

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. PRODUCTOS

4.1.1. Cultivo celular

- Los medios de cultivo utilizados, TSB, Caldo LB Miller y Agar LB Miller fueron adquiridos a Scharlau (Barcelona, España).
- Los antibióticos ampicilina sódica y sulfato de estreptomicina fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA).
- El inductor Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) fue adquirido a Roche Diagnostics S.L. (Barcelona, España).

4.1.2. Obtención de proteínas

- El citocromo c de corazón de caballo y la melitina fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA).
- La lactosa, TDG, sacarosa, d-biotina, DDM, OG, así como el antioxidante DTT fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA).
- El surfactante Genapol[®] fue adquirido a Fluka (España).
- El inhibidor de proteasas Pefabloc[®] fue adquirido a Roche Diagnostics S.L. (Barcelona, España).

4.1.3. Extracción de surfactantes

- Las Bio-Beads[®] SM-2 fueron adquiridas a Bio Rad (Hercules, CA, USA).
- Los *cassettes* de diálisis, Slide-A-Lyzer[®] fueron adquiridos a Pierce (Rockford, IL, USA).

4.1.4. Lípidos

- 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-fosfatidilcolina (POPC) y 1,2-dimiristoil-*sn*-fosfatidilcolina (DMPC) fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA), mientras que 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-fosfatidiletanolamina (POPE), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-

fosfatidilglicerol (POPG) y el extracto lipídico total de *Escherichia coli* fueron adquiridos a Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

- El lípido funcionalizado con Ni^{2+} , 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[succinil (ácido N-(5-amino-1-carboxypentil) iminodiacético)] (DOGS-NTA-Ni) fue adquirido a Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).
- El lipopolisacárido (LPS) utilizado fue de *Escherichia coli* Serotipo O55:B5 y adquirido a Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.1.5. Sondas fluorescentes

- Las sondas fluorescentes: ANS, HHC, DPH y TMA-DPH fueron adquiridas a Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

4.1.6. Microscopía de fuerza atómica

4.1.6.i. Soportes para muestras

- Los soportes para las muestras, mica muscovita y grafito (HOPG), fueron adquiridos a Metafix[®] (Francia) y Advanced Ceramics[®] (Cleveland, OH, USA), respectivamente.

4.1.6.ii. Palancas y puntas

➤ Palancas de aire OMCL-AC160TS

Las palancas de aire fueron adquiridas a Olympus[®] (Mannheim, Alemania). Son palancas alargadas que presentan puntas de silicio situadas en su extremo final. Están recubiertas por una fina capa de aluminio de 100 nm de grosor para facilitar la reflexión del láser. Las propiedades mecánicas de estas palancas se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades mecánicas de las palancas y puntas OMCL-AC160TS.

PROPIEDAD		VALOR
PALANCA	Grosor (μm)	4,6
	Largo (μm)	160
	Ancho (μm)	50
	Constante (N/m)	42
	Frecuencia de resonancia (kHz)	300
PUNTA	Altura (μm)	11
	Radio final (nm)	< 10

➤ **Palancas de líquido OMCL-TR400PSA**

Las palancas de líquido OMCL-TR400PSA fueron adquiridas a Olympus[®] (Mannheim, Alemania). Son palancas triangulares que presentan puntas de nitruro de silicio (Si_3N_4) situadas en su extremo final. La zona de reflexión de la palanca está recubierta de una fina capa de oro. En cada chip se encuentran dos pares de palancas de diferente constante, cuyas propiedades mecánicas se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Propiedades mecánicas de las palancas y puntas OMCL-TR400PSA.

PROPIEDAD		VALOR	
PALANCA	Grosor (nm)	400	400
	Largo (μm)	100	200
	Ancho (μm)	-	-
	Constante (N/m)	0,08	0,02
	Frecuencia de resonancia (kHz)	34	11
PUNTA	Altura (μm)	2,9	2,9
	Radio final (nm)	20	20

➤ **Palancas de líquido NP-S *Oxide sharpened***

Las palancas de líquido NP-S *Oxide sharpened* fueron adquiridas a Veeco Instruments® (Santa Barbara, CA, USA). Son palancas triangulares que presentan puntas de nitruro de silicio (Si₃N₄) situadas en su extremo final. La zona de reflexión de la palanca está recubierta de una fina capa de 15 nm de cromo. En cada chip se encuentran cuatro palancas de diferente constante, cuyas propiedades mecánicas se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Propiedades mecánicas de las palancas y puntas NP-S *Oxide Sharpened*.

PROPIEDAD		VALOR			
PALANCA	Grosor (µm)	0,6	0,6	0,6	0,6
	Largo (µm)	115	196	115	196
	Ancho (µm)	25	41	17	23
	Constante (N/m)	0,58	0,12	0,32	0,06
	Frecuencia de resonancia (kHz)	57	20	56	18
PUNTA	Altura (µm)	2,5-3,5	2,5-3,5	2,5-3,5	2,5-3,5
	Radio final (nm)	30	30	30	30

4.1.7. Material de uso frecuente

Se utilizó material, tanto de plástico de un solo uso, como de vidrio, de uso habitual en un laboratorio (tubos *eppendorff*®, pipetas Pasteur, vasos de precipitados, tubos de vidrio...).

El agua utilizada fue destilada para la realización de cultivos celulares y bidestilada y desionizada mediante un sistema MilliQ (MilliPore®) para la preparación de las soluciones reguladoras de pH.

4.1.7.i. Reactivos

- Los reactivos THF, DMSO y etanol fueron de calidad para espectroscopia y adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Los reactivos químicos utilizados fueron de calidad analítica y adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.1.7.ii. Otros productos

- Los productos químicos sólidos Tris-HCl, Hepes, NaCl, KCl, MgCl₂, glicina, urea... fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.2. MEDIOS DE CULTIVO

4.2.1. Caldo de triptona y soja

Medio líquido altamente nutritivo utilizado para el crecimiento de gran cantidad de microorganismos.

Composición en g/L:

Peptona de caseína.....	17,00
Peptona de soja.....	3,00
NaCl.....	5,00
KH ₂ PO ₄	2,50
Glucosa.....	2,50

Preparación: Disolver 30 g del producto en 1 L de agua destilada, ajustando a un pH de $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C. Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante un período de 20 minutos.

4.2.2. Caldo de Luria Bertani modificado por Miller

Medio de cultivo líquido nutritivo utilizado para el crecimiento de microorganismos modificados genéticamente.

Composición en g/L:

Peptona tríptica de caseína.....	10,00
Extracto de levadura.....	5,00
NaCl.....	10,00

Preparación: Disolver 25 g del polvo en un litro de agua destilada, ajustando a un pH de $7,2 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

4.2.3. Agar de Luria Bertani modificado por Miller

Medio de cultivo sólido nutritivo utilizado para el crecimiento de microorganismos modificados genéticamente.

Composición en g/L:

Triptona	10,00
Extracto de levadura	5,00
NaCl.....	10,00
Agar	15,00

Preparación: Disolver 40 g del polvo en un litro de agua destilada ajustando a un pH de $7,2 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

4.2.4. Medio de conservación

Medio utilizado para la conservación de las cepas bacterianas a bajas temperaturas (- 80 °C) durante largos periodos de tiempo. La conservación de las cepas a bajas temperaturas fue realizada según las directrices de la Farmacopea Americana (USP-NF, 2003).

