.2 Unión de GAP/Pal	142
3.4.3 Relevancia de cada una de las interacciones.....	143
3.4.4 Asociación de GAP a dominios ordenados.....	143
3.4.5 Observaciones acerca de los ensayos de asociación.....	144
Capítulo 4: Conclusiones generales y perspectivas	
4.1. Estudio de la interacción entre la membrana eritrocitaria y el detergente no-iónico Triton X-100.....	146
4.2 Estudio de la interacción de GAP con sistemas modelo de membrana	152
Bibliografía	155

Lista de abreviaturas

- a_0 : separación hiperfina isotrópica
- BSA: albúmina sérica bovina
- CDHE: eritrocitos humanos reducidos en colesterol
- CGN: red del *cis*-Golgi
- CLSM: microscopía de barrido láser confocal (*confocal laser scanning microscopy*)
- CMC: concentración micelar crítica
- Col: colesterol
- D: concentración de detergente
- D_0 : parámetro de resistencia a detergente
- DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina
- DOPE: dioleilfosfatidiletanolamina
- DPH: difenilhexatrieno
- DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina
- DPPS: dipalmitoilfosfatidilserina
- DRM: fracción insoluble al detergente o membrana resistente al detergente (*Detergent Resistant Membrane*)
- DTT: ditioneitol
- EPR: resonancia paramagnética electrónica (*Electron Paramagnetic Resonance*)
- ER: retículo endoplasmático
- ERGIC: compartimento intermedio de ER-Golgi
- FCS: espectroscopía de correlación de fluorescencia (*fluorescence correlation spectroscopy*)
- FRAP: recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (*fluorescence recovery after photobleaching*)
- FRET: transferencia resonante de energía de fluorescencia (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)
- FTIR: espectroscopía en el infrarrojo por transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*)
- GAP/Pal: GAP-43 palmitoilada
- GAP: GAP-43 sin palmitoilada
- GAP-MT: GAP-43 marcada con MT
- GlcCer: glucosilcerebrosido
- GPI: glicosilfosfatidilinositol
- GPL: glicerofosfolípidos
- GUVs: vesículas (liposomas) unilamelares gigantes
- HMW: marcadores proteicos de alto peso molecular

IBE: eritrocitos bovinos intactos
IHE: eritrocitos humanos intactos.
L_C: fase líquido desordenada o líquido cristalina
LMW: marcadores proteicos de bajo peso molecular
L_O: fase líquido ordenada
LUVs: vesículas (liposomas) unilamelares grandes
MAC: complejo de ataque a la membrana
MLVs: vesículas (liposomas) multilamelares
MT: marcador de espín maleimido Tempo (4-maleimido-1-oxyl-2,2,6,6-tetrametilpiperidina)
MβCD: metil-β-ciclodextrina
NMR: resonancia magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*)
n-SASL: n-doxil-ácido esteárico
PC: fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina
PI (4,5) P₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI: fosfatidilinositol
Pi: fósforo inorgánico
PKC: proteína kinasa C
PL: fosfolípidos
PM: peso molecular
POPC: palmitoiloleilfosfatidilcolina
PS: fosfatidilserina
PVM: membrana vacuolar parasitófora (*Parasitophorous Vacuolar Membrane*)
R: relación molar detergente/lípido
S_{APP}: parámetro de orden aparente
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SM: esfingomiélin
SPT: seguimiento de partícula única (*single-particle tracking*)
STD: seguimiento de marcador único (*single-dye tracing*)
TEM: Microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*)
TLC: cromatografía en capa fina
T_M: temperatura de transición
TX-100: Triton X-100
τ_C: tiempo de correlación rotacional



CAPÍTULO 1

**INTRODUCCIÓN
GENERAL**

1.1 Membranas biológicas [Cooper, 2000; Lodish y col., 2008]

La estructura y función de las células dependen fuertemente de las características de sus membranas, que no sólo separan el interior de las células de su entorno sino que también definen los compartimentos internos de las células eucariotas, incluyendo las organelas, el núcleo y el citoplasma. La formación de las membranas biológicas se basa en las propiedades fisicoquímicas de los lípidos, y todas las membranas celulares comparten una misma organización estructural: bicapas de fosfolípidos con proteínas asociadas. Estas proteínas de membrana son responsables de muchas funciones especializadas; algunas actúan como receptores que permiten a la célula responder a señales externas, algunas son responsables del transporte selectivo de moléculas a través de la membrana, y otras participan en el transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa. Además, las proteínas de membrana controlan las interacciones entre células de organismos pluricelulares. La organización estructural común de las membranas subyace de este modo a una gran variedad de procesos biológicos y funciones especializadas de las membranas.

Los procariotas, que representan las células más simples y pequeñas, de 1-2 μm de longitud, están rodeados por una membrana plasmática, pero no contienen subcompartimentos limitados por una membrana interna. Aunque el ADN se concentra en el centro de estos organismos unicelulares, se cree que la mayoría de las enzimas y metabolitos difunden libremente dentro de un único compartimento acuoso interno. Algunas reacciones metabólicas, incluyendo la síntesis de proteínas y la glucólisis anaeróbica, tienen lugar allí; otros, como la replicación del ADN y la producción de ATP, tienen lugar en la membrana plasmática.

En cambio, en las células eucariotas, de dimensiones mucho mayores, la velocidad de las reacciones químicas se vería limitada por la difusión de pequeñas moléculas, si la célula no estuviera dividida en subcompartimentos denominados organelas. Cada organela está rodeada por una o más biomembranas, y cada tipo de organela contiene un único conjunto de proteínas, algunas asociadas a su(s) membrana(s), y otras en su espacio interior acuoso, o lumen. Estas proteínas permiten a cada organela llevar a cabo sus funciones celulares características. El citoplasma es la parte de la célula que se encuentra por fuera de la mayor de las organelas, el núcleo. El citosol, la parte acuosa del citoplasma, también contiene su propio conjunto de proteínas características.

Todas las biomembranas forman estructuras cerradas, separando la luz en el interior del exterior, y todas comparten una estructura de bicapa similar. Controlan el movimiento de las moléculas entre el interior y el exterior de una célula, y dentro y fuera de las organelas de las células eucariotas.

Aunque la arquitectura básica de todas las células eucariotas se construye a partir de las membranas, las organelas y el citosol, cada tipo de célula presenta un diseño distintivo definido por la forma de la célula y la localización de sus organelas. La base estructural del diseño único de cada tipo de célula se encuentra en el citoesqueleto, una densa red de tres clases de filamentos de proteína que impregnan el citosol y soportan mecánicamente a las membranas celulares. Las proteínas del citoesqueleto se encuentran entre las proteínas más abundantes en una célula, y la extensa área superficial del citoesqueleto constituye una estructura a la cual se une un conjunto particular de proteínas y membranas.

Los componentes lipídicos de las membranas, de los que hablamos en la siguiente sección, no sólo afectan a su forma y función, sino que también juegan un papel importante en la estabilización de las proteínas en la membrana, modifican las actividades de las proteínas integrales, y participan en la transducción de señales hacia el citoplasma. A continuación, consideraremos la estructura general de las proteínas de membrana y las diferentes formas en que pueden relacionarse con ella. También comentaremos brevemente el papel del glicocálix en la superficie celular. Finalmente discutiremos las funciones principales de las membranas celulares

1.1.1 LA BICAPA LIPÍDICA

Todas las membranas biológicas comparten en su composición un agregado molecular de lípidos en forma de bicapa. Los fosfolípidos son los componentes básicos de todas las membranas biológicas, incluidas las membranas plasmáticas de las células, tanto procarionotas como eucariotas (*figura 1.1*). La característica fundamental de los fosfolípidos es que son moléculas anfipáticas, esto es, una porción de la molécula es soluble en agua y otra parte no lo es. Cuando se colocan en agua, los fosfolípidos espontáneamente se agrupan en una bicapa con sus grupos de cabeza que contienen fosfatos en el exterior, en contacto con el agua y sus colas hidrocarbonadas en el interior en contacto unas con otras. Esta doble capa de fosfolípidos forma una barrera estable entre dos compartimientos acuosos, por ejemplo, para separar el interior de la célula de su entorno.

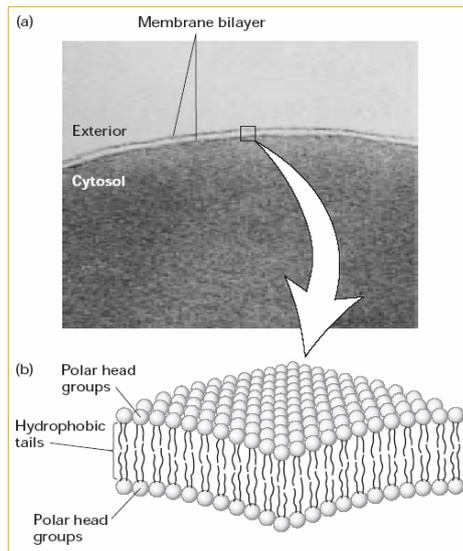


Figura 1.1. La estructura de bicapa de las biomembranas. **(a)** Micrografía electrónica de una delgada sección a través de una membrana de eritrocito teñido con tetróxido de osmio. La característica apariencia de "vía férrea" de la membrana indica la presencia de dos capas polares, en consonancia con la estructura de bicapa de fosfolípidos. **(b)** Interpretación esquemática de la bicapa de fosfolípidos en la que los grupos polares se orientan hacia afuera para proteger a las colas hidrofóbicas de ácidos grasos del agua. El efecto hidrofóbico y las interacciones de van der Waals entre las colas de ácidos grasos dirigen el autoensamblado de la bicapa. [Lodish y col., 2008]

La bicapa lipídica tiene dos propiedades importantes. En primer lugar, el núcleo hidrofóbico es una barrera impermeable que impide la difusión de los solutos hidrofílicos a través de la membrana. Es importante destacar que esta función de barrera simple es modulada por la presencia de proteínas de membrana que participan en el transporte de moléculas específicas a través de esta bicapa. La segunda propiedad de la bicapa es su estabilidad. La estructura de doble capa se mantiene mediante interacciones hidrofóbicas y de van der Waals entre las cadenas de lípidos. A pesar de que el medio acuoso exterior puede variar ampliamente en la fuerza iónica y pH, la bicapa tiene la fuerza para conservar su arquitectura característica.

Los constituyentes lipídicos mayoritarios de las biomembranas son los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y los esteroides. Las tres clases de lípidos son moléculas anfipáticas, con un grupo de cabeza polar (hidrofílico) y una cola hidrofóbica. El efecto hidrofóbico y las interacciones de van der Waals provocan que las colas hidrofóbicas se auto asocian en forma de bicapa con los grupos de cabeza polar orientados hacia el agua (*figura 1.1*). Aunque los lípidos de la membrana tienen este carácter anfipático en común, difieren en sus estructuras químicas, en su abundancia, y en las funciones en la membrana.

Los fosfoglicéridos, la clase más abundante de lípidos en la mayoría de las membranas, son derivados del glicerol 3-fosfato (*figura 1.2a*). Una molécula de fosfoglicérido típica consiste en una cola hidrofóbica compuesta por dos cadenas de ácidos grasos esterificados a los dos grupos hidroxilo en glicerol fosfato y un grupo de cabeza polar unido al grupo fosfato. Las dos cadenas de ácidos grasos pueden ser diferentes en el número de átomos de carbono que contienen (normalmente 16 o 18) y su grado de saturación (0, 1,

o 2 dobles enlaces). Los fosfoglicéridos se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su grupo de cabeza. En la fosfatidilcolina, el grupo de cabeza consiste en la colina, un alcohol de carga positiva, esterificado con el fosfato con carga negativa. En otros fosfoglicéridos, una molécula que contiene un grupo -OH se encuentra unido al grupo fosfato, como la etanolamina, la serina, o el inositol. El grupo fosfato con carga negativa y los grupos con carga positiva o los grupos hidroxilo en el grupo de cabeza interactúan fuertemente con el agua.

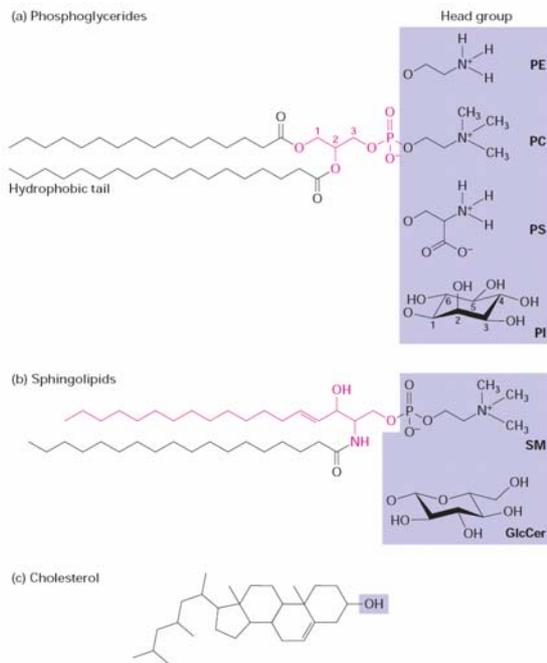


Figura 1.2. Las tres clases de lípidos de la membrana. **(a)** La mayoría de fosfoglicéridos son derivados del glicerol 3-fosfato (rojo), con dos cadenas de ácidos grasos esterificados en C1 y C2, que constituyen la "cola" hidrofóbica, y el "grupo de cabeza" polar esterificado con el fosfato. Los ácidos grasos pueden variar en longitud y estar saturados (ningún enlace doble) o insaturados (uno, dos o tres enlaces dobles). En la fosfatidilcolina (PC), el grupo de cabeza es la colina. También se muestran las moléculas unidas al grupo fosfato en otros tres fosfoglicéridos comunes: la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS), y el fosfatidilinositol (PI). **(b)** Los esfingolípidos son derivados del alcohol esfingosina (rojo), un amino-alcohol con una cadena hidrocarbonada larga. Distintas cadenas de ácidos grasos están conectados a la esfingosina por un enlace amida. Las esfingomielinas (SM), que contienen un grupo de cabeza fosfocolina, también son fosfolípidos. Otros esfingolípidos son glicolípidos que tienen un residuo de azúcar simple o de oligosacáridos ramificados unido a la columna vertebral de esfingosina. Por ejemplo, el glucolípidos simple glucosilcerebrosido (GlcCer) tiene una glucosa en el grupo de cabeza. **(c)** Al igual que los otros lípidos de la membrana, el colesterol (un esteroide) es anfipático. Su único grupo hidroxilo es equivalente al grupo de cabeza polar de otros lípidos; el conjunto de anillos condensados y la pequeña cadena hidrocarbonada forman la cola hidrofóbica. [Lodish y col., 2008]

Los plasmalógenos son un grupo de fosfoglicéridos que contienen una cadena de ácido graso, unida al glicerol por un enlace éster, y una larga cadena hidrocarbonada, unida al glicerol por un enlace éter. Estas moléculas constituyen alrededor del 20 por ciento del contenido total de fosfoglicéridos en seres humanos. Su abundancia varía entre los tejidos y especies, pero es especialmente elevada en el cerebro humano y el tejido del corazón. La estabilidad química adicional de la unión éter en los plasmalógenos o las sutiles diferencias en su estructura tridimensional en comparación con la de otros fosfoglicéridos pueden tener un significado fisiológico aún no establecido.

Una segunda clase de lípidos de membrana son los esfingolípidos (*figura 1.2b*). Todos estos compuestos son derivados de la esfingosina, un amino-alcohol con una larga cadena hidrocarbonada, y contienen un ácido graso unido al grupo amino de la esfingosina. En la esfingomielina, el esfingolípidos más abundante, la fosfocolina se une al grupo

hidroxilo terminal de la esfingosina. De esta manera, la esfingomielina es un fosfolípido, y su estructura general es bastante similar a la de la fosfatidilcolina. Otro tipo de esfingolípidos son los glicolípidos anfipáticos cuyos grupos de cabeza polares son azúcares. El glucosilcerebrosido, el glicoesfingolípidos más simple, contiene una unidad de glucosa adjunta a la esfingosina. En los glicoesfingolípidos complejos llamados gangliósidos, una o dos cadenas de azúcares ramificados que contienen grupos de ácido siálico se encuentran unidos a la esfingosina. Los glicolípidos constituyen del 2 al 10 por ciento del total de lípidos en las membranas plasmáticas, y son particularmente abundantes en el tejido nervioso.

El colesterol (Col) y sus derivados constituyen la tercera clase importante de lípidos de membrana, los esteroides (*figura 1.2c*). La estructura básica de los esteroides es un hidrocarburo cíclico de cuatro anillos. El colesterol, el componente de los esteroides más importante de los tejidos animales, tiene un sustituyente hidroxilo en uno de los anillos. Esta característica hace del colesterol una molécula anfipática y le permite insertarse en la bicapa lipídica. El colesterol es especialmente abundante en las membranas plasmáticas de las células de mamíferos, pero está ausente de la mayoría de las células procariotas. En otras especies (insectos, vegetales, etc) existen otros tipos de esteroides con estructuras muy similares al colesterol.

A pH neutro, algunos fosfoglicéridos (por ejemplo, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina) no poseen carga eléctrica neta, mientras que otros (por ejemplo, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol) poseen carga negativa neta. Sin embargo, los grupos de cabeza polar de todos los fosfolípidos pueden empaquetarse en la estructura de bicapa característica. Las esfingomielinas son similares en su forma a los fosfoglicéridos y pueden formar bicapas mixtas con ellos. El colesterol y otros esteroides son muy hidrofóbicos para formar una estructura de doble capa a menos que se mezclen con los fosfolípidos.

En el plano bidimensional de una bicapa, el movimiento térmico permite a las moléculas de lípidos rotar libremente alrededor de su eje longitudinal y difundir lateralmente dentro de cada hemicapa. Debido a que estos movimientos son laterales o de rotación, las cadenas de ácidos grasos permanecen en el interior hidrofóbico de la bicapa. Tanto en membranas naturales como artificiales, una molécula lipídica típica intercambia su lugar con sus vecinos en una hemicapa cerca de 10^7 veces por segundo y difunde varios micrómetros por segundo a 37°C . Estas tasas de difusión indican que la viscosidad de la bicapa es unas 100 veces mayor que la del agua (aproximadamente la misma viscosidad que la del aceite de oliva). A pesar de que los lípidos difunden más lentamente en la bicapa que en un solvente acuoso, un lípido de membrana puede difundir la longitud de una célula bacteriana típica ($1\ \mu\text{m}$) en tan sólo 1 segundo y la longitud de una célula animal en unos 20 segundos.

Estudios de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP, por *fluorescence recovery after photobleaching*) han demostrado que, en las membranas plasmáticas de los fibroblastos, los fosfolípidos se mueven libremente y recorren distancias de alrededor de 0,5 μm , pero la mayoría no puede difundir a través de distancias mucho mayores. Estos resultados sugieren que ciertas regiones de la membrana plasmática ricas en proteínas, de aproximadamente 1 μm de diámetro, separan regiones ricas en lípidos de las regiones adyacentes. Los fosfolípidos son libres de difundir dentro de dicha región, pero no de una región rica en lípidos a una adyacente. Además, la tasa de difusión lateral de los lípidos en la membrana plasmática es casi un orden de magnitud más lenta que en bicapas de fosfolípidos puros: las constantes de difusión características de la membrana plasmática y una bicapa lipídica son de $10^{-8} \text{ cm}^2 / \text{s}$ y $10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{s}$, respectivamente. Esta diferencia sugiere que los lípidos pueden estar estrechamente vinculados, pero no de manera irreversible, a ciertas proteínas integrales en algunas membranas.

Un dado tipo de célula contiene numerosos tipos de membranas, cada una con propiedades únicas, otorgadas por su particular mezcla de lípidos y proteínas. Los datos de la *Tabla 1.1* ilustran la variación en la composición de los lípidos entre biomembranas diferentes. Varios fenómenos contribuyen a estas diferencias. Por ejemplo, las diferencias entre las membranas del retículo endoplasmático (ER) y el aparato de Golgi se explican principalmente por el hecho de que los fosfolípidos son sintetizados en el RE, mientras que los esfingolípidos se sintetizan en el aparato de Golgi. Como resultado, la proporción de esfingomielina, como porcentaje del total de fósforo de los lípidos de la membrana, es mucho más alta en las membranas de Golgi que en las membranas de RE. En otros casos, la translocación de las membranas celulares de un compartimiento a otro puede enriquecer de forma selectiva a las membranas en ciertos lípidos.

Las diferencias en la composición lipídica también pueden estar relacionadas a la especialización de la membrana un cuanto a su función. Por ejemplo, la membrana plasmática de las células epiteliales que recubren el intestino presenta dos regiones distintas: la superficie apical se enfrenta a la luz del intestino y se expone a una amplia variedad de condiciones externas, mientras que la superficie basolateral interactúa con otras células epiteliales y con las estructuras extracelulares subyacentes. En estas células polarizadas, la proporción de esfingolípidos/fosfoglicéridos/colesterol en la membrana basolateral es 0.5:1.5:1, aproximadamente equivalente a la de la membrana plasmática de una célula no polarizada sometida a un estrés leve. En cambio, la membrana apical, que se somete a una tensión considerable, presenta una proporción 1:1:1 de estos lípidos. La concentración relativamente alta de esfingolípidos en esta membrana puede aumentar su estabilidad a causa de los enlaces de hidrógeno establecidos por el grupo hidroxilo libre de la esfingosina constituyente de la esfingomielina (ver *figura 1.2*).

Tabla 1.1 Major Lipid Components of Selected Biomembranes

Source/Location	Composition (mol %)			
	PC	PE + PS	SM	Cholesterol
Plasma membrane (human erythrocytes)	21	29	21	26
Myelin membrane (human neurons)	16	37	13	34
Plasma membrane (<i>E. coli</i>)	0	85	0	0
Endoplasmic reticulum membrane (rat)	54	26	5	7
Golgi membrane (rat)	45	20	13	13
Inner mitochondrial membrane (rat)	45	45	2	7
Outer mitochondrial membrane (rat)	34	46	2	11
Primary leaflet location	Exoplasmic	Cytosolic	Exoplasmic	Both

PC = phosphatidylcholine; PE = phosphatidylethanolamine; PS = phosphatidylserine; SM = sphingomyelin.
SOURCE: W. Dowhan and M. Bogdanov, 2002, in D. E. Vance and J. E. Vance, eds., *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, Elsevier.

La capacidad de los lípidos para difundir lateralmente en una bicapa indica que ésta se comporta como un fluido bidimensional. El grado de fluidez de la bicapa depende de la composición lipídica, de la estructura de las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos, y de la temperatura. Como ya se señaló, las interacciones de van der Waals y el efecto hidrofóbico causan que las colas no polares de los fosfolípidos se agreguen espontáneamente. Las cadenas acílicas saturadas tienen mayor tendencia a agregarse, empaquetándose muy apretadamente en un estado tipo gel. Los fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos cortas, que tienen menos superficie de interacción, forman bicapas más fluidas. Asimismo, los quiebres producidos por los enlaces dobles en las cadenas acílicas insaturadas establecen interacciones de van der Waals menos estables con otros lípidos, y por lo tanto, forman bicapas más fluidas. Cuando una bicapa muy ordenada en estado tipo gel se calienta, el aumento de movimientos moleculares de las colas de ácidos grasos provoca una transición a una fase más fluida y desordenada, denominada “*líquido desordenada*” o “*líquido cristalina*” (Lc) (figura 1.3). Cada clase de fosfolípido se caracteriza por una temperatura de transición (T_M) a la cual se produce esta transición de fase.

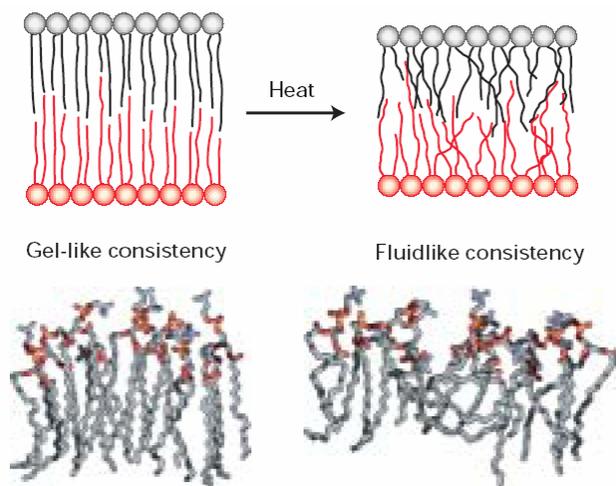


Figura 1.3. Estado Gel y fluido de la bicapa lipídica. (Arriba) Representación de la transición gel-fluido. Los fosfolípidos con largas cadenas de ácidos grasos saturados tienden a reunirse en una bicapa muy ordenada y gelatinosa en la que hay una escasa superposición de las colas no polares en las dos hemicapas. El calor desordena las colas no polares e induce una transición de gel a fluido dentro de un rango de temperatura de sólo unos pocos grados. Esta transición se produce a una temperatura característica (T_M) bien definida para bicapas de lípidos puros. A medida que las cadenas se desordenan, la bicapa también disminuye de espesor. (Abajo) Modelos moleculares de monocapas de fosfolípidos en los estados de gel y fluido, según lo determinado por los cálculos de la dinámica molecular. [Lodish y col., 2008]

A temperatura fisiológica, el interior hidrofóbico de las membranas naturales en general tiene una baja viscosidad y una consistencia de tipo fluido. El colesterol es importante para mantener la fluidez de las membranas naturales, lo que parece ser esencial para el crecimiento celular normal y la reproducción. Como se señaló anteriormente, el colesterol no puede formar una bicapa por su cuenta. En las concentraciones habituales en las que se encuentra en las membranas naturales, el colesterol se intercala entre los fosfolípidos. El colesterol restringe el movimiento aleatorio de los grupos de cabeza de los fosfolípidos en la superficie de la hemicapa exterior, pero su efecto sobre el movimiento de las largas colas hidrofóbicas de los fosfolípidos depende de su concentración. En las concentraciones habituales de colesterol, la interacción del anillo de esteroides con las largas colas hidrofóbicas de los fosfolípidos tiende a inmovilizar estos lípidos y así disminuir la fluidez de la biomembrana.

