



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Uso de liposomas para el análisis de la interacción de proteínas con membranas plasmáticas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Carmen Santamaría Basurto



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
VOCAL:	Profesor:	EUCLIDES AVILA CHÁVEZ
SECRETARIO:	Profesora:	ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
1er. SUPLENTE:	Profesora:	VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA
2° SUPLENTE:	Profesora:	PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. JOANNA ORTEGA ANAYA

SUSTENTANTE:

CARMEN SANTAMARÍA BASURTO

RESUMEN

Los liposomas son vesículas artificiales formadas por lípidos que al exponerse a un ambiente acuoso, conducen a la formación espontánea de bicapas cerradas debido a las interacciones entre ellos (efecto hidrofóbico). Son estructuras muy versátiles, y fácilmente reproducibles que representan un modelo biomimético para el estudio de proteínas de membrana.

En el presente estudio se estandarizó un método para la elaboración de liposomas mediante el método de deshidratación-hidratación y extrusión utilizando la mezcla de los fosfolípidos 1,2-Dimiristoil-*sn*-fosfatidilcolina y 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-fosfatidilcolina. Observamos que las vesículas formadas eran estables en intervalos amplios de temperatura y pH lo que favorece su aplicación con un gran número de proteínas cuyos óptimos de actividad varían.

La incorporación de proteínas de naturaleza diferente en los liposomas (proteoliposomas) se pudo demostrar utilizando técnicas como microscopía confocal, dicroísmo circular, dispersión dinámica de la luz, electroforesis en condiciones desnaturalizantes y mediante ensayos de actividad. Además, técnicas como la dispersión dinámica de la luz y la microscopía confocal pueden ayudar a conocer la naturaleza de la interacción de las proteínas con las membranas plasmáticas (integral a la membrana o periférica). Gracias a estas técnicas logramos determinar por primera vez que la hidratasa de *Lactobacillus plantarum* es una proteína periférica a la membrana.

Los liposomas resultaron un sistema ideal para mantener estables a proteínas de membrana sin modificar su estructura ni su actividad, pero también fueron útiles para incorporar otras proteínas de naturaleza no membranar como la lisozima o la esticolisina, sin embargo no funcionó con proteínas intrínsecamente desestructuradas como la lectina de *M. edulis* que al reconstituirse en el liposoma perdió su actividad, es probable que se requiera estructurarla primero antes de incorporarla en el liposoma.

Finalmente, demostramos que este tipo de modelos biomiméticos son ideales para estudiar sistemas enzimáticos formados por proteínas de naturaleza diferente.

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
CONTENIDO	4
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN.....	8
MARCO TEÓRICO	10
MEMBRANA CELULAR	10
Lípidos de la membrana celular.....	11
Fosfolípidos	12
Esfingolípidos	14
El colesterol	14
PROTEÍNAS DE MEMBRANA	15
Proteínas periféricas o extrínsecas.....	15
Proteínas integrales o intrínsecas.....	16
Proteínas ancladas por lípidos.....	16
LIPOSOMAS	16
Vesículas unilamelares:	17
Vesículas multilamelares, MLV (multi lamellar vesicles):	18
Preparación de liposomas	18
Hidratación de una bicapa fosfolipídica seca	19
Sonicación	19
Método de evaporación en fase reversa	20
Técnica de inyección (éter o etanol).....	20
Extrusión.....	20
Proteoliposomas	21
Tensoactivos.....	21
ANTECEDENTES	24
PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS.....	30
Preparación de la bicapa fosfolipídica seca.....	30

Hidratación de la película fosfolipídica.....	31
Método de extrusión, formación de vesículas unilamelares grandes (LUV).....	31
PREPARACIÓN DE PROTEOLIPOSOMAS.....	32
Preparación de la bicapa fosfolipídica seca con sonda.....	33
Citocromo c oxidasa.....	33
Hidratasa de Lactobacillus plantarum (HLP).....	33
Esticolisina I.....	34
Lisozima.....	34
Lectina de Mytilus edulis.....	34
CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS.....	35
Preparación de los reactivos y estándares.....	35
ESTUDIOS DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DDL).....	37
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	38
MICROSCOPIA CONFOCAL.....	40
ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	41
DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA POR TÉCNICA DE DICROÍSMO CIRCULAR.....	41
CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS DENTRO DEL LIPOSOMA Y EN SOLUCIÓN.....	43
Actividad de la citocromo c oxidasa.....	43
Actividad de la hidratasa de Lactobacillus plantarum.....	43
Actividad hemolítica de la esticolisina St-I.....	44
Actividad enzimática de la lisozima.....	44
Prueba de actividad hemaglutinante de la lectina de Mytilus edulis.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS.....	46
Efecto la temperatura.....	47
Efecto del pH.....	48
Efecto del tensoactivo.....	49
CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS EN LOS LIPOSOMAS.....	51
PREPARACIÓN DE LOS PROTEOLIPOSOMAS.....	51
Cuantificación de fosfolípidos en los proteoliposomas.....	51
Cuantificación de proteína en los proteoliposomas.....	52
Electroforesis SDS-PAGE.....	52
Citocromo c oxidasa.....	53
Estudios de dispersión dinámica de la luz de la COX.....	53
Estudios de microscopía confocal de la COX.....	54
Estudios conformacionales y de estructura secundaria.....	55
Actividad enzimática de la COX.....	56
Hidratasa de Lactobacillus plantarum (HLP).....	57

Estudios de dispersión dinámica de la luz de la HLP	58
Estudios de microscopía confocal de la HLP	58
Estudios conformacionales y de estructura secundaria de la HLP	60
Actividad de hidratasa de <i>Lactobacillus plantarum</i> (HLP)	61
Esticolisina I (St-I)	61
Estudios de dispersión dinámica de la luz de la St-I	61
Estudios conformacionales y de estructura secundaria de la St-I	62
Ensayos de actividad de la esticolisina I	64
Lisozima	66
Estudios de dispersión dinámica de la luz de la lisozima	66
Estudios conformacionales y de estructura secundaria de la lisozima	67
Actividad de lisozima	68
Lectina de <i>Mytilus edulis</i>	68
Estudios de dispersión dinámica de la luz de <i>Mytilus edulis</i>	68
Estudios conformacionales y de estructura secundaria de <i>Mytilus edulis</i>	69
Actividad hemaglutinante de la lectina de <i>M. edulis</i>	70
UTILIZACIÓN DE PROTEOLIPOSOMAS PARA EL ANÁLISIS DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS FORMADOS POR PROTEÍNAS DE NATURALEZA DIFERENTE.	72
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS	76

ABREVIATURAS

BCA: Ácido bicinconánico.

COX: Citocromo c oxidasa.

DC: Dicroísmo circular.

DDL: Dispersión dinámica de la luz.

DMPC: 1,2-Dimiristoil-*sn*-fosfatidilcolina.

GUV: Vesículas unilamelares gigantes.

KPB: Amortiguador de fosfatos de potasio.

λ : Longitud de onda.

HLP: Hidratasa de *Lactobacillus plantarum*.

LUV: Vesículas unilamelares grandes.

LYS: Lisozima.

MC: Membrana celular.

MVL: Vesículas multilamelares.

NaPB: Amortiguador de fosfatos de sodio.

PAM: Proteínas ancladas por lípidos.

PIM: Proteínas integrales de membrana.

PM: Proteínas de membrana.

POPC: 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-fosfatidilcolina.

PPM: Proteínas periféricas de membrana.

SM: Esfingomielina.

St-I: Esticolisina I.

SUV: Vesículas unilamelares chicas.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de membrana (PM) representan entre un 20 y un 35% de las proteínas totales presentes en una célula y constituyen junto con los fosfolípidos, los componentes principales de la misma [1,2]. El estudio de este tipo de proteínas representa un reto importante en la bioquímica de proteínas ya que una vez que son extraídas en un medio acuoso, tienden a formar oligómeros por afinidad de superficies hidrofóbicas (efecto hidrofóbico) y en la mayoría de casos se desestabilizan y agregan [3], por lo que es necesario encontrar las condiciones adecuadas para mantenerlas estables y activas.

Hasta noviembre de 2015 había descritas 112,968 estructuras terciarias de proteínas de membrana en el banco de datos de proteínas (PDB, <http://www.pdb.org>) [4] y de ellas, solamente 698 correspondían a proteínas de membrana, lo que habla de la dificultad de trabajar con ellas y de obtener cristales adecuados para realizar estudios que permitan determinar su estructura, de ahí la necesidad de estudiar un modelo biomimético que emule su ambiente natural y que permita estudiar la estructura y función de estas proteínas.

El estudio tanto estructural como funcional de las proteínas de membrana debería realizarse en su ambiente natural, la membrana plasmática, aunque este es un sistema muy complejo condicionado por muchos factores como lo son la gran variedad de proteínas y fosfolípidos, entre otras moléculas presentes en su estructura [5]. Algunos de los modelos que mejor mimetizan la membrana plasmática son las monocapas, las bicapas planas, los liposomas y los proteoliposomas. Estos dos últimos se forman a partir de fosfolípidos, dando lugar a una bicapa esférica que se autoensambla y que presenta propiedades fisicoquímicas similares a las de las membranas biológicas [6].

Una de las mayores ventajas de los liposomas es su capacidad para integrar proteínas de membrana extraídas y purificadas a partir de células vivas mediante diferentes técnicas de reconstitución [7]. Los liposomas permiten llevar a cabo estudios estructurales y funcionales de proteínas aisladas, en ausencia de otras moléculas, pueden incorporar proteínas periféricas a la membrana (PPM) o

integrales (PIM). Las PIM no se insertan en la estructura del liposoma de forma espontánea, para integrarlas debe realizarse un proceso de disrupción lipídica, dando lugar a micelas mixtas fosfolípido-tensoactivo. Los proteoliposomas se reconstituyen mediante la reducción de la concentración del tensoactivo, hasta su eliminación [8, 9].

En México, son muy pocos los grupos que trabajan con proteínas de membrana y la mayoría de ellos trabaja sólo con la fracción soluble de las mismas, esto por la gran dificultad de trabajar con ellas en un medio que no es el natural. Es por esto que en el presente proyecto planteamos la estandarización de un método de reconstitución de proteínas de membrana en un medio biomimético como son los liposomas. Además se demuestra la utilidad de estos sistemas biomiméticos para estudiar proteínas de naturaleza no membranal y para el estudio de sistemas enzimáticos formados por proteínas de naturaleza diferente como es el caso del sistema de la ácido linoleico isomerasa cuya función es la producción de ácido linoleico conjugado a partir de ácido linoleico. Este sistema está formado por una proteína de naturaleza membranal que realiza el primer paso de la reacción (la hidratación) y una proteína de naturaleza hidrofílica o soluble en medios acuosos que realiza el segundo paso de la reacción (deshidratación/isomerización). De esta manera podemos tener a ambas enzimas estables y activas.

MARCO TEÓRICO

Membrana celular

La célula, ya sea perteneciente a organismos procariotas o eucariotas, requiere de una barrera física que separe el interior de las células u organelos del ambiente exterior, preservando la composición química local y permitiendo la interacción con otros componentes biológicamente relevantes. Esta barrera es la membrana celular (MC) que es una estructura a base de lípidos que envuelve a la célula, encierra el citoplasma y crea una barrera selectivamente permeable. La MC, también conocida como membrana plasmática (MP) tiene un papel crucial para la vida de las células [10]. Sus componentes principales son lípidos, proteínas y glicolípidos. Los lípidos se encuentran dispuestos en forma de una bicapa y proporcionan una barrera flexible y semipermeable, mientras que las proteínas se disponen de forma irregular y asimétrica entre los mismos, conforman receptores y canales que median la transducción de información y regulan el flujo de moléculas [11,12].

La membrana plasmática no es igual para todos los organismos vivos, existen diferencias, por ejemplo, entre organismos procariotas y eucariotas, incluso entre los miembros de estos dos grupos existen diferencias características en la composición de sus membranas, sin embargo, todas las membranas presentan una unidad estructural básica llamada bicapa lipídica [13]. En 1972, Singer y Nicholson propusieron el modelo conocido como mosaico fluido (Figura 1) [11]. Este modelo postula que tanto lípidos como proteínas pueden difundir libremente en la membrana, sin embargo, hoy en día se sabe que los lípidos no tienen libertad total de difundir lateralmente ya que la distribución lateral de los lípidos y proteínas es heterogénea y muy compleja [14].

Cara externa de la membrana celular

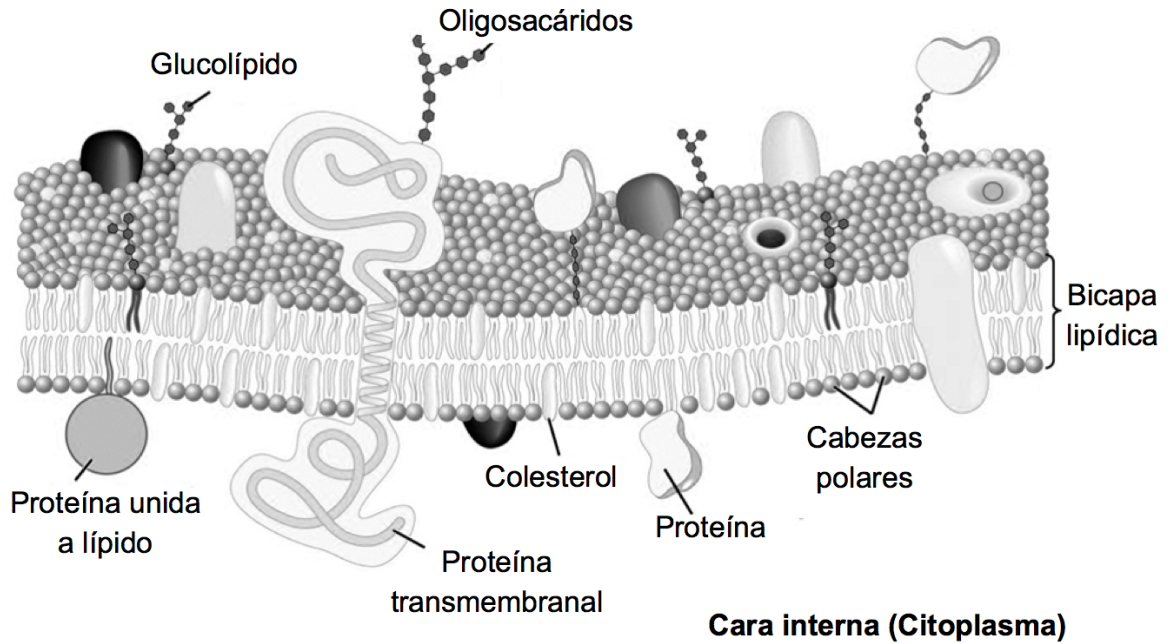


Figura 1. Representación esquemática de la membrana plasmática.

Lípidos de la membrana celular

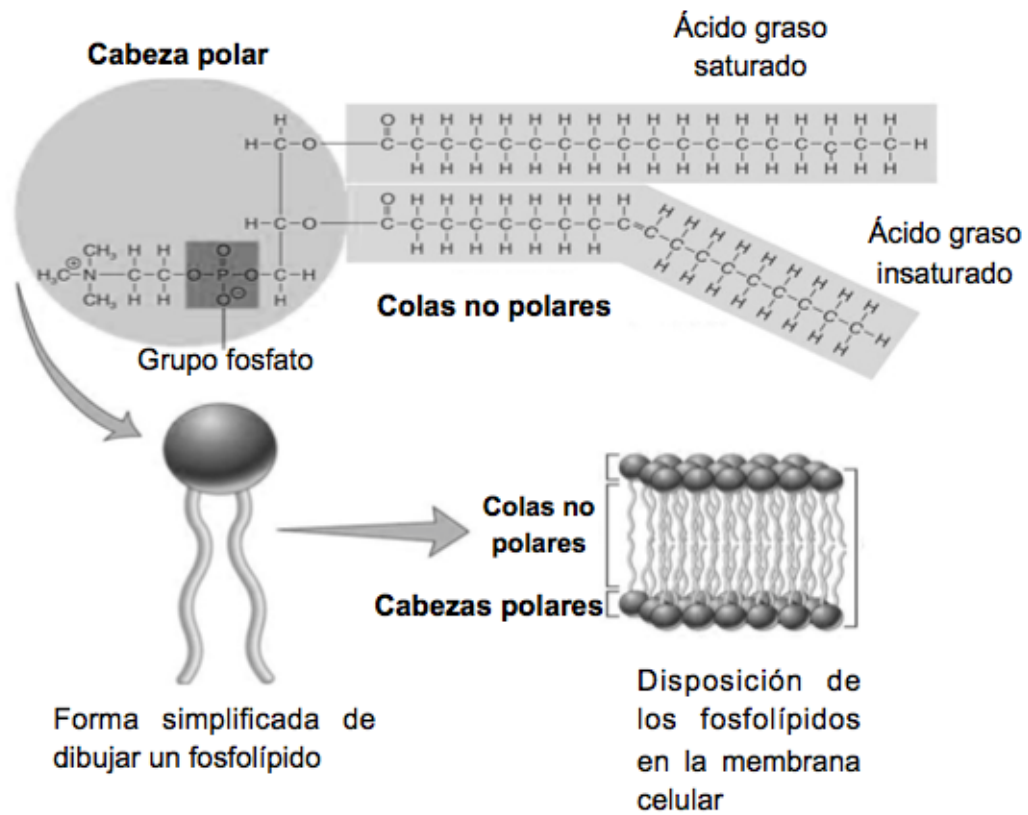
Los constituyentes lipídicos mayoritarios de las biomembranas son los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y los esteroides. Las tres clases de lípidos son moléculas anfipáticas, con una cabeza polar y una cola hidrofóbica. El efecto hidrofóbico y las interacciones de van der Waals provocan que las colas hidrofóbicas se auto asocien en forma de bicapas con los grupos de la cabeza polar orientados hacia el agua. 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 [15].

Fosfolípidos

Los lípidos más abundantes en la membrana celular son los fosfolípidos y son derivados del glicerol 3-fosfato (fosfoglicéridos). Estos son moléculas anfipáticas compuestas por una cabeza polar o región hidrofílica y una cola hidrofóbica compuesta por dos cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos. La región polar presenta un grupo NH_3 y se conecta a la región apolar mediante una molécula de glicerol, la que se une a las colas apolares mediante enlaces de tipo éster. La región apolar se compone de dos cadenas hidrocarbonadas de longitud variable (que contienen entre 14 y 24 átomos de carbono). Estas presentan un cierto grado de movilidad debido a su estructura y a la posible presencia de dobles enlaces (Figura 2) [16].

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 monocapas de la membrana, suelen ser más abundantes en una u otra. En particular, la fosfatidilcolina (componente principal de la membrana celular) se localiza preferentemente en la monocapa externa, mientras que la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol se localizan preferentemente en la monocapa 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 [17].

A)



B)

	CABEZA POLAR	FOSFOLÍPIDOS
	Etanolamina $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Fosfatidiletanolamina
	Colina $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Fosfatidilcolina (Lecitinas)
	Serina $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}(=\text{O})\text{O}^-)-\text{NH}_3^+$	Fosfatidilserina
	Inositol	Fosfatidilinositol

Figura 2. A) Composición de una molécula de fosfolípido. B) Posibles sustituyentes de la cabeza polar.

Esfingolípidos

En el caso de los esfingofosfolípidos, la esfingomielina (SM) es el único que se encuentra en la membrana. Tiene como unidad estructural la ceramida y su esqueleto no es el glicerol sino esfingosina. Su grupo amino está ligado a un ácido graso mediante un enlace amida y el grupo hidroxilo primario de la esfingosina está esterificado a la fosforilcolina. La SM es un componente fundamental de la membrana plasmática de las células eucariotas. Los esfingolípidos contienen cadenas acílicas largas y muy saturadas que les permiten empaquetarse fácilmente, una propiedad que da a estos compuestos temperaturas de transición de fase mucho mayores que las del resto de los fosfolípidos de la membrana [18,19].

El colesterol

El colesterol es un esteroide formado por la unión de cuatro anillos hidrocarbonados. En un extremo se le une una cola hidrocarbonada y al otro un grupo hidroxilo. La función más importante del colesterol es su capacidad para modular las propiedades físicas de las membranas plasmáticas. La cabeza polar del colesterol se alinea con las cabezas polares de los fosfolípidos e inmoviliza los primeros carbonos de las cadenas hidrocarbonadas estabilizando la membrana, el anillo esteroideo hidrofóbico se encuentra orientado paralelamente y embebido en las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (Figura 3). El colesterol induce un “estado intermedio” en los fosfolípidos con los que interactúa, aumenta el grado de orientación y reduce el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas de fosfolípidos [14, 20].

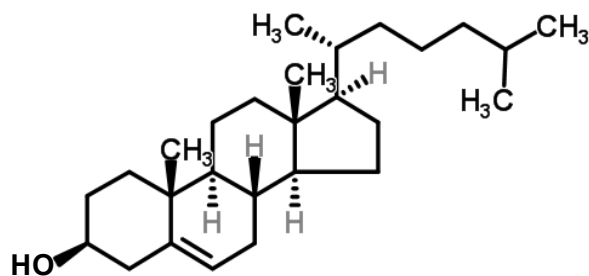


Figura 3. Estructura química del colesterol.

Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana (PM) son las principales herramientas de comunicación entre el interior y el exterior de la célula, gracias a ellas se produce el intercambio de las moléculas, nutrimentos o productos de desecho, así como la recepción de señales externas y una variedad de funciones vitales para la supervivencia de los organismos [21]. Estas pueden clasificarse de acuerdo a sus interacciones con las membranas en: integrales o intrínsecas (PIM), periféricas o extrínsecas (PPM) y unidas o ancladas por lípidos (PAM). En la figura 4 se pueden observar los diferentes tipos de proteínas de membrana [15].

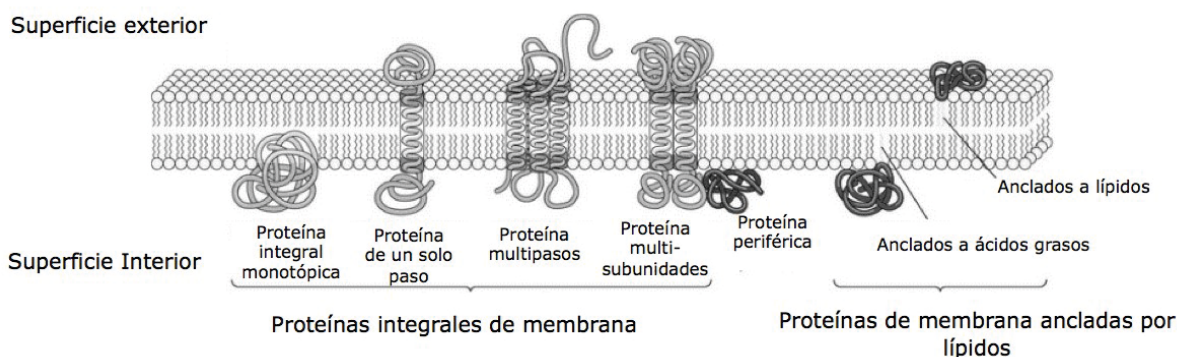


Figura 4. Asociación de proteínas de membrana con la bicapa lipídica.

Proteínas periféricas o extrínsecas

Pueden ser extraídas fácilmente de la membrana plasmática sin necesidad de destruirla, mediante la utilización de soluciones de moderada y alta fuerza iónica. Estas proteínas no interactúan con el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica, sino que se unen a la membrana indirectamente a través de interacciones no covalentes (puentes salinos e interacciones electrostáticas) con las proteínas integrales de membrana, o directamente con las cabezas polares de los fosfolípidos. Las proteínas periféricas se localizan en la región polar de la bicapa, ya sea interna o externa [22].

Proteínas integrales o intrínsecas

Las proteínas integrales requieren tensoactivos para ser extraídas de su fuente natural, estas proteínas están integradas en la membrana y se pueden encontrar, por tanto, a ambos lados de la bicapa. Las proteínas que no atraviesan totalmente la bicapa, sino que penetran hasta un cierto nivel de la membrana son llamadas proteínas integrales parciales mientras que las proteínas que atraviesan totalmente la bicapa lipídica son proteínas integrales totales. Estas proteínas son también denominadas proteínas transmembranales [15, 23].

Proteínas ancladas por lípidos

Se encuentran fuera de la bicapa lipídica, ya sea en la superficie extracelular o citoplasmática, se encuentran unidas covalentemente a una molécula de lípido que se encuentra dentro de la bicapa [15].

Liposomas

Los liposomas son vesículas artificiales compuestas por una o varias bicapas lipídicas separadas por compartimentos de agua. Están formados por lípidos que al exponerse a un ambiente acuoso, dan lugar a la formación espontánea de bicapas cerradas debido a las interacciones entre ellos (efecto hidrofóbico) (Figura 5). Se utilizan como modelos de membrana, o como vectores para el transporte de determinadas moléculas [24, 25].

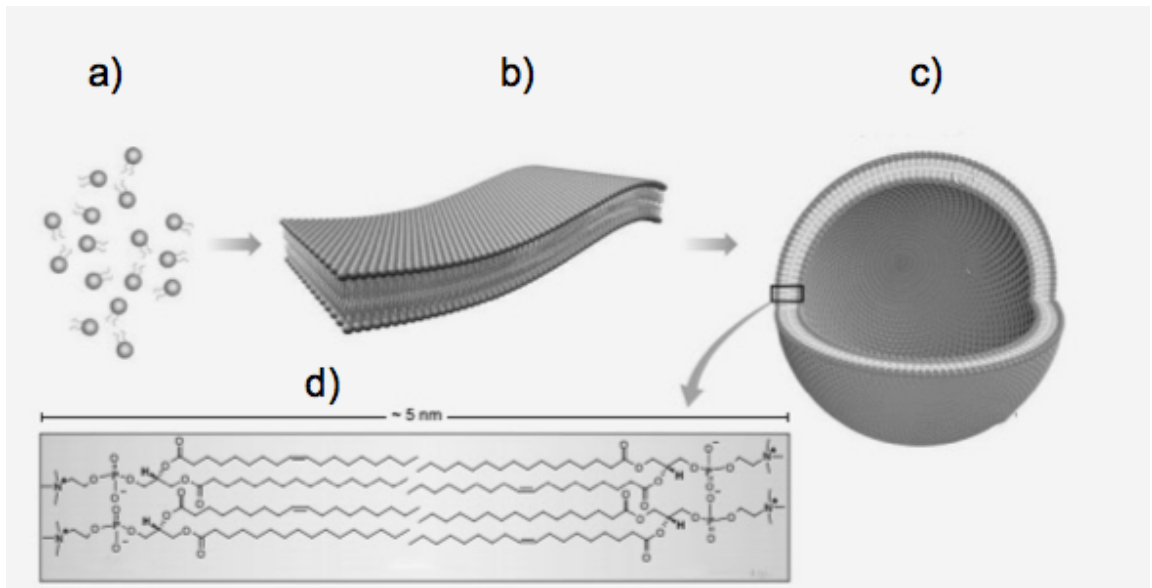


Figura 5. Representación esquemática de la formación de liposomas, (a) moléculas de fosfolípidos, que forman la bicapa fosfolipídica (b), y que al ser resuspendida en medio acuoso, da origen a la formación de liposomas (c), una sola bicapa mide aproximadamente 5 nm de espesor (d).

Con respecto al tamaño y número de bicapas, los liposomas se pueden clasificar en:

Vesículas unilamelares:

Poseen un compartimento central polar y una sola bicapa lipídica, son de especial interés en la investigación, debido principalmente a su similitud con la membrana y fácil preparación. Se dividen en tres tipos según su tamaño: pequeño, SUV (small unilamellar vesicles), grande, LUV (large unilamellar vesicles) y gigante, GUV (giant unilamellar vesicles). Estas tienen las mismas propiedades y sólo varían en el tamaño (Figura 6).

Vesículas multilamelares, MLV (multi lamellar vesicles):

Se caracterizan porque poseen múltiples compartimentos acuosos concéntricos, separados entre sí por un espacio acuoso de aproximadamente 5 nm de espesor. Muestran propiedades físicas y comportamientos diferentes a los de las vesículas unilamelares, no son modelos biomiméticos, pero se utilizan comúnmente para aplicaciones industriales tales como la administración de fármacos [26].



Figura 6. Representación esquemática del diámetro de los diferentes tipos de liposomas. Vesículas unilamelares pequeñas, SUV (menor a 100 nm), vesículas unilamelares grandes, LUV (entre 100 y 500 nm), vesículas unilamelares gigantes, GUV (mayor a 10 μm) y vesículas multilamelares, MLV (entre 0.1 a 10 μm).

Preparación de liposomas

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 (Figura 7).

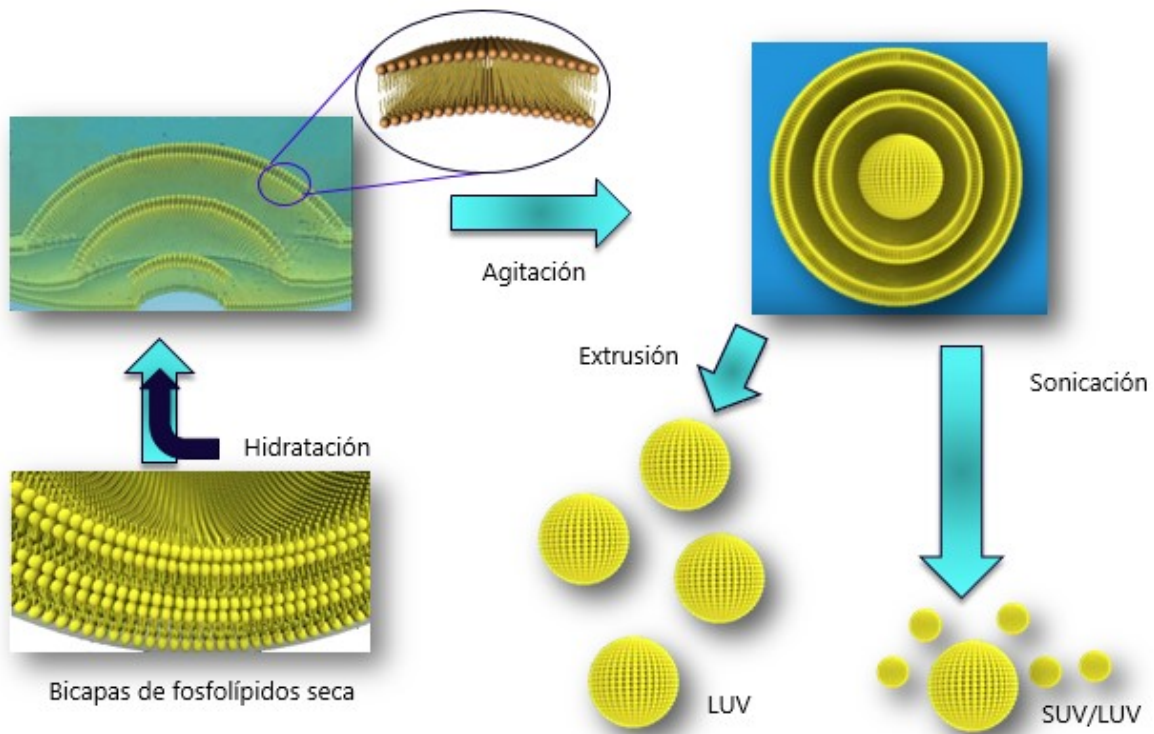


Figura 7. Representación esquemática de la formación de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

Hidratación de una bicapa fosfolipídica seca

Los lípidos constituyentes son disueltos en proporciones adecuadas de disolventes orgánicos, que posteriormente son removidos por evaporación y/o vacío. La bicapa fosfolipídica seca es resuspendida en un medio acuoso adecuado por encima de la temperatura de transición de los lípidos. La suspensión resultante son liposomas multilamelares (MLV), de tamaño polidisperso. A partir de esta suspensión, la preparación de vesículas unilamelares se puede lograr usando uno o la combinación de los siguientes métodos:

Sonicación

La sonicación es quizás el método más ampliamente utilizado para la preparación de SUV, en este método las MLV se someten a ultrasonido. La presión inducida rompe las vesículas multilaminares de la muestra para formar vesículas más pequeñas, sin

embargo el diámetro del liposoma resultante y la distribución no son tan reproducibles como los realizados por extrusión [27].

Método de evaporación en fase reversa

Una película lipídica se prepara por evaporación de disolvente orgánico bajo presión reducida. El sistema se purga con nitrógeno y los lípidos se vuelven a disolver en una segunda fase orgánica que generalmente está constituida por éter dietílico y/o éter isopropílico. Las LUV se forman cuando el amortiguador se introduce en esta mezcla. El disolvente orgánico se elimina posteriormente y el sistema se mantiene en atmósfera de nitrógeno [28].

Técnica de inyección (éter o etanol)

El método de inyección de etanol es una técnica que se puede utilizar para la formación espontánea de liposomas con un radio pequeño. En este método, una solución de fosfolípidos en etanol se inyecta rápidamente en solución acuosa para formar los liposomas. El disolvente de elección es normalmente etanol, se pueden utilizar otros alcoholes, sin dejar de tomar en cuenta factores tales como toxicidad, solubilidad en agua, la viscosidad y el poder de disolver lípidos. Sin embargo, el procedimiento de inyección de etanol posee dos desventajas: la suspensión de liposomas contendrá etanol; esto puede ser eliminado por diálisis o ultrafiltración y la utilización de grandes volúmenes de solución acuosa [27-29].

Extrusión

La extrusión de vesículas lipídicas es el proceso en el cual una solución de lípidos es forzada a pasar a través de una membrana de policarbonato con poros pequeños usando presión. Éste método permite obtener una distribución de tamaños más homogénea que las generadas por otros procedimientos, centrada en el tamaño del poro de la membrana utilizada. La distribución de tamaños también muestra dependencia con la presión de extrusión, con la velocidad de flujo de la solución de vesículas y con las características del lípido utilizado [30,31].

Proteoliposomas

Las vesículas de fosfolípidos que contienen proteínas de membrana son conocidas como proteoliposomas y son una excelente herramienta para la elucidación de la estructura y función de las proteínas de membrana [3].

Los proteoliposomas deben cumplir con una serie de criterios para que puedan ser considerados útiles como sistemas para estudios funcionales. Por un lado, se requiere una distribución de tamaño homogénea lo que se puede lograr mediante la extrusión y además, la proteína se debe distribuir uniformemente entre los liposomas y conservar su actividad [3].

Existe una variedad de métodos para insertar proteínas de membrana en liposomas, la reconstitución mediante tensoactivos es una técnica muy efectiva, ya que el tensoactivo se utiliza por lo general en el aislamiento inicial y purificación de la proteína [9].

Tensoactivos

La importancia de los tensoactivos en el estudio de proteínas de membrana es muy importante ya que son vitales en el aislamiento y la purificación de las proteínas, así como en la reconstitución en liposomas [32]. Son compuestos que tienen carácter anfipático, contienen un grupo hidrófobo (la cola) y grupo hidrófilo (la cabeza) [33]. Por lo tanto, son solubles en disolventes orgánicos y agua, los tensoactivos también se ensamblan para formar agregados que se conocen como 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 8). La concentración micelar crítica (CMC) es la concentración a la cual se forman las micelas y es característica de cada tensoactivo [34].

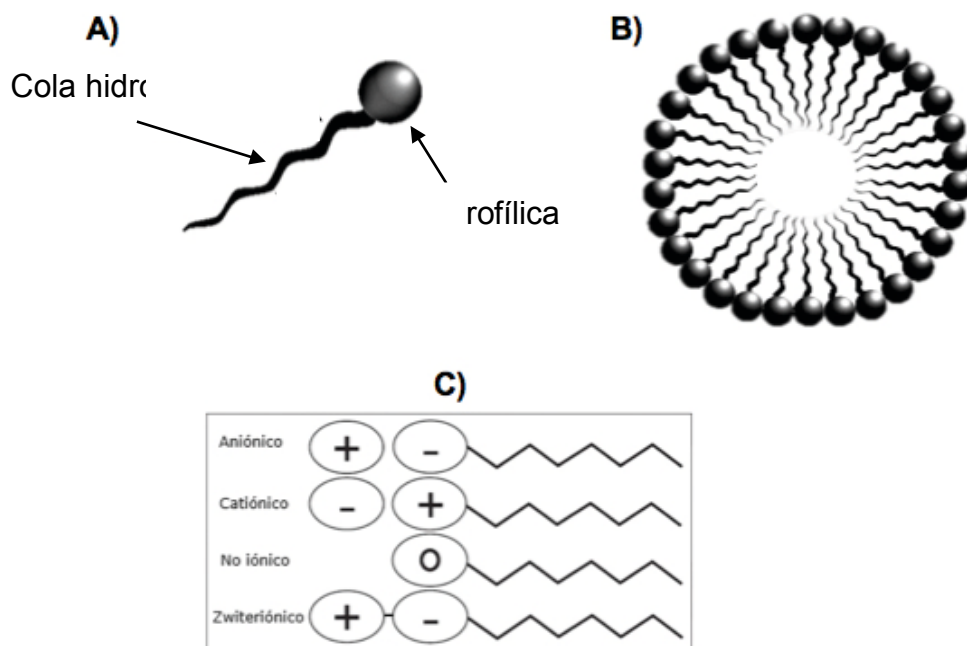


Figura 8. Representación esquemática de una molécula de tensoactivo (A), que al estar en contacto con agua forma micelas (B). Tipos de tensoactivos que existen (C).

Las proteínas de membrana son frecuentemente solubles en micelas formadas por tensoactivos anfipáticos. Estos solubilizan a las proteínas de membrana mediante la creación de un entorno similar al de los lípidos naturales en donde se encuentra la proteína [3] (Figura 9), por lo que son vitales en el aislamiento y la purificación de proteínas de membrana. Estos se clasifican en cuatro grupos dependiendo de la naturaleza de su grupo hidrofílico [3,33].

1) *Tensoactivos aniónicos*, tienen una porción de superficie activa que lleva una carga negativa. En una solución acuosa, la molécula ioniza cationes libres. Entre los tensoactivos considerados fuertes con respecto a la desnaturalización de las proteínas de membrana se encuentran los aniónicos tales como dodecilsulfato sódico (SDS), un agente solubilizante muy eficaz. Al igual que otros tensoactivos cargados, su libre asociación e interacción con las proteínas es altamente dependiente de la fuerza iónica de la solución [35].

2) *Tensoactivos catiónicos* tienen una porción de superficie activa que lleva una carga positiva. En este caso, la molécula del agente tensoactivo contiene un anión inorgánico para equilibrar la carga [36].

3) *Tensoactivos zwitteriónicos* poseen grupos de cabeza polares que en ionización puede impartir cargas tanto positivas como negativas. La carga positiva siempre se realiza por un grupo de amonio y la carga negativa es a menudo un carboxilato [36].

4) *Tensoactivos no iónicos* son generalmente considerados suaves y relativamente no desnaturizantes ya que sólo rompen las interacciones lípido-proteína sin afectar las interacciones proteína-proteína. Esto permite que muchas proteínas de membrana se solubilicen sin que se afecten sus características estructurales, de tal manera que pueden aislarse en su forma biológicamente activa; es por esto que son los más recomendables. Sin embargo, la elección del tensoactivo depende de la estabilidad de la proteína en el mismo y del estudio a realizar [36].

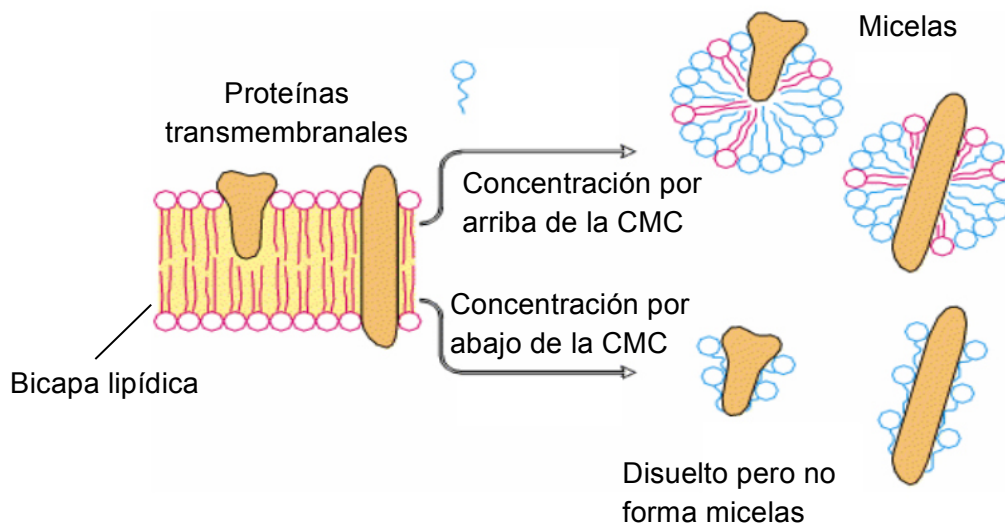


Figura 9. Solubilización de proteínas integrales de membrana utilizando tensoactivos no iónicos.

ANTECEDENTES

Las primeras observaciones sobre el comportamiento en medio acuoso de las lecitinas, un tipo de fosfolípido técnicamente denominado fosfatidilcolina, fueron a mediados del siglo XIX, cuando por primera vez se describieron fenómenos de hinchamiento provocados por la hidratación de estos lípidos [37].

En 1911, Otto Lehmann publicó una representación de micrografía a la que llamó “células artificiales”, pero no fue sino hasta el año 1965 cuando el científico británico A.D. Bangham y sus colaboradores, constataron que ciertos lípidos en agua forman inmediatamente esferas cuyas paredes se encuentran organizadas en bicapas debido a que cada molécula tiene una parte hidrosoluble y una hidrofóbica (moléculas anfifílicas) [38]. A partir de ese momento, estas estructuras vesiculares fueron nombradas liposomas.