4.2.4.i. Cepa codificante para Omp1 de *Serratia marcescens*

Medio de cultivo TSB al que se le adiciona ampicilina 100 µg/mL. En este medio de cultivo líquido se hace crecer la cepa bacteriana durante 18 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se toma una alícuota del cultivo y se le añade igual volumen de una solución al 20 % (v/v) de glicerol estéril en agua destilada. La congelación del medio se lleva a cabo de forma rápida mediante nitrógeno líquido y posterior conservación a - 80 °C.

4.2.4.ii. Cepas codificantes para lactosa permeasa de *Escherichia coli*

Medio de cultivo líquido LB Miller al que se le adiciona ampicilina sódica 100 $\mu\text{g/mL}$ y sulfato de estreptomicina 10 $\mu\text{g/mL}$. En este medio se realiza el cultivo de la cepa deseada durante 18 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se recoge una alícuota del cultivo a la que se le adiciona igual volumen de una solución al 20 % (v/v) de glicerol estéril en agua destilada y se procede a su rápida congelación con nitrógeno líquido y posterior conservación a - 80 °C.

4.3. SOLUCIONES REGULADORAS DE pH

4.3.1. Soluciones generales

➤ Solución KPi

Para 1 L de solución de KPi 1 M:

784 mL K_2PO_4 1 M

216 mL $KHPO_4$ 1 M

➤ Solución NaPi

Para 1 L de solución de NaPi 1 M:

784 mL Na_2PO_4 1 M

216 mL $NaHPO_4$ 1 M

4.3.2. Purificación de Omp1 de *Serratia marcescens*

➤ Solución de extracción

Tris-HCl..... 10 mM

EDTA 2 mM

Genapol[®] 2 % (v/v)

pH 7,40

➤ Solución de mantenimiento

Tris-HCl..... 10 mM

OG 2 % (p/v)

pH 7,40

4.3.3. Purificación de lactosa permeasa de *Escherichia coli*

➤ **Solución para Prensa de French[®] (FPB)**

NaPi 50 mM
MgSO₄ 5 mM
DTT 1,0 mM
Pefabloc[®] 0,50 mM
β-Lactosa 10 mM
pH 7,40

➤ **Solución para muestra en columna de níquel (SB-Ni)**

NaPi 50 mM
NaCl 200 mM
DTT 1,0 mM
Pefabloc[®] 0,50 mM
pH 8,00

➤ **Solución de lavado con urea (UW)**

NaPi 50 mM
DTT 1,0 mM
Pefabloc[®] 0,50 mM
Urea 5 M
pH 7,40

4.3.3.i. Purificación en columna de avidina

➤ **Solución salina de fosfatos (PBS)**

NaPi 0,10 M
NaCl 0,15 M
pH 7,20

➤ **Solución de la columna (CB-Av)**

NaPi 50 mM
NaCl..... 0,15 M
Pefabloc[®] 0,50 mM
DDM.....0,02 % (p/v)
pH 7,50

➤ **Solución de elución (EB-Av)**

NaPi 50 mM
d-biotina..... 10 mM
NaCl..... 0,15 M
Pefabloc[®] 0,50 mM
DDM.....0,02 % (p/v)
pH 7,50

4.3.3.ii. Purificación en columna de níquel

➤ **Solución de la columna (CB-Ni)**

NaPi 50 mM
NaCl..... 200 mM
Glicerol..... 10 % (v/v)
DTT 1,0 mM
Pefabloc[®] 0,50 mM
DDM.....0,02 % (p/v)
pH 8,00

➤ **Solución de lavado de la columna (WB-Ni)**

NaPi	50 mM
NaCl.....	200 mM
Glicerol.....	10 % (v/v)
DTT	1,0 mM
Pefabloc [®]	0,50 mM
DDM.....	0,02 % (p/v)
Imidazol.....	15 mM
pH 8,00	

➤ **Solución de Elución (EB-Ni)**

NaPi	50 mM
NaCl.....	200 mM
Glicerol.....	10 % (v/v)
DTT	1,0 mM
Pefabloc [®]	0,50 mM
DDM.....	0,02 % (p/v)
Imidazol.....	300 mM
pH 8,00	

4.3.4. Soluciones para diálisis

La composición de las soluciones reguladoras de pH para diálisis es idéntica a la de la muestra correspondiente, pero deficiente en aquel o aquellos componentes a eliminar.

4.3.5. Soluciones para espectroscopia de absorción y fluorescencia

Para llevar a cabo los experimentos de espectrofotometría visible y de fluorescencia con HHC se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos: KPi 50 mM regulada a un pH de 7,50.

Para los experimentos de anisotropía de fluorescencia se utilizó una solución reguladora de pH de composición: 10 mM Tris-HCl (pH 7,40) y 150 mM de NaCl.

4.3.6. Soluciones para microscopía de fuerza atómica

➤ **Solución de resuspensión para liposomas**

Hepes 10 mM
NaCl..... 150 mM
CaCl₂..... 20 mM
pH 7,40

➤ **Solución de resuspensión para proteínas**

Tris-HCl..... 10 mM
NaCl..... 150 mM
MgCl₂ 40 mM
pH 7,40

➤ **Solución de resuspensión para láminas 2D de Omp1**

Hepes 20 mM
KCl 300 mM
MgCl₂ 25 mM
pH 6,40

➤ **Solución de resuspensión para láminas 2D de LacY**

Tris-HCl..... 10 mM
NaCl..... 150 mM
MgCl₂ 40 mM
pH 7,40

4.4. INSTRUMENTACIÓN Y SOPORTE INFORMÁTICO

4.4.1. Instrumentación

- La rotura celular fue realizada mediante una Prensa de French[®] SLM-Aminco, presión máxima de 20.000 Psi (SLM Instruments, Inc.).
- Para centrifugar las muestras se utilizó una Ultracentrífuga Kontron[®] T1170 y una Microcentrífuga Spectrafuge 16M Labnet[®], así como una Centrífuga de Alta Velocidad Beckman Coulter[™], modelo AVANTI J-25 y una Ultracentrífuga Beckman Coulter[™], modelo OPTIMA L-90.
- La purificación de LacY se llevó a cabo mediante columnas de alta afinidad utilizando resina Ni-NTA *Superflow* adquirida a QUIAGEN (Alemania) o resina *ImmunoPure[®] Immobilized Monomeric Avidin* adquirida a Pierce (Rockford, Illinois, USA).
- La concentración de las proteínas fue realizada en una cámara de ultrafiltración de tipo Micro-ProDiCon[®] Modelo 320 (5,6 litros de capacidad) mediante el uso de membranas de celulosa 250.000 MWCO (*New Ultrafiltration MWCO*) Micro-ProDiCon[™] (125 μ L de capacidad de reservorio) adquiridas ambas a Spectrum[®] (Laguna Hills, CA, USA).
- Las muestras fueron sonicadas mediante un baño de ultrasonidos Transsonic Digital S (Elma), a una potencia del 100 % y bajo control de temperatura.
- El pH de las soluciones se reguló mediante un pHmetro Crison[®] 2001, con una precisión de $\pm 0,01$.
- Las medidas de dispersión de la luz se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de correlación fotónica Autosizer IIc (Malvern Instruments, U.K.).
- Los experimentos de espectroscopia visible fueron realizados mediante un espectrofotómetro Hitachi[®] modelo U-2001.
- Los experimentos de fluorescencia fueron realizados con un espectrofluorímetro SLM Aminco 8100, con unas rendijas de excitación y emisión de 8/8 y 4/4 nm, respectivamente. La temperatura de la cubeta fue regulada a través de un baño Haake DC5/K20 con una precisión $\pm 0,1$ °C.
- Las observaciones por microscopía de fuerza atómica fueron realizadas mediante un Microscopio Digital Instruments[®] (Santa Bárbara, CA, USA).