La composición lipídica de una bicapa también influye en su espesor, lo que a su vez puede jugar un papel importante en la localización de las proteínas en una membrana en particular. Los resultados de los estudios realizados sobre membranas artificiales demuestran que la esfingomielina tiende a asociarse en una bicapa más gelatinosa y más gruesa que los fosfolípidos (*figura 1.4a*). Del mismo modo, el colesterol y otras moléculas de la membrana que disminuyen la fluidez de la membrana aumentan su espesor. Debido a que las colas de esfingomielina ya están perfectamente estabilizadas, la adición de colesterol no tiene ningún efecto sobre el espesor de una bicapa de esfingomielina.

Otra de las propiedades que depende de la composición lipídica de una bicapa es su curvatura local, que depende del tamaño relativo de los grupos de cabeza polar y las colas no polares de los fosfolípidos que la constituyen. Los lípidos con largas colas y los grupos de cabeza grande tienen forma molecular cilíndrica, pero aquellos con grupos de cabeza pequeña tienen forma de cono (*figura 1.4b*). Como resultado de esto, las bicapas com-

puestas de lípidos cilíndricos son relativamente planas, mientras que las que contienen grandes cantidades de lípidos en forma de cono forman bicapas curvas (figura 1.4c). Este efecto de la composición de los lípidos en la curvatura de la bicapa puede desempeñar un papel en la formación de depresiones y protuberancias altamente curvas, vesículas de membrana interna y estructuras de membrana especializadas como las microvellosidades.

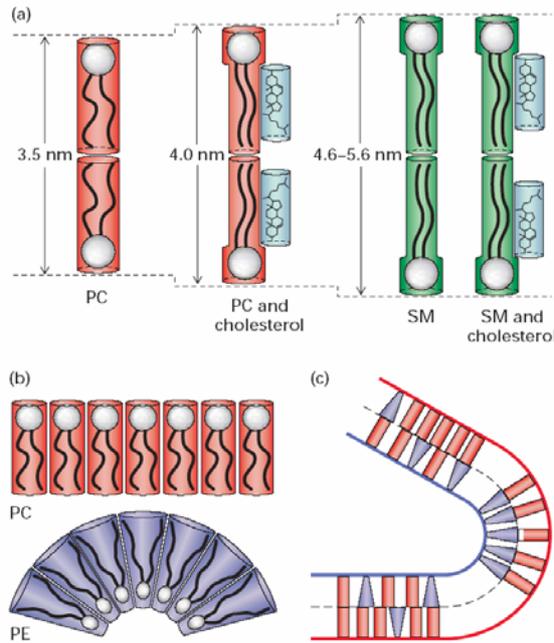


Figura 1.4. Efecto de la composición lipídica en el espesor de la bicapa y de su curvatura. (a) Una bicapa compuesta únicamente de esfingomielina (SM) es más gruesa que una formada por un fosfoglicérido como la fosfatidilcolina (PC). El colesterol tiene un efecto de ordenamiento lipídico en las bicapas de fosfoglicéridos que aumenta su espesor, pero no afecta el espesor de la bicapa más ordenada de SM. (b) Los fosfolípidos tales como PC tienen una forma cilíndrica y forman monocapas más o menos planas, mientras que aquellos lípidos con los grupos de cabeza más pequeños, como la fosfatidiletanolamina (PE) tienen una forma cónica. (c) una bicapa enriquecida con PC en la hemicapa exoplasmática y con PE en la cara citosólica, como en muchas de las membranas plasmáticas, tienen una curvatura natural. [Lodish y col., 2008]

Una característica común a todas las membranas es que presentan una asimetría en la composición de los lípidos en la bicapa. Aunque la mayoría de los fosfolípidos están presentes en las dos hemicapas de la membrana, suelen ser más abundantes en una u otra hemicapa. En particular, la fosfatidilcolina se localiza preferentemente en la hemicapa externa, mientras que la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol se localizan preferentemente en la hemicapa citosólica. Esta segregación “transversal” de los lípidos en la bicapa puede influir en la curvatura de la membrana. A diferencia de los fosfolípidos, el colesterol está distribuido de forma relativamente equitativa en ambas hemicapas de las membranas celulares.

Es aún poco claro cómo se establece y mantiene la distribución asimétrica de los fosfolípidos en las dos hemicapas. En bicapas puras, los fosfolípidos no migran espontáneamente de una hemicapa a la otra (proceso denominado flip-flop). Energéticamente, el movimiento de flip-flop es muy desfavorable, ya que implica el movimiento del grupo de cabeza polar por el interior hidrofóbico de la membrana. Este movimiento en algunas membranas naturales está catalizado por una serie de proteínas de transporte dependientes de ATP denominadas flipasas.

La ubicación preferente de los lípidos en una cara de la bicapa es necesaria para una variedad de funciones relacionadas a la membrana. Por ejemplo, los grupos de cabeza de todas las formas fosforiladas del fosfatidilinositol se ubican de cara al citosol. Algunos de ellos son hidrolizados por la fosfolipasa C situada en el citosol, y esta enzima, a su vez, se activa como consecuencia de la estimulación de las células por muchas hormonas. Estas reacciones de hidrólisis generan fosfoinositol, soluble en el citosol, y diacilglicerol, soluble en la membrana. Estas moléculas participan en las vías de señalización intracelular que afectan en muchos aspectos al metabolismo celular. La fosfatidilserina también suele ser más abundante en la hemicapa citosólica de la membrana plasmática. En las etapas iniciales de la estimulación de plaquetas, la fosfatidilserina es brevemente trasladada a la cara exoplasmática, presumiblemente por una enzima flipasa, donde activa las enzimas que participan en la coagulación sanguínea.

1.1.2 PROTEÍNAS DE MEMBRANA. FUNCIONES BÁSICAS.

Las proteínas de membrana se definen por su ubicación dentro o en la superficie de la bicapa lipídica. Aunque cada membrana biológica tiene la misma estructura básica de bicapa, las proteínas asociadas con una membrana especial son responsables de sus actividades distintivas. La densidad y el conjunto de las proteínas asociadas con las biomembranas varían, dependiendo del tipo celular y la localización subcelular. Por ejemplo, la membrana mitocondrial interna contiene un 76 por ciento de proteínas y la membrana de mielina, sólo el 18 por ciento.

La bicapa lipídica presenta un ambiente bidimensional único para las proteínas hidrofóbicas de la membrana. Algunas proteínas se encuentran inmersas dentro de la bicapa lipídica; otras proteínas están asociadas con la hemicapa externa o con la citosólica. Los dominios de las proteínas en la superficie extracelular de la membrana plasmática generalmente se unen a otras moléculas, incluyendo proteínas de señalización externa, iones y metabolitos pequeños (por ejemplo, la glucosa, ácidos grasos), y moléculas de adhesión en otras células o del entorno. Ciertos dominios proteicos dentro de la membrana plasmática, en particular los que forman los canales y poros, mueven moléculas hacia dentro y fuera de las células. Muchos dominios extendidos a lo largo de la cara citosólica de la membrana plasmática tienen una amplia gama de funciones, desde proteínas de anclaje del citoesqueleto a la membrana hasta activadores de las vías de señalización intracelular. En esta sección, se examinan las características estructurales de las proteínas de membrana y algunas de sus funciones básicas.

Las proteínas de membrana se pueden clasificar en tres categorías: integrales, ancladas a lípidos y periféricas, sobre la base de la naturaleza de las interacciones de las proteínas con la membrana (figura 1.5).

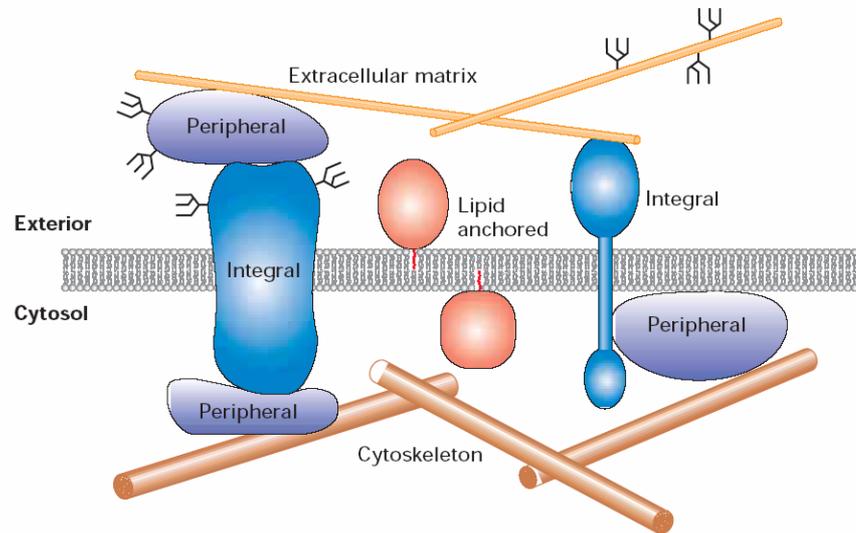


Figura 1.5. Diagrama de las diferentes maneras en las que las proteínas se asocian a la bicapa lipídica. Las proteínas integrales (transmembrana) atraviesan la bicapa. Las proteínas ancladas a lípidos se encuentran ligadas a una hemicapa por una larga cadena hidrocarbonada unida covalentemente. Las proteínas periféricas se asocian con la membrana principalmente a través de interacciones no covalentes específicas con proteínas integrales o con lípidos de la membrana. Más allá de la membrana existen proteínas asociadas a ésta, que incluyen al citoesqueleto, la matriz extracelular en las células animales, y la pared celular en células de plantas y bacterias (no representado). Las cadenas de carbohidratos están unidas a muchas proteínas extracelulares y a los dominios exoplasmáticos de muchas proteínas transmembrana. [Lodish y col., 2008]

Las proteínas integrales, también llamadas proteínas transmembrana, atraviesan la doble capa de fosfolípidos y están construidas por tres segmentos. Los segmentos citosólico y exoplasmático tienen superficies hidrofílicas exteriores que interactúan con las soluciones acuosas en las caras interna y externa de la membrana. Estos segmentos se parecen a otras proteínas solubles en agua en cuanto a su composición de aminoácidos y estructura. En cambio, el segmento transmembrana contiene muchos aminoácidos hidrofóbicos cuyas cadenas laterales sobresalen hacia el exterior e interactúan con el núcleo apolar de la bicapa lipídica.

Las proteínas ancladas a lípidos están unidas covalentemente a una o más moléculas de lípidos. La cadena de carbono hidrofóbica de estos lípidos está sumergida en una de las hemicapas de la membrana y vincula la proteína a la membrana.

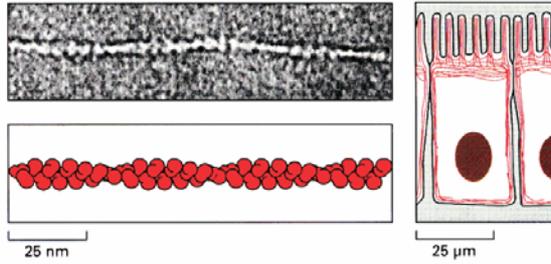
Las proteínas periféricas de membrana no interactúan con el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica, sino que se unen a la membrana indirectamente a través de interacciones con las proteínas integrales de membrana, o directamente por interacciones con los grupos de cabeza de los lípidos. Las proteínas periféricas se localizan en el citosol o bien la cara exoplasmática de la membrana.

Además de estas proteínas, que están estrechamente relacionadas con la bicapa lipídica, las proteínas del citoesqueleto están más indirectamente asociadas con la cara citosólica, generalmente a través de una o más proteínas periféricas. Estas asociaciones con el citoesqueleto prestan apoyo a diversas membranas celulares, y también desempeñan un papel en la comunicación entre el interior y el exterior de la célula. Por último, las proteínas periféricas de la superficie exterior de la membrana plasmática y los dominios extraplasmáticos de las proteínas integrales de membrana se encuentran a menudo unidos a los componentes de la matriz extracelular o a la pared que rodea la célula bacteriana y a las células vegetales.

El citoesqueleto de una célula eucariota contiene tres tipos de filamentos que se pueden distinguir sobre la base de su diámetro, el tipo de subunidad, y la disposición de las subunidades (*figura 1.6*). Los filamentos de actina, también llamados microfilamentos, tienen entre 8 y 9 nm de diámetro y presentan una estructura de dos cadenas trenzadas. Los microtúbulos son estructuras en forma de tubo hueco de unos 24 nm de diámetro, cuyas paredes están formadas por protofilamentos adyacentes. Y los filamentos intermedios tienen la estructura de una cuerda de aproximadamente 10 nm de diámetro. También existe un numeroso conjunto de proteínas asociadas a actina que desempeñan funciones importantes en la célula, principalmente en el cortex celular. Los tres tipos de filamentos, y en particular los filamentos de actina, presentan cierta interacción con la membrana plasmática y con la membrana de las diversas organelas. [Alberts y col., 2006].

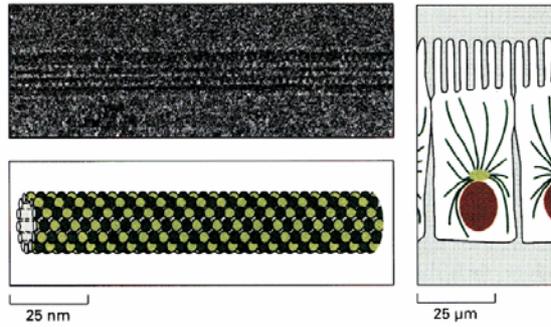
Tanto el cortex celular de espectrina-actina como la membrana plasmática del eritrocito serán tratados con mayor detalle en la segunda parte de este trabajo.

FILAMENTOS DE ACTINA



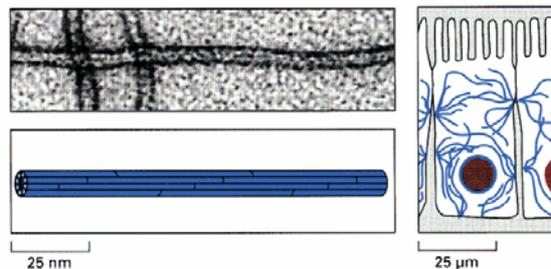
Los filamentos de actina (también conocidos como *microfilamentos*) son polímeros helicoidales, enroscados de dos en dos, de la proteína actina. Aparecen como estructuras flexibles, con un diámetro de 5 a 9 nm, que están organizadas en una gran variedad de haces, de redes bidimensionales y de geles tridimensionales. Aunque los filamentos de actina están dispersos por el citoplasma de la célula, están altamente concentrados en el *córtex*, justo por debajo de la membrana plasmática.

MICROTÚBULOS



Los microtúbulos son cilindros largos y huecos formados por una proteína tubulina. Su diámetro externo es de 25 nm y son mucho más rígidos que los filamentos de actina. Los microtúbulos son largos y rectos y típicamente disponen de un extremo unido a un centro organizador de microtúbulos (MTOC, de microtubule organizing center) llamado *centrosoma* tal como puede observarse en la imagen.

FILAMENTOS INTERMEDIOS



Los filamentos intermedios son estructuras parecidas a cuerdas, de un diámetro de aproximadamente 10 nm; están formados por las proteínas de los filamentos intermedios, que constituyen una gran familia heterogénea de proteínas. Uno de los tipos de filamentos intermedios forma una red llamada lámina nuclear que se localiza debajo de la membrana nuclear interna. Otros filamentos intermedios se extienden a lo largo del citoplasma proporcionando a las células resistencia mecánica y sosteniendo la tensión mecánica de los tejidos epiteliales mediante la unión de los citoplasmas de las células vecinas a través de las uniones celulares.

Figura 1.6 Los tres tipos de filamentos proteicos que constituyen el citoesqueleto. Se muestra una micrografía de cada tipo de filamento y un diagrama esquemático de cómo están formados a partir de sus subunidades. También puede observarse esquemáticamente la distribución en un tipo de célula epitelial. [Alberts y col., 2007]

1.1.3 GLICOCÁLIX [Cooper, 2000]

Las porciones extracelulares de las proteínas de la membrana plasmática generalmente se encuentran glicosiladas. Del mismo modo, las fracciones hidrocarbonadas de los glicolípidos se exponen en la cara externa de la membrana plasmática. Como consecuencia, la superficie de la célula está cubierta de un manto de carbohidratos, conocido como glicocáliz, constituido por los oligosacáridos de los glicolípidos y de las glicoproteínas transmembrana.

Una de las funciones del glicocáliz es proteger la superficie celular. Además, los oligosacáridos del glicocáliz sirven como marcadores de varios tipos de interacciones célula-célula. Un ejemplo bien estudiado de estas interacciones es la adhesión de los glóbulos blancos sanguíneos a las células endoteliales que limitan los vasos sanguíneos (proceso que permite a los leucocitos abandonar el sistema circulatorio e intervenir en la respuesta

inflamatoria en los tejidos dañados). El primer paso en la adhesión de entre los leucocitos y las células endoteliales está mediado por una familia de proteínas transmembrana denominadas selectinas, que reconocen carbohidratos específicos de la superficie celular. Dos miembros de la familia de las selectinas (E-selectina y P-selectina), que se expresan en las células endoteliales y en las plaquetas, se unen a oligosacáridos específicos expresados en la superficie de los leucocitos. Una selectina diferente (L-selectina) se expresa en los leucocitos y reconoce un oligosacárido en la superficie de las células endoteliales. Por lo tanto, los oligosacáridos expuestos en la superficie celular proporcionan un conjunto de marcadores que ayudan a identificar los distintos tipos de células de los organismos pluricelulares.

1.1.4 PRINCIPALES FUNCIONES DE LAS MEMBRANAS CELULARES.

Aunque la composición lipídica de la membrana determina en gran medida sus características físicas, el conjunto de proteínas que posee es el principal responsable de las propiedades funcionales de una membrana. Consideraremos brevemente aquí sus principales funciones.

En todas las células, la membrana plasmática actúa como una barrera de permeabilidad que impide la entrada de los materiales no deseados del medio extracelular y la salida de los metabolitos necesarios. Existen proteínas de transporte específicas en la membrana plasmática que permiten el paso de nutrientes hacia el interior de las células y la salida de los desechos metabólicos de ella, mientras que otras mantienen la composición iónica y el pH adecuado ($\approx 7,2$) del citosol.

La membrana plasmática es muy permeable al agua pero poco permeable a las sales y a las pequeñas moléculas como azúcares y aminoácidos. Debido a la presión osmótica, el agua se mueve a través de la membrana semipermeable desde una solución de baja concentración de solutos (alta concentración de agua) a una de alta concentración de solutos (baja concentración de agua) hasta que las concentraciones totales de solutos y por lo tanto las concentraciones de agua en ambos lados sean iguales. Cuando la mayoría de las células animales son colocadas en una solución isotónica (es decir, de concentración total de solutos igual a la del interior de la célula), no hay movimiento neto de agua dentro o fuera de las células. Sin embargo, cuando las células se colocan en una solución hipotónica (es decir, una con menor concentración de soluto que el del interior de la célula), el flujo de agua hacia el interior la célula hace que se hinche. Por el contrario, en una solución hipertónica (es decir, una con mayor concentración de soluto que el del interior de la célula), el agua fluye fuera de las células, causando que se encojan. En condiciones normales (in vivo), los canales iónicos en la membrana plasmática controlan el

movimiento de iones dentro y fuera de las células de modo que no hay flujo neto de agua y el volumen normal de la célula se mantiene.

A diferencia de las células animales, las bacterias, y las células de hongos y plantas están rodeadas por una pared celular rígida y carecen de la matriz extracelular que poseen los tejidos animales. La membrana plasmática está íntimamente comprometida en el montaje de las paredes celulares, que en las plantas se construyen principalmente de celulosa. La pared celular impide la expansión o contracción de una célula que se produciría si se colocase en un medio hipotónico o hipertónico, respectivamente. Por esta razón, las células rodeadas por una pared pueden crecer en medios con una fuerza osmótica mucho menor que la del citosol.

Además de estas funciones universales, la membrana plasmática tiene otras funciones cruciales en los organismos multicelulares. Pocas de las células de los organismos vegetales y animales multicelulares existen como entidades aisladas, sino como grupos de células con especializaciones relacionadas que se combinan para formar los tejidos. En las células animales, las áreas especializadas de la membrana plasmática contienen proteínas y glicolípidos que forman uniones específicas entre las células para fortalecer los tejidos y permitir el intercambio de metabolitos entre las células. Ciertas proteínas de la membrana sirven como anclaje de las células a los componentes de la matriz extracelular, que es la mezcla de proteínas fibrosas y polisacáridos que proporciona un lecho sobre el cual yacen la mayoría de las capas de células epiteliales o las pequeñas glándulas. Otras proteínas de la membrana plasmática actúan como puntos de anclaje para muchas de las fibras del citoesqueleto que impregnan el citosol, dando forma y fuerza a las células.

Las membranas plasmáticas de muchos tipos de células eucariotas también contienen proteínas que se unen a receptores específicos de moléculas de señalización (por ejemplo, hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores), dando lugar a diversas respuestas celulares. Estas proteínas son fundamentales para el desarrollo de la célula y su funcionamiento. Por último, ciertas proteínas citosólicas periféricas que son reclutadas a la superficie de la membrana funcionan como enzimas, transductores de señales intracelulares, y proteínas estructurales para la estabilización de la membrana.

Al igual que la membrana plasmática, la membrana que rodea cada organela de las células eucariotas, contiene un conjunto único de proteínas esenciales para su buen funcionamiento.

1.2 Modelo de la estructura de las membranas biológicas

En esta sección pretendemos realizar una pequeña reseña histórica de los modelos racionales utilizados para explicar la estructura y funcionamiento de las membranas biológicas y al mismo tiempo exponer los detalles del modelo actual. Con el paso del tiempo, a la luz de nuevos experimentos y del surgimiento de nuevas tecnologías, este modelo se ha vuelto cada vez más complejo. El descubrimiento de estructuras en las membranas biológicas con funciones específicas dio lugar a un refinamiento del modelo hasta llegar a la hipótesis de los rafts lipídicos, la cual se tratará en detalle al final de esta sección.

1.2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS MODELOS DE LA MEMBRANA.

Históricamente, el primer modelo de membrana fue propuesto por Gorter y Grendel (1925) [Gorter y Grendel, 1925], y estaba basado en la evidencia experimental de que el área superficial de una monocapa de los lípidos de membrana extraídos de fantasmas de eritrocitos era dos veces más grande que la de los eritrocitos intactos. Gorter y Grendel concluyeron acertadamente que la membrana de la célula no tenía una molécula de espesor, en la forma propuesta por Irving Langmuir en 1917 [Langmuir, 1917], sino por dos moléculas. Es decir, las moléculas de fosfolípidos que forman la membrana de la célula se encuentran dispuestas en dos capas de lípidos para formar un "bicapa". En este mismo trabajo, Gorter y Grendel (1925) [Gorter y Grendel, 1925] también predijeron correctamente la orientación de las moléculas de fosfolípidos en la bicapa basando su predicción en la comprensión de las interacciones moleculares. Esta hipótesis se convirtió en uno de los modelos básicos de la estructura de las membranas.

Las primeras observaciones de la membrana plasmática (de muchos tipos de células) fueron hechas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes mostraban una estructura característica de tres capas. La micrografía electrónica mostraba que el grosor, de borde a borde, era de 7,0-7,5 nm con una amplia zona central clara de alrededor de 3,5 nm, intercalada entre dos líneas electrodensas, cada una de alrededor de 2 nm de ancho. Robertson (1959) [Robertson, 1959] llamó a esta estructura como la "unidad de membrana", en la cual las tres capas de la estructura de 7,0-7,5 nm son componentes de una membrana. En su hipótesis, propuso que la zona central más transparente a los electrones corresponde a una bicapa lipídica continua, y que las dos zonas electrodensas representan capas de componentes no lipídicos, presumiblemente proteínas y carbohidratos. Para este modelo, se utilizó la teoría paucimolecular, que había sido propuesta por Davson y Danielli (1935) (*figura 1.7*) [Danielli y Davson, 1935].

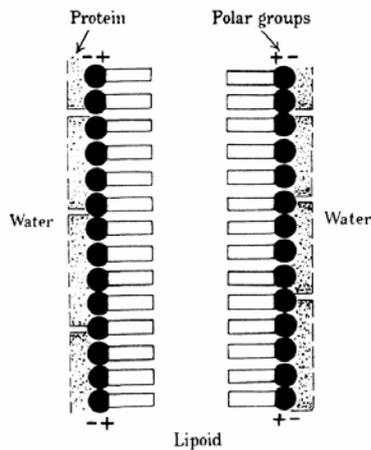


Figura 1.7 Diagrama esquemático de Davson-Danielli de la membrana plasmática.

Sin embargo, se hizo evidente a partir de membranas lipídicas sintéticas, membranas biológicas compuestas por una combinación de lípidos y proteínas, y, también de membranas de-lipidizadas, que todas poseían una apariencia similar de tres capas cuando se las observaba por TEM. Así, esta línea de investigación, por sí sola, no pudo aportar pruebas sólidas a favor o en contra de la existencia de una bicapa lipídica en la membrana. Sin embargo, el concepto de bicapa recibió un fuerte apoyo de otras pruebas físicas, tales como la difracción de rayos X [Engelman, 1970] y la calorimetría diferencial [Steim y col., 1969].