La permeabilidad selectiva de los liposomas, llevó al investigador británico G. Gregoriadis a mediados de 1970, a formular el concepto de liposoma como transportador de sustancias con actividad farmacológica, es decir, como sistemas de liberación controlada [39]. Trabajos posteriores del mismo autor y sus colaboradores, establecieron la factibilidad de emplear los liposomas con enzimas, sustancias antitumorales y antimicrobianas, además de su habilidad para potenciar la respuesta inmune de antígenos encapsulados [40].

El uso de liposomas como modelo de membranas biológicas derivó de la similitud que ambas presentan entre sí, por lo que la reconstitución de proteínas de diferente naturaleza, es una poderosa herramienta para estudiar la interacción proteína-membrana y permite investigar el transporte y/o las propiedades catalíticas de cualquier proteína de membrana sin interferencia de otros componentes [41]. Los proteoliposomas se han caracterizado usando diferentes técnicas, como la dispersión dinámica de la luz (DDL) [42-46], que permite determinar la polidispersidad y tamaño de los liposomas y el cambio que estos sufren al insertarse la proteína; y la microscopía confocal usada para el estudio de la interacción proteínas-liposomas y para determinar la localización de la proteína (si es intrínseca a la membrana o periférica), esto mediante la incorporación de fluoróforos [47-49].

La interacción de las proteínas con los liposomas se puede dar por atracciones electrostáticas que pueden ser influidas por factores externos como el pH y la fuerza iónica del medio y por interacciones hidrofóbicas que ocurren entre regiones no polares y las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.

Una proteína fuertemente estudiada en proteoliposomas es el citocromo c, proteína periférica globular catiónica de 12 kDa de masa molecular que se encarga de la transferencia de electrones entre la citocromo c reductasa y la citocromo c oxidasa en la cadena respiratoria y que se encuentra en la parte interna de la membrana mitocondrial. Es una proteína que presenta un grupo hemo enlazado de forma covalente a su estructura. El citocromo c es considerado un paradigma de proteína periférica de membrana, y su relación con los fosfolípidos ha sido ampliamente estudiada mediante diferentes técnicas [50, 51]. La interacción de esta proteína con los fosfolípidos de las membranas depende directamente de la carga de los mismos, así como de la fuerza iónica del medio en el que se encuentra. Se ha demostrado, que la interacción depende, tanto de factores electroquímicos como de la naturaleza hidrofílica de ambos componentes [50].

Otras proteínas que también se han estudiado en liposomas son las porinas, estas son proteínas integrales capaces de formar canales hidrofílicos en las membranas externas de las bacterias Gram negativas. Son proteínas bastante estables en solución, contrariamente a lo que ocurre en la mayoría de proteínas integrales. Las porinas han sido purificadas y reconstituidas en liposomas para analizar parámetros físicoquímicos tales como la conductancia, la selectividad y la regulación del voltaje [52].

La bacteriorrodopsina (bR) es una proteína transmembranal encargada de bombear protones desde el citoplasma de las bacterias tales como *Halobacterium salinarium* hacia el espacio extracelular [53]. El mecanismo de inserción de proteínas se ha estudiado empleando la bR y diferentes tensoactivos, con la finalidad de determinar cuál es el mejor para realizar una reconstitución eficiente, entre los que destacaron el octil glucósido y Triton X-100 [54].

En los proteoliposomas preparados con *E. coli* se ha demostrado que los parámetros de temperatura de fase de transición y pH del medio son importantes a

considerar a la hora de reconstituir, ya que pueden afectar el diámetro del liposoma y tener una población polidispersa [42]. En la última década, y con el desarrollo de nuevas metodologías se ha logrado estudiar la cinética y el mecanismo de transporte de muchas proteínas, por lo que se considera que el uso de proteoliposomas es una nueva herramienta que puede ser muy útil para el estudio de diferentes proteínas [55].

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Las proteínas de membrana juegan un papel muy importante en los procesos biológicos esenciales para la vida, sin embargo, la complejidad de las membranas plasmáticas hace difícil su estudio *in situ* y extraerlas de su medio natural constituye un reto ya que generalmente se ve afectada su estructura y actividad. Por lo anterior, en México son muy pocos los grupos que trabajan con proteínas de membrana y prácticamente no se han utilizado los modelos biomiméticos para el estudio de las mismas. Es por esto que surge la necesidad de estandarizar métodos de reconstitución de estas proteínas en liposomas donde se encuentran más estables y de esta manera desarrollar una línea de investigación donde se logre estudiar a este tipo de macromoléculas no sólo desde el aspecto bioquímico, sino también el estructural.

Por otro lado, el uso de proteoliposomas puede ayudarnos a estudiar sistemas multienzimáticos donde participan proteínas de naturaleza diferente que anteriormente se tenían que estudiar por separado ya que cada una necesitaba condiciones diferentes para mantenerse estables y activas, lo que abre un nuevo camino en el estudio de este tipo de sistemas.

HIPÓTESIS

Los proteoliposomas son sistemas biomiméticos que pueden estabilizar no sólo a proteínas de origen membranal sino también a proteínas solubles. Además, permiten el estudio de sistemas enzimáticos formados por dos o más proteínas de naturaleza diferente (membranal y solubles).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Utilizar liposomas para analizar la interacción de proteínas con membranas plasmáticas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Preparar liposomas de 1,2-Dimiristoil-*sn*-fosfatidilcolina (DMPC): 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-fosfatidilcolina (POPC) mediante el método de deshidratación-hidratación y extrusión.
- 2) Determinar la estabilidad de los liposomas con respecto al pH y temperatura por dispersión dinámica de la luz.
- 3) Reconstituir en liposomas a la lisozima de huevo de gallina (LYS), esticolisina I (St-I), citocromo c oxidasa (COX), hidratasa de *Lactobacillus plantarum* (HLP) y lectina de *Mytilus edulis*.
- 4) Comprobar que las proteínas se incorporaron en los liposomas por técnicas como la dispersión dinámica de la luz, electroforesis SDS-PAGE y mediante la cuantificación de proteína.
- 5) Analizar el cambio de la estructura secundaria de las proteínas incorporadas en los proteoliposomas y en solución.
- 6) Caracterizar las asociaciones de las proteínas con las vesículas lipídicas mediante microscopía confocal.
- 7) Verificar la utilidad de los proteoliposomas para el estudio de sistemas enzimáticos formados por proteínas de membrana y solubles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos fosfolípidos zwitteriónicos comerciales, estos fueron el 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-fosfatidilcolina (POPC) y 1,2-Dimiristoil-*sn*-fosfatidilcolina (DMPC), ambos obtenidos de Sigma Aldrich. El POPC (Figura 10 A) presenta una cadena derivada del ácido palmítico (16:0) y una cadena derivada del ácido oleico (18:1). Tiene una masa molar de 760.10 g/mol y una temperatura de transición (T_m) de -2°C . La insaturación que presenta en una de sus cadenas hidrocarbonadas confiere una gran movilidad a este lípido cuando se encuentra en la bicapa. El DMPC (Figura 10 B) presenta dos cadenas hidrocarbonadas derivadas del ácido mirístico (14:0), tiene una masa molar de 677.95 g/mol y una T_m de 23°C . Presenta una menor movilidad que el POPC.

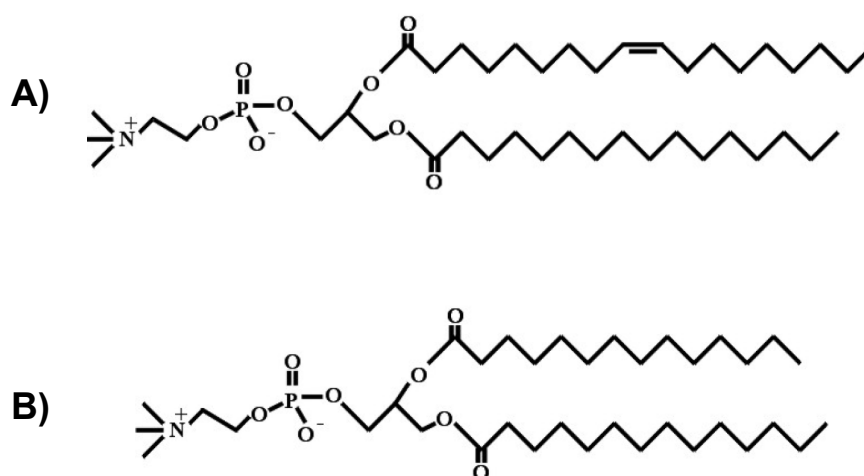


Figura 10. Fosfolípidos zwitteriónicos utilizados para la elaboración de los liposomas. A) 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-fosfatidilcolina (POPC) y B) 1,2-Dimiristoil-*sn*-fosfatidilcolina (DMPC).

En este trabajo se emplearon dos tensoactivos:

1) Octil β -D-1-tioglucopiranosido (OTGP). Es un tensoactivo no iónico, utilizado para la solubilización y reconstitución de proteínas de membrana. Es fácilmente eliminado

mediante diálisis. Su CMC es de 9 mM (20-25°C) (Figura 11 A). Con este tensoactivo es estable la HLP.

2) n-Dodecil β-D-maltósido (DDM) (Figura 11 B). Tensoactivo no iónico soluble en agua, es eficiente en la solubilización de proteínas integrales de membrana. Su CMC es de 0.15 mM (20-25°C). Se utilizó para que no se afectara la estabilidad y actividad de la citocromo c oxidasa, ya que este tensoactivo se encontraba dentro de las condiciones en las que venía la proteína.

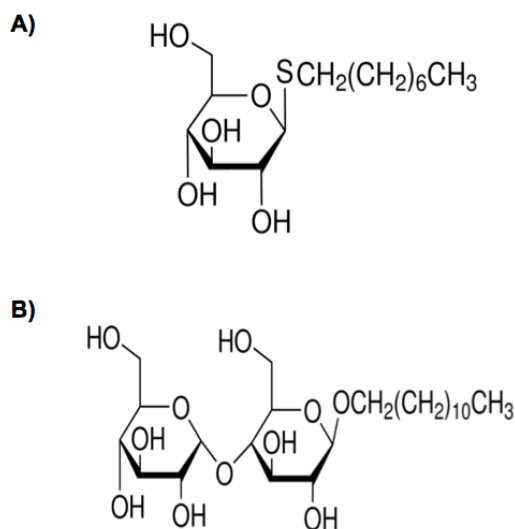


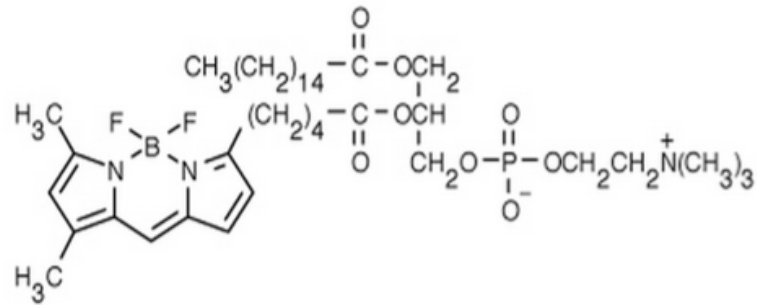
Figura 11. Tensoactivos utilizados en la solubilización y reconstitución de las proteínas de membrana. A) Octil β-D-1-tioglucopiranósido y B) n-Dodecil β-D-maltósido.

Para marcar a los constituyentes del proteoliposoma se emplearon dos sondas fluorescentes:

1) β-BODIPY® FL C5-HPC, fluoróforo no polar, se ha utilizado para marcar los lípidos, tiene un peso molecular de 797.77 g/mol, λ_{ex} 503 nm; λ_{em} 512 nm en metanol (Figura 12 A).

2) Rodamina B, es un marcador polar fluorescente para proteínas, tiene un peso molecular de 479.01 g/mol, λ_{ex} 553 nm; λ_{em} 627 nm en metanol (Figura 12 B).

A)



B)

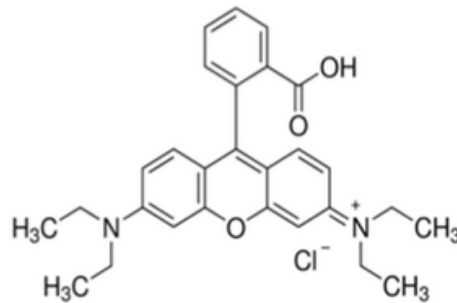


Figura 12. Sondas fluorescentes utilizadas para marcar los componentes de los proteoliposomas. A) Estructura química de β -BODIPY® FL C5-HPC utilizado para marcar al liposoma. B) Estructura química de rodamina B utilizada para marcar a las proteínas utilizadas en el estudio.

Preparación de liposomas

Preparación de la bicapa fosfolipídica seca

Las vesículas lipídicas se prepararon agregando cloroformo:metanol (50% v/v) a la mezcla lipídica DMPC:POPC 1 mM (relación molar 1:1). El disolvente se evaporó mediante vacío, obteniendo una fina película lipídica en el fondo del matraz bola de destilación. Las últimas trazas de disolvente se eliminaron colocando en un

desecador de vacío durante 2 horas. Para evitar el cambio de fase de la mezcla de fosfolípidos, todos los pasos para la formación de liposomas se realizaron a una temperatura por encima de la temperatura de transición (25°C), usando para este fin un baño termostático.

Hidratación de la película fosfolipídica

A la muestra seca, se le añadieron 3 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM pH 6.5, dejando hidratar durante 1 hora, formando así vesículas multilamelares (MLV), mediante agitación manual de la muestra.

Método de extrusión, formación de vesículas unilamelares grandes (LUV)

Este método comienza por la deshidratación-rehidratación. El Mini-Extruder Avanti® de Avanti Polar lipids permite preparar vesículas unilamelares por extrusión de una forma eficiente y rápida (Figura 13). Para este método, la solución de MLV es pasada repetidas veces a través de un filtro de policarbonato de tamaño de poro definido. El resultado son vesículas unilamelares de tamaño uniforme, en donde a partir de una disolución turbia se obtiene una solución translúcida, indicativo de que los LUV se encuentran formados. Se utilizan jeringas que permiten pasar 1 mL de la solución cada vez. En el primer paso a través de la membrana, la distribución de tamaño de liposomas tiende a una distribución bimodal, después de suficientes pasos a través de la membrana, se obtiene una población monodispersa. En este trabajo, la extrusión con este equipo se realizó 13 veces a través de la membrana de 200 nm (Whatman). Los liposomas se dejaron reposar durante una noche a 4°C.

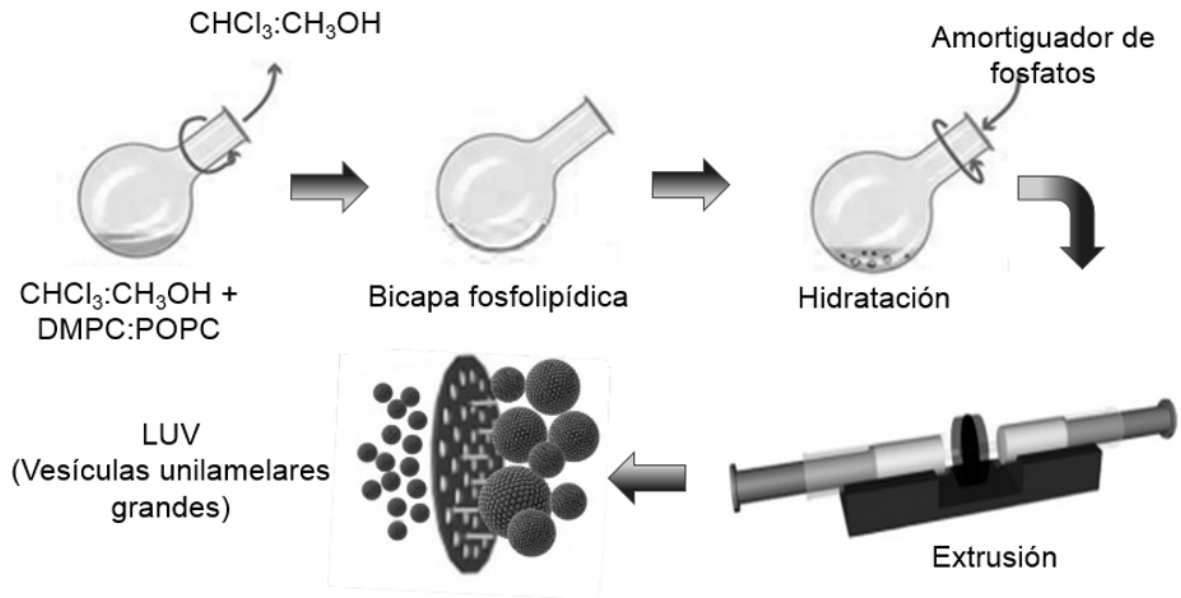


Figura 13. Representación esquemática de la preparación de liposomas unilamelares grandes (LUV), mediante la técnica de deshidratación-hidratación y extrusión.

Preparación de proteoliposomas

Para analizar la localización de las proteínas en la membrana, se seleccionaron dos proteínas; una que se sabe que es intrínseca a la membrana (citocromo c oxidasa), y una que se sabía que interactuaba con la membrana pero se desconocía de qué manera (Hidratasa de *Lactobacillus plantarum*, HLP), a ambas que se les adicionaron las sondas fluorescente; Además, se seleccionaron otras proteínas no membranales para determinar si estos sistemas biomiméticos eran útiles para el estudio de otro tipo de proteínas; las proteínas seleccionadas fueron: la lisozima (proteína soluble), la esticolisina (proteína formadora de poros) y la lectina de *M. edulis* (proteína intrínsecamente desestructurada).

En todos los casos se formaron las LUV por el método de extrusión a 25°C, utilizando una membrana de 200 nm, una vez formados los proteoliposomas, estos

se dejaron reposar a 4°C durante toda la noche, se dializaron utilizando el mismo amortiguador para la hidratación y una membrana de corte de 14 kDa y finalmente se lavaron por ultracentrifugación para eliminar todo lo que no se unió al liposoma. Dicho lavado se realizó utilizando una ultracentrífuga (Beckman, XL 90) a 50 000 x g (Rotor 60 Ti) durante 40 minutos, el precipitado que contenía a los proteoliposomas se resuspendió con amortiguador de fosfato de sodio 20 mM pH 6.5 (NaPB).

Preparación de la bicapa fosfolipídica seca con sonda

Se prepararon vesículas lipídicas agregando 1.75 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (50% v/v) (Grado HPLC) a la mezcla lipídica DMPC:POPC 1 mM (relación molar 1:1), posteriormente se le adicionó 0.1% (fracción molar) de β -BODIPY® FL C5-HPC (Life Technologies), para aquellas proteínas que se analizaron por microscopia confocal. El disolvente se evaporó mediante vacío, obteniendo una fina película lipídica en el fondo del matraz de bola de destilación. Las últimas trazas de disolvente se eliminaron colocando en un desecador al vacío durante 2 horas.

Citocromo c oxidasa

La enzima citocromo c oxidasa o complejo IV (Sigma Aldrich) es una proteína transmembranal, tiene un peso molecular de 20.01 kDa [56]. Los proteoliposomas se formaron hidratando la bicapa fosfolipídica seca con amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 7.8 con EDTA 5 mM y n-Dodecil β -n-maltósido 3.9 mM que contenía a la proteína (0.2 mg/mL concentración final).

Hidratasa de *Lactobacillus plantarum* (HLP)

Se aisló de células de *Lactobacillus plantarum* ATTC8014 adaptadas a un medio con ácido linoleico (0.2 μ L de ácido linoleico (AL) por mL de cultivo) [57]. La bicapa fosfolipídica seca con sonda, se hidrató con 3 mL de HLP recién purificada (0.2 mg/mL concentración final) en fosfato de potasio 20 mM pH 6.5, FAD 0.1 mM, glicerol 10%, OTGP 15 mM (Sigma Aldrich) y rodamina B (5 μ g/mL concentración

final) (Sigma Aldrich). El exceso de detergente, FAD y glicerol se eliminó por diálisis con amortiguador de fosfatos de sodio 20 mM pH 6.5 con una membrana de corte de 14 kDa. Esta proteína se purificó en nuestro laboratorio.

Esticolisina I

La esticolisina I (St-I) es una actinoporina (proteína soluble en agua con la capacidad de formar poros al insertarse en las membranas biológicas), tiene un peso molecular de 19.4 kDa [58]. Debido a la naturaleza de esta proteína que forma poros, en este caso se formaron primero los liposomas LUV y ya formados se adicionó la proteína. Es decir, la adición de la proteína no se hizo durante la hidratación de la bicapa fosfolipídica. Se prepararon proteoliposomas a 3 diferentes concentraciones 3, 6 y 10 nM, en amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.5.

Lisozima

La proteína comercial lisozima de clara de huevo (muramidasa) (Hampton Research) tiene un peso molecular de 14.6 kDa, hidroliza preferentemente los enlaces glucosídicos β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina presente en el peptidoglicano de la pared celular de ciertos microorganismos, particularmente de bacterias Gram-positivas [59]. Los proteoliposomas se prepararon hidratando la bicapa fosfolipídica con amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.5 que contenía 0.2 mg/mL de concentración final de esta proteína.