4.4.2. Soporte informático

Durante la realización de este trabajo, se utilizaron diversos programas informáticos de PC:

- Adobe Photoshop 5.0
- Corel Photo-Paint 10
- Excel 2000
- Internet Explorer 6.0
- Nanoscope III 5.12r3
- Power Point 2000
- Protein Explorer 2.25 Alfa
- RasMol 2.7.2.1.1
- Scion Image for Windows Beta 4.0.2
- Sigma Plot for Windows 2.01
- Word 2000

4.5. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

4.5.1. Cepas bacterianas

➤ ***Escherichia coli* T184**

La cepa T184 de *Escherichia coli* (lac^Z Y⁻ Rec A⁻), fue utilizada para el clonaje de los plásmidos codificantes para LacY. Esta cepa ha sido modificada de tal manera que se ha privado de la capacidad de expresión de los genes *lacZ* y *lacY*, así como de la expresión de la proteína RecA, la cual es fundamental en los mecanismos de reparación genética en los organismos procariotas. Esta cepa presenta pues un déficit de síntesis de la proteína LacY salvaje, solventado gracias a la introducción en la bacteria, mediante técnicas de biología molecular, de un plásmido que contiene el gen *lacY* con las modificaciones pertinentes para la sobreexpresión y purificación de la LacY.

➤ ***Escherichia coli* UH302**

La característica principal e identificativa de la cepa UH302 de *Escherichia coli* es, que es deficitaria en porinas en su membrana externa. Esta propiedad la hace ser una cepa de primera elección para la sobreexpresión de porinas de enterobacterias.

4.5.2. Plásmidos

El plásmido codificante para Omp1 fue cedido por el Dr. Miquel Viñas del Laboratorio de Microbiología del Campus de Bellvitge (Universidad de Barcelona), mientras que todos los plásmidos codificantes para LacY fueron cedidos por el Dr. H.R. Kaback del HHMI de UCLA (Los Angeles, CA, USA).

➤ **pOM100**

Plásmido codificante para el tipo salvaje de la porina Omp1 de *Serratia marcescens*. Este plásmido recombinante se obtuvo de la clonación del gen codificante

para Omp1 en el vector pUC19. Presenta una región codificante para resistencia a ampicilina sódica.

➤ **pT7-5/lacY/CxB**

A partir de este plásmido se obtuvo la proteína LacY de tipo salvaje. Presenta una mutación en forma de proteína de fusión, con el fin de facilitar su posterior purificación. La mutación consiste en la presencia de un dominio aceptor de biotina situado en el fragmento carboxilo terminal. Tiene una región codificante para resistencia a ampicilina y a estreptomicina.

➤ **pT7-5/lacY/6His**

Este plásmido codifica para el tipo salvaje de la proteína LacY. En este caso, de la misma forma que en el precedente, la proteína presenta una mutación en su estructura que permitirá su correcta purificación. Dicha mutación corresponde a una cola de seis histidinas situadas en la región carboxilo terminal. Tiene una región codificante para resistencia a ampicilina sódica y a estreptomicina.

4.6. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE Omp1 DE *Serratia marcescens*

La porina Omp1 de *Serratia marcescens*, como la mayoría de proteínas integrales de membrana, no se encuentra de forma comercial, por lo que se hace necesaria su obtención mediante cultivo celular y posterior purificación de la misma. Para obtener el mayor rendimiento posible de Omp1 ésta fue clonada en una cepa de *E. coli* deficiente en porinas, de la forma descrita en el apartado 4.5.

4.6.1. Cultivo celular

Un cultivo celular puede ser realizado de dos maneras: mediante un sistema abierto o cerrado (Wilson y Goulding, 1986).

- **Sistema abierto**: El flujo de entrada de medio de cultivo estéril es proporcional al flujo de medio de cultivo con microorganismos, de manera que se alarga la fase de crecimiento exponencial hasta que se elimine el suministro de medio de cultivo fresco.
- **Sistema cerrado**: No existe flujo alguno de entrada de medio de cultivo nuevo. El cultivo presenta las cuatro fases características del crecimiento bacteriano.

Se escogió para la realización de los cultivos celulares destinados a este trabajo, el sistema cerrado.

En un cultivo celular tipo, se pueden distinguir cuatro fases o etapas del crecimiento bacteriano (figura 35), que son:

1. **Fase de latencia**: En esta fase se produce la adaptación del microorganismo al medio en el que se encuentra, no hay por tanto multiplicación celular. Su duración depende tanto del microorganismo como del medio en que se encuentra.
2. **Fase exponencial o logarítmica**: El microorganismo, tras la fase de latencia, comienza a multiplicarse de forma rápida, dando lugar a un gran incremento de

la masa celular. Esta fase se mantiene mientras haya suficientes nutrientes y elementos esenciales.

3. Fase estacionaria: En esta fase, el crecimiento celular se detiene debido al agotamiento de los nutrientes del medio. Una parte de las células mueren, pasando a ser sustrato para otras que se multiplicarán. En esta fase, al variar los sustratos, se producen metabolitos secundarios, la mayor parte de las veces nocivos para la célula, que serán liberados al medio de cultivo.
4. Fase de lisis o muerte celular: En esta fase, debido a la acumulación de tóxicos en el medio y al descenso del pH, se produce la lisis o muerte celular de los microorganismos presentes, dando lugar a un descenso rápido de la población.

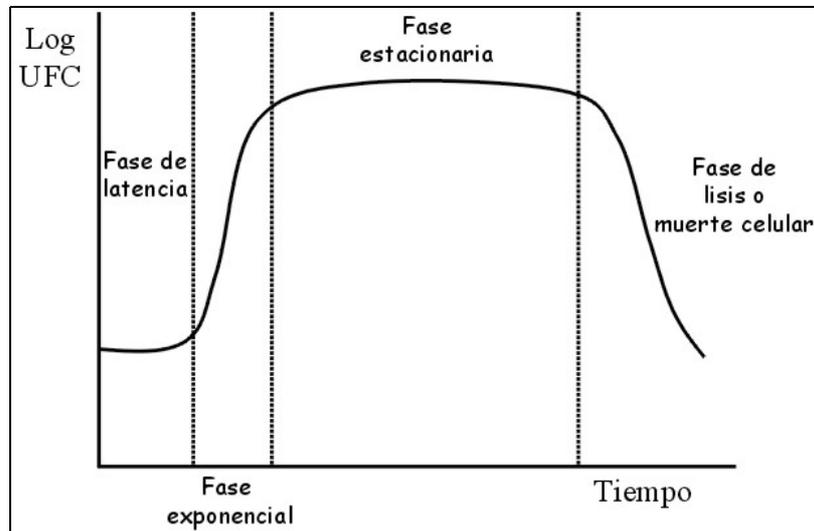


Figura 35. Cinética de crecimiento bacteriano, en la que se representa la variación de UFC en función del tiempo.