En 1972, Singer y Nicolson propusieron su nuevo concepto de "modelo de mosaico fluido" [Singer y Nicolson, 1972] sobre la base de los modelos de Danielli, Davson y Robertson, el cual tenía también en cuenta consideraciones termodinámicas acerca de la estabilidad de las membranas (*figura 1.8*) [Singer, 1975]. Estos autores presentaron dos términos para describir las proteínas asociadas a la bicapa lipídica de la membrana: las proteínas integrales y proteínas periféricas. Las proteínas pueden existir de forma individual o como agregados de subunidades. Este modelo de estructura de la membrana fue probado a través del aislamiento de proteínas periféricas e integrales (*figura 1.9*). Las proteínas integrales pudieron ser visualizadas como las partículas intramembrana (PIM) de las imágenes de microscopía electrónica con el método de congelación y fractura. Métodos biofísicos, como la recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP) [Tsuiji y Ohnishi, 1986], han permitido el estudio directo de las propiedades biofísicas de las proteínas integrales.

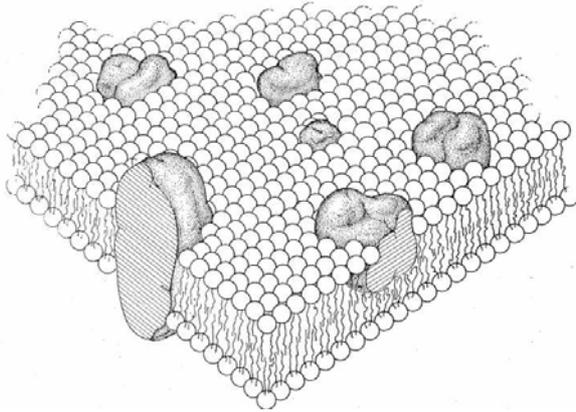


Figura 1.8: Figura original de Singer y Nicolson (1972) que representa la sección transversal con las proteínas integrales de membrana en el mosaico bicapa lipídica. Los fosfolípidos están representados como esferas con cola, y las proteínas como objetos globulares incrustados. Las proteínas periféricas, que deberían encontrarse sobre la superficie de la membrana, no se muestran. A la izquierda, la proteína transmembrana atraviesa todo el espesor de la membrana.

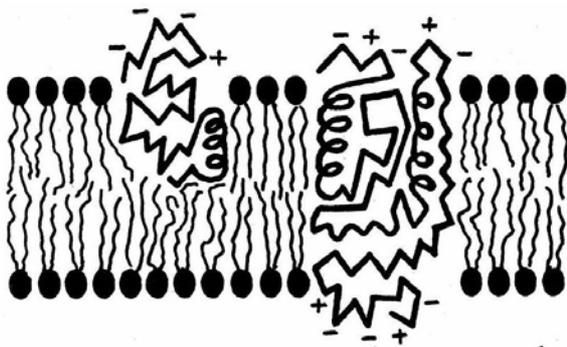


Figura 1.9: Figura original de Singer y Nicolson (1972) que representa una sección transversal de la membrana con las proteínas integrales de membrana en la bicapa lipídica. Las porciones iónicas y polares de las proteínas, como lo indican los signos +/-, están en contacto con las soluciones acuosas (citoplasma y/o líquido intersticial) que rodean la bicapa lipídica. La región de la proteína que atraviesa la membrana es apolar/hidrofóbica y por lo tanto carece de carga.

Con el refinamiento de este modelo de mosaico fluido, también se introdujo la red del citoesqueleto, que se encuentra justo debajo de la pared interna de la bicapa lipídica de las membranas celulares [Lux, 1979], lo cual le agregó importancia funcional al modelo.

Estudios recientes han cuestionado la creencia arraigada de que los lípidos se encuentran mezclados al azar en cada hemicapa de una bicapa. El primer indicio de que los lípidos pueden estar organizados dentro de las hemicapas fue el descubrimiento de que el residuo que queda tras la extracción de las membranas plasmáticas con detergentes se encuentra enriquecido en colesterol y esfingomiélin. Debido a que estos dos lípidos forman bicapas más ordenadas y menos fluidas, se planteó la hipótesis de que forman microdominios, denominados “rafts” lipídicos, rodeados de otros fosfolípidos más fluidos que se extraen fácilmente con detergente. [Lodih y col., 2008]

Este modelo de rafts lipídicos se discutirá en detalle más adelante en esta sección.

1.2.2 ORGANIZACIÓN DE LAS BIOMEMBRANAS EN DOMINIOS [Alberts y col., 2007]

Muchas proteínas de membrana son capaces de desplazarse lateralmente por la membrana (difusión lateral) y como ocurre con los lípidos de membrana, las proteínas no saltan

(flip-flop) a través de la bicapa, sino que giran alrededor de un eje aproximadamente perpendicular al plano de la bicapa (difusión rotacional). El reconocimiento de que las membranas biológicas son fluidos bidimensionales constituyó un gran avance en la comprensión de la estructura y de la función de la membrana. Ha quedado claro, sin embargo, que la representación de la membrana como un mar lipídico en el cual todas las proteínas flotan libremente, es una sobresimplificación. Muchas células tienen sistemas que les permiten limitar sus proteínas de membrana en dominios específicos de la bicapa lipídica continua. Por ejemplo, en células epiteliales como las que revisten el intestino o los túbulos del riñón, ciertas enzimas de la membrana plasmática y algunas proteínas de transporte están limitadas a la superficie apical de la células mientras que otras proteínas se hallan confinadas a las superficies basal y lateral (*figura 1.10*). Esta distribución asimétrica de las proteínas es a menudo esencial para la función del epitelio. La composición lipídica de estos dos dominios de membrana también es diferente, lo cual demuestra que las células epiteliales pueden evitar la difusión de las moléculas lipídicas y proteicas entre los dominios. Experimentos con lípidos marcados, no obstante, sugieren que sólo están confinadas de esta manera las moléculas lipídicas de la monocapa externa. Se cree que la separación tanto de moléculas de proteína como de moléculas lipídicas se mantiene, al menos en parte, por las barreras formadas por un tipo específico de uniones intercelulares (llamadas uniones estrechas o estancas). Está claro que las proteínas de membrana que forman estas uniones intercelulares no pueden difundir lateralmente entre las membranas que están interactuando.

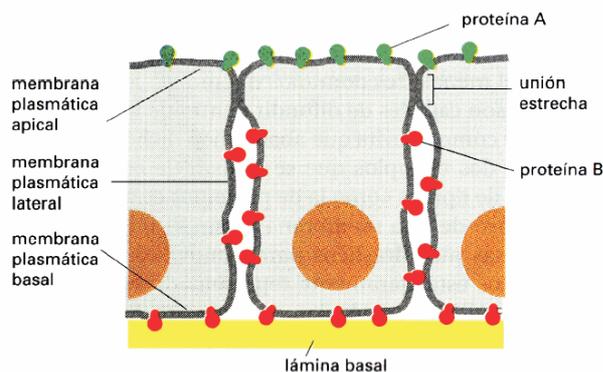


Figura 1.10. Diagrama de una célula epitelial en el que se muestra cómo una proteína de la membrana plasmática se halla confinada en un dominio particular de la membrana. La proteína A (en la zona apical de la membrana) y la proteína B (en la zona basal y basolateral) pueden difundir lateralmente dentro de sus dominios respectivos, pero no pueden entrar en el otro, en parte debido a la unión celular especial denominada *unión estrecha* o *estanca*. Igualmente, las moléculas lipídicas de la monocapa exterior de la membrana plasmática, tampoco pueden difundir entre ambos dominios, pero los lípidos de la monocapa citoplasmática sí pueden hacerlo. [Alberts y col., 2007]

Una célula también puede crear dominios de membrana sin utilizar uniones intercelulares. El espermatozoide de mamíferos, por ejemplo, es una célula aislada que presenta varias zonas estructural y funcionalmente distintas delimitadas por una membrana plasmática continua. Cuando se observa un espermatozoide por microscopía de inmunofluorescencia utilizando diferentes anticuerpos que reaccionen con antígenos de superficie, se constata que la membrana plasmática presenta al menos tres dominios diferentes.

En algunos casos, los antígenos son capaces de difundir dentro de los límites de su propio dominio; se desconoce cómo se evita que abandonen dichos dominios.

En los dos ejemplos que se acaban de considerar, tanto la difusión de las moléculas de lípidos como la de proteínas están confinadas a dominios especializados dentro de una membrana plasmática continua. Las células también tienen sistemas más drásticos para inmovilizar ciertas proteínas de membrana. Uno de ellos está claramente representado en la membrana púrpura de *Halobacterium*. Allí las moléculas de bacteriorrodopsina se ensamblan formando grandes cristales bidimensionales en los que las moléculas proteicas individuales están relativamente fijas unas respecto a las otras; los grandes agregados de este tipo difunden muy lentamente. Un sistema más común de restringir la movilidad lateral de proteínas de membrana específicas consiste en unir las a ensamblajes macromoleculares del interior o del exterior de la célula. Por ejemplo, algunas proteínas de la membrana del eritrocito están ancladas al citoesqueleto interior; en otros tipos celulares, las proteínas de la membrana plasmática pueden anclarse al citoesqueleto o a la matriz extracelular o a ambos. En la *figura 1.11* se resumen los cuatro sistemas de inmovilizar proteínas específicas de membrana.

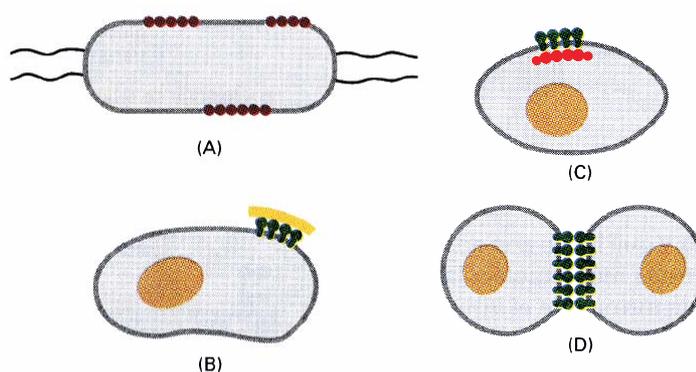


Figura 1.11. Cuatro sistemas mediante los cuales se puede restringir la movilidad lateral de determinadas proteínas de membrana plasmática. Las proteínas pueden autoensamblarse formando grandes agregados (A); pueden estar sujetas por interacciones con agregados macromoleculares del exterior (B) o del interior (C) de la célula, o pueden interactuar con proteínas de superficie de otra célula (D). [Alberts y col., 2007]

Existen otros tipos de sitios especializados en la membrana plasmática de las células eucariotas que son necesarios para el buen funcionamiento de las células. Estos dominios de membrana son las adhesiones focales, las depresiones recubiertas y las membranas sinápticas. Las depresiones recubiertas de clatrina se pueden identificar en micrografías electrónicas de sección fina por la presencia de una capa citoplasmática difusa, y así se distinguen fácilmente de la membrana que las rodea. Aunque las depresiones recubiertas de clatrina parecen ser grandes (100 nm) y estables en el microscopio electrónico, su formación e internalización toma varias decenas de segundos. Una caveola es una invaginación de la membrana en la superficie de las células endoteliales. La cubierta de la membrana se compone de caveolina-1, y contiene colesterol alrededor del borde del dominio. Las caveolas tienen un tamaño que va desde unos 50 a 80 nm, hasta unos 150 nm, e inclusive varios micrómetros en ocasiones especiales. [Matkó y Szöllosi, 2004]

1.2.3 RAFTS LIPÍDICOS

A diferencia de los dominios de membrana mencionados anteriormente, que pueden ser detectados fácilmente mediante técnicas microscópicas, existe en la superficie de las membranas biológicas otro tipo de dominios constituidos por lípidos y proteínas específicas que se segregan lateralmente del resto de la membrana, y que por su pequeño tamaño no pueden ser detectados fácilmente mediante las técnicas de microscopía usuales.

El modelo de mosaico fluido representa muy bien a una membrana en el estado líquido-desordenado (L_D). Sin embargo, con el descubrimiento de la fase líquido ordenada (L_O) en liposomas y sistemas modelo de membranas [Ipsen y col., 1987] se ha demostrado que ciertos lípidos poseen la propensión de asociarse unos con otros, segregándose así de la fase L_C (figura 1.12).

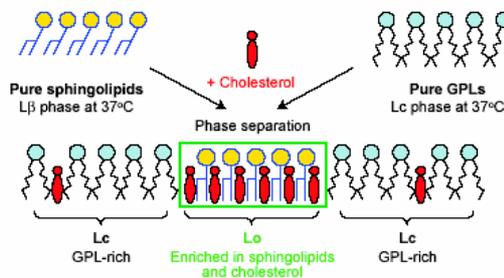


Fig. 1.12: A diferencia de los otros glicerosfosfolípidos, los esfingolípidos forman una fase gel (L_B) a 37°C, con un alto empaquetamiento de las cadenas saturadas. El col. interactúa preferentemente (pero no exclusivamente) con los esfingolípidos y favorece la separación de fases entre los esfingolípidos y los glicerosfosfolípidos. En la membrana plasmática, los glicerosfosfolípidos forman una fase L_C relativamente pobre en col, mientras que los esfingolípidos forman una fase L_O enriquecida en col. [Fantini y col., 2002]

Estos lípidos son el colesterol, los esfingolípidos (que habitualmente poseen cadenas acíclicas saturadas), y los glicerosfosfolípidos de cadenas saturadas, que pueden empaquetarse más estrechamente que los lípidos que poseen insaturaciones en sus cadenas [Schroeder y col., 1994; Ahmed y col., 1997; Dietrich y col., 2001; Silvius, 2003]. (Notar que la insaturación presente en los esfingolípidos, en la parte alta de la esfingosina, no impide el estiramiento de la cadena, según puede verse en figura 1.2b). La autosegregación de lípidos y proteínas en forma de microdominios discretos se ha detectado posteriormente en biomembranas de distintas células. Estos microdominios han recibido el nombre de *rafts lipídicos* (figura 1.13) [Simons e Ikonen, 1997]. Los rafts fueron inicialmente identificados con la fracción insoluble a detergente (DRM, por *Detergent Resistant Membrane*) que se obtiene por ultracentrifugación en gradiente de densidad [Brown y Rose, 1992; Brown y London, 1998a]; sin embargo, esta identidad ya no se considera válida, aunque la técnica de obtención de DRMs sigue siendo muy útil (vease más adelante).

Se ha reportado la presencia de rafts en membranas de células de mamíferos, de levaduras, y recientemente, de células vegetales [Bhat y Panstruga, 2005]. Las DRMs han sido aisladas de varios tipos celulares, incluyendo células epiteliales [Brown y Rose, 1992], fibroblastos [Sargiacomo et al., 1993] y linfocitos [Cinek y Horejsí, 1992], entre

otros. También, se ha demostrado la existencia de DRMs en eritrocitos [Civenni y col., 1998; Salzer y Prohaska, 2001; Rivas y Gennaro, 2003].

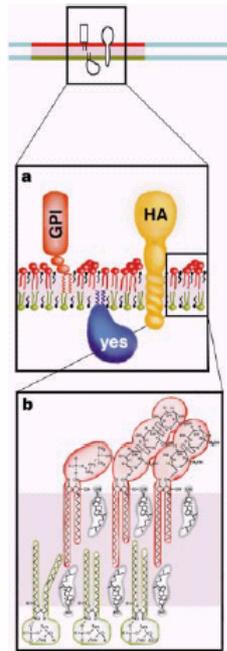


Fig. 1.13: Modelo de la organización de los rafts en la membrana plasmática. Los rafts (rojo) se segregan de las otras regiones de la bicapa (azul). a: Los rafts contienen proteínas unidas a la hemicapa exoplasmática ancladas al GPI, proteínas unidas a la hemicapa citoplasmática ancladas a cadenas acílicas, o proteínas asociadas a través de su dominio transmembrana. b: la bicapa lipídica en los rafts es asimétrica, con la hemicapa exoplasmática enriquecida en esfingomielina (rojo) y glicoesfingolípidos (rojo), y la hemicapa citoplasmática enriquecida en glicerofosfolípidos (por ej. PS y PE; verde). El colesterol (gris) está presente en ambas hemicapas y llena los espacios por debajo de los grupos de cabeza de los esfingolípidos o “extiende” la cadena de ácido graso interdigitante en la otra hemicapa. [Simons e Ikonen, 1997].

Hace ya algunos años que la identidad entre los rafts y las DRMs ha sido dejada de lado. Se ha sugerido que los rafts originalmente presentes en la membrana celular deben ser estructuras dinámicas, con composición y dimensiones fluctuantes [Ediddin, 2001; Taylor y col., 2002] mientras que las DRMs podrían incluso ser generados por la misma actividad del detergente [Heerklootz, 2002].

La función de los rafts parece depender fuertemente del estado físico de los lípidos que los componen. Se ha propuesto que el empaquetamiento denso entre el colesterol y la esfingomielina es el mecanismo que conduce a la estructuración de los rafts, que pueden considerarse como islas en fase líquido ordenada dispersas en una bicapa en fase líquido cristalina [Veatch y Keller, 2005; Goñi y col., 2008].

Estudios con sistemas modelo de membranas sugieren que los factores físico-químicos básicos que inducen la segregación de los lípidos en microdominios son principalmente las cadenas de ácidos grasos largas y saturadas [Masserini y Ravasi, 2001]. Algunos autores sostienen que los grupos de cabeza polar glicosilados y la red extendida de puentes de H que se produce entre ellos también contribuyen a la segregación [Masserini y Ravasi, 2001], aunque otros autores no acuerdan con esto [Maggio y col., 2004]. Existe un amplio consenso en el hecho de que la esfingomielina y el colesterol son los componentes lipídicos principales de los dominios rafts, segregándose de glicerofosfolípidos que contienen cadenas de ácidos grasos insaturados [Salzer y col., 2007; Duggan y col., 2008].

Muchos estudios han demostrado que estas moléculas de lípidos se segregan en microdominios en membranas modelo, incluso en ausencia de proteínas [London, 2002]. Aunque este tema es muy controvertido, se supone que el colesterol es un componente crítico en la estabilización de varios tipos de microdominios lipídicos, principalmente por razones estéricas [Xu y London, 2000].

El colesterol parece jugar un papel fundamental en la estabilización de los dominios que se encuentran en la superficie celular, principalmente debido a una interacción estéricamente favorable con las largas cadenas de ácidos grasos saturados de los esfingolípidos [Matkó y Szöllosi, 2004]. Algunos autores sostienen que la reducción parcial del contenido de colesterol en la membrana eritrocitaria destruye los rafts interrumpiendo ciertos procesos [Xavier y col., 1998; Ilangumaran y col., 1999; Vereb, y col., 2000; Matkó y col., 2002; Samuel et al., 2001; Salzer y col., 2007]. Sin embargo, la gran mayoría de estas evidencias están basadas en la solubilización de proteínas y la consecuente desaparición de éstas en las DRMs, y se ha demostrado que aún pueden obtenerse DRMs luego de la reducción de colesterol en eritrocitos [Rivas y Gennaro, 2003]. El uso de metil- β -ciclodextrina (M β CD) y derivados para modular reversiblemente el nivel de colesterol de la membrana parece ser una herramienta conveniente y reproducible para perturbar la integridad de los rafts sin perturbaciones graves de la membrana original. Sin embargo, se ha comprobado que numerosos agentes secuestradores de colesterol, como la filipina o la nistatina, perturban seriamente la membrana mediante la formación de grandes estructuras de poro (20-25 nm) [Bolard, 1986]. Además, debe tenerse en cuenta que la modulación de los niveles de colesterol produce también alteraciones que no necesariamente tienen que ver con los rafts, como por ejemplo la liberación de algunas proteínas pequeñas de unión al colesterol de la membrana. [Ilangumaran y Hoessli, 1998; Zidovetzki y Levitan, 2007]. El nivel de colesterol en la membrana también puede ser modulado mediante la inhibición de la biosíntesis o la oxidación del colesterol [Smart et al., 1994].

La manipulación de la biosíntesis/homeostasis de esfingolípidos, realizada principalmente mediante la inhibición selectiva de la síntesis de ceramidas y glicosilceramidas, que constituyen los bloques básicos de construcción de la esfingomielina y de los glicolípidos, también puede dar lugar a la disolución o la interrupción de los microdominios rafts en la membrana celular. Muchos experimentos bioquímicos y biofísicos han demostrado convincentemente que estas estrategias de manipulación de la membrana, cuando se aplican con especial atención a los problemas expuestos anteriormente, pueden ser utilizadas con éxito en el estudio del papel de los rafts en la compartimentalización de las subunidades de receptores o de moléculas de señalización en una amplia variedad de membranas celulares [Matkó y Szöllosi, 2004]. Una estrategia alternativa para estudiar el

rol de la esfingomielinina en la organización de los rafts lipídicos de eritrocitos, utilizada en esta tesis, fue la de trabajar con células de diferentes especies (humanos y bovinos) las cuales cuentan, de manera natural, con cantidades similares de la mayoría de los fosfolípidos de la membrana pero con un contenido muy diferente de SM.

Además de su enriquecimiento en colesterol y esfingolípidos, los rafts lipídicos se encuentran enriquecidos en muchos tipos de proteínas receptoras de superficie, así como muchas proteínas de señalización que se unen a los receptores y son activados por ellos. Estos complejos lípido-proteína pueden formarse sólo en el entorno bidimensional de la bicapa hidrofóbica y se cree que facilitan la detección de señales químicas procedentes del medio externo y la activación posterior de los acontecimientos citosólicos [Lodish y col., 2008] Se cree que los rafts lipídicos juegan un importante rol en procesos celulares relevantes tales como la motilidad y adhesión celular, la transducción de señales intracelulares, el tráfico de proteínas y el proceso de infección-entrada de patógenos y/o sus toxinas [Brown y London, 1998a; Simons y Toomre, 2000; Ikonen, 2001; Chazal y Gerlier, 2003; Brown y London, 2000].

Como se comentará en detalle en la siguiente sección, numerosos enfoques bioquímicos y biofísicos han dado lugar a una amplia disparidad en cuanto a las características fundamentales de los rafts lipídicos, y aun no ha surgido un consenso claro sobre su tamaño, forma y ubicación. Ensayos de entrecruzamiento químico han sugerido que los rafts están contruidos de sólo 15 moléculas. Del mismo modo, estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR) pulsado predicen la existencia de pequeños dominios ricos en colesterol que sólo contienen unas pocas moléculas. Según los estudios de apagamiento de fluorescencia de corto rango, tan sólo 25-50 moléculas de lípidos pueden formar dominios funcionales. Estos enfoques predicen rafts muy pequeños y dinámicos, cuya vida media oscila entre los nanosegundos a los milisegundos. De acuerdo con mediciones realizadas con captura con láser (*laser trapping*) y con transferencia resonante de energía de fluorescencia (FRET), el tamaño de los rafts puede ser de unos 50-70 nm. Los rangos de las zonas de confinamiento transitorio detectadas por seguimiento de partícula única (SPT) y seguimiento de marcador único (SDT) van de 110 a 300 nm, y la vida media de esta zona de confinamiento transitorio parece ser mayor a los 200 ms. El tamaño de los rafts detectados por microscopía confocal varía desde 250 nm a algunos micrómetros, y la vida media de estos rafts lipídicos gigantes, los cuales, probablemente, estén compuestos por el agregado de rafts originalmente pequeños, puede ser de hasta varios minutos. Se desprende de estos ejemplos que, a medida que el tamaño virtual de los rafts lipídicos aumenta, la vida media de estos dominios también se incrementa, aunque esta relación no es una correlación directa. La estabilización de estos rafts lipídicos

gigantes no estaría causada exclusivamente por la agregación, sino también por la interacción de los rafts con elementos del citoesqueleto [Matkó y Szöllosi, 2004].

Debido a la variedad de los resultados obtenidos se han planteado numerosos modelos para explicar la segregación lateral de lípidos y proteínas y la formación de rafts lipídicos. Subczynski y Kusumi han sugerido un modelo muy atractivo para explicar las relaciones entre los minirafts dinámicos de tamaño pequeño y de corta duración y los rafts funcionales de mayores tamaños y más estables. Estos investigadores denominaron a su modelo "modelo de Lego térmico", haciendo hincapié en la importancia de la agitación térmica de los componentes en los rafts lipídicos. Estos autores sugieren que por lo menos tres tipos de rafts pueden estar presentes en la membrana plasmática. El primer tipo es una especie de raft pequeño e inestable de sólo unas pocas moléculas, el segundo tipo se genera por la formación de oligómeros de proteínas que estabilizan a los rafts pequeños en torno a ellos simplemente debido a la ligera reducción de la agitación térmica de todo el grupo y forman un tercer tipo de "raft de señalización" por la coalescencia de los pequeños rafts inestables que contienen moléculas de señalización. Los rafts pequeños e inestables son como bloques de Lego para la construcción de las vías de señalización y las moléculas de señalización constituyen la parte central del bloque de Lego a la cual se adjuntan como piezas de conexión el colesterol y posiblemente también lípidos de cadenas saturadas [Subczynski y Kusumi, 2003].

Otro modelo que trata de abarcar la gran variedad de los rafts lipídicos en términos de tamaño y la vida media en una hipótesis de trabajo es el modelo de la "cáscara de lípidos" (lipid shell) [Anderson y Jacobson, 2002]. Los autores han sugerido que la baja densidad de flotación de las llamadas proteínas de rafts es causada por el hecho de que estas proteínas están envueltas en una cáscara de colesterol y esfingolípidos de unas 80 moléculas de lípidos. Ellos sugieren que las cáscaras de lípidos son estructuras termodinámicamente estables que tienen una afinidad por los rafts preexistentes y dirigen a la proteína encerrada hacia estos dominios de membrana. Complejos condensados que reclutan más y más proteínas dirigidas por sus cáscaras lipídicas pueden servir como un raft funcional en la membrana plasmática [Anderson y Jacobson, 2002].