Lectina de *Mytilus edulis*

La lectina del molusco marino *Mytilus edulis*, es una proteína que reconoce galactósidos, tiene un peso molecular de 17 kDa, y presenta su óptimo de actividad a 37°C y pH de 7.4, es una proteína con fuerte tendencia a oligomerizar cuando se incrementa su concentración. Los proteoliposomas se prepararon hidratando la bicapa fosfolipídica con Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM que contenía 0.2

mg/mL de concentración final de la proteína. Esta proteína se purificó en nuestro laboratorio.

Cuantificación de fosfolípidos

Para la cuantificación de los fosfolípidos incorporados en el liposoma se utilizó el ensayo de Stewart que se basa en la formación de un complejo colorido entre el fosfolípido y el ferrocianato de amonio. La ventaja de este método es que la presencia de fosfato inorgánico no interfiere con este ensayo y por lo tanto se pueden utilizar amortiguadores a base de fosfato [60]. La concentración de fosfolípidos se determinó utilizando una curva patrón elaborada con POPC y DMPC (Tabla 1 y Figura 14).

Preparación de los reactivos y estándares

Reactivo de ferrocianato de amonio: Disolver 2.7 g de cloruro férrico hexahidratado (Sigma Aldrich) y 3.0 g de tiocianato de amonio (Sigma Aldrich) en agua Milli-Q, llevar a 100 mL en un matraz aforado. La solución es estable a temperatura ambiente durante varios meses.

Solución estándar de fosfolípidos: Disolver 1.3 mg de POPC y 1.2 mg de DMPC con una mezcla cloroformo:metanol (50%v/v), llevarlo a 1.75 mL en un microtubo de 2 mL. Las diferentes concentraciones utilizadas fueron preparadas en tubos de vidrio (4 mL) con tapón de rosca Pyrex® de la manera que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Preparación de los estándares para la elaboración de la curva de calibración de fosfolípidos.

Tubo	Estándar (µL)	Cloroformo (µL)	Ferrocianato de amonio (µL)	Concentración final de fosfolípidos (mg/mL)
A	120	1380	1500	0.11
B	100	1400	1500	0.10
C	80	1420	1500	0.08
D	60	1440	1500	0.06
E	40	1460	1500	0.04
F	20	1480	1500	0.02
G	0	1500	1500	0

Cada tubo se agitó vigorosamente durante aproximadamente 1 minuto y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos. La fase orgánica fue leída espectrofotométricamente a una longitud de onda (λ) de 488 nm. Este ensayo se realizó por triplicado. La concentración de la muestra se determinó mediante la curva patrón que se presenta en la figura 14.

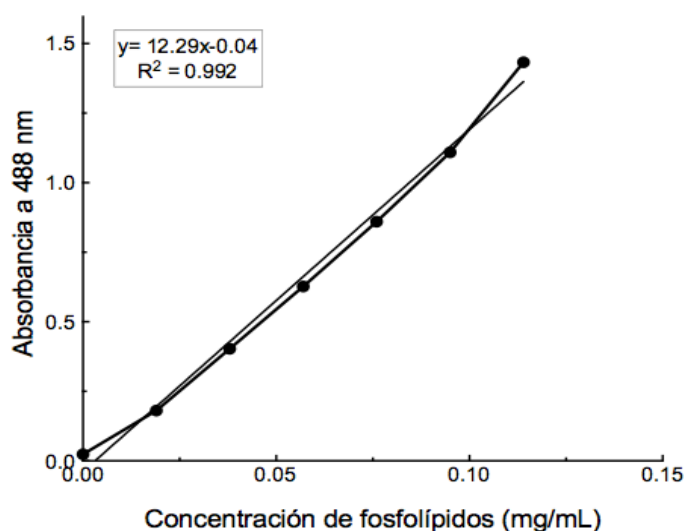


Figura 14. Curva patrón para la cuantificación de fosfolípidos.

Estudios de dispersión dinámica de la luz (DDL)

Para determinar la estabilidad de los liposomas frente a posibles variaciones en las propiedades fisicoquímicas del medio, se realizaron estudios de dispersión dinámica de la luz (DDL). Con esta técnica se analizan las fluctuaciones de intensidad en la luz dispersada (y detectada a cierto ángulo) por una disolución de partículas al hacer incidir sobre la misma una luz de longitud de onda no mucho mayor que el tamaño de dichas partículas. Estas fluctuaciones son consecuencia del movimiento browniano y, por tanto, se pueden correlacionar con el coeficiente de difusión de las mismas y con su radio hidrodinámico [61].

El equipo utilizado fue un Zetasizer μ V de Malvern Instruments, este equipo permite la determinación de la distribución de tamaño hidrodinámico de partículas en un amplio rango así como su polidispersidad. La temperatura de medida puede llegar hasta los 90°C. El equipo mide la intensidad de luz dispersada a un ángulo de 90° respecto a la prolongación del rayo incidente, técnica denominada detección de gran ángulo o backscatter. Los datos adquiridos durante la medida son procesados por el software del propio equipo (zetasizer μ V), a partir del cual se obtiene una distribución del diámetro hidrodinámico, determinado a través del coeficiente de difusión mediante la ecuación de Stokes-Einstein [62]. El software permite expresar los resultados obtenidos en dos modos que denomina: distribución en intensidad y distribución en volumen.

Ecuación de Stokes-Einstein

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Donde d_H es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión de traslación, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad de la solución.

En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura (en un intervalo de 15 a 90°C) en el tamaño y polidispersidad de las vesículas lipídicas en amortiguador de fosfato

de sodio 20 mM pH 6.5. La muestra de liposomas se preparó a una concentración de 1 mM.

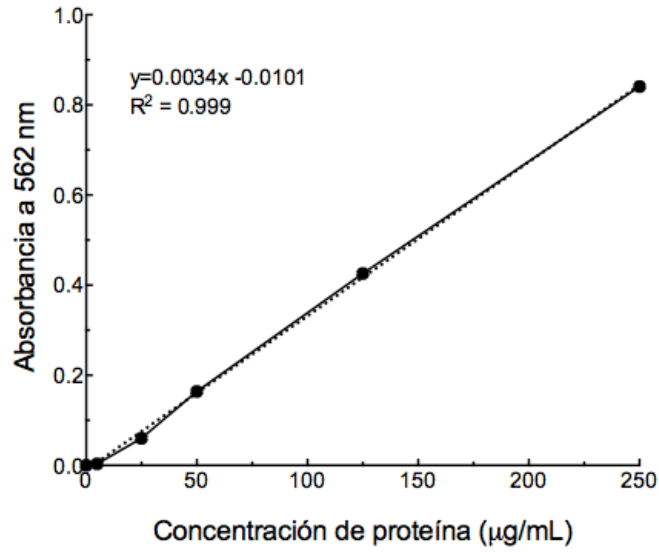
Para determinar el efecto del pH en los liposomas, se emplearon diferentes amortiguadores con valores de pH comprendidos entre 4.5 y 8. Para este último estudio se colocaron 90 μ L de muestra y 810 μ L del amortiguador correspondiente, se mezcló en el agitador para tubos durante 5 minutos y se dejó reposar una hora a temperatura ambiente.

Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método del ácido bicinconínico (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific), el cual es una formulación basada en ácido bicinconínico (BCA) para la detección colorimétrica y la cuantificación de proteína total. Este método combina la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} llevada a cabo por la proteína en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección altamente sensible del catión cuproso Cu^{1+} usando un reactivo que contiene BCA. La reacción de este ensayo produce una coloración púrpura formada por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso [63]. El complejo exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm y presenta un comportamiento lineal con el incremento en la concentración de proteína dentro del intervalo de 5-250 $\mu\text{g/mL}$. La estructura macromolecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la presencia de cuatro particulares aminoácidos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación de color con el BCA [64]. Este método es el más apropiado debido a que no tiene interferencia de los componentes de las muestras analizadas.

Para construir la curva patrón que se utilizó para cuantificar el contenido de proteína total, se preparó por triplicado una serie de diluciones con concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino (Figura 15). Tanto los estándares como las muestras fueron tratados de acuerdo a las instrucciones del kit. Todas las mediciones de absorbancia de este estudio, fueron leídas con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

A)



B)

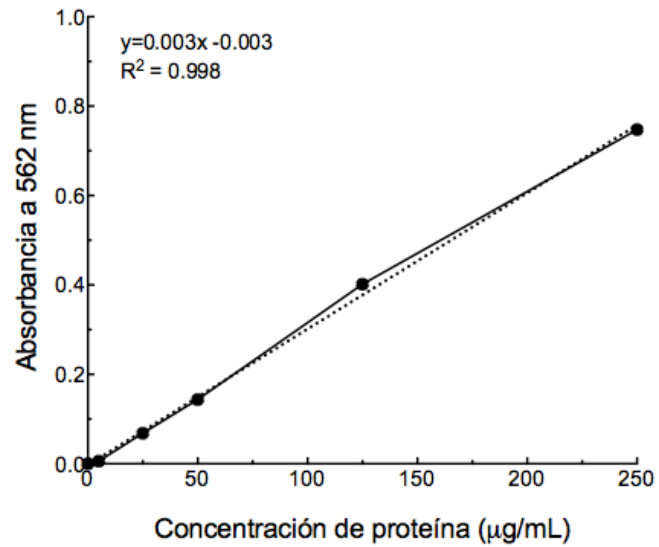


Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de proteína. Se utilizó el método del ácido bicinconínico y albúmina de suero de bovino como estándar. A) Para las muestras en amortiguador de fosfatos. B) Para la cuantificación de la lectina de *Mytilus edulis* (en amortiguador Tris-HCl).

Microscopía confocal

Es una técnica que permite el estudio de muestras marcadas con sondas fluorescentes, haciendo secciones ópticas de las mismas mediante la excitación de la muestra punto a punto por medio de un barrido láser. Las lentes del microscopio enfocan la luz láser sobre un sólo punto de la muestra con gran intensidad (punto focal), posteriormente el láser barre la muestra punto por punto generando una imagen en 3D. El microscopio y el sistema óptico enfocan la luz emitida por el punto focal sobre un segundo plano, el punto confocal, llegando así al detector a través del diafragma, que es una pequeña abertura situada frente al detector que elimina de forma óptica toda la información que se encuentra fuera del plano focal, por lo que sólo la información que se encuentre dentro de este plano será detectada con calidad. En el detector, la luz reflejada es transformada en una señal eléctrica digitalizada, mediante un convertidor analógico digital que incrementa el contraste de las imágenes, y posteriormente es recogida en un ordenador [65].

La interacción de las dos proteínas de membrana analizadas en este proyecto con los liposomas, se siguió mediante esta técnica. Los fosfolípidos fueron marcados con sonda hidrofóbica β -BODIPY® FL C5-HPC, mientras que las proteínas fueron marcadas con la sonda hidrofílica rodamina B. Se colocó una alícuota de 5 μ L de proteoliposomas en un portaobjetos de vidrio (1 x 3 en aprox. 1,0 cm), con un cubreobjetos (102 x 76 mm) y se selló con esmalte de uñas. Posteriormente se analizó mediante microscopía confocal (Leica TCS SP5 X, Leica Microsystems), usando un láser de excitación de 494 nm y un rango de emisión de 501-543 nm para β -BODIPY® FL C5-HPC. Para rodamina B se utilizó un láser de excitación de 554 nm y un rango de emisión de 588-648 nm.

Para las proyecciones en 3D de las muestras, se hizo un escaneo con incrementos de 0.3-0.49 μ m, a través de la mitad superior del proteoliposoma. Estas exploraciones se combinaron entonces, fusionando los colores, utilizando el software LAS AF Versión Lite 4.3 (Leica Microsystems).

Electroforesis SDS-PAGE

Otra forma de verificar que una proteína se incorporó en los liposomas es por medio de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes de dichos proteoliposomas. La electroforesis es un método para determinar la masa molecular y la pureza de una proteína [66]. Se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con una concentración de acrilamida al 12%, utilizando β -mercaptoetanol como agente reductor.

Determinación de la estructura secundaria por técnica de dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica de espectroscopia de absorción, se emplea para el estudio de la estructura secundaria de las proteínas (hélices α , hojas β , giros y lazos) en solución. Esta técnica se basa en la quiralidad de los aminoácidos que conforman a la proteína, utiliza las propiedades de la luz polarizada formada por dos componentes polarizados circulares, uno a la derecha y el otro a la izquierda, estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra, induce un desfaseamiento y un cambio de magnitud en ambos componentes circularmente polarizados de la luz. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse [67,68]. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda incidente, pudiéndose obtener un espectro de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda (λ).

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm), de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina y fenilalanina. La asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno ya que los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la

macromolécula. Los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína y las señales obtenidas son sensibles a los cambios en la misma. Por otro lado, los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices alfa, hojas beta, giros y lazos) (Figura 16) [67].

Los espectros de dicroísmo circular se adquirieron en un espectropolarímetro Jasco-720 a una temperatura constante de 20°C regulado por un recirculador de agua (Thermo Neslab). Las medidas se realizaron a concentraciones de proteína de 0.2 mg/mL, empleando una celda de 0.1 cm de paso de luz (400 μ L de muestra). El espectro fue adquirido a una velocidad de 20 nm/min. El espectro promedio de las tres corridas realizadas por muestra se analizó por medio del programa DichroWeb con el fin de estimar el contenido de estructura secundaria que presentaba.

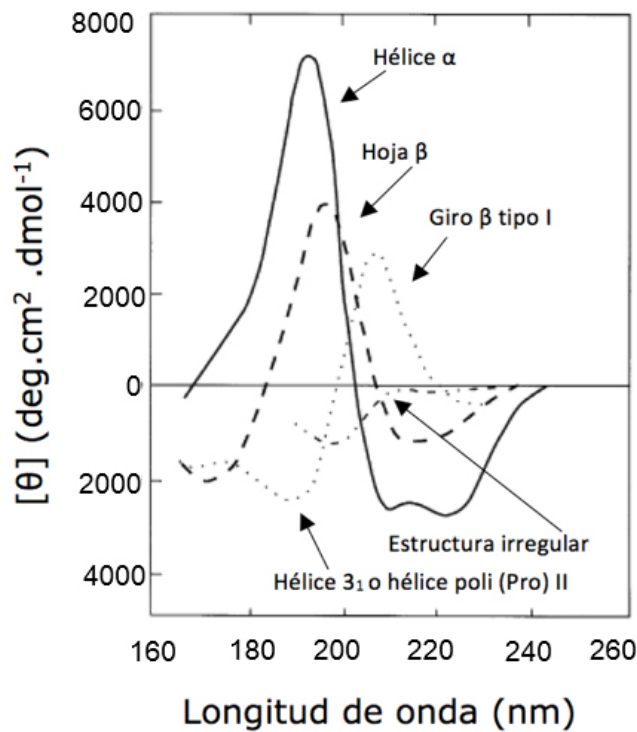


Figura 16. Espectros característicos en el UV lejano asociados a los diversos tipos de estructura secundaria.

Cuantificación de la actividad de las proteínas estudiadas dentro del liposoma y en solución.

Actividad de la citocromo c oxidasa

La actividad de esta enzima se determinó utilizando el kit desarrollado por Sigma para este fin (The Cytochrome c Oxidase Assay Kit). Este consiste en un ensayo colorimétrico que se basa en el decremento de la absorbancia del ferrocitocromo c a 550 nm causada por la oxidación del ferricitocromo c por la enzima. Una unidad oxida 1.0 mmoles de ferrocitocromo C por minuto a pH 7 a 25°C.

Actividad de la hidrataza de *Lactobacillus plantarum*

Cada reacción de hidratación del ácido linoleico se llevó a cabo por triplicado y consistió en colocar en un tubo con tapa de rosca, 5 mL de amortiguador de fosfato de potasio 20 mM a pH 6.5, 19.8 mg (22 µL) de AL como sustrato emulsificado con Tween 80 al 0.25% (p/v). A esta mezcla se le adicionaron 100 µL de proteína pura o de proteoliposomas (0.2 mg/mL) según el caso. La reacción se inició incubando los tubos a 30°C durante 24 h y agitación orbital a 200 rpm. Después de la incubación, los ácidos grasos se extrajeron de la mezcla de reacción adicionando 4 mL de hexano-acetato de etilo (70%-30%) y posteriormente realizando dos ciclos de congelamiento-descongelamiento (-20°C y 6°C, respectivamente) seguido de centrifugación (3 500 x g, 40 min, 4°C) para así, mejorar el rompimiento de la emulsión de ácidos grasos y obtener mayor rendimiento de lípidos extraídos en la fase orgánica [69]. Esta fase fue separada de la fase acuosa y lavada primero con 1 mL de solución saturada de NaCl y posteriormente con 2 lavados de 2 mL de H₂O desionizada (18 mΩ*cm) cada uno. Finalmente se secó durante una noche mediante la adición de Na₂SO₄ anhidro y después se filtró a través de papel Whatman No. 2. Los ácidos grasos se metilaron y se analizaron por cromatografía de gases para determinar cuantitativamente la producción del ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico (10-HOE) a partir de AL por comparación de los tiempos de retención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos [57].

Actividad hemolítica de la esticolisina St-I

Se obtuvo sangre humana fresca de un donante sano. Los eritrocitos se aislaron por centrifugación y se lavaron dos veces con TBS (NaCl 145 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4). En placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en forma de "U", se colocaron 50 µL de amortiguador TBS en cada pozo; en el primer pozo se colocaron 50 µL de proteína y se hicieron diluciones seriadas (1:2). Finalmente se añadieron 50 µL de eritrocitos al 2%. El mismo procedimiento se siguió con los proteoliposomas. Se utilizaron 2 controles negativos, uno realizando el mismo ensayo sin la presencia de proteína y el otro utilizando liposomas sin proteína (no proteoliposomas) para corroborar que el liposoma no provocaba algún tipo de efecto en los eritrocitos. Esta prueba se realizó a la proteína en solución y a los proteoliposomas (3 y 10 nM). Se incubaron a 25°C por toda una noche y se evaluó la actividad hemolítica a simple vista y a través de un microscopio [70].

Actividad enzimática de la lisozima

La actividad enzimática contra bacterias Gram positivas fue determinada utilizando la técnica turbidimétrica descrita por Shugar (1952). Se preparó una suspensión de sustrato (*Mycrococcus lysodeikticus*) al 0.01% en amortiguador de fosfato de potasio pH 6.2. La reacción se realizó colocando 2.5 mL de la suspensión de sustrato y adicionando posteriormente 100 µL de la proteína, se incubó a 25°C por 5 min, y al término de este tiempo fue medida la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. La actividad de la lisozima y proteolisozima fue determinada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática (U)} = \frac{\text{Lectura inicial} - \text{Lectura final}}{\text{Tiempo (min)}}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{U}{\text{mg proteína}}$$

Prueba de actividad hemaglutinante de la lectina de *Mytilus edulis*

La actividad hemaglutinante de la lectina se realizó en placas de 96 pozos con fondo en forma de "U". Se realizaron diluciones seriadas 1:2, esto es, en cada uno de los pozos, se colocaron 50 μ L de amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, 150 mM de NaCl, y en el primer pozo de cada serie se colocaron 50 μ L de la solución de proteína, se mezcló con el amortiguador y posteriormente se tomaron 50 μ L que fueron trasladados al segundo pozo, de nuevo se mezcló con el amortiguador ya presente y se tomaron otros 50 μ L para llevarlos al tercer pozo y así sucesivamente hasta completar la hilera de 12 pozos. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de la solución de eritrocitos formalinizados al 1%. Se incubaron a 37°C por toda una noche y se examinaron visualmente en busca de hemaglutinación. En donde hubo actividad, se observó una capa uniforme de eritrocitos y donde no presentó actividad se observó precipitación de eritrocitos en el fondo del pozo (Figura 17). Como controles negativos se utilizó amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM y liposomas.

La actividad hemaglutinante se define como el recíproco de la dilución más alta en donde se observó aglutinación. La actividad específica se expresó como U/mg de proteína.

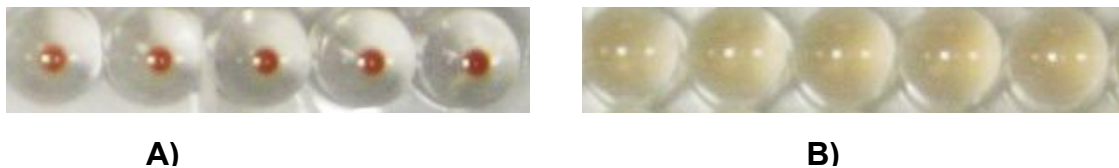


Figura 17. Pruebas de actividad hemaglutinante. A) La precipitación de los eritrocitos muestra que no hay actividad hemaglutinante. B) La presencia de una red que impide la precipitación de los eritrocitos indica la presencia de actividad hemaglutinante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la gran dificultad para trabajar con proteínas de membrana y poder llegar incluso a realizar análisis estructurales, se decidió estandarizar la reconstitución de este tipo de proteínas y en general proteínas hidrofóbicas en un modelo biomimético como son los proteoliposomas y de esta manera poder estudiar no sólo a las proteínas en forma individual sino incluso cuando forman parte de un sistema enzimático donde cada proteína involucrada es de naturaleza diferente (de membrana y soluble).