El cultivo de la cepa UH302/pOM100, así como la purificación de la Omp1 fue llevado a cabo por la Dra. Neus Ruiz en el Laboratorio de Microbiología del Campus de Bellvitge (Universidad de Barcelona) siguiendo la técnica descrita por Benz et al. en 1997:

Se realizó un cultivo de 18 h a 37 °C en 2 L de medio TSB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina sódica.

La masa celular obtenida fue centrifugada a temperatura ambiente a 8.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento obtenido fue resuspendido en 100 mL de solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40) y fue centrifugada de la forma descrita anteriormente, resuspendiendo de nuevo el sedimento obtenido en solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40).

4.6.2. Aislamiento de membranas

La rotura celular necesaria para la obtención de las envueltas celulares fue realizada por sonicación durante tres períodos de 1 minuto cada uno, con intervalos de 30 segundos y manteniendo la muestra en hielo.

Las células enteras, presentes en suspensión, fueron retiradas de la muestra mediante centrifugación de la misma a temperatura ambiente durante 20 minutos a 8.000 rpm.

El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar, en este caso a 30.000 rpm durante 90 minutos y a una temperatura de 20 °C, con el fin de sedimentar las membranas totales.

Las membranas totales así obtenidas fueron separadas mediante tratamiento de las mismas con un 2 % (p/v) de SDS durante 30 minutos a temperatura ambiente. El tratamiento de las membranas celulares con este surfactante tiene la finalidad de solubilizar completamente la membrana interna, de tal manera que se permite su separación de la membrana externa.

La membrana externa se recuperó mediante centrifugación a 25.000 rpm durante 60 minutos y a una temperatura de 20 °C. El sedimento obtenido fue lavado de nuevo con SDS y posteriormente centrifugado.

Finalmente, el sedimento se resuspendió en presencia de un 2 % (v/v) de surfactante Genapol[®], el cual es utilizado para solubilizar las proteínas presentes en la

membrana externa, en solución de extracción, incubando la misma durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugando a 30.000 rpm durante 30 minutos.

La pureza de la proteína así extraída se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La solución de extracción en la que se encontraba la Omp1 fue sustituida mediante diálisis por la solución de mantenimiento en la que se conservó esta porina a una temperatura de 4 °C.

La solución de mantenimiento presenta un 2 % (p/v) de OG, aunque esta concentración se puede cambiar en función de la cantidad de surfactante deseada.

4.7. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LACTOSA PERMEASA DE *Escherichia coli*

La lactosa permeasa de *Escherichia coli* no se encuentra de forma comercial, así que su obtención se realiza a partir de cultivo celular y posterior extracción de la proteína, de la membrana interna de la bacteria.

4.7.1. Cultivo celular

Con el fin de favorecer el crecimiento exponencial de las bacterias, se diseñó un protocolo de cultivo secuencial o por etapas, partiendo de células frescas (crecimiento de 24 h a 37 °C en placa de Petri con Agar LB Miller, al cual se le adicionó previamente ampicilina sódica 100 µg/mL y sulfato de estreptomina 10 µg/mL). Se inoculó la *E. coli* en 4 mL de caldo LB Miller estéril en presencia de ampicilina sódica (100 µg/mL) y sulfato de estreptomina (10 µg/mL). El cultivo se mantuvo durante unas horas a 37 °C hasta detección visual de crecimiento (turbidez del medio).

Una vez iniciado el crecimiento bacteriano, se transfirió el cultivo a 800 mL de medio de cultivo fresco y se mantuvo durante 24 h a 37 °C en un baño de agua con agitación moderada. Este cultivo es denominado *cultivo iniciador* o *starter* y es empleado como inóculo para el fermentador.

El cultivo iniciador fue inoculado en 40 litros de caldo LB Miller en presencia de los antibióticos ampicilina sódica y sulfato de estreptomina, en un fermentador (Servicio de Fermentación, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, UB). En este caso, el cultivo se realizó a 37 °C, con agitación y se limitó a 5 h. En este último cultivo, con el fin de favorecer e incluso maximizar la síntesis de lactosa permeasa, se inoculó al medio, tras 1 h de cultivo, el sustrato IPTG 0,3 mM, el cual actuará como inductor del plásmido.

Tras las 5 h de incubación, el cultivo se detuvo y las células fueron concentradas por centrifugación en el mismo fermentador hasta un volumen aproximado de 1 litro. La masa celular obtenida se centrifugó a 8.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.

Las células sedimentadas se congelaron de forma rápida con nitrógeno líquido y se conservaron a - 80 °C hasta su utilización.

4.7.2. Aislamiento de membranas

Para aislar las membranas celulares del global de la célula, se procedió a la rotura de las mismas. La rotura de la célula se puede realizar de dos formas, mediante sonicación o utilizando alta presión mediante una Prensa de French[®] (Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, UB). El método escogido para la realización de este trabajo fue el de alta presión.

A partir de las células congeladas, se procedió a su lenta descongelación en baño de hielo y a su resuspensión en FPB. Las células resuspendidas fueron pasadas dos veces por la Prensa de French[®]. Para separar las células no fracturadas del resto de la suspensión, la muestra fue centrifugada a 11.000 rpm durante 25 minutos a 4 °C.

El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 42.000 rpm durante 210 minutos a 4 °C para recuperar las envueltas celulares en forma de sedimento. El sobrenadante obtenido fue descartado.

En las envueltas celulares se encuentran gran cantidad de proteínas que deben ser desechadas durante el proceso de selección de la LacY. La proteína LacY, es resistente a concentraciones de hasta 8 M de urea en el medio. Así, se realizó una primera eliminación de proteínas mediante resuspensión y posterior incubación del sedimento obtenido en la centrifugación, con la solución de lavado con urea durante 30 minutos con agitación moderada en un baño de hielo.

La muestra tratada con urea fue centrifugada a 50.000 rpm durante 1 h a 4 °C. Con este proceso de centrifugación fueron separadas en el sobrenadante todas aquellas proteínas sensibles al tratamiento con el agente desnaturizante.

Las proteínas de membrana resistentes a urea se separaron mediante la utilización de surfactantes adecuados. En este caso se utilizó DDM, en el cual LacY ha

demostrado una gran estabilidad (Engel et al., 2002). El sedimento obtenido fue resuspendido en una solución con FPB, en el caso de la proteína que presenta el dominio aceptor de biotina, o con solución SB-Ni para la que presenta la cola de histidinas. A la solución obtenida se le añadió un 2 % (p/v) de DDM y se incubó con agitación moderada durante 30 minutos a 4 °C.

La separación de las proteínas se realizó mediante sedimentación de los restos de membrana por centrifugación a 50.000 rpm durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue conservado a 4 °C.

4.7.3. Purificación mediante columna de avidina

La proteína LacY que presenta un dominio aceptor de biotina, fue aislada del resto de proteínas de membrana mediante una columna de alta afinidad usando una resina con Avidina-Sephadex[®] (*Immunopure[®] Immobilized Monomeric Avidin* de Pierce). Esta mezcla se añadió a la columna y se dejó reposar durante 30 minutos aproximadamente. Transcurrido este tiempo se limpió la resina con PBS y se conservó a 4 °C.