Como se puede concluir de la amplia variedad de resultados obtenidos y de la diversidad de modelos que existen, los rafts lipídicos siguen siendo un tema de estudio de gran actualidad. Junto con el método bioquímico de extracción con detergente existen numerosas técnicas biofísicas que permiten estudiar los dominios de membrana tanto en sistemas modelo como en células intactas. Todas estas técnicas serán descriptas con mayor detalle en la siguiente sección.

1.3 Técnicas de estudio de dominios lipídicos

Aunque el concepto de microdominio está ampliamente aceptado, y la existencia de rafts ha sido confirmada por muchas líneas de evidencia experimental, algunas preguntas básicas sobre los microdominios lipídicos siguen abiertas o altamente polémicas.

Los microdominios de membrana se definen de varias formas distintas en función del método utilizado para su detección: (1) Una definición bioquímica basada en la resistencia de la membrana a la solubilización en frío con detergentes no iónicos (Triton-X100, Brij, Chaps, y demás). La composición de los microdominios se identifica con la de las fracciones insolubles al detergente o DRMs, que suelen aislarse por su propiedad de flotar por su baja densidad luego de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de los lisados celulares [Brown y Rose, 1992 ; Ilanguamaran y col., 1999]; (2), como grupos de proteínas y/o lípidos detectados *in situ* por diversas técnicas como la microscopía de barrido láser confocal (CLSM), FRET, microscopía de fuerza atómica (AFM) y TEM basada en la inmuno-marcación con partículas de oro coloidal en células intactas [Hwang y col., 1998; Vereb y col., 2000], y (3) como evidencia indirecta a partir de las limitaciones de los movimientos de difusión lateral de proteínas de membrana según lo revelado por el seguimiento de los movimientos moleculares con videomicroscopía [Saxton y Jacobson, 1997]. Este confinamiento puede surgir de interacciones lípido-lípido o lípido-proteína [Anderson y Jacobson, 2002], así como de un efecto de "anclaje/captura" del esqueleto de la membrana [Kusumi y Sako, 1996].

Así, la primera cuestión importante, debido a la diversidad de definiciones, es si los microdominios, detectados y definidos en las diferentes formas descritas anteriormente, coinciden entre sí, y en caso afirmativo, en qué medida. En segundo lugar, todos los enfoques sufren de algunas incertezas concretas: o bien debido a las circunstancias de aislamiento de DRMs (alteraciones de la membrana debido al detergente, la lisis celular) o debido a las características de los marcadores utilizados (anticuerpos, anticuerpos recubiertos de partículas de oro, etc), que pueden ser demasiado grandes en tamaño, o que puedan desencadenar entrecruzamientos entre proteínas o lípidos, perturbando la organización de la membrana *in situ*. Es así que las características de los ensayos pueden afectar tanto el tamaño como la estabilidad de los rafts lipídicos *in situ* en la superficie celular.

1.3.1 INSOLUBILIDAD FRENTE A DETERGENTES

La insolubilidad frente a detergente es la principal herramienta bioquímica para el estudio de rafts lipídicos en la membrana. De hecho, la definición de molécula constituyente

de raft es que se obtenga en la fracción de baja densidad (debido a su asociación con lípidos de membrana) después de la extracción en frío con Triton X-100 (TX-100) y la centrifugación en gradiente de densidad.

El tratamiento con detergente desestabiliza la mayoría de las interacciones lípido-lípido, pero una pequeña parte de la membrana original se preserva y puede ser aislada en la zona de baja densidad del gradiente como una fracción de membrana resistente a detergente denominada *DRMs*, [Brown y London, 1998b]. Las DRMs probablemente se originan a partir de los rafts lipídicos, que resisten a la extracción debido al estrecho empaquetamiento de sus lípidos [Brown y London, 1998b]. La extracción con detergente también interfiere en las interacciones lípido-proteína de manera tal que la mayoría de las proteínas de membrana se solubilizan. Sólo unas cuantas proteínas mantienen su asociación con los lípidos y se recuperan en las DRMs. Las primeras proteínas identificadas fueron las ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) [Brown y Rose, 1992] y posteriormente se caracterizaron otras, muchas de las cuales estaban involucradas en señales de transducción. De esta manera, la asociación de una proteína con las DRMs es indicativa de una fuerte interacción con dominios altamente ordenados en la fase L_0 .

Sin embargo, este enfoque bioquímico proporciona información limitada sobre los rafts y los mecanismos de funcionamiento en las membranas de las células vivas. Además, los métodos bioquímicos se han enfrentado a varias objeciones serias sobre la capacidad de la técnica de extracción con detergente para identificar *in situ* la composición de lípidos de los dominios existentes en las células intactas. Una cuestión importante es si estos dominios existen en la membrana plasmática antes de la extracción con detergente, o son creados por el procedimiento de extracción en sí mismo [Lichtenberg y col., 2005]. Esta pregunta aún no ha sido respondida de forma convincente. Varios de los estudios de reconstitución *in vitro* con membranas modelo indican que la extracción en sí no causa una perturbación artificial significativa de la composición del dominio [Ahmed y col., 1997; Schroeder y col., 1998]. Sin embargo, pueden surgir problemas de la concentración y la composición de los detergentes utilizados. La asociación de ciertas proteínas de membrana con DRM puede depender de la concentración y del tipo de detergente [Ilangumaran y col., 1999].

Se ha utilizado entrecruzamiento químico para demostrar que las proteínas ancladas a GPI existen en microdominios de membrana en la superficie celular. La agrupación de proteínas ancladas a GPI demostró ser específica ya que es sensible a la extracción de colesterol y esto no ocurrió para las versiones respectivas de las proteínas transmembrana modelo. En células vivas, se encontró que estas proteínas ancladas a GPI residen en microdominios compuestos de al menos 15 moléculas, los cuales son mucho menores que

los observados después de la extracción con detergente [Friedrichson y Kurzchalia, 1998].

Parece bastante claro que las DRMs solo pueden reflejar de forma parcial la distribución de los componentes de membrana entre las fases L_C y L_O [London y Brown, 2000], y no se conoce todavía cuán bien se relaciona la composición de los DRMs con los componentes de los rafts lipídicos nativos en la membrana celular. En el análisis de las DRMs, siempre se debe tener en cuenta que es probable incurrir en una sobre- o subrepresentación de las proteínas y lípidos en los rafts. La evidencia experimental de una representación excesiva de una proteína raft en DRM se mostró en un sistema de membranas modelo. PLAP, una proteína unida a GPI, fue reconstituida en liposomas unilamelares gigantes (GUVs) y resultó ser completamente insoluble en TX-100, aunque sólo el 30% se localiza en los dominios de las vesículas originales. Los protocolos de preparación de DRM deben ser cuidadosamente establecidos para cada sistema de células para reducir al mínimo la aparición de artefactos. [Salzer y col. 2007]

Sin embargo, a pesar de estas observaciones, la metodología de DRMs ha demostrado ser útil, porque la mayoría de las proteínas que están normalmente presentes en DRMs han demostrado estar asociadas a rafts cuando fueron examinadas por diferentes métodos [Salzer y col. 2007].

Debido a que uno de los objetivos principales de este trabajo es el estudio de la interacción de la membrana eritrocitaria con el detergente TX-100 en el uso de la técnica de obtención de DRMs, desarrollamos a continuación los principios básicos que rigen la interacción de las moléculas tensioactivas y las membranas biológicas.

La interacción entre detergentes y membranas viene siendo estudiada hace 25-30 años a partir del uso de detergentes para solubilizar membranas y conseguir así el aislamiento y caracterización de proteínas integrales [Helenius y Simons, 1975].

Los detergentes son moléculas anfipáticas que contienen tanto grupos polares como hidrofóbicos. A muy bajas concentraciones, los detergentes se disuelven en agua pura en forma de moléculas aisladas, pero a medida que se incrementa la concentración, las moléculas comienzan a formar *micelas*. Las micelas son pequeños agregados en los cuales las partes hidrofílicas de las moléculas se orientan hacia el exterior acuoso y las partes hidrofóbicas se agrupan en el centro (*figura 1.14*). La *concentración micelar crítica* (CMC) a la cual se forman las micelas es característica de cada detergente y es una función de las estructuras de sus partes hidrofílicas e hidrofóbicas [Lodish y col., 2008]

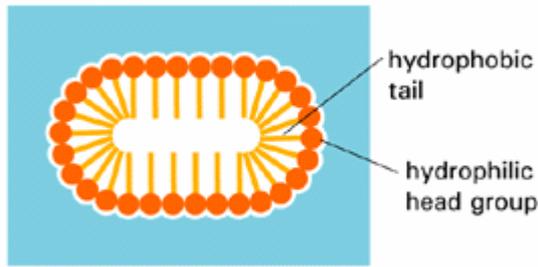


Fig. 1.14: Micela de detergente en el agua, vista en sección transversal. Las moléculas de detergente son anfipáticas debido a que tienen un extremo polar y otro extremo no polar. [Alberts y col., 2007]

Debido a su naturaleza anfipática, los detergentes son capaces de desorganizar las membranas biológicas intercálándose en la bicapa lipídica y solubilizando los lípidos y las proteínas [Lodish y col., 2008]. Las micelas son mucho más pequeñas que las vesículas y, por lo tanto, los lípidos incorporados dentro de las micelas de detergente se considera que están solubilizados [London y Brown, 2000].

Existe un gran número de detergentes con diferentes combinaciones de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Basado en la naturaleza de sus grupos de cabeza hidrofílicos, pueden ser clasificados, de manera amplia, *en iónicos, no iónicos y zwitteriónicos*.

Los *detergentes iónicos* contienen un grupo de cabeza con una carga neta. Pueden ser aniónicos o catiónicos. Son capaces de unirse a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana tanto como al core hidrofóbico de las proteínas hidrosolubles. Debido a su carga neta, estos detergentes también pueden interferir en los enlaces iónicos y los puentes de hidrógeno. A altas concentraciones el dodecilsulfato sódico (SDS), por ejemplo, desnatura completamente a las proteínas uniéndose a las cadenas laterales de los aminoácidos.

En cambio, los detergentes *no iónicos* actúan de diferente manera a diferentes concentraciones. A altas concentraciones (por encima de la CMC), solubilizan las membranas biológicas formando micelas mixtas de detergente, fosfolípidos y proteínas integrales de membrana (*figura 1.15*). A bajas concentraciones (por debajo de la CMC), estos detergentes pueden unirse a las regiones hidrofóbicas de la mayoría de las proteínas de membrana. En este caso, a pesar de que las micelas mixtas no se forman, las proteínas permanecen en solución y no precipitan. (*Ver figura 1.15*)

Finalmente, los detergentes *zwitteriónicos* poseen propiedades combinadas. Al igual que los detergentes no-iónicos, carecen de carga neta. Sin embargo, similarmente a los detergentes iónicos son eficientes rompiendo las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína pero siendo menos desnaturizantes que ellos. [Neugebauer, 1990]

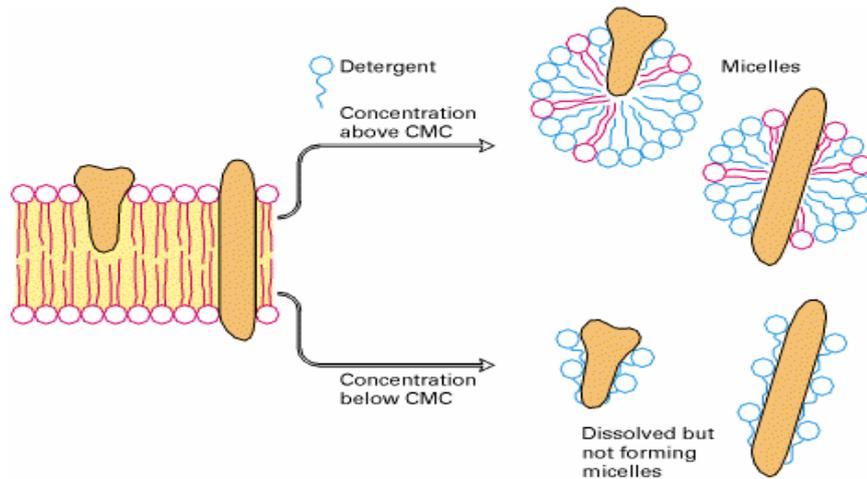


Fig. 1.15: Solubilización de proteínas integrales de membrana por detergentes no iónicos. A concentraciones más altas que la CMC, los detergentes solubilizan lípidos y proteínas integrales de membrana formando micelas mixtas de detergente, proteínas y lípidos. A concentraciones por debajo de la CMC, muchos detergentes, como por ej. el octilglucósido, pueden disolver proteínas de membrana sin formar micelas, cubriendo la región de la proteína que originalmente estaba en contacto con los lípidos de la membrana. Ya que estos detergentes como el octilglucósido tienen altos valores de CMC, son particularmente efectivos solubilizando proteínas integrales de membrana sin desnaturalizarlas ni formar micelas mixtas. [Lodish y col., 2008]

Un modelo comúnmente usado para describir el mecanismo de acción de los detergentes sobre vesículas lipídicas contempla (al menos) tres etapas de solubilización: (i) unión del detergente con los lípidos de membrana, (ii) ruptura de la vesícula saturada de detergente resultando en la formación de micelas mixtas en equilibrio con vesículas, o más generalmente, con estructuras lamelares y (iii) una etapa en la que todos los lípidos son solubilizados en micelas mixtas [Lichtenberg, 1985].

Es importante destacar que todas las evidencias experimentales indican que las estructuras lipídicas son susceptibles a la acción de detergentes cuando se encuentran en la fase desordenada L_c , y que tanto en la fase gel como en la fase líquido ordenada son en general relativamente más resistentes a la solubilización con detergente [London y Brown, 2000], aunque existe la posibilidad de que distintos detergentes realicen extracciones selectivas de ciertos tipos de lípidos [Banerjee et al, 1995].

Un paso crucial en la obtención de DRMs es el aislamiento de la fracción resistente a detergente mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad. Por este método es posible separar una fracción “liviana” de baja densidad que constituye, por definición, a las DRMs, y que consiste en cierto subconjunto de proteínas asociadas a moléculas lipídicas (y moléculas de detergente) que constituyen una estructura vesicular [Koumanov y col., 2005] separada de la fase micelar, constituida por elementos de la membrana original que han sido disueltos, incluyendo proteínas no asociadas a lípidos, y que se obtienen en la zona de mayor densidad del gradiente. Sin embargo, si esta fracción resistente al detergente mantiene, luego del tratamiento con detergente, algún tipo de interacción

con estructuras de la célula, como el citoesqueleto cortical que subyace a la membrana de muchos tipos celulares, los elementos que aparecerían flotando en zonas de baja densidad del gradiente serán arrastrados hacia zonas de mayor densidad.

Una alternativa al proceso de separación del material insoluble de aquél que ha sido incorporado a la fase micelar de detergente consiste en una microcentrifugación, a una velocidad y durante un lapso adecuado, que permite sedimentar el material más denso que el medio acuoso y que posee un tamaño de partícula adecuado (estructuras vesiculares y agregados proteicos) [Rivas y Gennaro, 2003].

Estos aspectos operativos, junto con otros, fueron investigados y se analizarán en detalle en este trabajo.

1.3.2 SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA

El estudio a nivel molecular del rol de los lípidos y de las proteínas en los diversos procesos que se llevan a cabo en las membranas biológicas se ve a menudo obstaculizado por la complejidad de las membranas nativas. Así, como un primer paso hacia una mejor comprensión de las membranas biológicas complejas, a menudo es necesario centrarse en los sistemas más simples, compuestos de mezclas lipídicas artificiales con o sin proteínas asociadas a la bicapa lipídica.

La preparación de liposomas cuenta con una gran cantidad de variantes operacionales, sin embargo consta de algunos pasos comunes a todos los procedimientos de preparación. Los lípidos constituyentes son disueltos en las proporciones adecuadas en un solvente orgánico, que luego es removido por evaporación y/o vacío. El depósito seco de lípidos es luego resuspendido en un medio acuoso adecuado. La suspensión resultante consiste, en la gran mayoría de los casos, en liposomas multilamelares (MLVs) de tamaño polidisperso que luego pueden ser procesados para obtener liposomas unilamelares grandes (LUVs) mediante diferentes técnicas (extrusión, sonicado, ciclos de calentamiento/enfriamiento, etc). Una técnica en particular permite obtener liposomas unilamelares gigantes muy útiles en microscopía.

Los resultados de numerosos estudios bioquímicos y biofísicos realizados en membranas modelo han apoyado la teoría de los rafts lipídicos. Se ha podido aislar una fracción insoluble a detergente a partir de membranas modelo con una composición que se asemeja a los obtenidos a partir de las membranas plasmáticas. Esta fracción se asemeja a las fracciones de DRM de las células en cuanto a la composición de lípidos y proteínas ancladas a GPI [Schroeder y col., 1994]. De manera similar a las bicapas en estado líquido ordenado (L_o), esta fracción se encuentra enriquecida en colesterol y lípidos con cadenas acílicas saturadas (por ejemplo, esfingolípidos). Además, bicapas en estado L_o ,

compuestas de DPPC/colesterol resultaron ser insolubles a detergente, por lo que se propuso que los rafts lipídicos son dominios de lípidos ordenados [Schroeder y col., 1994; Sot y col., 2002]. Cabe destacar, sin embargo, que si bien las fases lipídicas segregadas son estructuras de equilibrio, las membranas de las células vivas se encuentran lejos del equilibrio. Los dominios en membranas celulares son muy probablemente estructuras transitorias fuera del equilibrio. Teniendo esto presente, los resultados de estudios bioquímicos y biofísicos llevados a cabo en membranas modelo pueden proporcionar información útil sobre la estructura y dinámica de los rafts lipídicos.

1.3.3 MÉTODOS BIOFÍSICOS

Además de los enfoques bioquímicos, la estructura de los rafts se puede estudiar *in situ* mediante estudios biofísicos en membranas modelo y en membranas biológicas. Además, dependiendo de la resolución temporal de la técnica biofísica utilizada, la dinámica de los rafts también puede seguirse en varias escalas de tiempo. La caracterización de los rafts de membrana depende enteramente de la resolución espacial, temporal, y química del método utilizado. Métodos diferentes pueden dar diferentes imágenes del mismo dominio y puede ser ciegos a otros aspectos de las propiedades de los rafts. Estos enfoques biofísicos incluyen varias técnicas espectroscópicas: la resonancia paramagnética electrónica (EPR), la resonancia magnética nuclear (NMR), el quenching de fluorescencia, técnicas microscópicas clásicas y avanzadas como la microscopía de fluorescencia, microscopía de transferencia de energía resonante de fluorescencia, (FRET), seguimiento de partícula única (SPT), seguimiento de marcador único (STD), microscopía de fuerza atómica (AFM), atrapamiento óptico (*optical trapping*), y espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS).

En esta sección describiremos en detalle la técnica de EPR, principalmente en cuanto a sus aplicaciones al estudio de bicapas lipídicas y a la dinámica conformacional de proteínas, ya que esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el presente trabajo. Finalmente se resumirán las características de algunas técnicas biofísicas habitualmente utilizadas en el estudio de los rafts y ciertos resultados relevantes obtenidos.

(a) *Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR)*

La espectroscopía de EPR es una técnica que detecta electrones desapareados. El principio en el que se basa la técnica es la separación de niveles de energía asociados al momento magnético del espín electrónico por la interacción con un campo magnético aplicado. Luego, la muestra es irradiada con ondas electromagnéticas y si la energía de los fotones

corresponde a la separación de niveles producida por el campo magnético externo se produce absorción resonante. La señal detectada aparece como la derivada del espectro de absorción [Campbell y Dwek, 1984].

Cuando se quieren investigar muestras que no son intrínsecamente paramagnéticas y por lo tanto, no tienen señales de EPR, se utilizan marcadores de espín. Los marcadores de espín son radicales libres, estables y sintéticos (usualmente nitróxidos), cuya utilización ha permitido que EPR sea aplicada a un amplio rango de sistemas [Griffith y Jost, 1976; Berliner y Reuben, 1989]. En particular, los marcadores de espín liposolubles permiten utilizar la espectroscopía de EPR para sensar el orden conformacional a distintas profundidades en la región hidrofóbica de membranas o sistemas modelo. También es de particular utilidad el estudio por EPR de proteínas a las cuales se le incorpora un marcador de espín unido covalentemente a la cadena polipeptídica. Otro campo de aplicación de la espectroscopía de EPR al estudio de proteínas es la investigación de metaloproteínas que contienen en su estructura metales de transición con señal de EPR intrínseca.

El espectro de EPR de un marcador de espín, además de ser muy sensible a la movilidad en el rango de tiempos entre $5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-11} s, brinda información sobre la polaridad de su microentorno [Fajer, 2000]. La información dinámica obtenida por espectroscopia EPR convencional se basa en la difusión reorientational de la fracción nitróxido ubicada en las sondas lipídicas en la membrana o en los radicales nitróxido unidos a proteínas.

En el estudio de bicapas lipídicas, el experimento de EPR permite detectar modificaciones en los movimientos de rotaciones alrededor de los diferentes enlaces C-C los cuales conducen a un equilibrio de múltiples conformaciones de las cadenas lipídicas. En las membranas, las rotaciones de los grupos metilo en el centro de la bicapa ocurren con frecuencias del orden de 10^{11} Hz y las isomerizaciones trans-gauche están en el rango de frecuencias de entre 10^{10} - 10^9 Hz en la fase fluida y 10^4 Hz en la fase gel [Levstein y col., 2002]. Los valores típicos para la rotación axial de los lípidos son del orden de 10^9 Hz, mientras que los movimientos perpendiculares a éste (movimientos de wobbling o bamboleo) están entre los 10^6 a 10^8 Hz. [Levstein y col., 2002] En esta escala de tiempo de nanosegundos (los diferentes movimientos se expresan habitualmente por un tiempo de correlación rotacional, el cual corresponde aproximadamente a la inversa de la frecuencia), las moléculas en el microdominio lipídico de frontera, es decir, los lípidos adyacentes a la parte de membrana de una proteína integral de membrana, parecen estar inmobilizados por la proteína [Griffith y Jost, 1976]. Por el contrario, las mediciones de NMR, que tienen una escala de tiempo de microsegundos, dan una imagen diferente de los lípidos de la frontera como una capa de moléculas móviles y muy desordenados [Jost y Griffith, 1980]. De manera similar a NMR, en experimentos de EPR pulsado, la diná-

mica de la membrana puede ser observada en periodos más largos de tiempo (1-10 μ s), en los cuales se mide el tiempo de relajación espín-red (T_{1s}) de los grupos nitróxido. Utilizando EPR pulsado con doble marcado, Kusumi y colaboradores fueron capaces de determinar que los pequeños dominios ricos en colesterol (que contienen varias moléculas) pueden formarse de manera continua y dispersarse con una vida media del orden de 1-100 ns en bicapas artificiales de fosfatidilcolina insaturada y colesterol. [Subczynski y Kusumi, 2003].

En el estudio de la dinámica conformacional de proteínas, la escala de tiempo del experimento de EPR convencional corresponde al movimiento de péptidos y pequeñas proteínas y a la movilidad de los marcadores de espín en la superficie de proteínas grandes [Fajer, 2000]. Ciertas técnicas de desarrollo reciente, como la marcación de espín sitio dirigida, permiten estudiar la dinámica conformacional de las diferentes partes de una cadena polipeptídica incorporando residuos aminoacídicos adecuados mediante mutagénesis dirigida e inclusive estimar distancias entre residuos en mutantes doblemente marcadas [Hubbell y col., 2000]

En el grupo de investigación en el cual se desarrolló esta tesis se estudian muestras biológicas y sistemas modelo con marcadores de espín [Gennaro y col., 1996; Gennaro y col., 1998; Pincelli y col., 2000]. Se han estudiado los efectos de la modulación de colesterol en la membrana de eritrocitos [Cassera y col., 2002] y se obtuvieron e investigaron por EPR dominios resistentes a detergente de la membrana eritrocitaria utilizando TX-100. Pudo demostrarse que la estructura característica de los DRMs se mantiene aún cuando se reduce previamente el colesterol de la membrana original [Rivas y Gennaro, 2003].

(a.1) Determinación del orden dinámico de membranas por Espectroscopía de EPR.

Para marcar membranas, pueden utilizarse los marcadores de espín liposolubles n-doxil-ácido esteárico (n-SASL), donde el radical doxil (4,4-dimetiloxazolidina-N-oxil) reemplaza al carbono **n** de una molécula de ácido esteárico (*figura 1.16*).

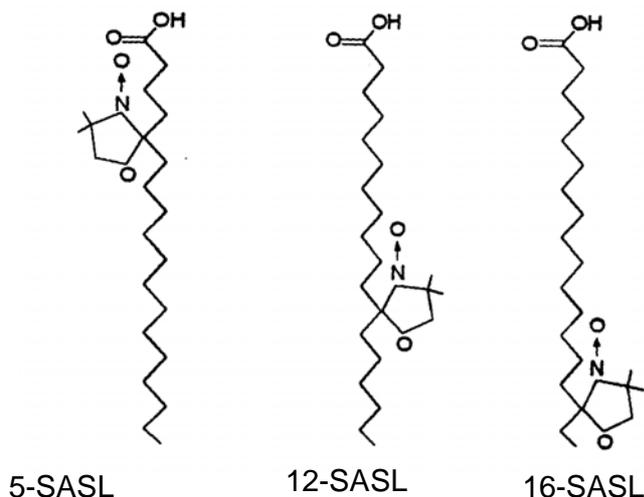


Figura 1.16: Marcadores de espín liposolubles 5-, 12- y 16-SASL utilizados en este trabajo para realizar espectroscopía de EPR de las muestras analizadas.