Estudios de estabilidad de los liposomas

Una vez elaborados los liposomas se procedió a evaluar su estabilidad en diferentes condiciones de temperatura y pH utilizando técnicas de dispersión dinámica de la luz. Los parámetros que se evaluaron fueron el tamaño y la polidispersidad. Este último parámetro es un índice que nos indica si en la solución hay varias especies, o liposomas de diferentes tamaños (polidispersa), lo que se refleja en un índice mayor a 0.5, o si existe una sola especie (monodispersa) que se refleja en un índice menor a 0.5. Se elaboraron vesículas lipídicas de 200 nm, considerando que los liposomas termodinámicamente más estables oscilan entre 100 y 200 nm [71]. Debido a que la T_m de los fosfolípidos DMPC:POPC es de $11.5 \pm 0.4^\circ\text{C}$, durante el proceso de elaboración de los liposomas se trabajó a 25°C , ya que se recomienda trabajar 10°C por encima de la temperatura de transición de fase de la mezcla de fosfolípidos para que estos se encuentren en la fase gel-líquido, donde existe un equilibrio de los estados gel y cristal-líquido [72-74] (Figura 18).

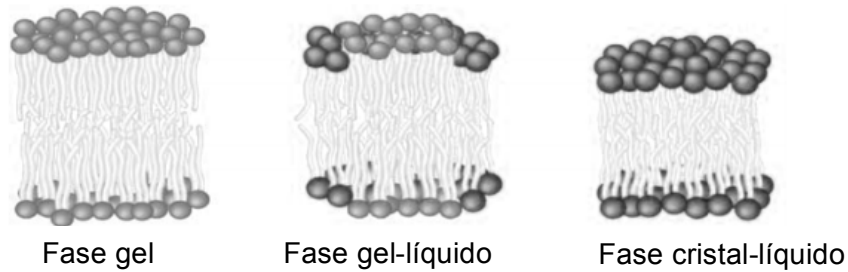


Figura 18. Transición de fases de los fosfolípidos. Debajo de la temperatura de transición los fosfolípidos se encuentran en fase gel (flexible), mientras que arriba de esta se encuentran en fase cristal-líquido (rígida). La fase gel-líquido es la ideal para la elaboración de los liposomas.

Efecto la temperatura

Los liposomas se sometieron a diferentes temperaturas en un intervalo de 15 a 80°C (Figura 19). Se observó que el diámetro obtenido de los LUV se mantenía estable en todo el intervalo de temperaturas. Los valores de polidispersidad fueron menores a 0.2 lo que indica que la muestra se encontraba monodispersa, las pequeñas variaciones observadas son debido al efecto de la forma de los liposomas que no son totalmente simétricos y esféricos. Esta estabilidad confiere una gran ventaja ya que se pueden estudiar proteínas con diferentes óptimos de temperatura para su actividad.

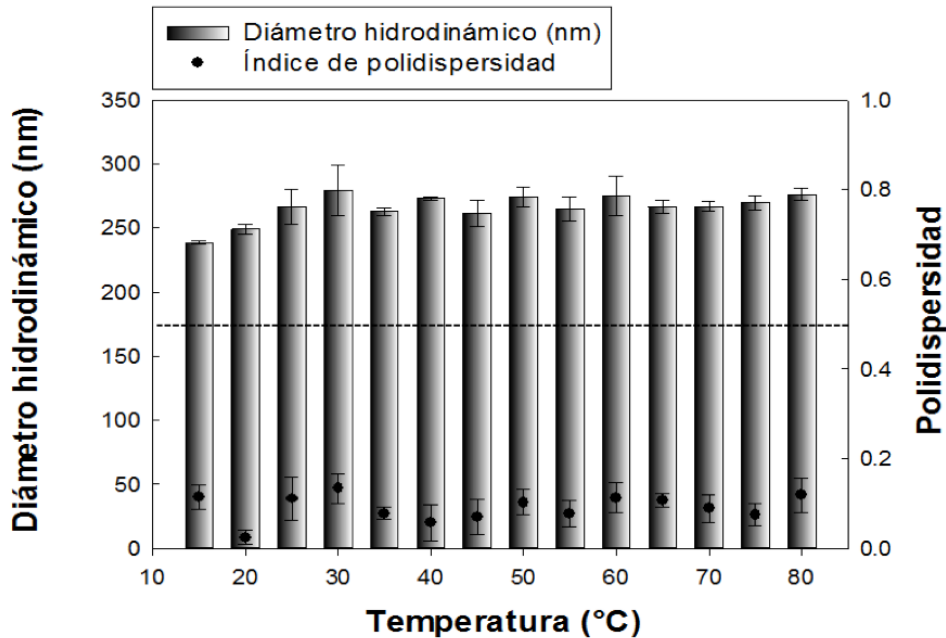


Figura 19. Efecto de la temperatura en el diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad de los liposomas LUV, formados con DMPC:POPC (1:1 mol:mol). Las barras muestran el diámetro hidrodinámico de los liposomas y los círculos el índice de polidispersidad. En ambos casos se muestra la desviación estándar. La línea punteada muestra el valor límite para que una solución se considere monodispersa.

Efecto del pH

Los liposomas se sometieron a variaciones en el pH en un intervalo de 4.5-8.0. En la figura 20 se observa que el diámetro hidrodinámico se ve afectado por el pH, incrementándose conforme se incrementa el pH, sin embargo no hay coalescencia y se mantienen monodispersos. Se ha demostrado que el pH de la solución de fosfolípidos durante la preparación de liposomas puede afectar el tamaño final de los liposomas [75] sin embargo, se pueden utilizar mientras no exista coalescencia. Los resultados mostraron que estos sistemas biomiméticos pueden ser utilizados en un amplio intervalo de pH. En el presente estudio se utilizaron valores de pH entre 6.5 y

7.8 para la elaboración de los proteoliposomas, dependiendo del óptimo de actividad y estabilidad de cada proteína [76].

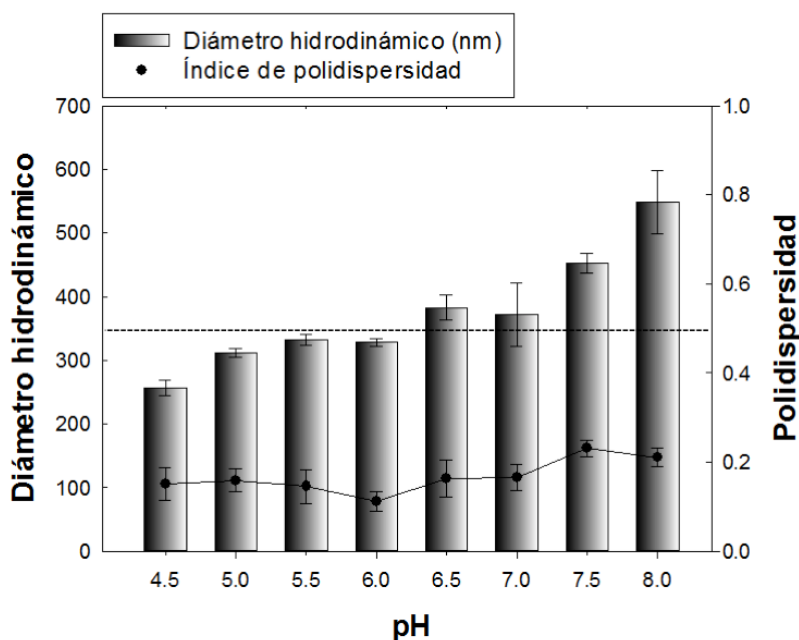


Figura 20. Efecto pH en el diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad de los liposomas LUV, formados con DMPC:POPC (1:1 mol:mol) a una temperatura de 25°C. Las barras muestran el diámetro hidrodinámico de los liposomas y los círculos el índice de polidispersidad. En ambos casos se muestra la desviación estándar. La línea punteada muestra el valor límite para que una solución se considere monodispersa.

Efecto del tensoactivo

Para evaluar el efecto del tensoactivo se utilizó el n-Dodecil β -D-maltósido. En la figura 21 se observa que en presencia del tensoactivo se incrementa el tamaño del liposoma y además se observan dos especies una de un diámetro de 324.5 nm y otra de 5198.8 nm, mientras que sin tensoactivo el tamaño es de 248 nm. Observamos que también se incrementó el índice de polidispersidad hasta un valor de 0.4. Sin embargo, los tensoactivos son reactivos indispensables en la solubilización y la reconstitución de proteínas de membrana [77]. Es importante mencionar que la

especie P1 tiene una abundancia de 90% mientras que la P2 sólo del 9%, es decir sólo el 9% de los liposomas coalescen. El fenómeno físico de coalescencia se refiere a la fusión de los liposomas en solución lo que afecta el tamaño de las vesículas lipídicas y es común en liposomas [78]. El incremento en el tamaño de P1 es de esperarse ya que el tensoactivo ocupa un espacio en el liposoma, mismo que ocuparán las proteínas al desplazarlo durante la diálisis.

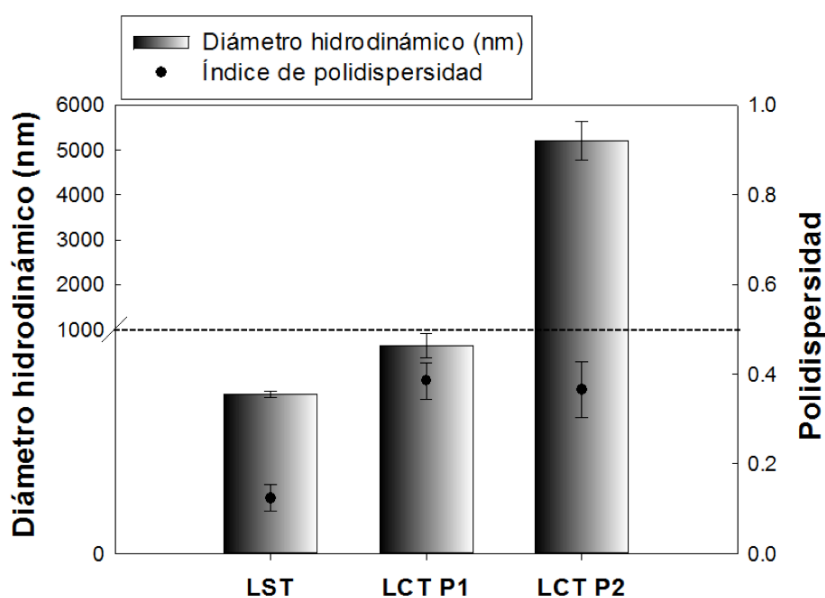


Figura 21. Efecto del tensoactivo n-Dodecil β -D-maltósido. LST corresponde al liposoma sin tensoactivo y LCT al liposoma con tensoactivo, como se observaron dos especies se nombraron LCT P1 y LCT P2. Las barras muestran el diámetro hidrodinámico de los liposomas y los círculos el índice de polidispersidad. En ambos casos se muestra la desviación estándar. La línea punteada muestra el valor límite para que un sistema se considere monodisperso.

Cuantificación de fosfolípidos en los liposomas

Con el fin de determinar si todos los fosfolípidos utilizados en la preparación de los liposomas se incorporaban en los mismos, se cuantificó el contenido de ellos en el liposoma y en solución. Fue interesante notar que en los liposomas se determinó que se encontraban a una concentración de 0.44 mg/mL, siendo que en la preparación de ellos se utilizó una concentración de 0.8 mg/mL. Esto indica que sólo el 50% de los fosfolípidos formaron liposomas y el otro 50% se perdió en la diálisis.

Preparación de los proteoliposomas

Para determinar la factibilidad del uso de liposomas como un sistema biomimético para el análisis de proteínas, se reconstituyeron 5 proteínas de naturaleza diferente, entre las que se encuentran una transmembranal, una membranal pero cuya interacción con la membrana se desconocía, una proteína formadora de poro, una intrínsecamente desestructurada y finalmente una soluble en medio hidrofílico, todas las pruebas se realizaron a una temperatura de 25°C.

Cuantificación de fosfolípidos en los proteoliposomas

Es importante destacar que a todos los proteoliposomas formados con las diferentes proteínas se les cuantificó el contenido de fosfolípidos antes y después de la incorporación de la proteína y esta no varió, se mantuvo muy cercana a 0.44 mg/mL, sólo en el caso de la citocromo c oxidasa, el contenido de fosfolípidos disminuyó a 0.32 mg/mL, esto puede deberse a que como se trata de una proteína transmembranal, necesitó desplazar más fosfolípidos para poder incorporarse en el liposoma. A continuación se muestran los análisis realizados a los proteoliposomas de las diferentes proteínas utilizadas.

Cuantificación de proteína en los proteoliposomas

Un primer criterio que se utilizó para determinar si las diferentes proteínas se habían reconstituido en los liposomas fue la cuantificación de proteína antes de formar los liposomas (en solución) y una vez formados. Observamos que en el caso de la hidratasa de *Lactobacillus plantarum*, la lisozima de huevo de gallina, la esticolisina I y la lectina de *Mytilus edulis*, la concentración en el liposoma fue ligeramente mayor, esto puede deberse a que hay zonas en las moléculas que interaccionan con los liposomas, lo más seguro es que de manera extrínseca, favoreciendo una mayor incorporación de moléculas en ellos concentrando así la proteína en los liposomas. Por el contrario, con la citocromo c oxidasa hubo una disminución en la concentración. Esto debido a que esta proteína tiene una interacción más fuerte con los liposomas, es decir estas penetran el liposoma y por tanto no pueden incorporarse tantas moléculas por simple competencia. Se necesitarían liposomas más grandes o un mayor número de ellos para que toda la proteína se incorpore. Sin embargo, si se utilizaran liposomas de mayor tamaño, estos serían menos estables [71].

Electroforesis SDS-PAGE

Otra forma de evaluar si las proteínas se reconstituyeron en los liposomas consistió en determinar su presencia por medio de electroforesis SDS-PAGE. En la figura 22 se puede observar la presencia de proteína en todos los casos salvo con la esticolisina I, esto debido a que en la elaboración de los liposomas se utilizaron concentraciones muy bajas (del orden nanomolar) para que no los perforaran. Además observamos que se debe tener cuidado ya que los liposomas también dan una banda cercana a los 6 kDa. En el caso de la citocromo c oxidasa, al desnaturalizarla se formó un oligómero que no penetró en el gel, sin embargo se observa su presencia.

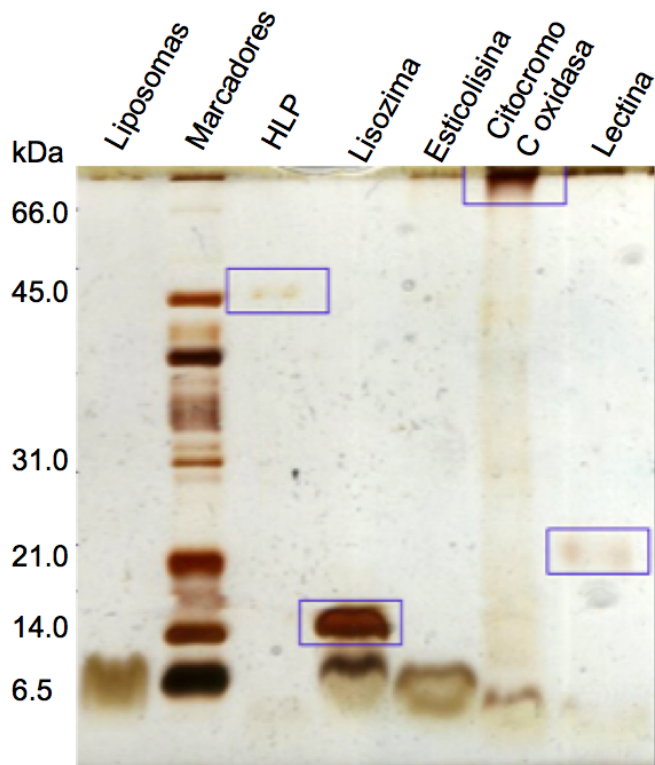


Figura 22. Determinación de la presencia de las proteínas estudiadas en los liposomas por medio de electroforesis en condiciones desnaturizantes. Se utilizó en gel al 12% y la tinción con plata.

Citocromo c oxidasa

Estudios de dispersión dinámica de la luz de la COX

Al reconstituir a la proteína transmembranal COX en liposomas, observamos por DDL que el tamaño del liposoma se incrementa lo que sugiere que si se incorporó en el mismo (Figura 23) sin embargo, no hay coalescencia. Además la polidispersidad no se incrementa notablemente, lo que nos habla de un buen sistema biomimético.

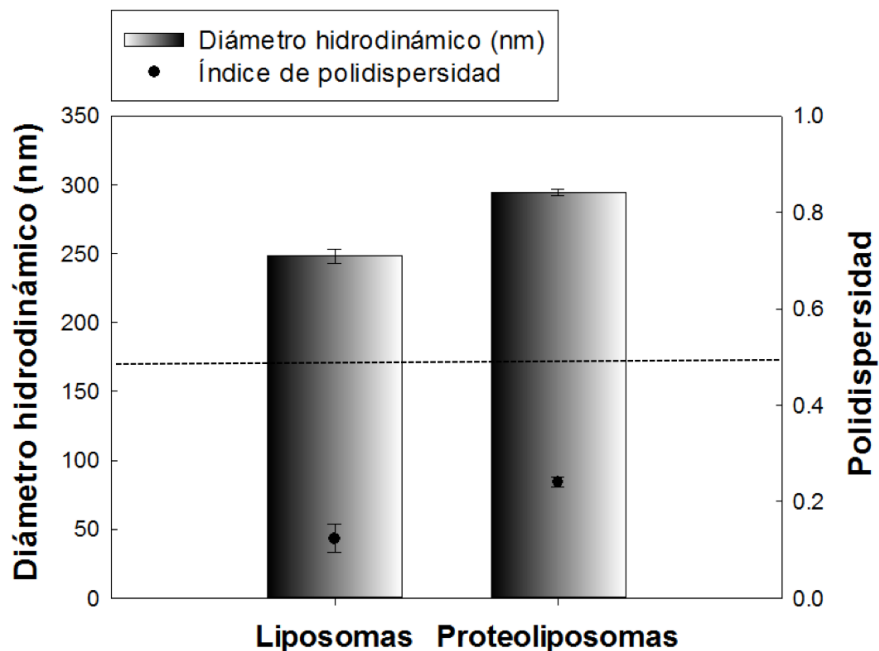


Figura 23. Reconstitución de la citocromo c oxidasa en liposomas. Las barras muestran el diámetro hidrodinámico de los liposomas y los círculos el índice de polidispersidad. En ambos casos se muestra la desviación estándar. La línea punteada muestra el valor límite para que un sistema se considere monodisperso.

Estudios de microscopía confocal de la COX

La localización de la citocromo c oxidasa en liposomas se analizó mediante la técnica de microscopía confocal, esta técnica nos permite visualizar la ubicación de las proteínas por medio del marcaje de zonas hidrofóbicas e hidrofílicas con sondas fluorescentes. La microscopía confocal se ha empleado para investigar la organización espacial de las proteínas en las vesículas lipídicas [79], estos mismos estudios se han realizado en GUV, en donde se demuestra que la proteína está distribuida homogéneamente en la membrana [80]. También se ha empleado esta técnica para observar la transición de fase y cómo afecta a las vesícula lipídicas [81]. En la figura 24, en la parte inferior se observa que la proteína se reconstituyó dentro

de los liposomas lo que corrobora que se trata de una proteína integral a la membrana [82].

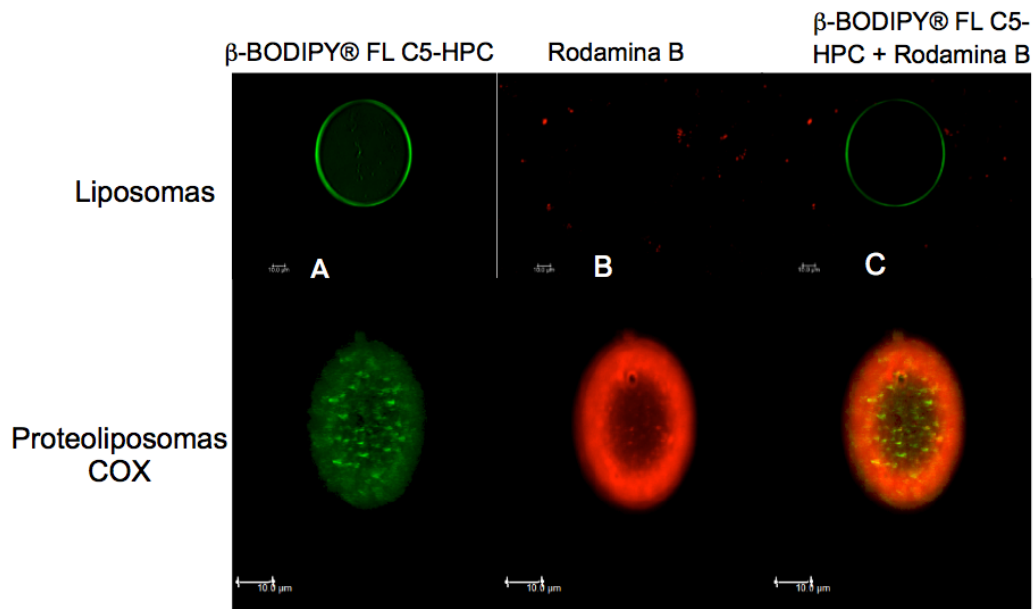


Figura 24. Microscopía confocal de la COX. En la parte superior se observan los controles: A. La fluorescencia verde corresponde a la señal hidrofóbica (del liposoma) marcado con β -BODIPY® FL C5-HPC. B. La fluorescencia roja corresponde a la señal hidrofílica (de la proteína) marcada con rodamina B y C. Se presentan ambas señales de fluorescencia sin presencia de proteína. En la parte de abajo se observa la incorporación de la COX en el liposoma.