La activación de la resina, necesaria para la correcta separación de la proteína, así como su liberación cuando ésta sea necesaria, fue realizada mediante lavado con PBS y una solución 2 mM de d-biotina en PBS. Con este paso, se produce la completa saturación de los lugares de unión de la d-biotina con la avidina monomérica, tanto de los lugares de unión reversible, como de los lugares de unión irreversible, evitando así la unión irreversible de la proteína en la resina y permitiendo su posterior extracción.

Para liberar los lugares de unión reversibles, manteniendo bloqueados los de tipo irreversible, se realizó un lavado de la columna con una solución de glicina 0,1 M a un pH de 2,80.

Previamente al paso de la muestra, la columna se estabilizó mediante flujo de solución CB-Av con el fin de acondicionarla al medio en el que se encuentra la muestra. La mezcla de proteínas se hizo fluir lentamente por la columna, de forma que las

proteínas biotiniladas quedaron retenidas en la resina. Una vez pasada toda la muestra, la columna se lavó abundantemente con CB-Av, para eliminar completamente todos los residuos presentes en la muestra.

La elución de la proteína biotinilada se realizó mediante competencia molecular por un mismo lugar de unión. Se hizo pasar solución EB-Av por la columna y se recogieron las fracciones eluidas, en las cuales estará presente la proteína. Para liberar los lugares de unión reversibles, se pasó por la columna una solución de glicina 0,1 M (pH 4,00) y, de la misma forma que antes, se recogieron todas las fracciones eluidas de la columna.

La columna fue regenerada de nuevo mediante el paso de una solución ácida de glicina 0,1 M (pH 2,80).

Finalmente, la columna fue lavada con PBS y conservada a 4°C.

4.7.4. Purificación mediante columna de níquel

La proteína LacY que presenta una cola de 6 histidinas ubicada en el extremo carboxilo terminal, fue purificada mediante el uso de columnas de alta afinidad con Ni²⁺ (Ni-NTA) (figura 36).

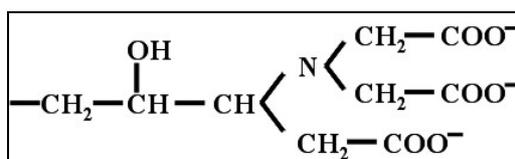


Figura 36. Estructura química del NTA.

La resina se dejó reposar en la columna durante 30 minutos aproximadamente. Transcurrido este tiempo se procedió al lavado de la resina con PBS.

Previamente a su utilización, la columna se limpió con agua desionizada (milli-Q). La activación de la resina utilizada no fue necesaria ya que ésta se encuentra

comercializada en su forma activa. La resina fue equilibrada mediante lavado de la misma con CB-Ni.

La muestra se pasó lentamente por la columna de tal forma que se permitiera una correcta unión de las histidinas con el Ni²⁺. Seguidamente, se realizó un lavado de la columna con WB-Ni para eliminar completamente las proteínas no deseadas.

Con el fin de liberar la proteína adsorbida se recurrió a la competencia entre moléculas, concretamente entre el imidazol y la cola de histidinas. Se utilizó un volumen de EB-Ni y se recogieron las fracciones eluidas de la columna, en las que se encontraba la proteína.

La limpieza de la columna se realizó haciendo pasar por la misma abundante volumen de SB-Ni. La columna se conservó a 4 °C.

Los residuos de imidazol presentes en las fracciones obtenidas de la elución de la proteína, fueron eliminados mediante diálisis, ya que, de lo contrario podrían interferir durante el proceso de cuantificación.

4.8. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de las proteínas obtenidas se realizó mediante un sistema de ultrafiltración de tipo Micro-ProDiCon™ (figura 37), modelo 320, utilizando membranas Micro-ProDiCon™ MWCO 250.000. El volumen total de muestra fue reducido a un volumen inferior a 500 μ L.



Figura 37. Recipiente y columna para ultrafiltración, Micro-ProDiCon™.

La solución utilizada para este proceso fue KPi 50 mM (pH 7,50).

4.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El método escogido para la cuantificación de las proteínas fue el Micro BCA[®] de Pierce. Este método consiste en la realización de una colorimetría utilizando como referencia una curva patrón obtenida a concentraciones de proteína comprendidas entre 0 y 10 µg/mL.

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a una longitud de onda (λ) de 562 nm, y los valores obtenidos de la curva de calibración fueron ajustados linealmente.

4.10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La identificación y comprobación de la pureza de las proteínas obtenidas se realizó a través de geles SDS-PAGE, utilizando patrones de amplio rango de pesos moleculares. El voltaje seleccionado para la realización de estos geles fue de 20 mV y de tipo constante (tanto para el gel iniciador como para el gel separador).

4.10.1. Preparación del gel

➤ Gel separador (12 %)

Agua destilada	3,35 mL
Tris-HCl 1,5M (pH 8,80).....	2,50 mL
SDS 10 % (p/v)	0,10 mL
Acrilamida/bis-acrilamida (30/0,8 %)	3,30 mL

Esta solución se mantuvo al vacío durante 15 minutos para desgasificarla, ya que el oxígeno es un potente inhibidor de la polimerización. Seguidamente se añadieron los siguientes componentes:

Persulfato amónico 10 % (p/v)	50 µL
TEMED	20 µL

La solución recién preparada se inyectó entre los vidrios de soporte del gel y se dejó en reposo durante 30 minutos aproximadamente.

➤ Gel iniciador (4 %)

Agua destilada	1,54 mL
Tris-HCl 0,5M (pH 6,80).....	625 µL
SDS 10 % (p/v).....	25 µL
Acrilamida/bis-acrilamida (30/0,8 %)	335 µL

Esta solución se mantuvo al vacío durante 15 minutos para desgasificarla. Seguidamente se añadieron los siguientes componentes:

Persulfato amónico 10 % (p/v)	12,50 µL
TEMED	5,00 µL

El gel iniciador se inyectó entre los vidrios de soporte, sobre el gel separador y previamente a su polimerización se colocó el molde para los carriles. El gel se dejó en reposo durante 30 minutos aproximadamente y se retiró el molde.

La solución de persulfato amónico, tanto para el gel separador, como para el gel iniciador debe ser fresca, o en su defecto, conservada a - 20 °C.

4.10.2. Soluciones para el gel

➤ Solución de recorrido (10x)

Tris-HCl.....	0,25 M
Glicina	1,92 M
SDS.....	1,00 % (p/v)
pH 8,30	

➤ Solución para la muestra (5x)

Glicerol.....	50 % (v/v)
β-mercaptoetanol.....	25 % (v/v)
SDS.....	11,5 % (p/v)
Tris-HCl.....	132,5 mM
azul de bromofenol.....	5 % (p/v)
pH 6,80	

4.10.3. Tinción del gel

El tipo de tinción seleccionada fue la de nitrato de plata (*Silver Stain*) (Bollag y Edelstein, 1991), ya que su sensibilidad es superior a la de la tinción con Azul de Coomasie (*Coomasie Blue Stain*).

➤ **Tinción con nitrato de plata**

Se realizó la fijación de las proteínas en el gel sumergiéndolo en una solución con un 50 % de metanol y un 10 % de ácido acético glacial. Se incubó durante 1 h con agitación moderada. La solución se cambió entre 2 y 3 veces durante el proceso.

Se lavó el gel con agua destilada en tres etapas de 10 minutos de duración cada una.

Se prepararon las soluciones de tinción A, B y C.