El marcador se incorpora a las estructuras lipídicas en forma paralela a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, con su extremo carboxilo próximo a las cabezas polares y su distribución lateral en la membrana es homogénea y al azar. Si el radical nitróxido reemplaza al carbono 5 de la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico ($n=5$), sensa la bicapa lipídica en una región próxima a las cabezas polares. Por el contrario, si el radical nitróxido está en las posiciones 12 o 16 se encuentra más sumergido en la bicapa y por lo tanto sensa la región hidrofóbica de la membrana. El espectro de EPR que generan está afectado por la interacción entre el electrón desapareado localizado en el orbital $2p\pi$ del enlace N-O y el núcleo del ^{14}N (de espín nuclear $I=1$). En consecuencia, el espectro consta de tres líneas de significativa anisotropía debido a que el espín electrónico se encuentra en un orbital tipo p. Esta anisotropía puede ser promediada total o parcialmente debido a movimientos moleculares. Cuando los movimientos son rápidos e isotrópicos (marcador pequeño en medio de baja viscosidad), el espectro consta de tres líneas finas de alturas similares, pero en un estado de no-movimiento el espectro tiene estructuras muy anchas. Entre estos dos extremos existe un régimen intermedio, en el cual el espectro de EPR es sensible a la velocidad y anisotropía del movimiento. Estos efectos son observados en los lípidos constituyentes de membranas. Por ejemplo, el marcador de espín 16-SASL, que sensa la región más interna de las estructuras lipídicas, donde los movimientos de las cadenas son menos restringidos, tiene un espectro de líneas más finas que el de 12 o 5-SASL, que están en regiones más inmovilizadas.

A partir de los espectros de estos marcadores se calcula el parámetro de orden aparente, S_{APP} [Griffith y Jost, 1976, Cassera y col., 2002]. El S_{APP} puede variar entre 0 y 1, donde un valor de $S_{\text{APP}}=1$ indicaría un estado de ordenamiento máximo de las cadenas

acíclicas, es decir las cadenas están perfectamente estiradas y empaquetadas, mientras que $S_{APP} = 0$ indicaría que las cadenas se encuentran totalmente desordenadas.

Los valores del S_{APP} se calculan a partir de los espectros de EPR según la ecuación 1.1, donde $A_{//}$ y A_{\perp} se determinan como se muestra en la figura 1.17.

$$S_{app} = \frac{(A_{//} - A_{\perp})}{[A_{ZZ} - \frac{1}{2}(A_{XX} + A_{YY})]} \quad (\text{ec. 1.1})$$

A_{XX} , A_{YY} y A_{ZZ} son parámetros conocidos para los SASL [Griffith y Jost, 1976] y los valores correspondientes son: $A_{XX} = 5.9$ G, $A_{YY} = 5.4$ G, $A_{ZZ} = 32.9$ G.

Una medida más directa del orden dinámico del marcador incorporado a la muestra se puede obtener mediante $A_{//}$ y A_{\perp} , denominados también A_{MAX} y A_{MIN} , respectivamente. Los valores posibles de A_{MAX} varían entre el límite isotrópico de alrededor de 16 G, esperado para un marcador de espín llevando a cabo una reorientación rápida e irrestricta en un medio isotrópico (completamente desordenado), y el valor límite de alrededor de 32 G, correspondiente al marcador de espín inmovilizado. En forma correspondiente, A_{MIN} puede variar entre un valor mínimo de alrededor de 6 G, correspondiente al marcador inmovilizado, y el límite isotrópico rápido de 16G [Griffith y Jost, 1976].

Las gráficas de los parámetros hiperfinos (S_{APP} , A_{MAX} o A_{MIN}) en función de la posición del radical nitróxido son llamadas “Gradientes de Flexibilidad”. Estas representan el perfil de profundidad en la membrana. S_{APP} y A_{MAX} disminuyen a medida que el marcador se localiza más profundo; en cambio, A_{MIN} tiene un comportamiento opuesto. Este tipo de figuras es característico de estructuras de membrana [Griffith y Jost, 1976; Schorn y Marsh, 1996; Cassera y col., 2002].

La explicación del gradiente de flexibilidad se basa en que la mayoría de los carbonos de las cadenas acíclicas presentan hibridación sp^3 y los enlaces C-C son uniones simples, lo cual les confiere libertad en cuanto a la orientación relativa al enlace anterior de la cadena (posiciones *trans*, *gauche +*, *gauche -*). El intercambio entre las distintas posibilidades de orientación da lugar a isomerizaciones *trans-gauche*. Estos movimientos proporcionan flexibilidad a la cadena y su efecto es acumulativo cadena abajo, dando una mayor amplitud de movimiento hacia el centro de la membrana y generando de esta manera una disminución en S_{APP} y A_{MAX} , y un aumento de A_{MIN} .

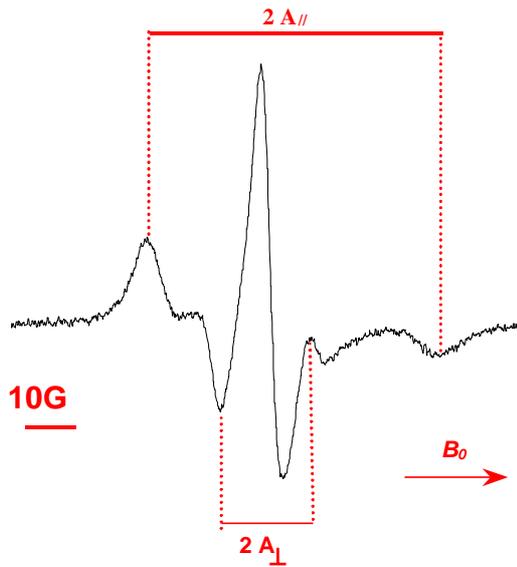


Figura. 1.17: Espectro típico de EPR (marcador 5-SASL en membrana de glóbulos rojos humanos). En la figura se indica como se obtiene la información del espectro que luego se utiliza para calcular el parámetro de orden.

Como se mencionó anteriormente, los espectros de EPR son sensibles tanto a la dinámica como a la anisotropía del marcador de espín en el medio en el que se encuentra, principalmente en condiciones de movimientos lentos (tiempos de correlación rotacional del orden de 10^{-7} a 10^{-9} s). Es debido a esto que, formalmente, las características de un espectro de EPR, por ejemplo el aumento del parámetro A_{MAX} , pueden deberse tanto a un aumento del ordenamiento lipídico de la membrana como a una disminución en la movilidad del marcador de espín. Por lo tanto, el término estrictamente correcto a utilizar es el de “orden dinámico”, aunque en esta tesis, por simplicidad nos referimos sencillamente al orden u ordenamiento lipídico.

(a.2) Determinación de la dinámica conformacional de proteínas marcadas y de su interacción con membranas por EPR.

La espectroscopia de EPR de proteínas marcadas con marcadores de espín derivados de la maleimida (*figura 1.18*) ha sido ampliamente utilizada para evaluar la movilidad y los cambios conformacionales en los grupos sulfhidrilo de las proteínas y para estudiar la difusión rotacional global de las proteínas de membrana a través de EPR de transferencia de saturación. [Esmann y col., 1992; Fajer, 2000]. Más recientemente, el método de marcación de espín sitio-dirigida se ha convertido en una nueva herramienta para analizar la estructura y la dinámica conformacional de las proteínas [Hubbell y col., 2000]. Este método utiliza mutagénesis sitio-dirigida para sustituir los residuos de aminoácidos de una posición predeterminada en la secuencia de una proteína con una cisteína (único aminoácido con un grupo sulfhidrilo), y todos los residuos de cisteínas originales por un sustituto adecuado. Posteriormente, la única cisteína es entonces modificada con un

marcador específico de grupos sulfhidrilo, habitualmente un derivado del metanotiosulfonato [Hubbell y col., 2000]. Mediante EPR de radicales nitróxidos unidos a proteínas es posible determinar la accesibilidad de la cadena lateral del nitróxido, la dinámica de la cadena lateral, y realizar estimaciones de las distancias entre dos residuos de cisteína de una proteína doble mutante [Hubbell y col., 2000].

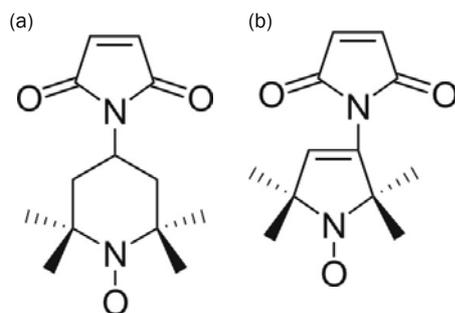


Figura 1.18: Marcadores de espín utilizados en la marcación de proteínas. Estos compuestos son derivados del radical nitróxido y contienen un electrón desapareado en el orbital pp del enlace N-O. El radical nitróxido es estable debido a la presencia de grupos metilo en los átomos de carbono vecinos. Para limitar su flexibilidad, el grupo NO se encuentra formando (a) un anillo de piperidina (6 átomos) o (b) un anillo de pirrol (5 átomos). Sin embargo, todo el anillo puede girar alrededor del enlace sp^3 que lo conecta a la maleimida. Éste último anillo permite la unión del marcador al grupo tiol de un residuo de cisteína en las proteínas. En el espectro de EPR aparecen 3 líneas de absorción debido al desdoblamiento hiperfino provocado por la interacción con el ^{15}N (con el ^{14}N aparecen sólo dos líneas). El electrón desapareado interactúa con los 1H de la molécula pero este desdoblamiento habitualmente no puede resolverse.

Los espectros de EPR de proteínas marcadas con un marcador de espín derivado de la maleimida están generalmente constituidos por dos componentes espectrales llamados fuertemente (S) y débilmente (W) inmovilizado, y se asocian con movimientos más o menos restringidos del radical nitróxido en la escala de tiempo del experimento EPR [Alonso y col., 2003] (figura 1.19).

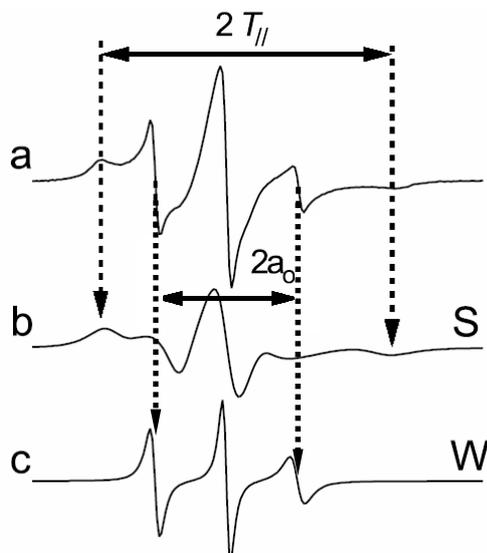


Figura 1.19. EPR de proteínas: (a) Espectro típico de EPR marcadores de espín derivados de la maleimida unido a los grupos sulfhidrilo de proteínas (b y c) espectros obtenidos por simulación que corresponden a los dos componentes espectrales fuerte (S) y débilmente (W) inmovilizado. Los parámetros $T_{||}$ (también llamado A_{max}) y a_0 correspondientes a la máxima separación hiperfina y a la separación hiperfina isotrópica, respectivamente, están indicados en el gráfico. [Alonso y col., 2001]

Alonso [Alonso y col., 2000] ha propuesto que estos dos componentes son el resultado de un equilibrio termodinámico entre dos poblaciones de nitróxidos con estados de mo-

vilidad muy diferentes. De los parámetros de los espectros de EPR se deriva que el componente menos móvil se debe a nitróxidos cuya cadena lateral adopta una conformación “inclinada” poniéndose en contacto con otros sitios de la proteína a través de enlaces de hidrógeno en los que participa el átomo de oxígeno del radical nitróxido, mientras que el componente móvil se origina por los marcadores de espín en contacto con el solvente, y reflejan la polaridad dentro del rango típico para sistemas acuosos. [Alonso y col., 2001]

El componente de mayor movilidad W (*figura 1.19c*) presenta tres líneas de resonancia finas con una separación hiperfina isotrópica $2a_0$, la cual es muy sensible a la polaridad del solvente en donde se encuentra disuelto el radical nitróxido. Si a_0 del componente W es similar al del marcador de espín en el buffer, los radicales nitróxido del componente W están expuestos al solvente. En este caso, sus movimientos están relacionados con el tiempo de correlación efectivo debido a isomerizaciones rotacionales alrededor de los enlaces que unen el anillo nitróxido a la proteína. El componente menos móvil S (*figura 1.19b*), habitualmente representa la mayor fracción del espectro y permite medir la separación hiperfina de las líneas de resonancia exteriores, el parámetro $2T_{//}$. El valor del parámetro $T_{//}$ (A_{MAX}) es usualmente de unos 34 G a 18 °C. Este parámetro es sensible a la movilidad del nitróxido pero también puede ser afectado por la formación de puentes de hidrógeno [Griffith y Jost, 1976], que aumentan la densidad de espín del electrón no apareado en los núcleos de nitrógeno. En un entorno hidrofóbico, donde el nitróxido no es capaz de formar enlaces de hidrógeno, el valor máximo de $T_{//}$ es menor a 32 G. De este modo, el estado de escasa movilidad del marcador que genera el componente espectral S se explica por su fuerte unión con la proteína. Por un lado, está unido covalentemente al átomo de azufre de los residuos de cisteína, y la rotación del grupo que contiene al NO se encuentra dificultada por la formación de enlaces de hidrógeno con el grupo amida o con algunas cadenas laterales de aminoácidos [Alonso y col., 2003].

Se puede verificar que un aumento de temperatura disminuye la relación de poblaciones entre los componentes fuerte y débilmente inmovilizado N_s/N_w , y como este proceso es totalmente reversible, parece claro que los dos componentes espectrales se encuentran en equilibrio termodinámico. Es así que estos componentes provienen de dos estados intercambiables del radical nitróxido (ver *figura 1.20*). Además de los posibles enlaces de hidrógeno nitróxido-proteína también son posibles otros enlaces de hidrógeno de los átomos de oxígeno del anillo maleimida con la cadena polipeptídica. Estos enlaces podrían sujetar al anillo maleimida a la proteína. En esta circunstancia el enlace que une a la maleimida y al nitróxido sería el condicionante más importante de los movimientos rotacionales [Alonso y col., 2003].

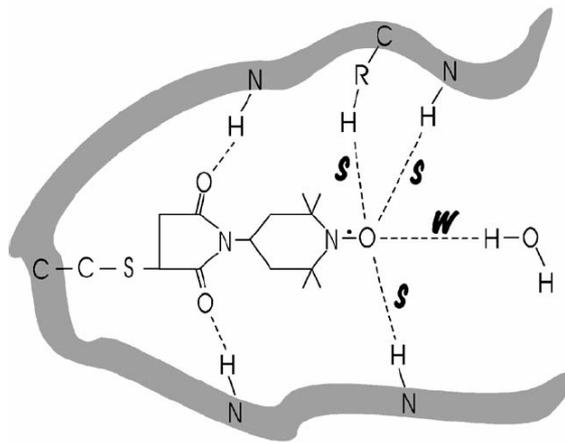


Figura 1.20. EPR de proteínas. Modelo molecular esquemático que ilustra al marcador de espín maleimido Tempo (MT) unido a la cadena polipeptídica a través del grupo sulfhidrilo de una cisteína. El radical nitróxido es capaz de formar enlaces de hidrógeno tanto con los residuos aminoacídicos, generando el componente espectral fuertemente inmovilizado (S), o sólo con el agua, generando el componente espectral debilmente inmovilizado (W). Los dos átomos de oxígeno del anillo de maleimida pueden formar enlaces de hidrógeno con la cadena polipeptídica. [Alonso y col., 2003]

(b) Otras técnicas biofísicas

El estudio de apagado (quenching) de la fluorescencia en las membranas modelo ha demostrado que el estrecho empaquetamiento que se produce entre los esteroides y los esfingolípidos es la fuerza motriz para la formación de los rafts. En este método se utilizan quenchers de corto alcance para suprimir la fluorescencia de las moléculas fluorescentes que están en la vecindad. Los quenchers incorporados a los lípidos pueden detectar dominios en bicapas intactas, porque la intensidad de fluorescencia de una sonda fluorescente apropiadamente unida a la membrana ubicada en una bicapa que contiene una mezcla aleatoria de lípidos que contienen quenchers es muy diferente de la intensidad obtenida cuando la misma sonda fluorescente se incorpora a bicapas que contienen dominios coexistentes, unos enriquecidos en quencher, y otros reducidos en su contenido de quencher [London, 2002]. El corto alcance del apagado de la fluorescencia es sensible a dominios muy pequeños, tan pequeños como 25-50 lípidos. Lamentablemente, el corto alcance del quenching requiere un nivel relativamente alto de un quenchers adosados a los lípidos, lo que limita los tipos de mezclas de lípidos que pueden ser investigadas y hace difícil la utilización de quenching de la fluorescencia en los estudios de las células porque tales lípidos no pueden ser introducidos en las células en cantidades elevadas.

En contraste con los métodos dinámicos (EPR, quenching de corto alcance), la transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET) puede detectar dominios sólo algo más grande, y la microscopía de fluorescencia puede detectar sólo dominios relativamente grandes. La microscopía de FRET es una herramienta muy selectiva y sensible para resolver la heterogeneidad espacial de las interacciones moleculares en las células individuales, con una resolución espacial impuesta por el límite de difracción inherente de la microscopía óptica. La microscopía FRET produjo resultados controvertidos al ser

aplicada al estudio de la distribución de las proteínas ancladas a GPI en los rafts lipídicos. En un estudio de FRET la eficiencia medida entre moléculas de 5'-nucleotidasa marcadas con donante y aceptor se encontró fuertemente correlacionada con la densidad superficial del aceptor, lo que sugiere que la 5'-nucleotidasa está, al menos parcialmente, distribuida al azar y no de forma constitutiva en dominios. [Kenworthy y Edidin, 1998]. Debido a estos resultados y a otros similares, se concluyó que en las membranas plasmáticas, los rafts lipídicos sólo existen como estructuras estabilizadas transitoriamente, o si son estables, sólo representan una pequeña fracción de la superficie celular [Kenworthy y col., 2000].

La organización espacial y el comportamiento dinámico de los dominios lipídicos también pueden ser estudiados por seguimiento de partícula única (SPT). En SPT, partículas de oro coloidal de dimensiones nanométricas (15-40 nm) son recubiertas con anticuerpos específicos contra proteínas de la membrana o con ligandos de moléculas receptoras y luego, a una única (o un número pequeño de) molécula(s). Los complejos de oro con los receptores son monitoreados por vídeo microscopía de contraste mejorada, y los movimientos de los complejos se puede seguir con un nivel de precisión nanométrica [Jacobson y Dietrich, 1999]. La SPT ha demostrado que la membrana citoplasmática está compartimentada en lo que respecta a la difusión lateral de proteínas de membrana, y que muchas proteínas muestran una difusión con "saltos intercompartimentales". Estos compartimentos son también llamadas zonas de confinamiento transitorio [Jacobson y Dietrich, 1999]. Los estudios de SPT mostraron que aproximadamente un tercio de Thy-1, una proteína anclada a GPI, se encuentra confinada en zonas de 200-300 nm de diámetro [Jacobson y Dietrich, 1999]. Es importante destacar que las sondas de oro utilizado para estos experimentos de SPT pueden haberse entrecruzado ligeramente con las moléculas localizadas en los rafts, lo cual potencia la apariencia de las zonas de confinamiento transitorio [Matkó y Szöllosi, 2004].

En la técnica de seguimiento de marcador único (STD), se puede registrar y obtener imágenes del movimiento lateral de una única molécula lipídica marcada fluorescentemente en una escala de tiempo de milisegundos y con una precisión espacial de alrededor de 50 nm. Schutz y colaboradores han utilizado sondas análogas con cadenas de ácidos grasos saturados para monitorear los rafts lipídicos y encontraron que el tamaño de los rafts lipídicos era de entre 0,2 y 2 μm [Schutz y col., 2000].

Utilizando técnicas de molécula única (SPT y/o STD) se pudo registrar el movimiento en la membrana celular de CD59, una proteína anclada a GPI, y se encontró que era prácticamente idéntico al de la dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), un fosfolípido no perteneciente a rafts. Ambos difunden rápidamente, al mismo tiempo que muestran estar confinados en compartimentos de 110 nm. En promedio, cada uno realiza un salto

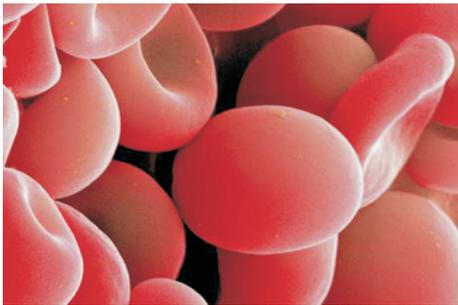
a un compartimiento nuevo cada 25 ms. Las escalas casi idénticas de confinamiento y frecuencias de saltos indican que CD59 puede asociarse únicamente con rafts pequeños con tiempos de vida muy cortos de unos pocos milisegundos [Subczynski y Kusumi, 2003].

La microscopía de fuerza atómica (AFM) constituye un enfoque prometedor para la detección de rafts. Debido a que posee una mayor resolución que la de la microscopía óptica, es capaz de discriminar diferencias de altura del orden de Angstroms (resolución vertical, la resolución horizontal suele ser por lo menos un orden de magnitud mayor) entre los dominios lipídicos. En esta técnica, una “aguja” con una punta afilada explora la superficie de la membrana en condiciones de fuerza aplicada constante, y la altura de la aguja se registra en cada posición, generando así una imagen topológica de la superficie de la membrana. Un análisis de AFM utilizando bicapas depositadas mostró la partición de la fosfatasa alcalina placentaria, una proteína anclada a GPI, en bicapas ordenadas [Saslowsky et al., 2002]. Además, otro estudio de AFM en bicapas depositadas demostró el engrosamiento de la bicapa luego de la formación de dominios ordenados [Rinia y col., 2000]. La AFM también se ha aplicado para analizar en tiempo real los efectos de la manipulación de los niveles de colesterol en membranas modelos depositadas [Lawrence y col., 2003]. Aunque la AFM tiene una resolución superior, el inconveniente de este método es que utiliza bicapas depositadas, que pueden mostrar un comportamiento perturbado bajo ciertas condiciones. [Rinia y col., 2000]. Cuando la AFM se aplicó a células vivas, como las membranas de eritrocitos, los rafts no pudieron ser analizados debido a la alta rugosidad de la superficie. Sin embargo, la estructura del esqueleto de membrana de los eritrocitos se puede detectar fácilmente [Takeuchi et al., 1998]. La agregación de proteínas en la superficie de la célula también puede ser monitoreada por AFM. Sin embargo, cuando se estudió por AFM la distribución de proteínas de membrana específicas de la superficie celular, se utilizó la inmunomarcación para obtener especificidad. Este enfoque ha sido aplicado con éxito para revelar distintos niveles jerárquicos en los dominios de la superficie celular de las moléculas de MHC de la clase I y clase II, así como la de los receptores IL-2 en células linfoides intactas [Vereb y col., 2000].

La técnica de atrapamiento óptico (*optical trapping*) también proporcionó información útil acerca de la difusión local de proteínas de rafts, revelando la resistencia viscosa impuesta a estas proteínas. En este nuevo método de microscopía, las moléculas de proteína a ser monitoreadas son marcadas con microesferas cubiertas de anticuerpos monoclonales. La esfera se confina por un láser a una pequeña superficie (de un diámetro menor a 100 nm) y las fluctuaciones térmicas en la posición de la esfera son rastreadas con una resolución espacial menor a los nanómetros y una resolución temporal del orden de

los milisegundos. Utilizando este método, se ha encontrado que la resistencia viscosa de las proteínas asociadas a rafts era mayor que las de las proteínas no pertenecientes a rafts, y que era independiente del tipo de ancla lipídica que tenían las proteínas. El radio promedio de los rafts observados en células inmunocompetentes fue estimado en alrededor de 26 nm [Pralle y col., 2000].

La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) proporciona información del coeficiente de difusión lateral así como del número absoluto de moléculas que están difundiendo. La FCS está basada en el tiempo de correlación de la fluctuación temporal de la fluorescencia detectada en volúmenes muy pequeños, lo cual está gobernado por los parámetros dinámicos del sistema. El poder de la FCS resulta de la sensibilidad para detectar moléculas únicas y de la capacidad de explorar un amplio rango de eventos dinámicos con una alta resolución temporal y una buena precisión estadística. Utilizando GUVs, Kahya y colaboradores demostraron que el colesterol juega un importante rol promoviendo la formación de rafts y en el ajuste de la movilidad de los lípidos. Con la ayuda de FCS fue posible obtener información acerca de la composición de los rafts lipídicos, permitiendo el mapeo de los diagramas de fase basados enteramente en parámetros dinámicos [Kahya et al., 2003]



CAPÍTULO 2

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
ENTRE LA MEMBRANA
ERITROCITARIA Y EL DETERGENTE
NO-IÓNICO TRITON X-100**

2.1 Introducción

Los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes), son los elementos figurados cuantitativamente más numerosos de la sangre. Son células altamente especializadas que transportan oxígeno a los tejidos periféricos y contribuyen al transporte de dióxido de carbono a los pulmones. Los eritrocitos humanos tienen una forma de disco bicóncavo, aplanado, con una depresión en el centro, de más o menos 6 a 8 μm de diámetro y de 80 a 100 fl de volumen. Carecen de núcleo y de otras organelas intracelulares rodeadas por membrana lo que lo convierte en un sistema de ideal para el estudio de las membranas biológicas. Una característica sobresaliente de los eritrocitos es su deformabilidad, la cual es necesaria para permitir el paso por los vasos capilares de los tejidos donde liberan la carga de oxígeno. El citoesqueleto, que cubre el lado citoplasmático de la membrana como una red poligonal, es el principal determinante de la forma de la célula y de estas propiedades mecánicas. Los glóbulos rojos contienen hemoglobina, que se encarga del transporte de oxígeno y del dióxido de carbono. Asimismo es el pigmento que le da el color rojo a la sangre.