Estudios conformacionales y de estructura secundaria

El hecho de que la proteína se reconstituya en el liposoma no implica que no haya tenido cambios en su estructura. Para determinar el efecto de este proceso en la estructura secundaria de la proteína se realizaron estudios de dicroísmo circular en el UV lejano. Los resultados obtenidos (Figura 25) revelan que la proteína reconstituida en el liposoma presenta un ligero cambio conformacional y modificaciones en la estructura secundaria respecto a la proteína en solución (Tabla 2), esto puede ser atribuido a que la proteína al ser transmembranal, fuera de la célula cambia su

conformación por la cantidad de aditivos (tensoactivos, glicerol) que se tienen que adicionar al medio para mantenerla estable. Por otro lado, en el liposoma está en un medio biomimético que se puede considerar como el natural. Al hacer la desconvolución de los espectros utilizando el servidor DichroWeb, observamos que en general la estructura secundaria que predomina es la hoja β en ambas condiciones, sin embargo, en el liposoma el porcentaje es ligeramente mayor.

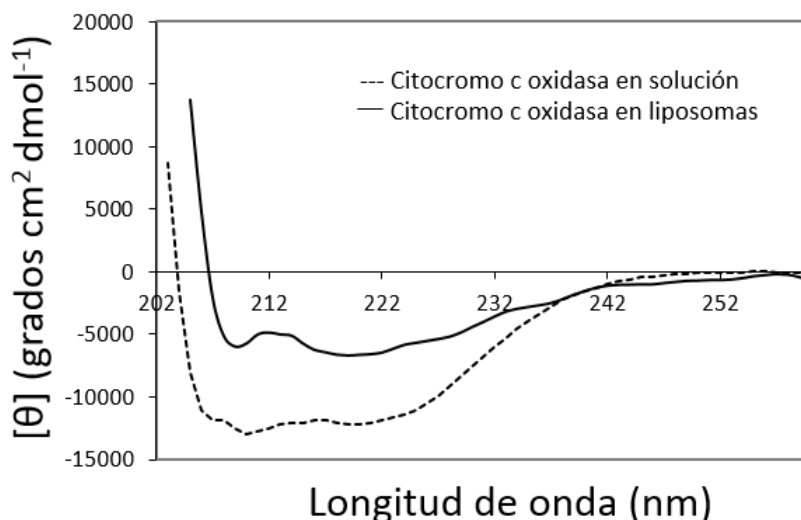


Figura 25. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano de la proteína citocromo c oxidasa en solución y reconstituida en liposomas.

Tabla 2. Contenido de estructura secundaria calculada a partir de los espectros de DC con el servidor DichroWeb.

	Hélices	Hojas β	Desestructurada
Citocromo c oxidasa en solución	7%	29%	63%
Citocromo c oxidasa en proteoliposomas	6%	34%	59%

Actividad enzimática de la COX

Para corroborar si este pequeño cambio conformacional podría afectar la actividad de la enzima, se determinó su actividad mediante la oxidación del ferricitocromo c por la enzima (ver métodos). Observamos que en solución la actividad de la enzima fue

de 624.12 mUnidades/min/mg de proteína, mientras que en el liposoma la actividad fue de 749.18 mUnidades/min/mg, es decir, se incrementó 125 miliUnidades. Esto puede ser el resultado de encontrarse en un medio más favorable para la proteína, que al ser membranar es más estable en este medio biomimético. Este resultado resalta la importancia de utilizar este tipo de sistemas para poder estudiar con mayor precisión a este tipo de proteínas sin modificar sus propiedades.

Hidratasa de Lactobacillus plantarum (HLP)

El ácido linoleico (AL), junto con otros ácidos grasos poliinsaturados, es tóxico para muchas bacterias causando la inhibición del crecimiento celular. A fin de evitar esta toxicidad, los ácidos grasos poliinsaturados son hidrogenados por un mecanismo llamado biohidrogenación produciendo ácidos grasos saturados no tóxicos. La biohidrogenación de AL en *Lactobacillus plantarum*, implica varios pasos, entre ellos la hidratación (Figura 26), produciendo ácido 10-hidroxi-12-cis-octadecenoico (10-HOE). Una vez que se produce el 10-HOE puede sufrir deshidratación y la isomerización catalizada por otra proteína, no asociada a membranas, para producir el isómero bioactivo, ácido linoleico conjugado (ALC) (ácido 9-cis,11-trans octadecadienoico) que está asociado con una variedad de efectos benéficos para la salud que incluyen, efecto anti-obesidad y anticancerígeno, entre otros [57].

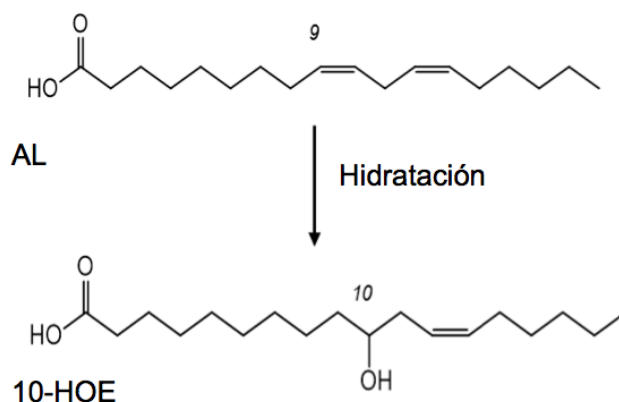


Figura 26. Reacción de hidratación del ácido linoleico catalizada por la HLP de *Lactobacillus plantarum* dando como producto el 10-HOE.

Estudios de dispersión dinámica de la luz de la HLP

Después de la reconstitución de la HLP en las vesículas lipídicas, se determinó su diámetro hidrodinámico. En la figura 27 se observa que los liposomas no se afectan por la reconstitución de la proteína en ellos, ya que el tamaño es el mismo y la polidispersidad muy baja.

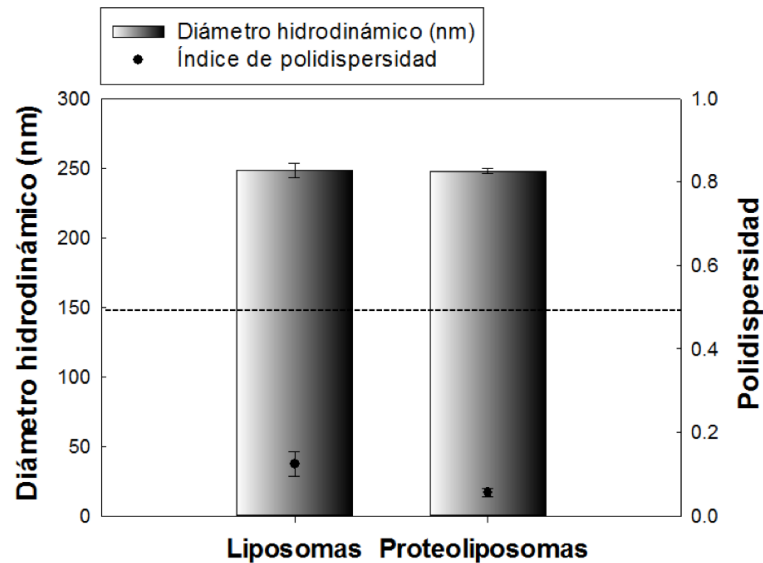


Figura 27. Reconstitución de la hidratasa de *Lactobacillus plantarum* en liposomas. Las barras muestran el diámetro hidrodinámico de los liposomas y proteoliposomas y los círculos el índice de polidispersidad. En ambos casos se muestra la desviación estándar. La línea punteada muestra el valor límite para que un sistema se considere monodisperso.

Estudios de microscopía confocal de la HLP

Hasta este momento, sabíamos que la proteína si había interactuado con los liposomas ya que al cuantificarla estaba presente en ellos, sin embargo no incrementó el tamaño de los mismos. Con el fin de determinar de qué manera había interactuado la proteína con el liposoma, decidimos realizar estudios de microscopía confocal. Es importante mencionar que de esta proteína se sabía que estaba asociada a la membrana celular pero se ignoraba de qué manera. En la figura 28 se observa que la proteína reconstituida en los liposomas no es transmembranal

sino periférica, se puede observar el halo (rojo) que rodea al liposoma. Estos resultados revelaron por primera vez la naturaleza periférica de esta proteína. Es posible que la unión en la superficie de los liposomas esté mediada por interacciones electrostáticas entre una de las superficies positivas de la HLP y las cabezas polares de los fosfolípidos. Esta es la razón por la cual el tamaño de los liposomas no se incrementó con la incorporación de la proteína de membrana en ellos y porqué la concentración de proteína es mayor.

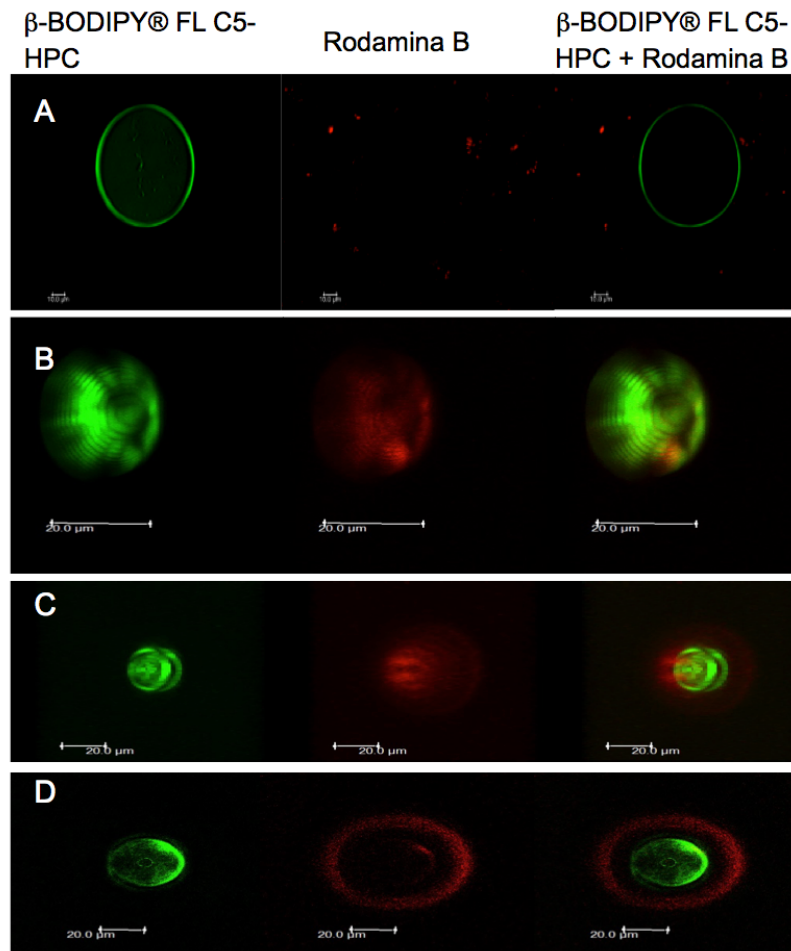


Figura 28. Análisis de la incorporación de la hidratasa de *Lactobacillus plantarum* en liposomas utilizando la microscopia confocal. A) y B) Controles donde se observa la tinción del liposoma (verde), la de la proteína en solución (rojo) y el traslape de ambas. C) y D) Proteoliposomas donde se observa la señal del liposoma, de la proteína y el traslape de ambas.

Estudios conformacionales y de estructura secundaria de la HLP

Para determinar si la interacción periférica de la hidratasa de *L. plantarum* provocaba algún cambio estructural en la proteína, se analizó su conformación y estructura secundaria por DC (Figura 29). Observamos que la proteína en solución y unida a los liposomas era idéntica, no tenía ningún cambio conformacional. Esto se explica porque no penetró las bicapas lipídicas donde podría verse afectada por la naturaleza hidrofóbica de las mismas. Se observó que en ambas condiciones hay un predominio de hélices en su estructura (Tabla 3).

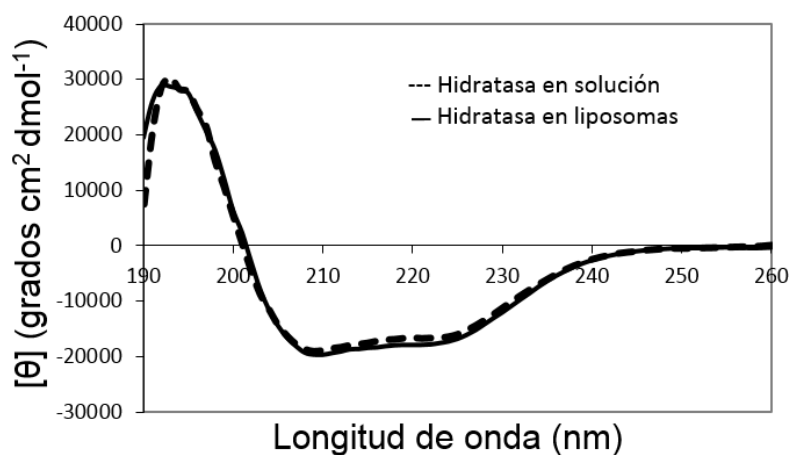


Figura 29. Comparación de los espectros de dicroísmo circular de la hidratasa de *L. plantarum* en solución y en los liposomas.

Tabla 3. Contenido de estructura secundaria de la hidratasa de *L. plantarum* calculada a partir de los espectros de DC utilizando el servidor DichroWeb.

	Hélices	Hojas β	Desestructurada
HLP	56%	19%	25%
Proteoliposomas	62%	9%	31%

Actividad de hidratasa de *Lactobacillus plantarum* (HLP)

Al verificar la actividad de la hidratasa observamos que esta no cambia, se mantiene igual en solución y en los liposomas (Tabla 4). Este sistema tiene como ventaja el estabilizar a la proteína ya que emula a la membrana celular, algún cambio en la solución podría causar que la proteína se oligomerice al no estar en su ambiente natural cosa que se evita en este sistema además de que no se requieren agentes solubilizantes o estabilizantes como tensoactivos que pueden provocar cambios en el comportamiento y función de la proteína.

Tabla 4. Actividad de la hidratasa de *L. plantarum* en solución y en los proteoliposomas.

	U (μmoles/min)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg proteína)
HLP en solución	0.02	0.22	0.09
HLP en proteoliposomas	0.02	0.22	0.09

Esticolisina I (St-I)

La esticolisina I es una actinoporina de *Stichodactyla helianthus*, que tiene la capacidad de formar poros que atraviesan la membrana celular, causando la lisis.

Estudios de dispersión dinámica de la luz de la St-I

Cuando se reconstituyó esta proteína en los liposomas se observó que el tamaño de los mismos variaba muy poco (Figura 30). Para estudiar esta proteína se utilizaron diferentes concentraciones 3, 6 y 10 nM debido a que al formar poros podría romper los liposomas y a bajas concentraciones esto no ocurría. En la figura 30 sólo se grafica la concentración de 6 nM pero las tres concentraciones dieron algo similar. A una concentración de 4800 nM el tamaño del proteoliposoma se incrementa

notablemente. Es posible que a bajas concentraciones la esticolisina I interaccione con el liposoma de manera superficial, mientras que al incrementar la concentración de esta proteína pudo haberse insertado completamente en los liposomas, rompiéndolos y provocando coalescencia, dando lugar a liposomas de mayor tamaño.

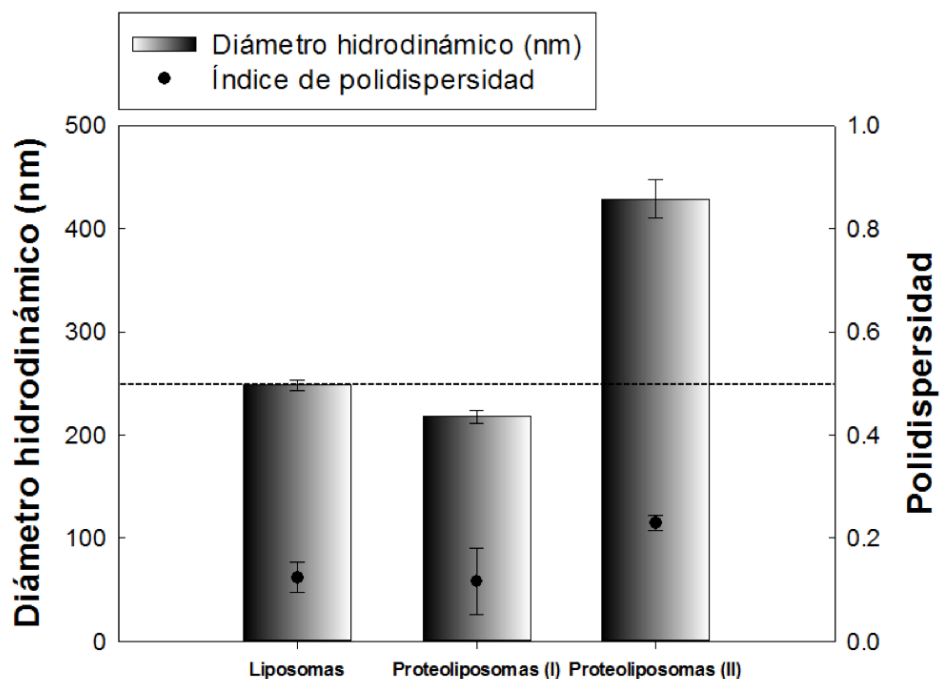


Figura 30. Reconstitución de la St-I en liposomas. Las barras muestran el diámetro hidrodinámico de los liposomas y proteoliposomas y los círculos el índice de polidispersidad. En ambos casos se muestra la desviación estándar. La línea punteada muestra el valor límite para que un sistema se considere monodisperso. La barra de proteoliposomas (I) corresponde a una concentración de esticolisina de 6 nM y la de proteoliposomas (II) a una concentración de 4800 nM.

Estudios conformacionales y de estructura secundaria de la St-I

Cuando quisimos verificar si al interaccionar con los liposomas la esticolisina I sufría algún cambio conformacional o estructural esto fue imposible ya que en el estudio de

dicroísmo circular de la proteína dentro de los liposomas no se observó señal. Sin embargo, sabíamos que sí se había incorporado ya que al cuantificar se comprobó la presencia de la proteína en el proteoliposoma. El problema es que se utilizaron concentraciones muy bajas para que no rompiera las vesículas [83] y en la técnica de dicroísmo circular en el UV lejano se requieren concentraciones de proteína de 0.2-0.3 mg/mL para poder observar una señal apropiada. Sin embargo, sí pudimos obtener el espectro en solución que muestra que la estructura secundaria que predomina es la hoja β (Figura 31 y Tabla 5).

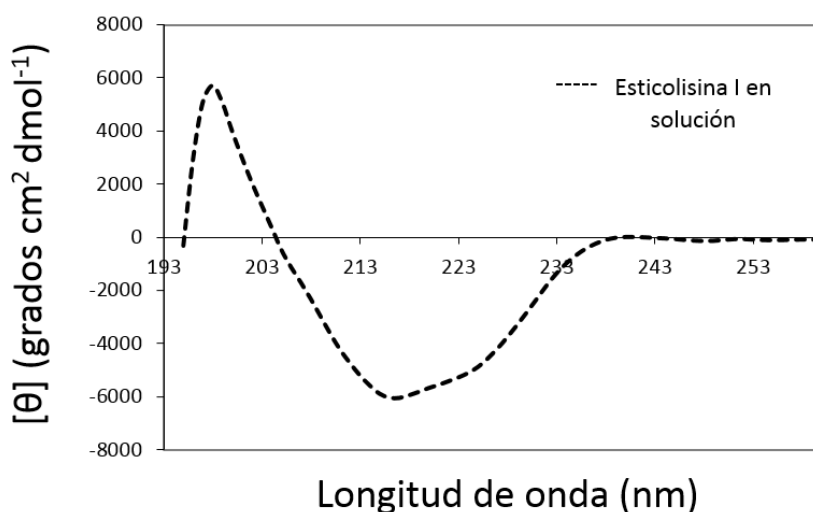


Figura 31. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de la esticolisina I en solución.