- Solución A: 0,8 g de nitrato de plata en 4 mL de agua destilada.
- Solución B: 21 mL de NaOH 0,36 % + 1,4 mL de hidróxido amónico 30 % (14,8 M).
- Solución C: Añadir la solución A sobre la solución B en agitación, hasta la aparición de un precipitado y llevar a 100 mL.
- Solución D: Mezclar 0,5 mL de ácido cítrico con 50 μ L de formaldehído 38 % y agua hasta un volumen final de 100 mL.

Se tiñó el gel sumergiéndolo en la solución C durante 15 minutos con moderada agitación.

Transcurrido este tiempo, se limpió el gel con agua destilada durante 2 minutos para eliminar los restos de la solución de tinción.

El gel se reveló con solución D mediante agitación moderada hasta la aparición de bandas bien definidas.

El proceso de revelado fue detenido mediante tratamiento del gel con una solución al 1 % (v/v) de ácido acético glacial durante 10 minutos.

El gel fue lavado durante 1 h con agua destilada, en varias etapas.

Finalmente, el gel se preparó para ser conservado en un soporte plástico, mediante tratamiento con una solución al 10 % (v/v) de glicerol durante 30 minutos.

4.11. FORMACIÓN DE LIPOSOMAS

Para la obtención de los liposomas se preparó una disolución madre de fosfolípidos a una concentración de 1 mM, utilizando como solvente una mezcla de cloroformo y metanol al 50 % (v/v).

Partiendo de la mezcla orgánica, se creó una fina película de fosfolípidos por evaporación lenta del solvente mediante corriente de nitrógeno, en un tubo de vidrio de fondo cónico. La película lipídica se mantuvo durante unas horas en un desecador de vacío, para asegurar la completa evaporación del solvente orgánico. Una vez secada, la película (*film*) fosfolipídica fue resuspendida en un solvente acuoso determinado.

Los liposomas así obtenidos fueron MLV. La obtención de liposomas unilaminares se realizó mediante sonicación de los mismos, con un baño de ultrasonidos, durante 30 minutos y a una temperatura de entre 30 y 37 °C (el uso de ultrasonidos incrementa la temperatura del baño de agua). Los liposomas se dejaron reposar durante una noche a 4 °C .

El tamaño y estabilidad de las vesículas obtenidas, se determinaron mediante estudios de dispersión de la luz (*Quasi-elastic light-scattering*) bajo diferentes condiciones experimentales. Estos estudios fueron realizados para establecer las condiciones óptimas de trabajo con estos liposomas así como para comprobar su estabilidad frente a posibles variaciones en las propiedades fisicoquímicas del medio (Merino, 2002).

4.11.1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos presentan las características generales detalladas en el apartado 2.1.1.i, aunque existen algunas diferencias entre ellos, debidas a su estructura química. Se utilizaron en el presente trabajo cinco fosfolípidos, así como una mezcla lipídica comercial: POPC, DMPC, POPE, POPG, DOGS-NTA-Ni y extracto lipídico de *Escherichia coli*.

4.11.1.i. POPC

El POPC, cuya estructura se muestra en la figura 38 es un fosfolípido zwitteriónico que presenta una cadena derivada del ácido palmítico (16:0) y una cadena derivada del ácido oleico (18:1). Tiene una M de 760,10 g/mol y una T_m de -2 °C.

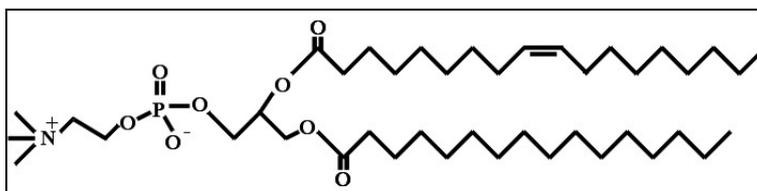


Figura 38. Estructura química del POPC.

Es un fosfolípido que a temperatura ambiente se encuentra en fase de cristal-líquido. La insaturación que presenta en una de sus cadenas hidrocarbonadas confiere una gran movilidad a este lípido cuando se encuentra en la bicapa.

4.11.1.ii. DMPC

El DMPC es un fosfolípido zwitteriónico que presenta dos cadenas hidrocarbonadas derivadas del ácido mirístico (14:0). Su estructura química se muestra en la figura 39. Tiene una M de 677,95 g/mol y una T_m de 23 °C.

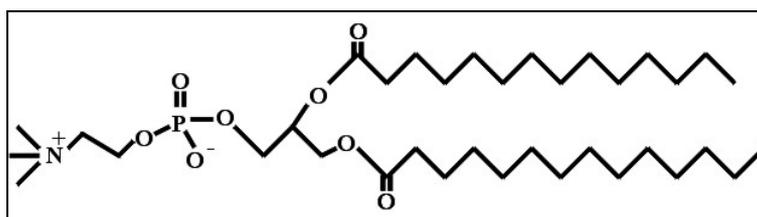


Figura 39. Estructura química del DMPC.

El DMPC presenta una menor movilidad que el POPC. Su valor de T_m se encuentra próximo a la temperatura ambiente, siendo así sencillo su cambio de estado de gel a estado de cristal-líquido en función de las condiciones ambientales.

Se determinó la T_m correspondiente a liposomas formados por DMPC:POPC (1:1, mol:mol) mediante anisotropía de fluorescencia (Vázquez et al., 2001). El valor de T_m fue $11,5 \pm 0,4$ °C, por tanto, la mezcla fosfolipídica de DMPC:POPC (1:1, mol:mol) se encuentra en estado de cristal-líquido a temperatura ambiente.

4.11.1.iii. POPE

El POPE es un fosfolípido zwitteriónico capaz de dar lugar a enlaces de hidrógeno (Hauser et al., 1981). Presenta una cadena derivada del ácido palmítico (16:0) y una cadena derivada del ácido oleico (18:1), como puede apreciarse en la figura 40. El POPE tiene una M de 718,01 g/mol y una T_m de 25 °C.

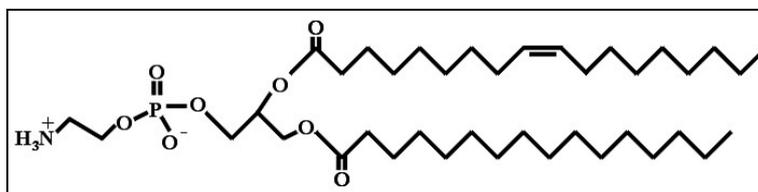


Figura 40. Estructura química del POPE.

El POPE, a temperatura ambiente se puede encontrar tanto en estado de gel como en estado de cristal-líquido, de forma similar a lo que ocurre en el caso del DMPC, ya que su T_m es muy cercana a la temperatura ambiente.

4.11.1.iv. POPG

El POPG es un fosfolípido con carga neta negativa que presenta una cadena derivada del ácido palmítico (16:0) y una cadena derivada del ácido oleico (18:1) (figura 41). El POPG tiene una M de 770,99 g/mol y una T_m de -2 °C.

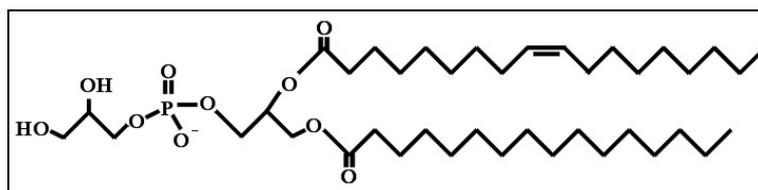


Figura 41 Estructura química del POPG.