Desde hace ya casi 20 años que se ha reportado la presencia de dominios de membrana en este tipo de células [Rodgers y Glaser, 1991]. Más recientemente se ha postulado que también contienen dominios de tipo raft lipídico detectados y caracterizados mediante la técnica de extracción con detergente [Civenni y col., 1998].

En el presente capítulo nos proponemos investigar las características de la interacción de la membrana eritrocitaria con el detergente Triton X-100.

2.1.1 BIOLOGÍA CELULAR DEL ERITROCITO [Yawata, 2003; Guyton y Hall, 2006]

Los eritrocitos se derivan de las células madre denominadas hemocitoblastos. La eritropoyetina, una hormona de crecimiento producida en los tejidos renales, estimula la formación de eritrocitos y es responsable de mantener una masa eritrocitaria en un estado constante. Los eritrocitos, al igual que los leucocitos, son producidos continuamente en la médula ósea de los huesos largos (en el embrión, el hígado es el principal productor de glóbulos rojos.) El bazo actúa como reservorio de eritrocitos, pero su función es algo limitada en los humanos. Sin embargo, en otros mamíferos como los perros y los caballos, el bazo libera grandes cantidades de glóbulos rojos en momentos de estrés.

Las células eritroides atraviesan numerosas etapas de desarrollo morfológico hasta convertirse finalmente en hematíes cuando ya carecen de núcleo y mitocondrias. El eritrocito está rodeado por la membrana plasmática y por un citoesqueleto cortical que subyace a ésta (ver más adelante) el cual es importante para mantener la deformabi-

lidad celular. Al envejecer la célula, la membrana se hace rígida, permeable y el eritrocito es destruido en el bazo. La vida media promedio del eritrocito normal es de 100 a 120 días. La cantidad normal de eritrocitos circulantes fluctúa entre 4.500.000 en la mujer y 5.000.000 en el hombre por milímetro cúbico y depende del sexo, edad, y ubicación geográfica. Se encuentran cantidades más altas en zonas de gran altitud, en varones y en recién nacidos. Las disminuciones por debajo del rango de referencia resultan en un estado denominado anemia. Esta alteración provoca hipoxia tisular. El aumento de la concentración de eritrocitos (eritrocitosis) es menos común.

La hemólisis es la destrucción de los eritrocitos envejecidos y sucede en los macrófagos del bazo e hígado. Los elementos esenciales, globina y hierro, son conservados y reutilizados. La fracción hemo de la molécula es catabolizada a bilirrubina y biliverdina y finalmente excretada a través del tracto intestinal. La rotura del eritrocito a nivel intravascular libera hemoglobina directamente a la sangre. Aquí, la molécula se disocia en dímeros α y β , los cuales se unen a la proteína de transporte, haptoglobina. Esta transporta los dímeros al hígado donde posteriormente son catabolizados a bilirrubina y excretados.

Los eritrocitos de los mamíferos pierden su núcleo cuando llegan a la madurez y por lo tanto su ADN (los anfibios y aves tienen eritrocitos con núcleo). Los eritrocitos también pierden sus mitocondrias y utilizan la glucosa para producir energía mediante el proceso de glucólisis seguido por la fermentación láctica. La célula ha perdido su ARN residual, así como algunas enzimas importantes; por tanto es incapaz de sintetizar nuevas proteínas o lípidos. Tampoco es capaz de realizar un recambio endocítico de la membrana.

2.1.2 LA MEMBRANA ERITROCITARIA.

Se tiene más información de la membrana del glóbulo rojo humano que de cualquier otra membrana eucariota, ya que éstos se pueden obtener en gran número y están relativamente poco contaminados por otros tipos celulares. Por otra parte, dado que no poseen ni núcleo ni orgánulos intracelulares, la única membrana que poseen es la membrana plasmática, de forma que puede ser aislada sin contaminaciones de membranas internas. Muchos principios básicos demostrados inicialmente en membranas de eritrocitos, se han generalizado a las membranas de las células nucleadas.

Su composición lipídica es asimétrica: la mayoría de las moléculas lipídicas que tienen colina en su grupo de cabeza (esto es PC y SM) se encuentran en la hemicapa exterior, mientras que la mayoría de las moléculas de fosfolípidos que contienen un grupo amino primario terminal (PE y PS) se hallan en la hemicapa interior (*figura 2.1*).

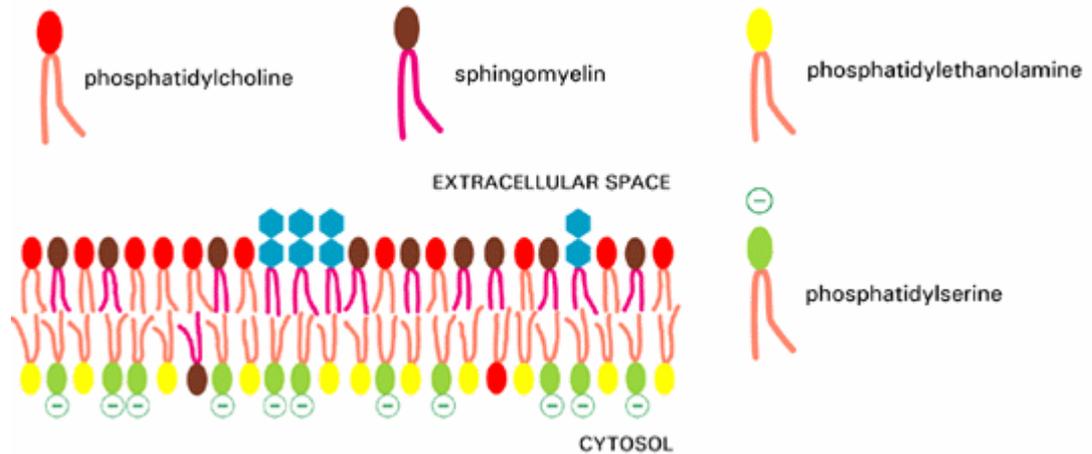


Fig. 2.1 La distribución asimétrica de los fosfolípidos y de los glicolípidos en la bicapa lipídica de los eritrocitos humanos. Los glicolípidos se han dibujado con grupos de cabeza polar de forma hexagonal (azul). Se cree que el colesterol (no dibujado) se distribuye casi en partes iguales en ambas hemicapas. [Alberts y col, 2007]

La hemicapa exterior contiene además, en forma exclusiva, moléculas lipídicas que contienen azúcares, denominadas glicolípidos. Estas constituyen aproximadamente un 5% de las moléculas lipídicas de la hemicapa exterior de prácticamente todas las membranas plasmáticas de las células animales. Los glicolípidos más complejos, los gangliósidos, contienen oligosacáridos con uno o más residuos de ácido siálico, lo que les proporciona una carga neta negativa.

Exponiendo las células a un medio hipoosmótico (en el que la concentración de sal sea mucho menor que la del interior celular), resulta fácil preparar membranas celulares de eritrocito vacías o “fantasmas” (ghosts). En estas condiciones el agua fluye hacia el interior de los eritrocitos, hinchándolos y rompiéndolos (lisis), liberando la hemoglobina (la principal proteína no perteneciente a la membrana).

Al estudiar las proteínas de la membrana plasmática del eritrocito humano mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se detectan aproximadamente 15 bandas proteicas principales, cuyos pesos moleculares oscilan entre 15.000 y 250.000. Tres de estas proteínas (la espectrina, la glicoforina y la banda 3) constituyen más del 60% (en peso) de la proteína total de la membrana (*figura 2.2*). [Alberts y col., 2007]

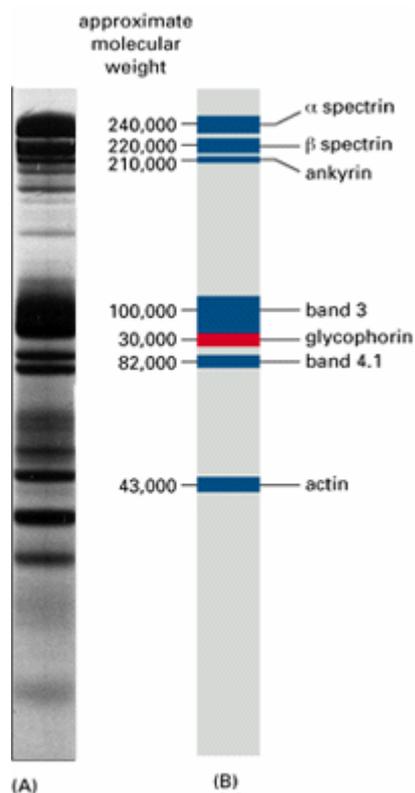


Fig. 2.2: Patrón de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las proteínas de la membrana de eritrocitos humanos. El gel en (A) está teñido con Coomassie. El dibujo (B) indica la posición en el gel de algunas de las proteínas mayoritarias: la glicoforina se muestra en color rojo para distinguirla de la proteína banda 3. En el dibujo se han omitido otras bandas del gel. La gran cantidad de carbohidratos de la molécula de glicoforina retarda su migración, por lo que se desplaza casi tan lentamente como las moléculas de la proteína banda 3, que son mucho mayores. [Alberts y col., 2007]

La espectrina, junto con la actina, son los componentes principales del citoesqueleto cortical en los eritrocitos, que proporciona la base estructural de la célula. La espectrina eritrocitaria es un tetrámero constituido por dos cadenas polipeptídicas diferentes, denominadas α y β , con un peso molecular de 240 y 220 kDa, respectivamente. La cadena β presenta un único dominio de unión a la actina en la región amino terminal. Las cadenas α y β se asocian lateralmente para formar dímeros que se unen cabeza con cabeza para formar tetrámeros con dos dominios de unión a la actina separados aproximadamente por 200 nm. Los extremos de los tetrámeros de espectrina se asocian con filamentos cortos de actina, dando como resultado una red de espectrina-actina que forma el citoesqueleto cortical de los glóbulos rojos (*figura 2.3*). Debido a que los eritrocitos humanos carecen de otros componentes citoesqueléticos (microtúbulos o filamentos intermedios), el citoesqueleto cortical de espectrina-actina es el determinante principal de su morfología característica en forma de discos bicóncavos [Cooper y col., 2000].

Todo el citoesqueleto está dispuesto por debajo de la membrana formando una red de polígonos unidos (*figura 2.3*). Cada lado de los polígonos está compuesto de un tetrámero de espectrina, que se extiende desde un vértice al otro. Cada vértice consiste de un filamento corto de actina (14-subunidades) además de adducina, tropomiosina, tropomodulina y la proteína banda 4.1 (*figura 2.3A, recuadro*). Las últimas dos proteínas fortalecen la red previniendo la despolimerización de los filamentos de actina.

Para mantener la forma característica del eritrocito, el citoesqueleto de espectrina-actina está firmemente unido a la membrana plasmática por dos proteínas periféricas, cada una de las cuales se une a una proteína de membrana específica y a los fosfolípidos de membrana. La anquirina conecta el centro de la espectrina a la proteína integral banda 3, una proteína de transporte de aniones en la membrana. La proteína banda 4.1, un componente de los vértices de la red, se une a la proteína integral glicoforina. Por otra parte, tanto la anquirina como la banda 4.1 contienen motivos de unión a lípidos, que ayudan a unirlos a la membrana. Esta unión doble a través de la anquirina y la banda 4.1 garantiza que la membrana está conectada tanto a los lados como a los vértices de la red del citoesqueleto de espectrina y actina (véase la *figura 2.3B*) [Lodish y col., 2008].

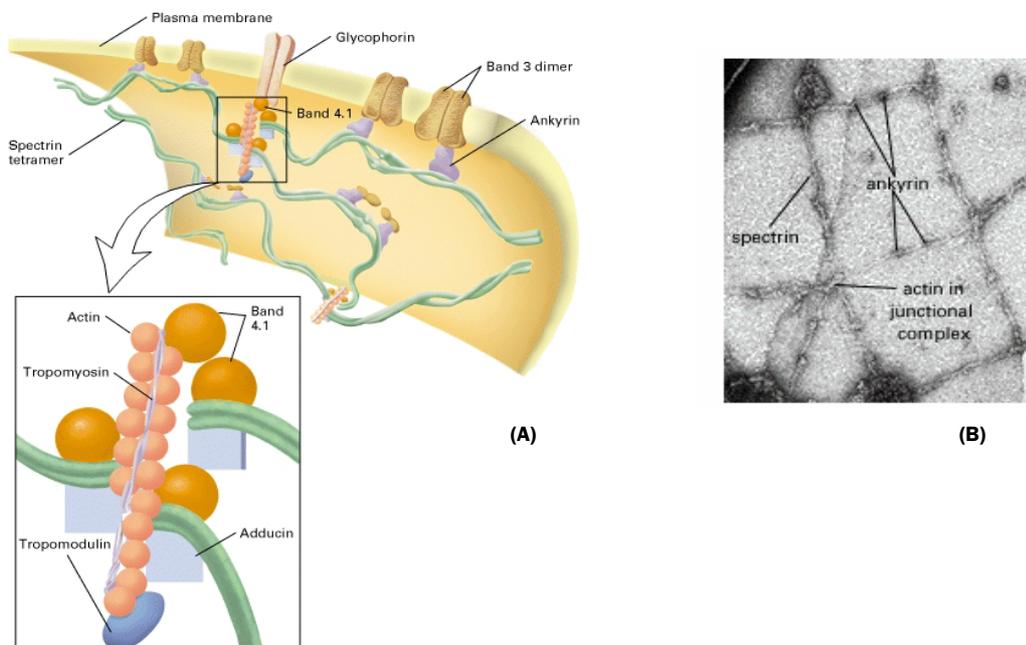


Fig. 2.3: El citoesqueleto del eritrocito humano. Dibujo esquemático (A) y electromicrografía (B). La disposición que se muestra en (A) se ha deducido principalmente a partir de estudios sobre las interacciones *in vitro* de las proteínas purificadas. Los dímeros de espectrina asociados cabeza con cabeza forman tetrámeros que se hallan unidos formando una red por medio de complejos de unión compuestos de cortos filamentos de actina (que contienen unos 14 monómeros de actina), tropomiosina, proteína banda 4.1 y aducina (aumentado en la casilla de la izquierda). El citoesqueleto está unido al lado citoplasmático de la membrana mediante la unión indirecta de los tetrámeros de espectrina a la proteína banda 3, a través de moléculas de anquirina y también por medio de la unión de banda 4.1 a la glicoforina (no se muestra). La electromicrografía de (B) muestra el citoesqueleto del eritrocito después de su fijación y su tinción negativa. La red de espectrina se ha estirado a propósito para permitir observar los detalles de su estructura: en la célula normal, la trama mostrada debe ocupar únicamente una décima parte de esta área. [Lodish y col., 2008; Alberts y col., 2007]

Otros tipos de células contienen uniones entre el citoesqueleto cortical y la membrana plasmática que son similares a las observadas en los glóbulos rojos. Las proteínas relacionadas con la espectrina (la espectrina no-eritroide también se denomina fodrina), la anquirina, y la proteína 4.1 se expresan en una gran variedad de tipos celulares, donde rea-

lizan funciones análogas a las descritas para los eritrocitos. Por ejemplo, una familia de proteínas relacionada con la proteína 4.1 (las proteínas ERM) unen los filamentos de actina a la membrana plasmática de muchas clases de células, y la proteína filamina, similar a la espectrina constituye el principal puente entre los filamentos de actina y la membrana plasmática de las plaquetas sanguíneas. [Cooper y col., 2000]

2.1.3 DOMINIOS DE MEMBRANA EN EL ERITROCITO

La obtención de membranas resistentes a detergente (DRMs) a partir de eritrocitos, y estudios en sistemas modelo de membrana con una composición lipídica específica de eritrocitos sugieren la existencia de rafts lipídicos en la membrana eritrocitaria.

El antecedente más antiguo de estudios de solubilización de la membrana eritrocitaria con detergente es un trabajo de hace casi 40 años, donde se muestra que luego de la extracción con el detergente no iónico Triton X-100, los glicerofosfolípidos eran solubilizados, mientras que los esfingolípidos permanecían asociados al “residuo de ghosts insoluble al detergente”. Al ser estudiados por microscopía electrónica, estos residuos de membrana parecían ser un “retículo filamentoso con vesículas y láminas lipídicas adheridas” [Yu y col., 1973]. Más recientemente, y a la luz del modelo de rafts lipídicos planteado [Simons e Ikonen, 1997], se han realizado numerosos experimentos de obtención y análisis de DRMs a partir de eritrocitos [Civenni y col., 1998; Lauer y col., 2000; Salzer y Prohaska, 2001]. En estos trabajos se muestra como las DRMs se encuentran enriquecidas en colesterol y esfingolípidos y en un subconjunto específico de proteínas [revisado en Murphy y col., 2006]

La caracterización de DRMs es el principal enfoque en la investigación de rafts en eritrocitos, debido a que resulta muy dificultoso o directamente imposible aplicar otro tipo de métodos a estas células [Salzer y col., 2007].

Por otra parte, existen estudios realizados en membranas modelo que sugieren que en la membrana del eritrocito podrían coexistir lípidos en fase L_c y L_o [Keller y col., 1998]. Este estudio sugiere que la bicapa del eritrocito esta cerca de un punto crítico de miscibilidad lo cual debería afectar significativamente las propiedades biofísicas de la membrana.

Un aspecto importante acerca de la composición de las DRMs de eritrocitos es el de la posible asociación de los componentes del citoesqueleto cortical a las fracciones resistentes al detergente. Ciertos autores reportan la ausencia de espectrina, actina, proteína 4.2 y proteína 4.1 en las DRMs [Samuel y col., 2001; Murphy y col., 2004]. Sin embargo otros trabajos reportan la presencia de estas proteínas en la fracción insoluble, las cuales aparecen flotando a densidades comparativamente mayores, en el gradiente de densi-

dad [Salzer y Prohaska, 2001; Ciana y col., 2005]. En estos trabajos también se reporta el hecho de que un tratamiento con carbonato de sodio (por su efecto de aumentar la fuerza iónica y el pH del medio) desestabiliza las interacciones que mantienen unida la red del citoesqueleto.

Salzer y colaboradores han encontrado una fuerte asociación entre el citoesqueleto y las DRMs, y concluyen que el citoesqueleto está involucrado en la regulación de los rafts lipídicos, presumiblemente influyendo en la movilidad, la estabilidad y el tamaño de estos dominios [Salzer y col., 2007].

Es interesante notar a este respecto la notable variabilidad y relativa imprecisión en los protocolos experimentales utilizados en la obtención de DRMs, no sólo a partir de eritrocitos sino de una gran cantidad de tipos celulares, en los cuales se incluye no sólo el tratamiento con agentes que alteran la fuerza iónica y/o el pH, sino también el uso de métodos físicos para generar un estrés mecánico.

Se ha propuesto que, en los eritrocitos, los rafts lipídicos están involucrados en el proceso de exovesiculación. Los rafts pueden agregarse específicamente en regiones de la membrana que se encuentran desacopladas del citoesqueleto y se cree que ciertos dominios rafts lo suficientemente grandes forman espontáneamente gemaciones esféricas que minimizan la tensión de línea en el límite entre las fases lipídicas. Se ha sugerido que los eritrocitos “aprovechan” esta propiedad de coexistencia de fases en su estrategia de defensa contra la lisis mediada por complemento emitiendo exovesículas que contienen el complejo de ataque a la membrana (MAC) [Hagerstrand y col., 2006].

También se ha propuesto que el parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*, utiliza un mecanismo similar para transformar sectores de la membrana del eritrocito en una membrana vacuolar parasitófora (PVM, por Parasitophorous Vacuolar Membrane) durante la infección del eritrocito [Lauer y col., 2000].

2.1.4 OBJETIVOS

El objetivo central de esta parte del trabajo es investigar la interacción del detergente no iónico Triton X-100 con la membrana del eritrocito y analizar el proceso de solubilización de los principales componentes de la membrana plasmática, ya que este proceso constituye la base de la obtención de DRMs en el estudio de los rafts lipídicos. Para poder separar toda la fracción insoluble de los componentes solubilizados, empleamos un paso de microcentrifugación de la suspensión de células tratadas con el detergente. Este detalle experimental nos permitió analizar ciertas particularidades del proceso de extracción de la membrana eritrocitaria con el detergente, y al mismo tiempo, llevar a cabo un estudio más directo de la fracción insoluble por medio de técnicas espectroscópicas.

Llamaremos a esta fracción insoluble DRM, al igual que las aisladas mediante ultracentrifugación, aclarando en cada caso el método de obtención utilizado.

Una vez aislada la fracción insoluble al Triton nos proponemos:

- Analizar la composición proteica y lipídica de estas DRMs, obtenidas a partir de eritrocitos humanos
- Caracterizar el ordenamiento lipídico de estas fracciones resistentes al detergente
- Estudiar el efecto de un aumento de la proporción de Triton utilizado en el aislamiento de DRMs
- Analizar el comportamiento frente al Triton X-100 de la membrana eritrocitaria bovina (que posee un gran contenido de SM) y de las membranas de eritrocitos humanos y bovinos previamente reducidas en su contenido de colesterol, con el objetivo de estudiar el papel de la esfingomielina y del colesterol (dos de los lípidos fundamentales en la formación de dominios lipídicos en las membranas) en la resistencia al detergente.
- Estudiar la relación entre la composición lipídica, el ordenamiento de la membrana y la susceptibilidad a la acción del detergente.
- Aislar DRMs utilizando el protocolo convencional, las cuales se obtienen flotando a baja densidad en el gradiente de sacarosa generado por ultracentrifugación, caracterizar el ordenamiento lipídico de estas membranas y compararlo con las DRMs aisladas por microcentrifugación.

Finalmente, en la *sección 2.4* discutiremos los resultados obtenidos, la importancia de los aspectos experimentales de la obtención de las DRMs, y la relevancia de estos resultados en la discusión acerca de la hipótesis de rafts lipídicos.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 MATERIALES

El detergente no iónico Triton X-100 y la metil- β -ciclodextrina (M β CD) fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, EE.UU.). Los lípidos puros son de Sigma y de Avanti Polar lipids (Alabaster, EE.UU.). Los marcadores de espín liposolubles, isómeros posicionales de n-ácido esteárico 5 -, 12 - y 16-SASL, son de Sigma. Los disolventes, sales inorgánicas y todos los demás productos químicos fueron de la más alta pureza disponible. Las placas para cromatografía en capa delgada son de Sigma. Se utilizó un kit enzimático comercial (Wiener Lab., Rosario, Argentina) para las determinaciones de colesterol. Para la realización de la curva de calibrado en el ensayo de cuantificación de proteínas se utilizó como estándar albúmina sérica bovina (BSA, Sigma). Todos los reactivos utilizados en la preparación del reactivo de color fueron de calidad analítica (Merck). Los reactivos utilizados en la preparación de los geles de poliacrilamida, buffer de muestra, soluciones colorantes y decolorantes, fueron de calidad analítica (Sigma, Fluka AG, Merck y Cicarelli). Las proporciones para la preparación de las distintas soluciones son las descritas en [Graham y Higgins, 1993]

2.2.2 SEPARACIÓN DE LOS ERITROCITOS

La sangre bovina fue obtenida a partir de la punción venosa de terneros Holstein (edad media: 2 meses) y se utilizó antes de las 48 horas de la extracción. Las muestras frescas de sangre humana se recogieron a partir de donantes sanos entre personal de laboratorio. En ambos casos, se utilizó heparina como anticoagulante. Los eritrocitos fueron separados del plasma y de la capa leucocitaria por centrifugación a 1500 g, 5min, y tres lavados en buffer Tris salino isotónico (TBS: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 7,4).

2.2.3 OBTENCIÓN DE GHOSTS A PARTIR DE ERITROCITOS HUMANOS.

A un volumen de eritrocitos lavados se le agregaron 10 volúmenes de buffer Tris hipotónico TBh (10 mM Tris, pH 7,4) para provocar su hemólisis. Posteriormente se centrifugó a 18000xg, 4°C, durante 30 minutos en microcentrífuga refrigerada (Microfuge 22R, Beckman Coulter) y se descartó el sobrenadante, obteniéndose un pellet rojizo. Luego se le realizaron 3 lavados (con un volumen igual al del sobrenadante descartado) con buffer TBh seguidos de separación por centrifugación a 18000g, 4°C, durante 15 minutos. Finalmente se obtuvo un pellet blanquecino. Este procedimiento de obtención

de membranas libres de contenido celular (ghosts) se realizó tanto en eritrocitos control como en los previamente reducidos en su contenido de colesterol (véase *sección 2.2.4*).