Tabla 5. Contenido de estructura secundaria de la esticolisina I calculada a partir de los espectros de DC utilizando el servidor DichroWeb.

	Hélices	Hojas β	Desestructurada
Esticolisina I	9%	35%	56%

Ensayos de actividad de la esticolisina I

Al no poder obtener el espectro de dicroísmo circular de los proteoliposomas y por ende saber si habíamos inducido algún cambio conformacional que pudiera alterar su función al reconstituirla en las vesículas lipídicas, se cuantificó la actividad de la proteína en solución y en los proteoliposomas. Para determinar esto se realizaron pruebas de hemólisis utilizando eritrocitos humanos. Para este ensayo se cuidó de emplear dos controles negativos uno sin proteína (en vez de proteína se colocó amortiguador) y el otro de liposomas para saber si los liposomas sin proteína podían provocar hemólisis y así evitar falsos positivos. Se encontró que en ambos casos no hubo hemólisis (Figura 32 A). Con la proteína en solución se observó que sí había hemólisis aún a las bajas concentraciones de 3 y 10 nM que se manejaron (Figura 32 B). En las pruebas de actividad con los proteoliposomas observamos que también había hemólisis pero esta era mayor (Figura 32 C). Si bien llegaba la actividad a la misma dilución (segundo pozo de la dilución seriada), en el pozo se veía una mayor hemólisis, prácticamente se había liberado todo el contenido del eritrocito, mientras que con la proteína en solución no. Esta proteína empieza a formar poros a partir de su región amino terminal [84,85] cuando se encuentra a concentraciones por arriba de 6 nM. Es posible que a las concentraciones que se utilizaron, esta no forme poros o sean muy pocas las moléculas involucradas en la formación de los mismos de tal forma que una gran cantidad de las moléculas interaccionan con el liposoma a través del extremo carboxilo terminal dejando expuesto el amino y ordenando las moléculas de tal manera que se potencializa la actividad hemolítica de la proteína. Como se trata de una prueba de actividad semicuantitativa, al calcular la actividad específica esta da un mismo valor para la actividad de la proteína en solución y en proteoliposomas (Tabla 6) sin embargo, al microscopio se observa claramente una hemólisis casi total con los proteoliposomas. Esto nos demuestra que los sistemas biomiméticos nos pueden ayudar a estudiar y estabilizar proteínas formadoras de poros cuando se trabajan a bajas concentraciones.

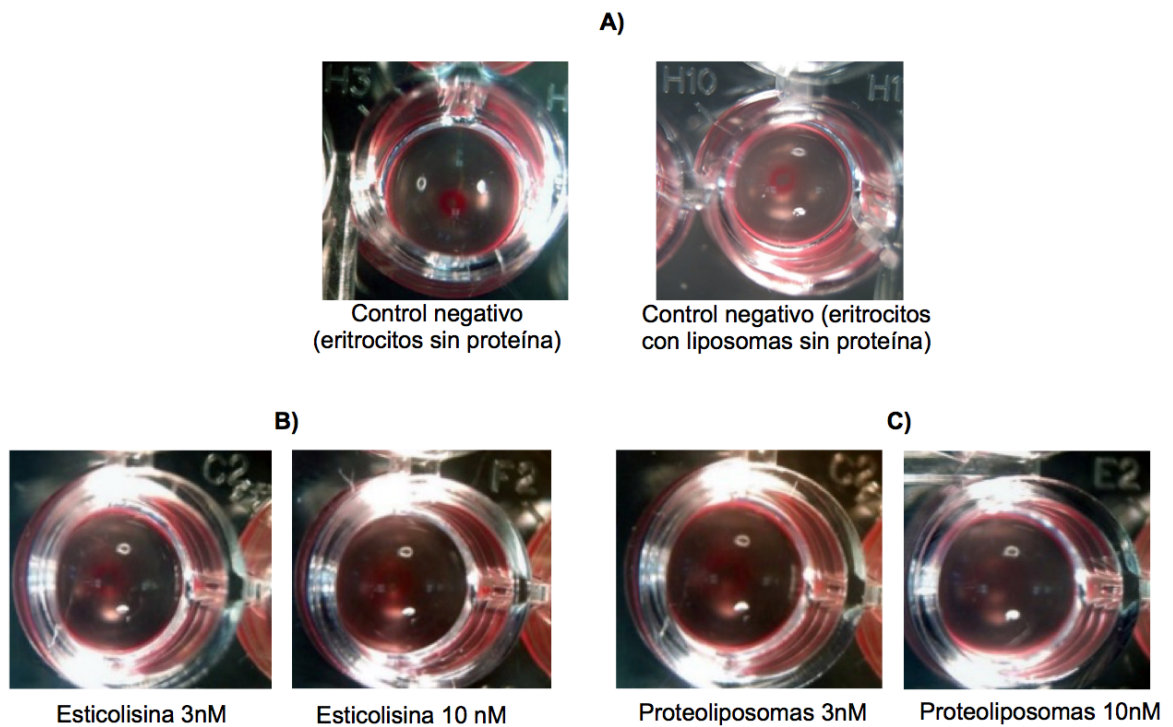


Figura 32. Actividad hemolítica de la esticolisina I. En A) se observan los controles. En B) se observa la actividad de la esticolisina I en solución a dos diferentes concentraciones y en C) se observa la actividad de la esticolisina I reconstituida en liposomas a 2 concentraciones.

Tabla 6. Cuantificación de la actividad hemolítica de la esticolisina I en solución y reconstituida en liposomas.

	Actividad total (U*)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg⁻¹)
Esticolisina I en solución	6.88×10^5	1.45×10^{-6}	4.74×10^{11}
Esticolisina I en proteoliposomas	6.88×10^5	1.45×10^{-6}	4.74×10^{11}

*Una unidad de actividad (U) está definida como la dilución más alta que presentó actividad hemolítica.

Lisozima

Estudios de dispersión dinámica de la luz de la lisozima

Los estudios realizados con la lisozima, que es una glicohidrolasa que hidroliza enlaces β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina revelaron que al reconstituir la proteína en el liposoma, el tamaño de estos era prácticamente el mismo (Figura 33) y el índice de polidispersidad se mantenía muy bajo lo que implica que tenemos una solución monodispersa. Este comportamiento nos indica que quizás la proteína está interaccionando de manera periférica y por eso no incrementó dicho tamaño. El hecho de que la enzima sí está incorporada en el proteoliposoma se demostró al cuantificar la proteína por el método del BCA y por electroforesis (Figura 22).

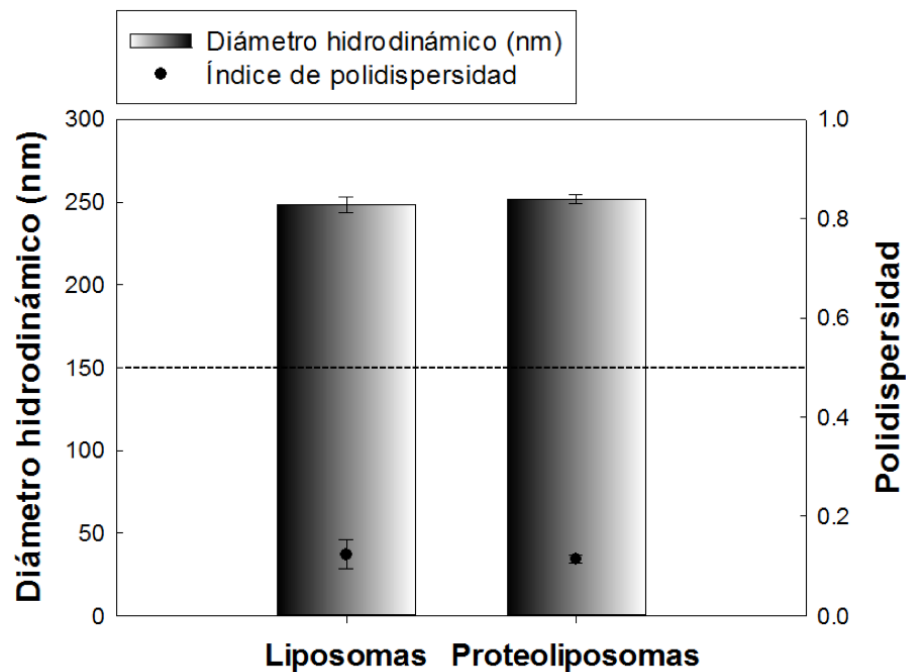


Figura 33. Reconstitución de la lisozima en liposomas. Las barras muestran el diámetro hidrodinámico de los liposomas y proteoliposomas y los círculos el índice de polidispersidad. En ambos casos se muestra la desviación estándar. La línea punteada muestra el valor límite para que una solución se considere monodispersa.

Estudios conformacionales y de estructura secundaria de la lisozima

Al ver que no se encontraba cambio en el diámetro hidrodinámico, se quería saber si la conformación y estructura secundaria de la proteína reconstituida permanecía igual que la proteína en solución, los resultados revelaron que los espectros de la lisozima en solución y reconstituida en liposomas fueron similares y en ambas predominó la hélice lo que indica que no presentó cambio conformacional ni en el contenido de estructura secundaria (Figura 34 y Tabla 7). Estos resultados revelaron que son similares a los descritos en publicaciones previas [86].

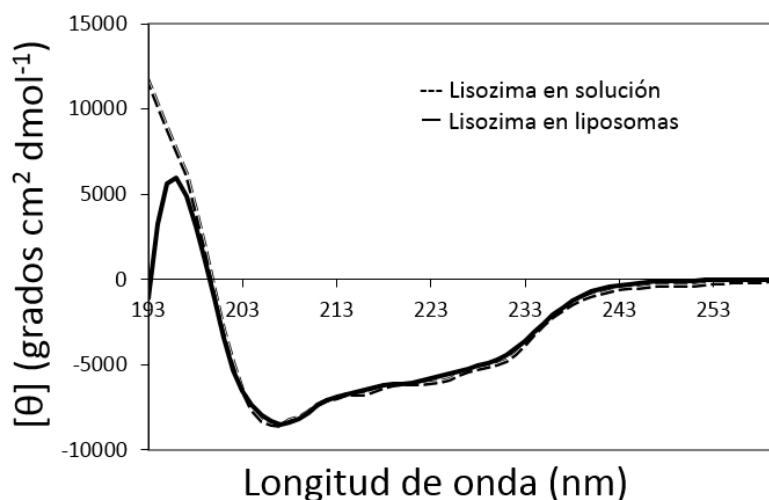


Figura 34. Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de la lisozima en solución y reconstituida en liposomas.

Tabla 7. Porcentaje de estructura secundaria de la lisozima de huevo de gallina obtenidos a partir del espectro de DC.

	Hélices	Hojas β	Desestructurada
Lisozima	42%	30%	28%
Proteoliposomas	42%	30%	28%

Actividad de lisozima

La actividad de los proteoliposomas se comparó con la de la proteína en solución y se observó que la actividad era prácticamente la misma (Tabla 8); no afecta porque su interacción es periférica. Es interesante observar que con liposomas también podemos estabilizar proteínas solubles y estudiarlas en un medio prácticamente sólido como el liposoma donde se mantienen fijas. De ahí que estos sistemas puedan servir incluso como acarreadores de proteínas.

Tabla 8. Actividad de la lisozima en solución y proteoliposomas.

	Lectura inicial Abs. ₄₅₀	Lectura final Abs. ₄₅₀	mg de proteína	Actividad enzimática (U*)	Actividad específica (U/mg)
Lisozima en solución	0.54	0.30	0.10	0.05	0.48
Lisozima en proteoliposomas	0.60	0.37	0.10	0.05	0.46

Una unidad de actividad (U*) está definida como el $\Delta\text{Abs}_{450}/5$ minutos.

Lectina de Mytilus edulis

Estudios de dispersión dinámica de la luz de *Mytilus edulis*

Las lectinas son moléculas que reconocen carbohidratos sin hidrolizarlos y participan en uno de los principales mecanismos de defensa empleado por invertebrados marinos, ya que al carecer de un sistema inmune mediado por anticuerpos dependen exclusivamente de la respuesta inmune innata para defenderse de patógenos [87]. La lectina de *Mytilus edulis* reconoce una serie de carbohidratos y presenta una mayor especificidad por D-galactosa y por N-acetilgalactosamina. En la figura 35 se observa que con esta proteína ocurrió algo muy extraño, los liposomas disminuyeron su tamaño al incorporarse esta lectina. Este comportamiento no se observó en ninguna otra proteína. Es importante resaltar que esta proteína se comporta como una proteína intrínsecamente desestructurada y sólo en presencia de su ligando se estructura. Es posible que debido a esta característica la proteína interaccione más

con el liposoma favoreciendo un mayor número y fuerza de las interacciones compactando al liposoma.

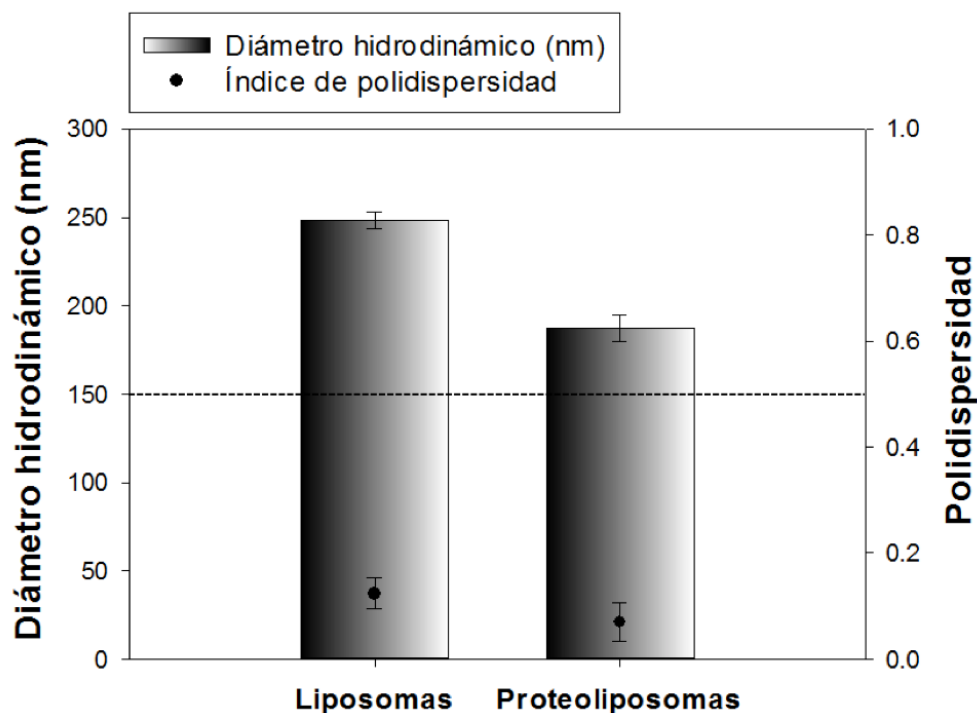


Figura 35. Reconstitución de la lectina de *M. edulis* en liposomas. Las barras muestran el diámetro hidrodinámico de los liposomas y proteoliposomas y los círculos el índice de polidispersidad. En ambos casos se muestra la desviación estándar. La línea punteada muestra el valor límite para que una solución se considere monodispersa.

Estudios conformacionales y de estructura secundaria de *Mytilus edulis*

Analizando los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano observamos que la lectina está desestructurada tanto en solución como en el liposoma (Figura 36).

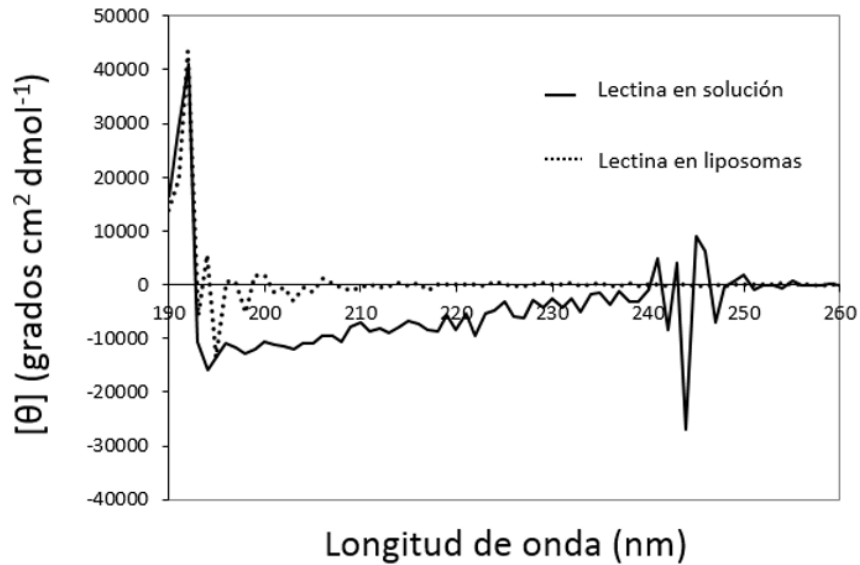


Figura 36. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la lectina de *Mytilus edulis* en solución y reconstituida en liposomas.

Actividad hemaglutinante de la lectina de *M. edulis*

El análisis de la actividad de la lectina de *M. edulis* por medio de pruebas de eritroaglutinación reveló que la proteína en solución sí está activa como se observa por la aglutinación de eritrocitos, misma que llega hasta el pozo 5 (Figura 37); sin embargo, en los liposomas perdió su actividad por completo (Figura 37 y Tabla 9). Esto nos indica que con proteínas intrínsecamente desestructuradas, no se puede utilizar este sistema ya que durante la reconstitución, la proteína interacciona con el liposoma ocupando o impidiendo el acceso a los sitios de reconocimiento volviéndose inactiva. Es posible que el sistema funcione si la reconstitución de la lectina en el liposoma se realiza en presencia de su ligando para favorecer la estructuración de la proteína antes de que esta se una al liposoma. Posteriormente se podría eliminar el ligando por medio de diálisis exhaustiva para continuar con su estudio.

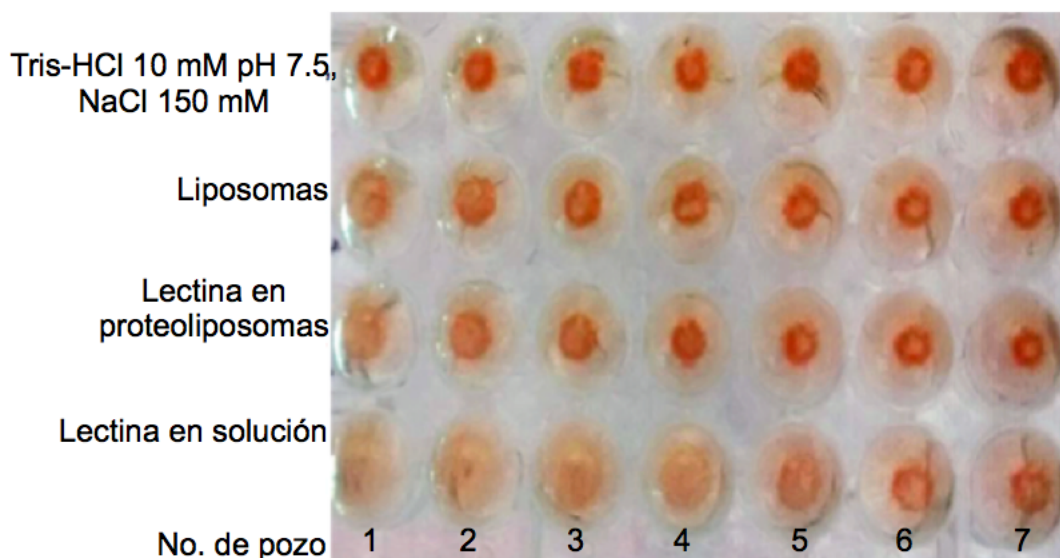


Figura 37. Actividad hemaglutinante de la lectina de *Mytilus edulis* en solución y en proteoliposomas.

Tabla 9. Cuantificación de la actividad hemaglutinante de la lectina de *Mytilus edulis* en solución y proteoliposomas.

	Actividad total (U*)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg⁻¹)
Lectina en solución	9.58×10^2	1.04×10^{-3}	9.21×10^5
Lectina en proteoliposomas	0	0	0

*Una unidad de actividad (U) está definida como la dilución más alta que presentó actividad hemolítica.

Utilización de proteoliposomas para el análisis de sistemas enzimáticos formados por proteínas de naturaleza diferente.