El POPG presenta aproximadamente la misma T_m que el POPC y de la misma forma que él se encuentra en estado fluido a temperatura ambiente.

Se utilizó en este trabajo una mezcla compuesta por POPE:POPG (3:1, mol:mol) con una T_m de $19,2 \pm 0,5$ °C calculada experimentalmente por anisotropía de la fluorescencia.

4.11.1.v. DOGS-NTA-Ni

El DOGS-NTA-Ni es un fosfolípido que presenta dos cadenas hidrocarbonadas derivadas del ácido palmítico (18:1), cuya característica principal es su funcionalización con níquel en la región polar (figura 42). El DOGS-NTA-Ni tiene una M de 1056,00 g/mol.

Este fosfolípido presenta la capacidad de unirse selectivamente a las histidinas, de esta forma, puede ser utilizado para la selección y aislamiento de proteínas que presenten en su estructura una cola de histidinas.

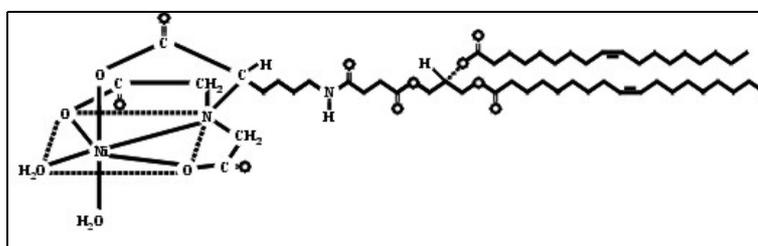


Figura 42. Estructura química del DOGS-NTA-Ni.

4.11.1.vi. Extracto lipídico de *Escherichia coli*

El extracto lipídico de *E. coli* es una mezcla de los lípidos totales presentes en la membrana interna del microorganismo. La composición lipídica en % (p/p) es: PE 57,5 %, PG 15,1 %, CL 9,8 % y otros 17,6%. La T_m de los lípidos que forman la membrana de *E. coli* es de $10,5 \pm 0,9$ °C. Esta temperatura fue calculada experimentalmente por anisotropía de fluorescencia.

4.12. FORMACIÓN DE PROTEOLIPOSOMAS

La formación de proteoliposomas es compleja, ya que depende de múltiples factores. El inicio del proceso es la formación de liposomas multilaminares mediante el método descrito en el apartado 4.11. A los liposomas así formados se les añadió un 0,5 % (p/v) de DDM o un 2 % (p/v) de OG, el cual desestabiliza su estructura y permite la incorporación de la proteína, que fue añadida seguidamente hasta obtener una LPR de 50. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 4 °C. Tras esta incubación se procedió a la eliminación progresiva del surfactante para que el liposoma se reconstituya incorporando la proteína en su estructura y dando lugar por tanto al proteoliposoma.

La eliminación del surfactante se llevó a cabo por adsorción, añadiendo a la muestra una cantidad determinada de Bio-Beads[®] SM-2 (5 g/25 mL) e incubando la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente (~ 23 °C). Transcurrido este tiempo se eliminaron las Bio-Beads[®] por decantación y se centrifugó la muestra en una microcentrífuga a 14.000 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. La recuperación de los proteoliposomas se produjo en forma de sedimento, el cual fue resuspendido en el solvente acuoso adecuado. Finalmente, las muestras fueron sonicadas mediante baño de ultrasonidos durante 20 minutos a una temperatura de entre 30 y 37 °C. De la misma forma que en los liposomas, las muestras se dejaron reposar durante una noche a 4 °C.

Las posibles pérdidas tanto de fosfolípido, como de proteína se cuantificaron aplicando los métodos descritos a continuación. Asimismo, se realizó un ensayo de cuantificación de surfactantes para determinar su cantidad residual en las muestras de proteoliposomas.

4.12.1. Cuantificación de fosfolípido

La cuantificación de fosfolípido presente en las muestras de proteoliposomas fue realizada según la metodología descrita a continuación (Stewart, 1980):

- Se tomaron 0,1 mL de muestra de proteoliposomas y se añadieron a 2,9 mL de cloroformo en tubos de ensayo de vidrio Pyrex[®], con tapón de rosca.

- Se añadieron 3 ml de reactivo:

Cloruro férrico hexahidratado 0,1 M

Tiocianato de amonio 0,4 M

- Cada una de las muestras se agitó vigorosamente durante aproximadamente 1 minuto.
- Las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- La fase clorofórmica fue leída espectrofotométricamente a una λ de 488 nm.

El ensayo de cuantificación de fosfolípidos fue realizado empleando triplicados de todas las muestras.

4.12.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína insertada en los proteoliposomas se llevó a cabo según el método descrito en el apartado 4.9.

4.12.3. Cuantificación de surfactantes

La cuantificación del surfactante residual presente en las muestras de proteoliposomas es fundamental, ya que un exceso de surfactante al final del proceso, podría dificultar o incluso impedir la formación del proteoliposoma.

La cuantificación se llevó a cabo aprovechando la presencia de estructura sacarídica en la molécula de surfactante, tanto en el caso del DDM como en el caso del OG:

Se prepararon muestras de referencia a concentraciones comprendidas entre 0 y 0,5 % (p/v) de DDM y entre 0 y 2 % (p/v) de OG, con el fin de realizar una curva de calibrado para ambos surfactantes. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

El procedimiento a seguir fue el siguiente (Dubois et al., 1956):

- Se realizó la dilución de 10 μL de muestra en 390 μL de agua Milli-Q en tubos de vidrio Pyrex[®], con tapón de rosca, y se procedió a su homogeneización mediante agitación en vórtex.
- Se adicionó 20 μL de fenol saturado con agua a todas las muestras y se agitó de nuevo mediante vórtex.
- Se añadió a cada una de las muestras 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado y se agitaron en vórtex. Las muestras tomaron una coloración anaranjada de diferente intensidad en función de la concentración de surfactante presente en las mismas.
- Las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, manteniendo los tubos separados entre sí para facilitar la ventilación de los mismos, ya que la reacción producida es exotérmica.
- La reacción se detuvo mediante enfriamiento de los tubos en un baño de agua a 23 °C durante 15 minutos.
- Las medidas de absorción de las muestras fueron realizadas a una λ de 490 nm.

4.13. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Se realizaron diversos estudios de estabilidad de las vesículas lipídicas formadas, con el fin de comprobar su resistencia frente a procesos tales como la sonicación (Huang, 1969) o variaciones de las condiciones del medio en el que se encuentran en suspensión, tales como la adición de surfactantes o variaciones del pH de la solución.

En todos los casos se empleó la técnica de dispersión de la luz o *Quasi-elastic light scattering* para la determinación del diámetro medio de las vesículas formadas y la polidispersidad que éstas presentan.

Para cada una de las muestras se realizaron 10 medidas que fueron promediadas por el propio instrumento. La temperatura empleada para los estudios de estabilidad fue de 37 °C.

4.13.1. Proceso de sonicación

Para determinar la estabilidad de las vesículas lipídicas frente al proceso de sonicación, se prepararon cuatro muestras de liposomas multilaminares en un tubo de vidrio de fondo cónico, con las cuatro composiciones lipídicas objeto de estudio: POPC, DMPC:POPC (1:1) y POPE:POPG (3:1) a una concentración de 50 μ M y extracto lipídico de *Escherichia coli* a una concentración de 50 μ g/mL. La solución empleada para estos estudios fue KPi 50 mM (pH 7,50).