2.2.4 REDUCCIÓN DEL CONTENIDO DE COLESTEROL EN MEMBRANAS DE ERITROCITOS CON METIL- β -CICLODEXTRINA

La M β CD es un agente eficaz para reducir el colesterol de cultivos y suspensión de células [Rivas y Gennaro, 2003; Ohtani y col., 1989; Yancey y col., 1996; Christian y col., 1997]. Se ha demostrado que la M β CD no se incorpora en las membranas tratadas [Yancey y col., 1996]. Los eritrocitos humanos o bovinos lavados y empaquetados fueron incubados en una concentración del 5% (v / v) en una solución 3 mM M β CD en TBS a 37 ° C, con mezcla ocasional. Eritrocitos control se incubaron en TBS en las mismas condiciones. Después de 30 min. de incubación, se centrifugaron durante 3 min. a 1500 g, y los eritrocitos pelleteados fueron lavados con TBS. La incubación en estas condiciones con M β CD provocó una reducción del 46% del colesterol en los eritrocitos humanos y de 35% en los eritrocitos bovinos, sin modificaciones en el contenido de fosfolípidos.

2.2.5 OBTENCIÓN DE MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTE DE ERITROCITOS.

En el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizó, fundamentalmente, un protocolo de trabajo consistente en el aislamiento de la fracción resistente al detergente mediante microcentrifugación (Protocolo experimental I). Sin embargo, con el objetivo de estudiar las características de la interacción entre las membranas y el detergente se utilizó también un segundo protocolo experimental basado en la separación de la fracción resistente a detergente mediante un gradiente de densidad generado por ultracentrifugación en presencia de sacarosa, que es el que se considera método "estándar" para la obtención de DRMs (Protocolo experimental II).

a) Protocolo experimental I

Un volumen de eritrocitos lavados y empaquetados y lavados se incubó en hielo durante 20 min en 4 vol. de una solución de TBS de los detergentes no iónicos Triton X-100. Las siguientes concentraciones de detergente (w / v) fueron utilizadas para estudios de EPR y de lípidos: 1%, 2%, 3%, 4%, 6% y 10%. Una gama más amplia y detallada de concentraciones se utilizó para cuantificar el rendimiento de material insoluble. Tenien-

do en cuenta el contenido de colesterol y fosfolípidos de la membrana original, tanto de eritrocitos humanos como bovinos (ver *sección 2.2.6*), la relación molar detergente/lípidos totales se puede estimar en torno a 12 para la solución 1% de Triton, aumentando proporcionalmente en las diferentes concentraciones de detergente. Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas en una microcentrífuga a 18000g, 4 ° C durante 30min, y el precipitado insoluble se lavó por lo menos 3 veces en TBS y se centrifugó de la misma manera. El aspecto final del pellet fue el de un gel de color amarillento y el volumen disminuyó con la concentración de detergente. Una inspección visual determinó una apariencia turbia con las concentraciones más bajas de detergente, pero esta turbidez disminuyó con el aumento de la concentración de detergente, y el pellet obtenido con un 10% de Tritón fue completamente transparente.

El mismo procedimiento de extracción se aplicó a eritrocitos reducidos en colesterol por tratamiento previo con M β CD (véase *sección 2.2.4*). En este caso, la relación detergente lípido no se modifica significativamente debido a que los eritrocitos reducidos en colesterol muestran un grado de empaquetamiento superior a los eritrocitos intactos.

b) Protocolo experimental II

Se llevó a cabo la obtención de DRMs utilizando diferentes concentraciones de TX-100: 1, 2, 6 y 10 % (w/v).

A 200 μ l de paquete celular (en frío) se le agregó 800 μ l de solución de Triton (también en frío). Se incubó en hielo durante 30'.

Luego de la incubación, al volumen de muestra con el Triton X-100 incorporado (1ml en total) se le agregó 1ml de sacarosa 80%, para obtener 2 ml de una solución de sacarosa al 40%.

En los tubos de centrífuga (de policarbonato) se cargó 1 ml de sacarosa 5%. Luego, desde abajo del tubo y con una jeringa se cargó 2,2 ml de sacarosa 35%. Y finalmente se cargó 1ml de la solución de extracción (correspondiente a 100 μ l de eritrocitos de partida), también desde el fondo con jeringa. De este modo, se formó un gradiente discontinuo de densidad. Los tubos se centrifugaron 18 hs a 40000 rpm en un rotor Beckman SW60 Ti (g max 215.578) a 4 °C.

Luego de la centrifugación se colectaron 12 fracciones de 330 μ l c/u tomando desde la superficie y un 13° tubo con la última fracción del gradiente y el pellet del fondo del tubo. A simple vista se observaron 2 bandas muy tenues en una zona de densidad intermedia correspondiente a 35% de sacarosa sólo en el tubo correspondiente a 1% de Triton. En los otros tubos no se observó presencia de bandas flotantes.

Una variante de este protocolo incluyó el agregado de Na_2CO_3 0,3 M [Ciana y col., 2005] para desestabilizar el citoesqueleto cortical del eritrocito. El resto del procedimiento fue idéntico al mencionado más arriba. En este caso se pudo observar la presencia de una banda blanquecina flotando en la zona de la interfase 5/35 % en el tubo correspondiente a 1% de Triton que se separó del gradiente, junto con la fracción 13^o para posterior análisis. En los tubos correspondientes a concentraciones mayores de Triton no se observó ninguna banda.

2.2.6 CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

a) Extracción lipídica

Los lípidos de las membranas eritrocitarias o del material insoluble fueron extraídos por el método de Rose y Oklander [Rose y Oklander, 1965]. Brevemente, a 100 μl de muestra se le agregó 140 μl de agua destilada. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió 2,64 ml (11 vol.) de 2-propanol con agitación. Después de 1 h de incubación, 1,92 ml (7 vol.) de cloroformo fue añadido mientras se agitaba el tubo, y después de 1 h de incubación, la suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 2700 g, se recuperó el sobrenadante y se evaporó bajo corriente suave de aire comprimido hasta sequedad produciendo un extracto seco de lípidos. En la extracción de los pellets de material insoluble al detergente se omitió el agregado inicial de agua, ajustando proporcionalmente el volumen de solventes orgánicos.

b) Cuantificación de Fosfolípidos

El contenido de fosfolípidos totales de las muestras fue determinado cuantificando el fósforo inorgánico (Pi) de acuerdo con el método de Rouser [Rouser y col., 1970]. Brevemente, 650 μl de ácido perclórico se añadió al residuo seco de lípidos y los tubos se calentaron a 180°C en baño de arena hasta que el color amarillo desapareció. Después de añadir 3,3 ml de agua, 0,5 ml de molibdato de amonio 2,5%, y 0,5 ml de ácido ascórbico 10 %, los tubos fueron colocados en un baño de agua hirviendo. La absorbancia de las muestras fue leída a 800 nm, y el contenido de Pi cuantificado con estándares de KH_2PO_4 en diluciones adecuadas. Los ensayos se realizaron por triplicado. El contenido de fósforo del material resistente al detergente se normalizó al contenido de fósforo de las correspondientes membranas originales, que se consideró como 100%.

c) Estimación de la proporción de fosfolípidos individuales por TLC.

Los porcentajes de fosfolípidos individuales se cuantificaron mediante cromatografía en capa fina (TLC). Las placas de TLC fueron pre-lavadas con cloroformo / metanol / agua 60: 35: 8, y luego activadas a 100° C durante 30 min. Se prepararon mezclas de lípidos estándar (1, 3, 6 o 12 µg de DPPC, SM y Col) a partir de soluciones stock. Las muestras y los estándares fueron depositados por duplicado y corridas en un tanque cerrado previamente equilibrado conteniendo cloroformo / metanol / agua 60:25: 4. Las placas se colorearon con azul brillante Coomassie [Nakamura y Handa, 1984], y fueron escaneadas y analizadas por densitometría con el software libre de V-Scion Image (versión beta).

d) Cuantificación de Colesterol

El colesterol se cuantificó con un ensayo enzimático (Colestat Kit, Wiener Lab., Rosario. Argentina). Un volumen de alcohol isopropílico y de reactivo de colesterol se añadió al extracto seco de lípidos de cada muestra. Después de eso, los tubos fueron colocados en un baño de agua caliente. La absorbancia se leyó a 500 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.2.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN DRM.

Las proteínas totales de ghosts y de pellet insoluble a detergente se cuantificaron por el método de Bradford modificado [Stoscheck, 1990a]. El ensayo convencional de Bradford puede dar valores de concentración de proteínas menores a los reales cuando las mismas se encuentran en membranas. El tratamiento de las muestras con agentes desestabilizantes de membranas, tales como urea, NaOH u otros detergentes, puede reducir este problema [Kirazov y col., 1993]. Además, la variación del pH provocada por el agregado de NaOH reduce la variación de la sensibilidad a proteínas individuales observada para esta técnica [Stoscheck, 1990b]. De esta manera se pudo tener una razonable seguridad de que el contenido de proteína en las muestras sembradas en los geles de SDS-PAGE (véase *sección 2.2.8*) fueran similares y comparables.

Se utilizó como estándar albúmina sérica bovina (BSA, Sigma). Todos los reactivos utilizados en la preparación del reactivo de color fueron de calidad analítica (Merck). Debido a que el contenido de humedad de la BSA sólida puede variar durante el almacenamiento, la concentración precisa de proteínas en la solución madre se determinó por medida de su absorbancia a 280nm, dando el valor esperado de 0.66 [Kruger, 1994].

Para la preparación de 500ml del reactivo de color, se disolvieron 50mg de Coomassie Brilliant Blue en 23,8ml de etanol al 95%, luego se agregaron 50ml de ácido fosfórico 85% y c.s.p de agua destilada. La solución resultante fue filtrada con un filtro de nitrato de celulosa de 0,2 μ m. A 20 μ l de las muestras se le agregó 1ml de reactivo de Bradford y 50 μ l de NaOH. Posteriormente a la incubación se determinó la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20, contra blanco de reactivo y en muestras por triplicado.

2.2.8 CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN PROTEICO POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

La caracterización del patrón proteico se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% T (2,7%C) y al 6% T (2,7%C). Alícuotas de ghosts o DRMs fueron diluidas en buffer de muestra en la proporción adecuada de manera de tener entre 12 y 25 μ g de proteínas totales sembradas en cada calle, y hervidas durante 1 minuto. Se utilizó un kit de marcadores de bajo peso molecular (LMW, para los geles de 10%) y otro de marcadores de alto peso molecular (HMW, para los geles de 6%) adquiridos de Amersham Pharmacia, los cuales fueron reconstituidos según especificaciones del proveedor. Las muestras tratadas fueron sembradas en volúmenes calculados para contener cantidades aproximadamente iguales de proteínas totales (Método de Bradford modificado, véase *sección 2.2.7*), y posteriormente corridas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 200V en baño de hielo durante aproximadamente 1 hora (equipo para electroforesis vertical BIORAD).

El revelado de los geles se realizó con una solución colorante compuesta por Coomassie Blue (0.1% p/v), ácido acético, metanol, y agua destilada (1:4:5), durante 15 minutos. Para la decoloración se utilizó una solución conteniendo metanol, ácido acético y agua destilada (2:3:35).

Luego los geles fueron escaneados y las imágenes digitales se analizaron con el software libre de V-Scion Image (versión beta) para obtener los densitogramas correspondientes a cada muestra.

2.2.9 EXPERIMENTOS DE EPR Y ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizaron los marcadores de espín liposolubles n-doxil- ácido esteárico (n-SASL, con n= 5, 12 o 16), que poseen un radical libre estable nitróxido en la posición n = 5, 12 o

16 de la cadena de ácido esteárico (adquiridos a Sigma). Se prepararon soluciones madre (8,67 mM) en etanol (Merck), que se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La incorporación del marcador de espín en las muestras se realizó de la siguiente manera: primeramente se depositó en un eppendorf una cantidad de la solución madre conteniendo 1 % molar de los lípidos totales a marcar (en casos especiales se utilizó un 3%) y se dejó evaporar el solvente (etanol absoluto). Luego se incorporó la suspensión de membranas (eritrocitos, ghosts o DRMs) y se incubó la mezcla a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Cumplido el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 1500 g durante 5 minutos (si la muestra era de eritrocitos) o a 16000 g durante 10 minutos (si la muestra era de DRMs o ghosts) y el sobrenadante fue descartado de manera de eliminar el marcador no incorporado. Los espectros de EPR fueron registrados a $25 (\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a 9.7 GHz (banda X) en un espectrómetro Bruker ER 200. Las muestras fueron ubicadas en capilares de vidrio, sellados en un extremo y ubicadas en tubos de cuarzo de 4 mm de diámetro exterior. La frecuencia de modulación del campo fue de 100 KHz y la amplitud del campo de modulación se mantuvo siempre por debajo del 30% de los anchos de línea, para evitar distorsionar los espectros por sobremodulación. El campo central fue de 3340 G y se barrieron 100G en 200 segundos.

Los espectros de EPR obtenidos permitieron evaluar los parámetros hiperfinos A_{MAX} y A_{MIN} a distintas profundidades de la bicapa lipídica, a partir de los cuales puede calcularse el parámetro de orden aparente S_{APP} [Griffith y Jost, 1976; Berliner y Reuben, 1989].

2.3 Resultados

2.3.1 TRATAMIENTO DE ERITROCITOS HUMANOS CON TRITON X-100

Se incubaron eritrocitos humanos con 1% de Triton y se aisló la fracción insoluble mediante microcentrifugación (ver *sección 2.2.5*). La composición y las propiedades de esta fracción insoluble al detergente (DRM) fueron analizadas mediante diversas técnicas.

a) Caracterización del patrón proteico en dominios resistentes a detergente mediante SDS-PAGE

En la *figura 2.4* se muestran algunos de los geles obtenidos al correr las muestras de ghosts de eritrocitos humanos y sus DRMs y separarlas por SDS-PAGE. En la imagen aparecen tanto los geles correspondientes a 6% como a 10% de bisacrilamida. Debido a las diferencias en el desarrollo de cada una de las experiencias (tiempo y extensión de la corrida, calidad de los geles, etc.) cada una de las calles fue comparada con el marcador de peso molecular sembrado en el mismo gel, y se evaluaron de esta manera los pesos moleculares aproximados de cada una de las bandas (para lo cual se procedió a realizar una curva de calibrado con los Rf de cada una de las bandas del marcador de peso molecular).

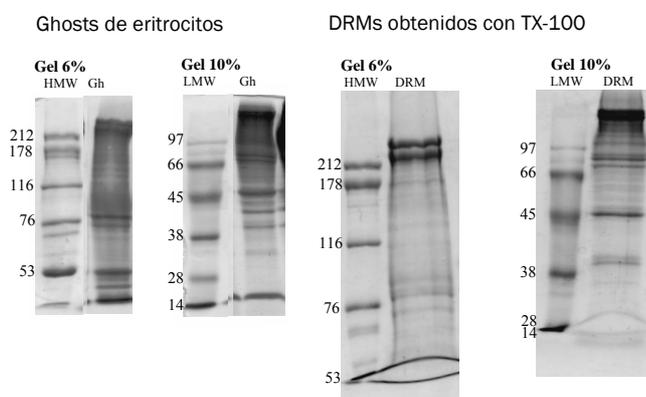


Fig. 2.4: Geles correspondientes a algunas de los ensayos de SDS- PAGE. Aquí se muestran las imágenes obtenidas a partir de ghosts de eritrocitos humanos y los DRMs obtenidos a partir de ellos, y cada uno de los tipos de geles (los geles de 6% no se utilizaron luego para obtener resultados). Gh: ghosts de eritrocitos. DRM: fracción de la membrana del eritrocito insoluble a detergente. HMW: Marcador de alto peso molecular. LMW: Marcador de bajo peso molecular.

Como el rango de pesos moleculares de las proteínas presentes en la membrana del eritrocito es muy amplio, se decidió en principio utilizar dos tipos de geles con diferentes porcentajes de bisacrilamida. Sin embargo, resultó de mayor utilidad el de 10% ya que permite lograr una correcta separación de los polipéptidos de menor peso molecular, a diferencia del de 6%. Por otro lado, aunque los polipéptidos de más de 100 kDa no migraban de acuerdo a su peso molecular en este gel, lo mismo podían ser separados e identificados satisfactoriamente. Debido a esto se analizaron principalmente los geles de 10 %.

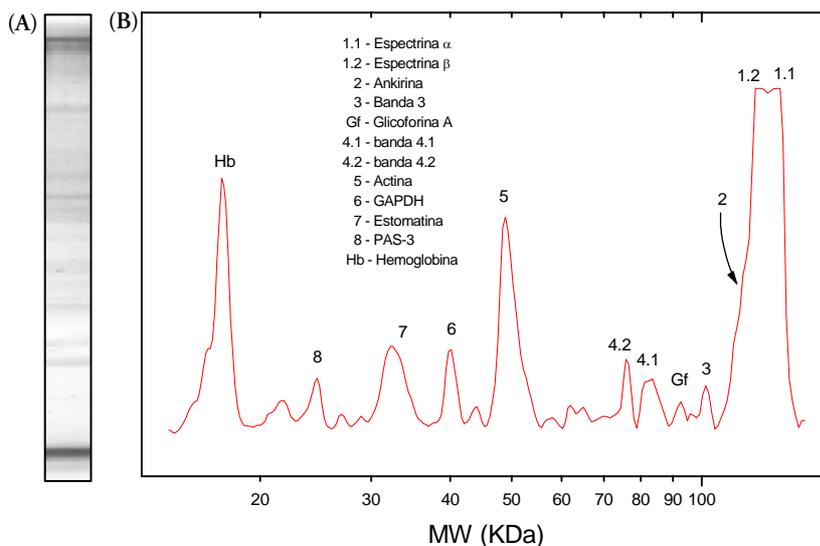


Fig. 2.5 Gel de SDS-PAGE (A) y densitograma (B) correspondiente a una muestra de ghosts de eritrocitos. En (B) se indica también la asignación tentativa a cada una de las bandas según su peso molecular esperado. (Se ha omitido de la imagen A la calle correspondiente al marcador de peso molecular).

La *figura 2.5* muestra el análisis por SDS-PAGE de las muestras de ghosts de eritrocitos. Aquí se puede realizar una identificación tentativa de cada una de las bandas, a través de su peso molecular, por comparación con datos bibliográficos [Alberts y col., 2007; Voet y Voet, 1995; Yawata, 2003]. También se muestra aquí el densitograma correspondiente al gel.

A pesar de que el patrón es muy complejo, se pueden observar claramente dos bandas a 120 y 130 kDa (tentativamente asignadas a las espectrina α y β) y otra a 45 kDa (posiblemente actina), presentes en gran proporción. También aparece una serie de bandas de menor intensidad a 102, 92, 83, 76, 40, 32, 25 kDa que podrían corresponder a la banda 3, la glicoforina A, las bandas 4.1 y 4.2, la GAPDH, la estomatina, y la PAS-3 (glicoforina B), respectivamente. Además se observa una importante cantidad de monómeros de hemoglobina que no lograron eliminarse en el proceso de preparación de los ghosts.

En la *figura 2.6* se pueden observar los geles correspondientes a la muestra de DRMs obtenida con TX-100 comparada con el correspondiente a ghosts de eritrocitos.

A grandes rasgos se observa en las DRM la presencia de la mayoría de las bandas presentes en la membrana plasmática original. Sin embargo parecen estar ausentes (o más probablemente en muy baja proporción) las bandas tentativamente asignadas a la GAPDH (proteína periférica) y la PAS-3 (glicoforina B, proteína integral), ninguna de las dos reportada como marcadora de rafts.

Es importante notar que en las muestras de DRM se puede observar claramente la presencia de actina y espectrina (principales componentes del citoesqueleto cortical). Esto implica que estas proteínas permanecen asociadas al material resistente a detergente y se aíslan en el pellet insoluble.

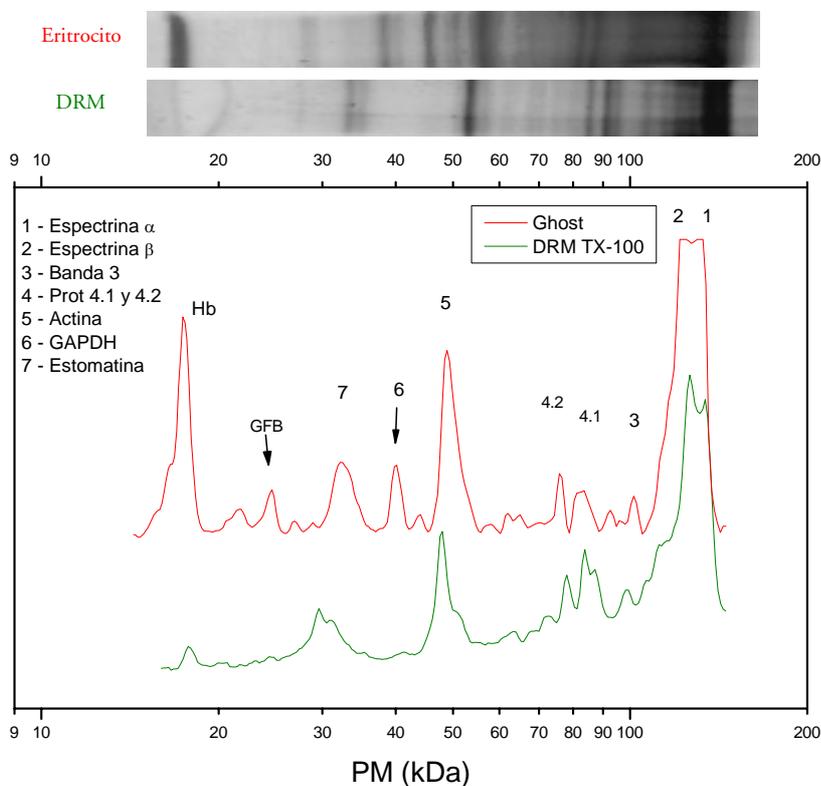


Fig. 2.6: Geles y densitogramas de: ghost de eritrocitos humanos y de DRMs obtenidos con TX-100 (Las imágenes corresponden a diferentes geles y fueron normalizadas con los marcadores de PM.). En el gráfico también se señala una asignación tentativa (por pesos moleculares) de cada una de las bandas

b) Composición lipídica

Mediante TLC se determinó la composición lipídica de la membrana del eritrocito y del material insoluble a detergente.

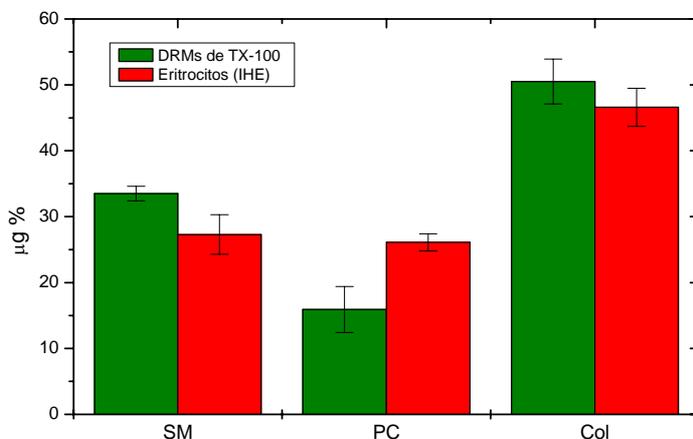


Fig. 2.7: Composición lipídica en masa de DRMs de TX-100 (n=7) obtenidos a partir de eritrocitos humanos comparada con la de la membrana de eritrocitos intactos (n=6). SM: esfingomielina; PC:fosfatidilcolina; Col: Colesterol. El 100% en masa corresponde a la suma de estos 3 componentes

En la *figura 2.7* se presentan los resultados correspondientes a las DRMs (material insoluble) obtenidos por tratamiento con 1% de TX-100 comparados con la membrana del glóbulo rojo humano. Como se ve, en DRMs el contenido de esfingomielina y de colesterol es superior al de la membrana eritrocitaria mientras que el porcentaje de PC es menor.

c) Ordenamiento lipídico por EPR

Se incorporaron a la membrana de eritrocitos y a las DRMs los marcadores de espín liposolubles 5-, 12- y 16-SASL. Esto permitió determinar el orden dinámico de la bicapa lipídica. En la *figura 2.8* se muestran los resultados obtenidos

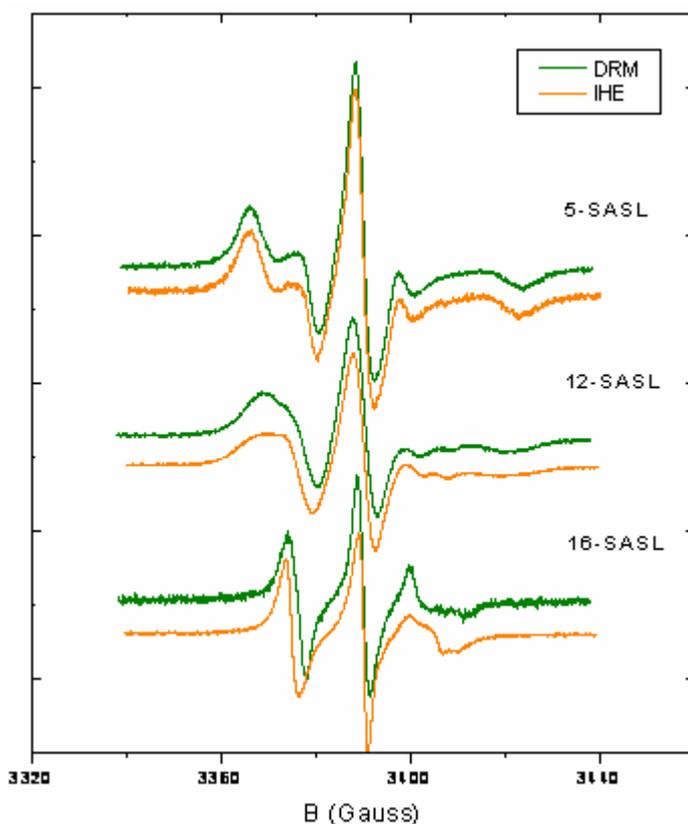


Fig. 2.8: Espectros de EPR de los marcadores de espín de ácido esteárico (5-, 12-, y 16-SASL) incorporados a los DRMs obtenidos a partir de eritrocitos por incubación con 1% de TX-100 (DRM, verde) junto con los espectros correspondientes a la membrana de los eritrocitos intactos (IHE, anaranjado). T= 25°C

En la *figura 2.9* se grafican los parámetros de orden obtenidos a partir de los espectros de EPR. Se observa que las DRMs tienen mayor parámetro de orden que la membrana de eritrocitos, indicando que las cadenas acílicas en las DRM se encuentran más ordenadas que en la membrana eritrocitaria original.