Muchos organismos requieren de proteínas de diferente naturaleza para poder cumplir con sus funciones. En ocasiones para lograr llegar a la formación de un producto se requiere la actividad concertada de diferentes proteínas de naturaleza diferente. Tal es el caso del sistema de la ácido linoleico isomerasa donde para la conversión del ácido linoleico hasta la formación del conjugado bioactivo, se requiere de la participación de dos enzimas, una de naturaleza hidrofóbica membranal que nosotros nombramos como HLP (Hidratasa de *Lactobacillus plantarum*) que lleva a cabo la hidratación del ácido linoleico dando como producto el 10-HOE (ver arriba) y otra de naturaleza hidrofílica, soluble en medio acuoso que hace una deshidratación e isomerización del 10-HOE para dar como resultado un isómero bioactivo (con actividad anti obesidad y anticancerígeno). A esta enzima la nombramos deshidratasa de *L. plantarum* (DLP). Como mencionamos anteriormente, la HLP es periférica a la membrana y en el liposoma se mantiene estable aún sin los tensoactivos que se requieren para mantenerla estable en solución. Gracias a esto, podemos tener el sistema completo en un medio acuoso y llevar a cabo la reacción total en un sistema aislado de otros componentes celulares (Figura 38). En la Tabla 10 se observa que la actividad obtenida haciendo primero la producción del 10-HOE por la proteína de membrana (HLP) en solución y en presencia de tensoactivos, glicerol y NaCl (que se requieren para mantenerla estable) y purificando posteriormente el 10-HOE para adicionarlo como sustrato a la proteína soluble (DLP) y obtener el isómero bioactivo 9-cis, 11-trans octadecadienoico, es la misma que incluyendo a la proteína de membrana reconstituida en liposomas en un medio acuoso (amortiguador de fosfatos 20 mM pH 6.5) y adicionando a la proteína soluble. De esta forma se evita la purificación del 10-HOE y se tiene un sistema aislado de otros componentes.

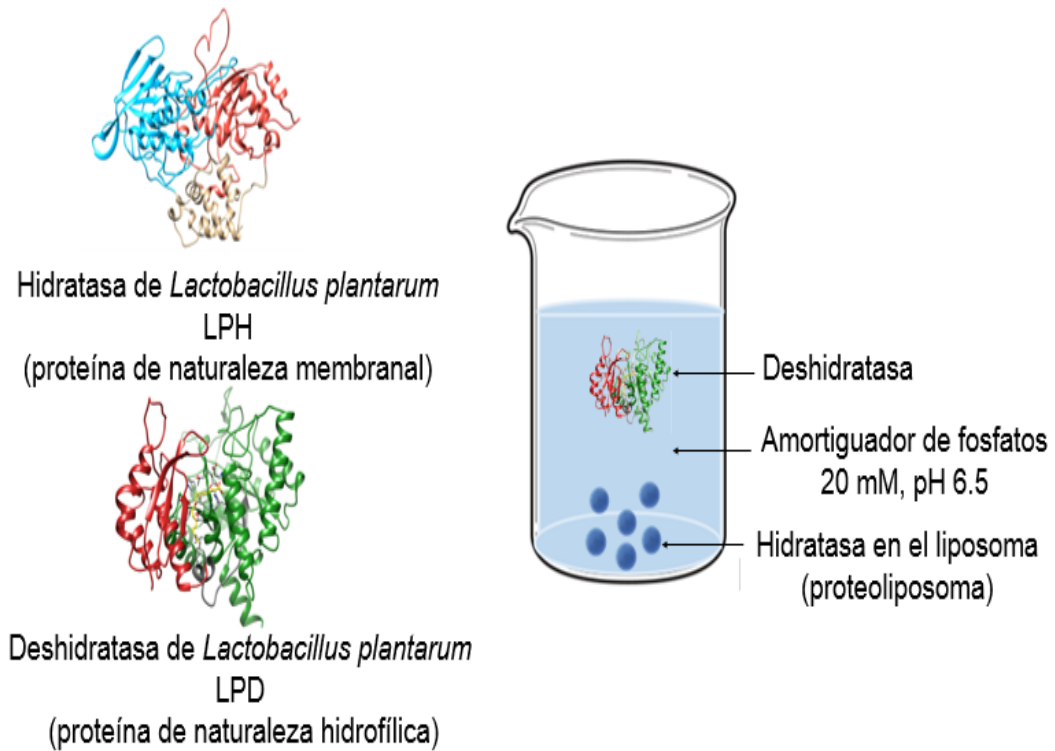


Figura 38. Producción del isómero bioactivo ácido 9-cis, 11-trans octadecadienoico a partir del ácido linoleico, por el sistema enzimático de la ácido linoleico isomerasa de *L. plantarum*.

Tabla 10. Producción del isómero bioactivo 9-cis, 11-trans octadecadienoico por el sistema de la ácido linoleico isomerasa de *Lactobacillus plantarum*. Con la proteína HLP reconstituida en liposomas y en solución.

	U (μmoles/min)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
DLP+HLP en proteoliposomas	0.003	0.50	0.006
DLP+HLP en solución	0.003	0.50	0.006

CONCLUSIONES

Del presente estudio se derivaron las siguientes conclusiones:

- ✓ Se logró estandarizar un método para la elaboración de proteoliposomas mediante el método de deshidratación-hidratación y extrusión utilizando DMPC:POPC, observando que los liposomas son muy estables en intervalos amplios de temperatura y pH sin llegar a coalescer.
- ✓ La mezcla de fosfolípidos DMPC:POPC puede utilizarse para el análisis de proteínas de diferente naturaleza, no sólo las membranales.
- ✓ Técnicas como la dispersión dinámica de la luz pueden darnos indicios de la localización de las proteínas en la membrana. Si son integrales, se verá un aumento en el tamaño de los liposomas mientras que si son periféricas el tamaño no se afecta.
- ✓ La proteína de naturaleza transmembranal, citocromo c oxidasa, presentó cambios en la estructura secundaria al ser reconstituida en liposomas, mismos que favorecieron su actividad al mantenerla en un medio similar al de la membrana, lo que demuestra que al extraer las proteínas de membrana de su medio se pueden modificar sus características, cosa que se evita en proteoliposomas.
- ✓ En el caso de proteínas periféricas a la membrana no se observan cambios conformacionales, por lo que su estructura se mantiene estable al igual que su actividad.
- ✓ La esticolisina I, proteína formadora de poro aumentó su actividad hemolítica en las vesículas lipídicas en comparación con la proteína en solución, lo que nos habla de que estos sistemas biomiméticos pueden estabilizar proteínas evitando interacciones proteína-proteína que pueden ocultar sitios catalíticos o inducir agregación.
- ✓ La lisozima de huevo no presentó cambio en la estructura secundaria en los liposomas y su actividad se mantuvo constante. Por lo que este sistema formado

por los fosfolípidos DMPC:POPC puede ayudarnos a fijar también a proteínas solubles.

- ✓ Se observó que en el caso de proteínas intrínsecamente desestructuradas se requiere primero tener plegada a la proteína antes de la reconstitución, lo que se podría lograr en presencia de su ligando, ya que se ha observado que este tipo de proteínas adquieren estructura al estar presente su ligando.
- ✓ Diferentes técnicas nos pueden ayudar a demostrar la reconstitución de proteínas en proteoliposomas. Por ejemplo la cuantificación de proteína, la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, la dispersión dinámica de la luz, la microscopía confocal, las pruebas de actividad y el dicroísmo circular. Cada una aporta información valiosa para demostrar si se está afectando la estructura y función de las proteínas.
- ✓ Se pudo determinar por primera vez la localización de la proteína de membrana periférica (HLP) mediante la técnica de microscopía confocal y se observó que la actividad se mantuvo tanto en solución como en los liposomas.
- ✓ Este tipo de modelos biomiméticos son ideales para estudiar sistemas enzimáticos de proteínas de naturaleza diferente.

REFERENCIAS

- [1] Palsdottir H, Hunte C. (2004) Lipids in membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta.* 1666, 2-18.
- [2] Stevens TJ, Arkin IT. (2000) Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes?. *Proteins.* 39, 417-420.
- [3] Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta.* 1666, 105-117.
- [4] Raman P, Cherezov V, Caffrey M. (2006) The Membrane Protein Data Bank. *Cell Mol Life Sci.* 63, 36-51.
- [5] Montero SM. Aplicación de técnicas de fluorescencia y microscopía de fuerza atómica al estudio de la interacción lípido-proteína en modelos de membrana, Barcelona, 2005, pp. 300.
- [6] Shen HH, Lithgow T, Martin L. (2013) Reconstitution of membrane proteins into model membranes: seeking better ways to retain protein activities. *Int J Mol Sci.* 14, 1589-1607.
- [7] Rigaud JL. (2002) Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Braz J Med Biol Res.* 35, 753-766.
- [8] Rigaud JL, Pitard B, Levy D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1231, 223-246.
- [9] le Maire M, Champeil P, Moller JV. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta.* 1508, 86-111.
- [10] Mahmoudi M, Meng J, Xue X, Liang XJ, Rahman M, Pfeiffer C, Hartmann R, Gil PR, Pelaz B, Parak WJ, Del Pino P, Carregal-Romero S, Kanaras AG, Tamil Selvan S. (2014) Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. *Biotechnol Adv.* 32, 679-692.

- [11] Singer SJ, Nicolson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175, 720-31.
- [12] Nickels JD, Smith JC, Cheng X. (2015) Lateral organization, bilayer asymmetry, and inter-leaflet coupling of biological membranes. *Chem Phys Lipids*. 3084, 30017-7.
- [13] Vellai T, Vida G. (1999) The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc Biol Sci*. 266, 1571-7.
- [14] Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*. 41, 66-97.
- [15] G. Karp. (2013) *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, 7th Ed.
- [16] B. Alberts. (2010) *Molecular Biology of the Cell*, 5^a Ed.
- [17] van Meer G1, Voelker DR, Feigenson GW. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 112-24.
- [18] Ramstedt B, Slotte JP. (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett*. 531, 33-7.
- [19] Brown DA, London E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 275,17221-4.
- [20] Mannoock DA1, McIntosh TJ, Jiang X, Covey DF, McElhaney RN. (2003) Effects of natural and enantiomeric cholesterol on the thermotropic phase behavior and structure of egg sphingomyelin bilayer membranes. *Biophys J*. 84, 1038-46.
- [21] Sachse R, Dondapati SK, Fenz SF, Schmidt T, Kubick S. (2014) Membrane protein synthesis in cell-free systems: from bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Lett*. 588,2774-81.
- [22] Veld GI, Driessen AJ, Konings WN. (1993) Bacterial solute transport proteins in their lipid environmet. *FEMS Microbiol Rev*. 12, 293-314.
- [23] De Marothy MT, Elofsson A. (2015) Marginally hydrophobic transmembrane α -helices shaping membrane protein folding. *Protein Sci*. 24,1057-74.

- [24] Frézard F. (1999) Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Braz J Med Biol Res.* 32, 181-9.
- [25] Melis Çağdaş, Ali Demir Sezer and Seyda Bucak (2014). Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery, Application of Nanotechnology in Drug Delivery, PhD. Ali Demir Sezer (Ed.), ISBN: 978-953-51-1628-8, InTech, DOI: 10.5772/58459.
- [26] Jesorka A, Orwar O.(2008) Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu Rev Anal Chem* 1, 1-32.
- [27] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 8, 102.
- [28] Laouini A. Jaafar-Maalej C. Limayem-Blouza I. Sfar S. Charcosset C. Fessi H. (2012) Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci Biotechnol*, 1, 147-168.
- [29] Batzri S, Korn ED.(1973) Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta.* 298,1015-1019.
- [30] Patty PJ, Frisken BJ. (2003) The pressure-dependence of the size of extruded vesicles. *Biophys J.* 85, 996-1004.
- [31] Frisken BL, Asman C, Patty PJ. (2000) Studies of Vesicle Extrusion. *Langmuir*, 16, 928-933.
- [32] Rigaud JL, Lévy D. (2003) Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.* 372, 65-86.
- [33] Schramm L.L., (2000) Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry, Thesis, Cambridge University.
- [34] Privé GG. (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods.* 41, 388-397.
- [35] Tulumello D.V. (2012) Detergents as membrane-mimetic media for structural characterization of membrane proteins, Thesis, University of Toronto.

- [36] Mwangi P. (2010) An experimental study of surfactant enhanced waterflooding, The Craft and Hawkins Department of Petroleum Engineering, Thesis, University of Rochester.
- [37] Lasic DD and Papahadjopoulos (Eds) (1998) Medical Applications of Liposomes, Elsevier Science.
- [38] Deamer DW. (2010) From "banghasomes" to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. FASEB J. 24, 1308-10.
- [39] Perrie Y. (2008) Gregory Gregoriadis: Introducing liposomes to drug delivery. J Drug Target. 16, 518-519.
- [40] Allison AG, Gregoriadis G. (1974) Liposomes as immunological adjuvants. Nature, 252, 252.
- [41] Rigaud JL, Bluzat A, Buschlen S.(1983) Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. Biochem Biophys Res Commun. 111, 373-382.
- [42] White GF, Racher KI, Lipski A, Hallett FR, Wood JM. (2000) Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids. Biochim Biophys Acta. 1468, 175-186.
- [43] Neves P, Lopes SC, Sousa I, Garcia S, Eaton P, Gameiro P. (2009) Characterization of membrane protein reconstitution in LUVs of different lipid composition by fluorescence anisotropy. J Pharm Biomed Anal. 49, 276-281.
- [44] Popplewell JF, Swann MJ, Freeman NJ, McDonnell C, Ford RC. (2007) Quantifying the effects of melittin on liposomes. Biochim Biophys Acta. 1768,13-20.
- [45] Milano F, Italiano F, Agostiano A, Trotta M. (2009) Characterisation of RC-proteoliposomes at different RC/lipid ratios. Photosynth Res. 100, 107-112.
- [46] Hickey KD, Buhr MM. (2011) Lipid bilayer composition affects transmembrane protein orientation and function. J Lipids. 2011, 208457.
- [47] Ernst S, Schönbauer AK, Bär G, Börsch M, Kuhn A. (2011) YidC-driven membrane insertion of single fluorescent Pf3 coat proteins. J Mol Biol. 412,165-175.

- [48] Doeven MK, Folgering JH, Krasnikov V, Geertsma ER, van den Bogaart G, Poolman B. (2005) Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys J.* 88,1134-1142.
- [49] Mathiasen S, Christensen SM, Fung JJ, Rasmussen SG, Fay JF, Jorgensen SK, Veshaguri S, Farrens DL, Kiskowski M, Kobilka B, Stamou D. (2014) Nanoscale high-content analysis using compositional heterogeneities of single proteoliposomes. *Nat Methods.* 11, 931-934.
- [50] Subramanian M, Jutila A, Kinnunen PK.(1998) Binding and dissociation of cytochrome c to and from membranes containing acidic phospholipids. *Biochemistry.* 37, 1394-1402.
- [51] Bernabeu A, Contreras LM, Villalaín J. (2007) Two-dimensional infrared correlation spectroscopy study of the interaction of oxidized and reduced cytochrome c with phospholipid model membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1768, 2409-2420.
- [52] Pagès JM1, James CE, Winterhalter M. (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 6, 893-903.
- [53] Kimura Y, Vassilyev DG, Miyazawa A, Kidera A, Matsushima M, Mitsuoka K, Murata K, Hirai T, Fujiyoshi Y. (1997) Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature.* 389, 206-211.
- [54] Richard P, Pitard B, Rigaud JL. (1995) ATP synthesis by the F₀F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* co-reconstituted with bacteriorhodopsin into liposomes. Evidence for stimulation of ATP synthesis by ATP bound to a noncatalytic binding site. *J Biol Chem.* 270,21571-21578.
- [55] Scalise M, Pochini L, Giangregorio N, Tonazzi A, Indiveri C. (2013) Proteoliposomes as tool for assaying membrane transporter functions and interactions with xenobiotics. *Pharmaceutics.* 5, 472-97.
- [56] Li Y, Park JS, Deng JH, Bai Y. (2006) Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J Bioenerg Biomembr.* 38, 283-291.

- [57] Ortega-Anaya J, Hernandez-Santoyo A. (2015) Functional characterization of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus plantarum* and its interaction with biosynthetic membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1848, 3166-3174.
- [58] Valcarcel CA, Dalla Serra M, Potrich C, Bernhart I, Tejuca M, Martinez D, Pazos F, Lanio ME, Menestrina G. (2001) Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J*. 80, 2761-2774.
- [59] Liburdi K, Benucci I, Esti M (2014) Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications. *Compr Rev Food Safety* 13, 1062-1073.
- [60] Stewart JC. (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem*. 104, 10-14.
- [61] Karow AR1, Götzl J, Garidel P. (2015) Resolving power of dynamic light scattering for protein and polystyrene nanoparticles. *Pharm Dev Technol*. 20, 84-89.
- [62] Naiim M, Boualem A, Ferre C, Jabloun M, Jalocha A, Ravier P. (2015) Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements. *Soft Matter*. 11, 28-32.
- [63] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150, 76-85.
- [64] Wiechelman KJ1, Braun RD, Fitzpatrick JD. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*. 175, 231-237.
- [65] Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. (2012) Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol*. 132, e3.
- [66] Garfin DE (1990) One-dimensional gel electrophoresis, *Methods Enzymol*, 182, 425-441.
- [67] Kelly SM, Jess TJ, Price NC. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 1751,119-139.

- [68] Kelly SM, Price NC. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta.* 1338,161-185.
- [69] Ariyaprakai S. Tananuwong K. (2015) Freeze-thaw stability of edible oil-in-water emulsions stabilized by sucrose esters and Tweens, *J Food Eng,* 152, 57-64.
- [70] Martinez D, Campos AM, Pazos F, Alvarez C, Lanio ME, Casallanovo F, Schreier S, Salinas RK, Vergara C, Lissi E. (2001) Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: a comparison. *Toxicon.* 39, 1547-60.
- [71] Szleifer I, Gerasimov OV, Thompson DH. (1998) Spontaneous liposome formation induced by grafted poly(ethylene oxide) layers: theoretical prediction and experimental verification. *Proc Natl Acad Sci* 95, 1032-7.
- [72] Perkins WR, Li X, Slater JL, Harmon PA, Ahl PL, Minchey SR, Gruner SM, Janoff AS. (1997) Solute-induced shift of phase transition temperature in Di-saturated PC liposomes: adoption of ripple phase creates osmotic stress. *Biochim Biophys Acta.* 1327, 41-51.
- [73] Silva T, Adão R, Nazmi K, Bolscher JG, Funari SS, Uhríková D, Bastos M. (2013) Structural diversity and mode of action on lipid membranes of three lactoferrin candidacidal peptides. *Biochim Biophys Acta.* 828, 1329-39.
- [74] Leekumjorn S, Sum AK. (2007) Molecular studies of the gel to liquid-crystalline phase transition for fully hydrated DPPC and DPPE bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 1768, 54-65.
- [75] Hautala JT, Wiedmer SK, Riekkola ML. (2005) Influence of pH on formation and stability of phosphatidylcholine/phosphatidylserine coatings in fused-silica capillaries. *Electrophoresis.* 26, 176-86.
- [76] Dumetz AC, Chockla AM, Kaler EW, Lenhoff AM. (2008) Effects of pH on protein-protein interactions and implications for protein phase behavior. *Biochim Biophys Acta.* 1784, 600-10.
- [77] de la Maza A, Parra JL. (1999) Solubilizing effects caused by the nonionic surfactant dodecylmaltoside in phosphatidylcholine liposomes. *Biophys J.* 72, 668-75.

- [78] Cevc G, Richardsen H. (1999) Lipid vesicles and membrane fusion, *Adv Drug Deliv Rev*, 38, 207-232.
- [79] Kahya N, Scherfeld D, Bacia K, Poolman B, Schwille P. (2003) Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem*. 278, 28109-15.
- [80] Aimon S, Manzi J, Schmidt D, Poveda Larrosa JA, Bassereau P, Toombes GE. (2011) Functional reconstitution of a voltage-gated potassium channel in giant unilamellar vesicles. *PLoS One*. 6, e25529.
- [81] Metso AJ, Zhao H, Tuunainen I, Kinnunen PK. (2005) Observation of the main phase transition of dinervonoylphosphocholine giant liposomes by fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1713, 83-91.
- [82] Brändén G, Gennis RB, Brzezinski P. (2006) Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1757, 1052-63.
- [83] Alvarez C, Pazos IF, Lanio ME, Martinez D, Schreier S, Casallanovo F, Campos AM, Lissi. (2001) Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytolyisin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 39, 539-53.
- [84] Alvarez C, Casallanovo F, Shida CS, Nogueira LV, Martinez D, Tejuca M, Pazos IF, Lanio ME, Menestrina G, Lissi E, Schreier S. (2003) Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces--modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chem Phys Lipids*. 122, 97-105.
- [85] Casallanovo F, de Oliveira FJ, de Souza FC, Ros U, Martínez Y, Pentón D, Tejuca M, Martínez D, Pazos F, Pertinhez TA, Spisni A, Cilli EM, Lanio ME, Alvarez C, Schreier S. (2006) Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. *Biopolymers*. 84, 169-80.
- [86] Das A, Thakur R, Dagar A, Chakraborty A. (2014) A spectroscopic investigation and molecular docking study on the interaction of hen egg white lysozyme with liposomes of saturated and unsaturated phosphocholines probed by an anticancer drug ellipticine. *Phys Chem Chem Phys*. 16, 5368-81.

[87] Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. (1980) "What Should Be Called A Lectin." *Nature* 285, 66-66.