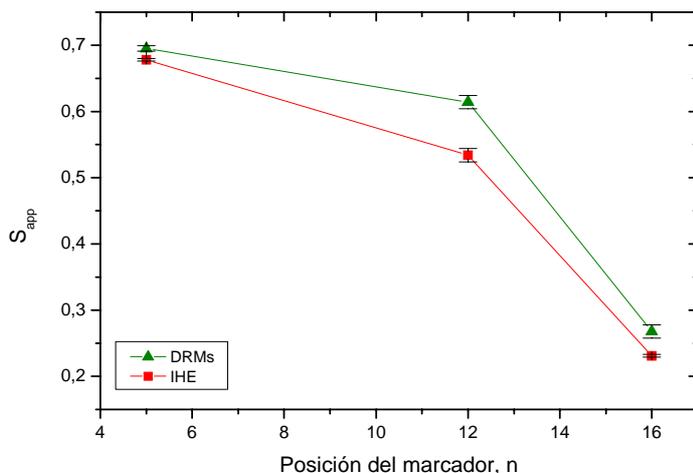


Fig. 2.9: Gradiente de flexibilidad de los marcadores de espín liposolubles en la membrana de eritrocitos humanos intactos (IHE, anaranjado) y en los DRMs obtenidos a partir de ellos (verde)

d) ¿Qué pasa si aumentamos la concentración de Triton X-100?

Para comenzar a estudiar el efecto del Triton sobre la membrana eritrocitaria se decidió llevar a cabo un estudio del proceso de solubilización con diferentes concentraciones del detergente, analizando el contenido lipídico (colesterol y fosfolípidos totales, incluyendo esfingomielina) del material resistente al detergente obtenido en el pellet luego de la centrifugación. Los resultados se muestran en las *figuras 2.10 y 2.11*.

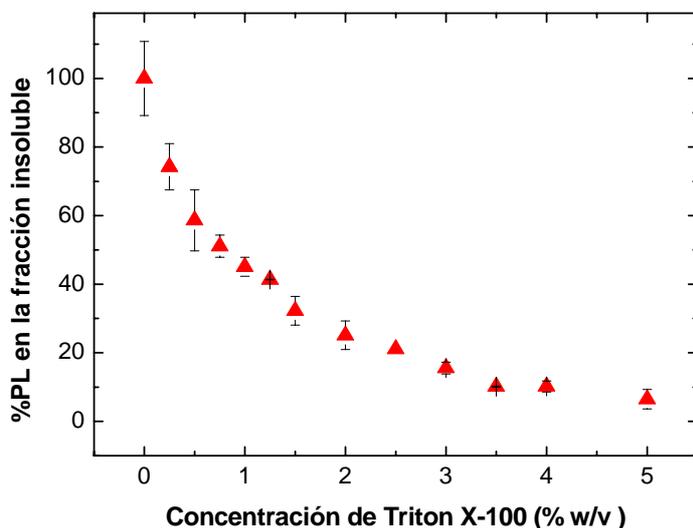
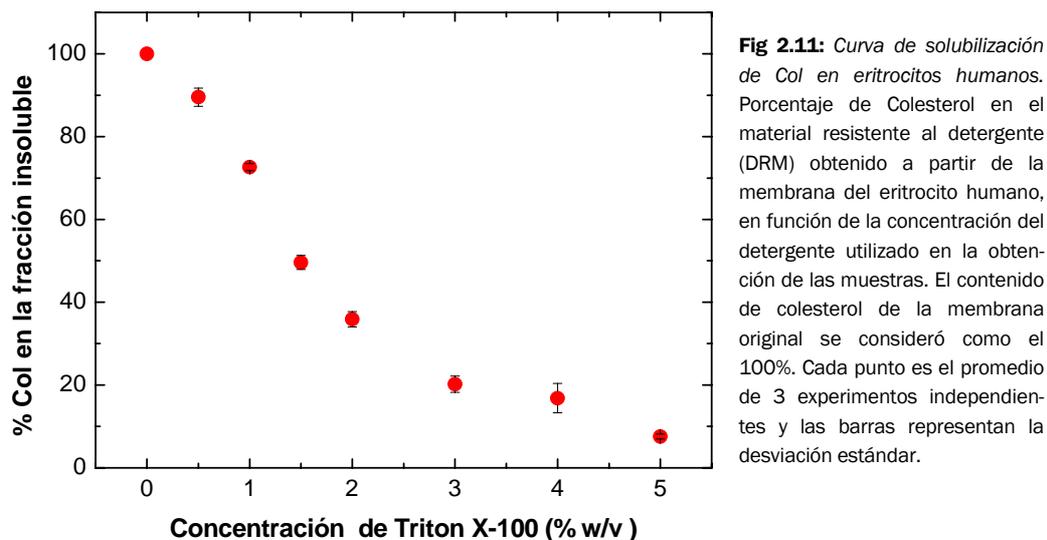


Fig 2.10: Curva de solubilización de PL en eritrocitos humanos. Porcentaje de fosfolípidos (PL) en DRM de eritrocitos humanos, relativo al contenido de fosfolípidos en la membrana eritrocitaria original. Los eritrocitos humanos intactos fueron incubados con cantidades variables del detergente a 4°C por 30 min. El contenido de fósforo inorgánico (Pi) de cada muestra fue evaluado colorimetricamente y normalizado al contenido de fósforo de la membrana original, considerado como 100%. Este porcentaje equivale al contenido relativo de fosfolípidos (incluyendo esfingomielina) de cada muestra. Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar.



Observamos, como era de esperar, que la cantidad de material insoluble, cuantificada con el contenido de fósforo inorgánico (Pi) o con el colesterol (Col) presente en esta fracción, disminuye monótonamente al aumentar la concentración de Triton. En estas curvas de solubilización no se observa ningún rango de concentración de detergente para el cual la cantidad de material insoluble permanezca constante. Esto es, no se observa ninguna región de relativa insolubilidad de la membrana, ya que un aumento de la concentración de Triton produce siempre un aumento de la fracción de membrana solubilizada. Sin embargo, las características de las curvas de solubilización de fósforo y de colesterol presentan ligeras pero significativas diferencias (ver más adelante).

2.3.2 EFECTO DE LA REDUCCIÓN DEL CONTENIDO DE COLESTEROL EN LA SOLUBILIZACIÓN DE ERITROCITOS HUMANOS

La importancia del colesterol en el mantenimiento de la integridad de los dominios de membrana ha sido reportada ampliamente en la literatura. Con el objetivo de estudiar el rol del colesterol en el proceso de solubilización decidimos estudiar la acción del Triton X-100 en membranas de eritrocito previamente reducidas en su contenido de colesterol.

Mediante incubación con M β CD se produjo una reducción del contenido original de colesterol de la membrana de eritrocitos humanos en un 45%. Luego se sometió a estas células a la acción de soluciones de distintas concentraciones de Triton y se cuantificó el contenido de colesterol y fósforo en el material insoluble. En la *figura 2.12* se comparan las curvas de solubilización para ambos casos.

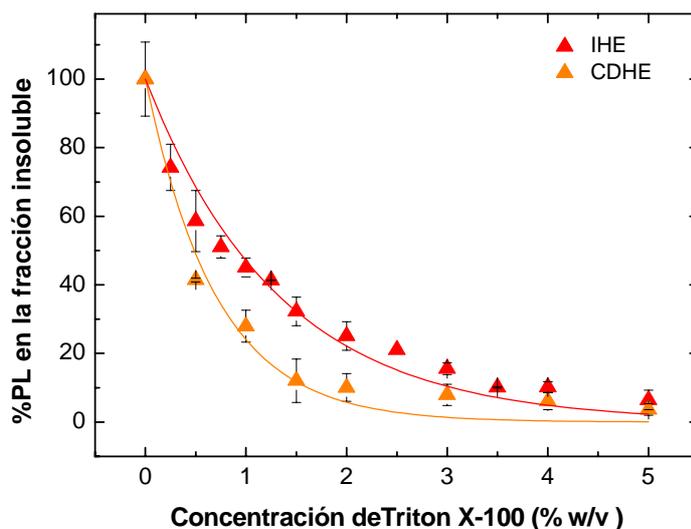


Fig 2.12: *Efecto de la reducción del Col I: solubilización de PL de la membrana eritrocitaria* Porcentaje de fosfolípidos (PL) en el material resistente a detergente (DRM) relativo al contenido de PL en la membrana original sometida a la acción del Triton X-100. Los eritrocitos intactos y los reducidos en su contenido de colesterol fueron incubados con diferentes concentraciones de Triton a 4°C por 30 min. El contenido de fósforo en cada muestra fue evaluado colorimétricamente y normalizado al contenido de fósforo de la membrana original correspondiente, el cual fue considerado como el 100%. Las líneas llenas corresponden a los mejores ajustes con la función exponencial, como se detalla en la siguiente sección. Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar.

IHE: eritrocitos humanos intactos. CDHE: eritrocitos humanos reducidos en colesterol

Es posible observar aquí que una reducción del 45% del contenido original de colesterol en la membrana del eritrocito provoca una menor resistencia a la acción del Triton. Sin embargo, luego de la reducción de colesterol, aun es posible aislar material resistente al detergente utilizando concentraciones relativamente elevadas de Triton, es decir dos o tres veces mayores a las utilizadas en los protocolos de obtención de DRMs reportados en la literatura.

a) Caracterización del proceso de solubilización. Parámetro de resistencia al detergente.

Con el objetivo de comparar cuantitativamente el proceso de solubilización de las membranas eritrocitarias intactas y las reducidas en colesterol, se ajustaron los datos de fosfolípidos insolubles (%PL) en función de la concentración de detergente D con una sencilla función decreciente

$$\%PL = 100.e^{-D/D_0} \tag{ec. 2.1}$$

donde D_0 representa la concentración de Triton X-100 para la cual $\%PL=37\%$, lo que significa que el 63% de los fosfolípidos de la membrana original se han solubilizado. Como los valores más altos de D_0 corresponden a membranas que necesitan más detergente para ser solubilizadas, D_0 constituye un parámetro útil para cuantificar la resistencia a la solubilización, y le llamaremos “parámetro de resistencia a detergente”.

Las líneas llenas en la *figura 2.12* representan los mejores ajustes a la función propuesta de los datos de solubilización de PL de cada membrana. Los valores de D_0 obtenidos para eritrocitos humanos intactos y reducidos en colesterol son 1,33(7) y 0,70(6) % (w/v), respectivamente.

b) Solubilización del colesterol remanente en la membrana del eritrocito reducido.

Luego de llevar a cabo la reducción del 45% del colesterol presente en la membrana de eritrocitos humanos y de someterlos a la acción de cantidades variables de Triton, se cuantificó el contenido de colesterol remanente en el material insoluble. Los resultados se muestran en la *figura 2.13*.

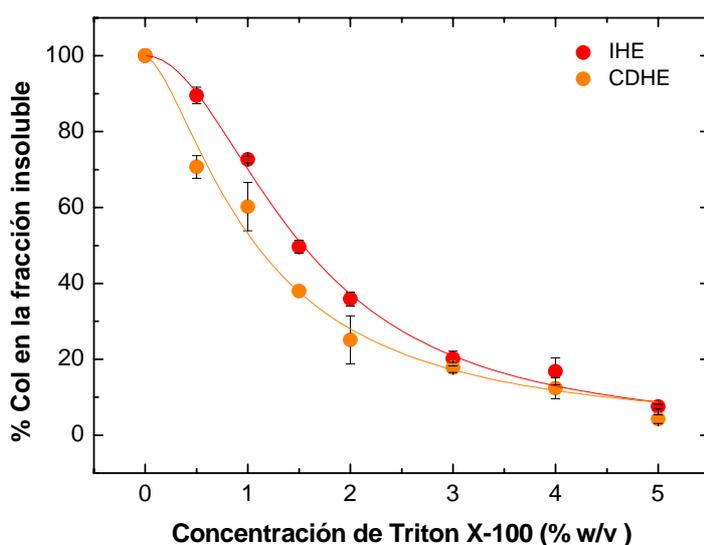


Fig 2.13: *Efecto de la reducción del Col. II: solubilización del Col remanente de la membrana eritrocitaria.* Porcentaje de colesterol (Col) en el material resistente a detergente (DRM) obtenido a partir de la membrana eritrocitaria humana intacta y de la reducida en su contenido de colesterol, en función de la concentración de Triton usada en el tratamiento de las muestras. El contenido de colesterol en cada membrana original se consideró como el 100%. Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar. Las líneas continuas corresponden al mejor ajuste con la función de ajuste propuesta
 IHE: eritrocitos humanos intactos
 CDHE: eritrocitos humanos reducidos en colesterol

En la *figura 2.13* es posible observar que para una determinada concentración de detergente, el porcentaje de colesterol solubilizado es siempre mayor para los eritrocitos previamente reducidos que para los eritrocitos intactos. Esto implica que una reducción

previa del colesterol de la membrana hace que el colesterol remanente sea más susceptible a la acción del Triton.

Con el objetivo de cuantificar de manera más precisa el proceso de solubilización del colesterol se ajustaron los resultados de % de Col insoluble en función de la concentración de detergente con la siguiente función empírica (diferente a la utilizada para ajustar los datos de PL debido a que estos resultados no muestran un decrecimiento exponencial).

$$\%Col = 100 \cdot \left(1 - \frac{D^n}{k^n + D^n} \right) \quad (\text{ec. 2.2})$$

En este modelo, k corresponde a la concentración de Triton que solubiliza el 50% del contenido original de colesterol de la membrana. El parámetro n es una medida en la que la curva de ajuste se asimila a una sigmoidea. A partir de la expresión analítica, se verifica que la curva presentará un punto de inflexión (siempre que n sea mayor que 1) en

$$D_L = \left(\frac{k^n \cdot (n-1)}{(n+1)} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (\text{ec. 2.3})$$

Un valor grande de n indica una resistencia inicial relativa del colesterol, dándole a la curva de ajuste la característica distintiva de una función sigmoidea.

Las líneas llenas en la *figura 2.13* representan los mejores ajustes a la función propuesta de los datos de solubilización de Col de cada membrana. Los parámetros de ajuste se muestran en la *tabla 2.1*.

	k	n
Eritrocitos humanos intactos (IHE)	1,53(4)	1,99(9)
Eritrocitos humanos reducidos en Col (CDHE)	1,08(7)	1,5(1)

Tabla 2.1: Valores de los parámetros de ajuste de los datos de solubilización de Col en eritrocitos humanos de la **Fig 2.13** según la **ec. 2.2**.

2.3.3 PAPEL DE LA ESFINGOMIELINA EN LA INSOLUBILIDAD AL DETERGENTE.

La fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante de la membrana de los eritrocitos humanos, pero se encuentra prácticamente ausente en los eritrocitos bovinos, los cuales en cambio contienen altos niveles de SM [Florin-Christensen y col., 2000]. La SM, junto con el Col, es relevante en la determinación del empaquetamiento y el ordenamiento conformacional de la bicapa lipídica [Simons y Vaz, 2004]. También han sido reportadas interacciones preferenciales entre la SM y el Col [Ramstedt y Slotte, 2002] que po-

drían ser importantes para determinar la resistencia al detergente en los sistemas modelo [Sot y col., 2002].

Con el objetivo de analizar el rol de la esfingomiolina en la insolubilidad al detergente de la membrana eritrocitaria, estudiamos el comportamiento de la membrana de eritrocitos bovinos frente a la acción del Triton X-100. En la *figura 2.14* se muestra la composición lipídica en masa de las membranas eritrocitarias humana y bovina.

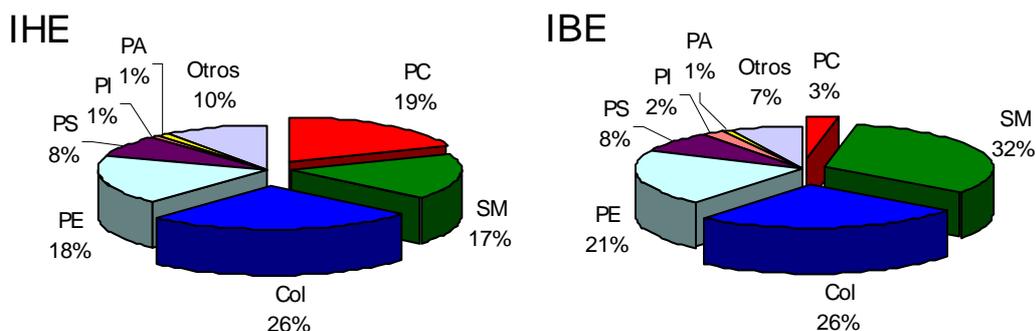


Fig.2.14: Composición lipídica (% en masa) de los eritrocitos humanos (IHE) [Voet y Voet, 1995] y de los eritrocitos bovinos (IBE) [Florin-Christensen y col., 2000]. Notar que la principal diferencia entre las dos especies es la alta proporción de SM y la baja proporción de PC de los eritrocitos bovinos comparados con los humanos. Lípidos mayoritarios: SM, esfingomiolina; Col, colesterol; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PE, fosfatidiletanolamina; PA, ácido fosfatídico. Otros: gangliósidos; ésteres de colesterol; triglicéridos; ácidos grasos libres; lisofosfolípidos

En un primer ensayo, determinamos la composición y el ordenamiento lipídico de las DRMs obtenidas con 1% de TX-100 (R=12) y la comparamos con la membrana original. En la *figura 2.15* se muestran los resultados obtenidos.

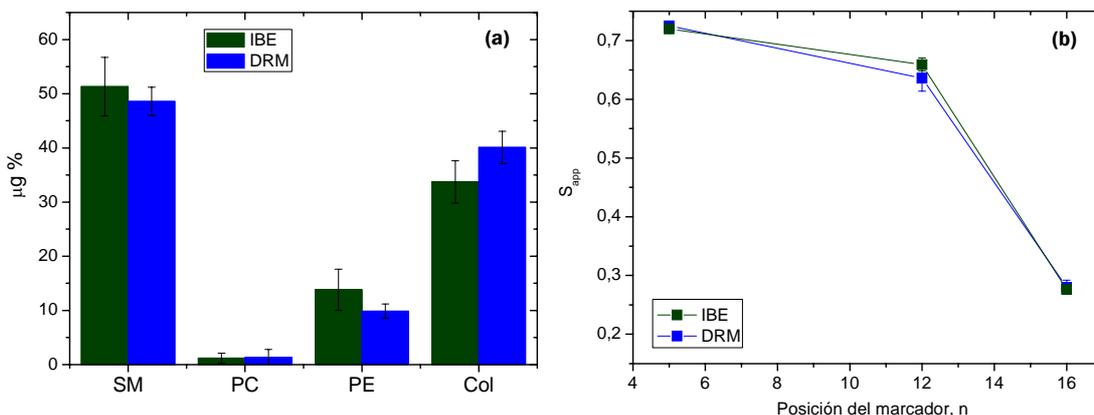


Fig 2.15: *Efecto de un aumento de la proporción de SM. I:* Composición lipídica (a) y ordenamiento lipídico (b) de DRMs obtenidas a partir de eritrocitos bovinos con 1% de TX-100 (R=12), comparadas con la membrana original (IBE).

SM: esfingomiolina; PC:fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; Col: Colesterol

A diferencia de lo que ocurre con los eritrocitos humanos (*ver figuras 2.7 y 2.9*), las DRMs de eritrocitos bovinos obtenidas con 1% de TX-100 no muestran diferencias

significativas, tanto en su composición como en su ordenamiento lipídico, con respecto a la membrana original.

A continuación llevamos a cabo un estudio del proceso de solubilización con diferentes concentraciones del detergente. La *figura 2.16* muestra las curvas de solubilidad del eritrocito bovino comparado con el humano. Se observa que la membrana eritrocitaria bovina tiene mayor resistencia al Triton que la humana para todo el rango de concentración de detergente. Como ejemplo, al incubar las células bovinas con 1% de detergente permanece insoluble alrededor de 72% de los PL (incluyendo SM), mientras que para humanas este valor es aproximadamente 45%. Debe remarcarse que la proporción de colesterol es similar en ambas membranas (alrededor de 26 % en masa). El valor de D_0 obtenido para eritrocitos bovinos es de 2,83(9).

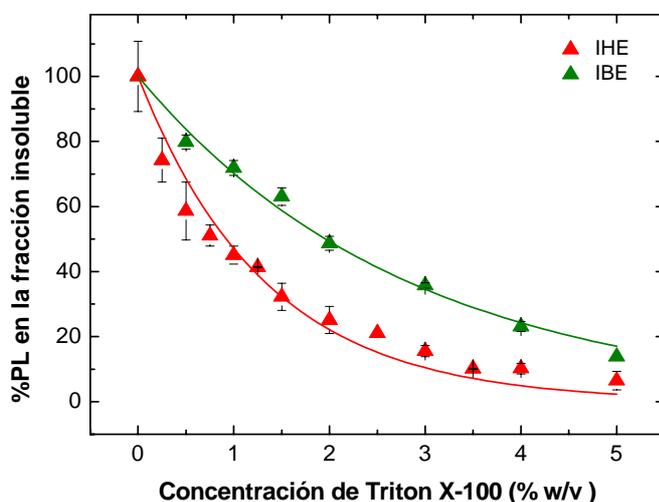


Fig 2.16: Efecto de un aumento de la proporción de SM. II: solubilización de PL de membranas eritrocitarias bovinas y humanas. Porcentaje de fosfolípidos (PL) en el material resistente a detergente (DRM) relativo al contenido de PL de la membrana original sometida a la acción del Triton. Los eritrocitos humanos y bovinos (intactos) fueron incubados con cantidades variables de Triton X-100 a 4°C por 30 min. El contenido de fósforo en cada muestra fue evaluado colorimétricamente y normalizado al contenido de fósforo de la membrana original correspondiente, el cual fue considerado como el 100%. Las líneas llenas corresponden a los mejores ajustes con la función exponencial, como se detalló en el texto. Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar.

IHE: eritrocitos humanos intactos

IBE: eritrocitos bovinos intactos

En la *figura 2.17* se muestra la solubilidad del colesterol en ambas membranas.

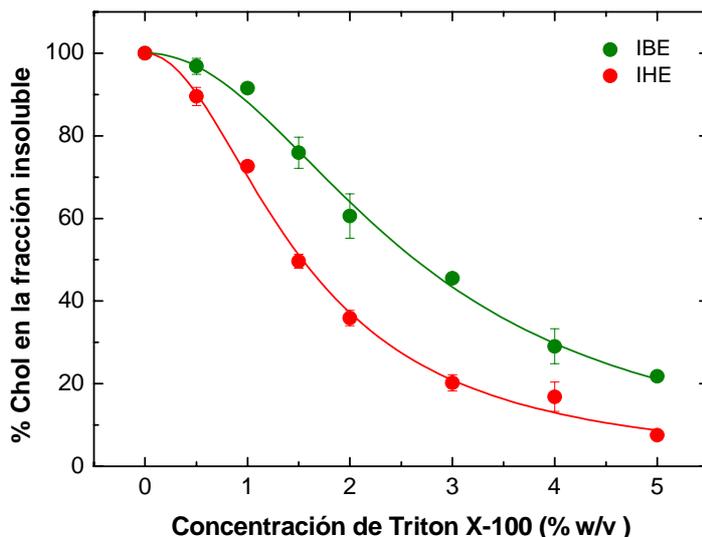


Fig 2.17: Efecto de un aumento de la proporción de SM. III: solubilización del Col de membranas eritrocitarias bovinas y humanas. Porcentaje de colesterol (Col) en el material resistente a detergente (DRM) obtenido a partir de eritrocitos humanos y bovinos, en función de la concentración de Triton usada en el tratamiento de las muestras. El contenido de colesterol en la membrana original se consideró como el 100%. Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar. Las líneas continuas corresponden al mejor ajuste con la función propuesta en el texto.

IHE: eritrocitos humanos intactos; IBE: eritrocitos bovinos intactos

El gráfico muestra claramente una menor solubilización del colesterol a partir de la membrana bovina respecto de la humana, a pesar que el porcentaje de colesterol en ambas membranas es similar. Los valores de los parámetros de ajuste obtenidos a partir de la ec. 2.2 se muestran en la Tabla 2.2

	k	n
Eritrocitos humanos intactos (IHE)	1,53(4)	1,99(9)
Eritrocitos bovinos intactos (IBE)	2,64(6)	2,07(9)

Tabla 2.2: Valores de los parámetros de ajuste de los datos de solubilización de Col en eritrocitos humanos y bovinos intactos de la Fig 2.17 según la ec. 2.2.

Es interesante remarcar también que el efecto del Triton no es el mismo sobre los fosfolípidos que sobre el colesterol. Los resultados parecen indicar que tanto para los eritrocitos humanos como para los bovinos, los PL se solubilizan más fácilmente que el colesterol, lo que provocaría un enriquecimiento relativo de colesterol en las DRM. Esta propiedad se observa en la zona de baja concentración de Triton, donde la pendiente de la curva de solubilización de Col es menor que la de PL.

Podemos hacer un análisis, entonces, de cómo cambia la relación PL/Col teniendo en cuenta los resultados anteriores. En la figura 2.18 se muestra una gráfica de la relación (molar) PL/Col para las DRM de eritrocitos humanos y bovinos.