Las muestras de liposomas multilaminares fueron sometidas a un proceso de sonicación de 90 minutos de duración, durante el cual se tomaron alícuotas de 2 mL, de cada una de las muestras, a intervalos de 15 minutos. Se determinaron los parámetros de diámetro medio y polidispersidad de cada alícuota.

4.13.2. Adición de surfactantes

Se prepararon muestras de liposomas sonicados durante 30 minutos, a los que se les añadieron diferentes volúmenes de surfactante (OG y DDM). Se realizó la medida de su tamaño y polidispersidad en las mismas condiciones que en el estudio del proceso de sonicación.

4.13.3. Variaciones del pH de la solución

Se prepararon muestras de LUV de diferente composición lipídica mediante sonicación durante 30 minutos en solución KPi 50 mM. Las muestras de liposomas fueron reguladas a un pH inicial aproximado de 4,00 empleando para ello H₃PO₄ (2M). El pH fue incrementándose progresivamente mediante adición de KOH (2M). Los valores de pH fueron controlados mediante un pHmetro convencional que disponía de un microelectrodo. Se realizaron medidas de tamaño y polidispersidad de los liposomas a diferentes valores de pH, de la misma manera que en el proceso de sonicación.

4.14. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

El proceso de solubilización de los liposomas, por acción del DDM y del OG, se estudió observando las variaciones en la absorbancia de las muestras mediante espectrofotometría visible (Lichtenberg et al., 1983).

Los surfactantes, al ser moléculas anfipáticas, tienen la capacidad de integrarse en la estructura del liposoma, en un primer momento, dando lugar a vesículas mixtas fosfolípido-surfactante. Estas vesículas son estables a concentraciones determinadas de surfactante, pero al aumentar la concentración del surfactante, se produce su solubilización. El proceso de solubilización depende de diversos parámetros como son la relación molar efectiva entre surfactante y lípido (Re), la CMC del surfactante y el coeficiente de distribución del surfactante entre la bicapa y el medio acuoso (K) (Lichtenberg et al., 1983; Cócera et al., 2000; López et al., 2002).

El coeficiente de distribución del surfactante entre la bicapa lipídica y el medio acuoso se define como,

$$K = \frac{S_B}{[(L + S_B)S_W]} \quad (1)$$

siendo S_B la concentración de surfactante en la bicapa, L la concentración de lípido total y S_W la concentración de surfactante en el medio acuoso. En el caso que la concentración de lípido fuese muy superior a la de surfactante en la bicapa ($L \gg S_B$), y teniendo en cuenta la definición de Re ($Re = S_B/L$), la ecuación (1) se reduce a,

$$K = \frac{S_B}{LS_W} = \frac{R_e}{S_W} \quad (2)$$

para cualquier otro tipo de situación diferente a la anterior, la ecuación a aplicar es,

$$K = \frac{R_e}{S_W[1 + R_e]} \quad (3)$$

La determinación de los parámetros Re y K se llevó a cabo teniendo en cuenta la dependencia lineal existente entre las concentraciones requeridas de surfactante y la concentración de lípido, tal y como se define en la siguiente ecuación,

$$S_T = S_W + R_e L \quad (4)$$

donde S_T es la concentración total de surfactante presente en la muestra.

La ecuación (4) se aplicó a la etapa de saturación y de solubilización, obteniéndose los parámetros correspondientes a cada proceso,

$$S_{SAT} = S_{WSAT} + R_{eSAT} L \quad (5)$$

$$S_{SOL} = S_{WSOL} + R_{eSOL} L \quad (6)$$

A partir de los valores obtenidos en estas ecuaciones se puede calcular el valor de K_{SAT} y K_{SOL} , respectivamente, aplicando la ecuación (3).

El método a seguir para la realización de los experimentos fue el siguiente:

- Preparación de una solución madre de fosfolípido utilizando como disolvente una mezcla de cloroformo y metanol (1:1, v:v).
- Evaporación del disolvente bajo corriente de nitrógeno y mantenimiento de la película lipídica durante unas horas en un desecador de vacío para asegurar la completa eliminación de los disolventes orgánicos.
- Resuspensión de la película lipídica en solución KPi 50 mM (pH 7,50) mediante ciclos de calentamiento y agitación sucesivos, dando lugar a MLV con una concentración final de 10 mM.
- Preparación de 5 series de 21 tubos cada una, con concentraciones crecientes de surfactante frente a una misma concentración de lípido. Las cinco series ensayadas correspondieron a las siguientes concentraciones lipídicas: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM y 0,5 mM.

- Todas las muestras se llevaron a un volumen final de 1 mL con KPi 50 mM y se dejaron en reposo a 25 °C durante 24 horas para asegurar la completa interacción del surfactante con la bicapa lipídica.
- Se determinó el valor de absorbancia de cada muestra a una λ de 500 nm.
- Se realizó la normalización de los valores obtenidos en porcentaje.

4.15. MÉTODOS DE FLUORESCENCIA

4.15.1. Potencial electrostático de superficie

En la superficie de cualquier membrana biológica, sea procariota o eucariota, se presenta un cierto movimiento de cargas debido a la atracción-repulsión de las mismas por las cargas intrínsecas de la membrana. Esto da lugar a la formación de una doble capa difusa de iones situada a una cierta distancia de la superficie de la membrana. La consecuencia de este fenómeno es la generación de un potencial eléctrico entre la superficie de la membrana y el medio acuoso (ψ), el valor del cual puede variar en función de la fuerza iónica del medio.

Para el cálculo del potencial electrostático de superficie de los modelos de membrana ensayados, se utilizó la sonda fluorescente HHC, cuya estructura y localización en la bicapa se muestran en la figura 43. Se trata de una molécula que se sitúa en la interfase lípido-agua y que su fluorescencia se manifiesta al integrarse en la matriz lipídica. La HHC tiene un tiempo de vida medio de la fluorescencia independiente de la temperatura y del estado de los fosfolípidos. Presenta un punto isobéptico centrado en 333 nm. La HHC es una molécula sensible al pH, como puede apreciarse en los espectros de emisión mostrados en la figura 44.

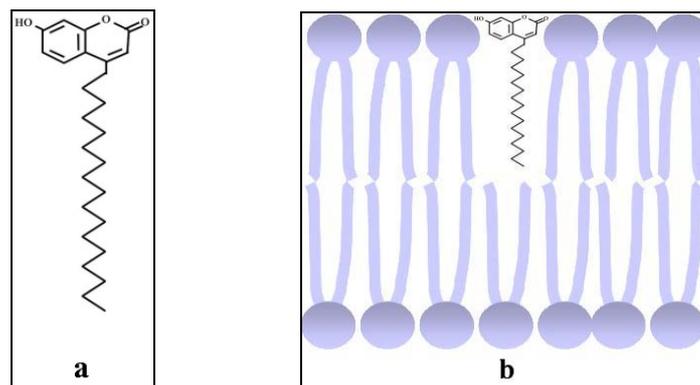


Figura 43. Estructura y disposición de la sonda fluorescente HHC.
(a) Estructura química. (b) Disposición de la sonda en la bicapa lipídica.

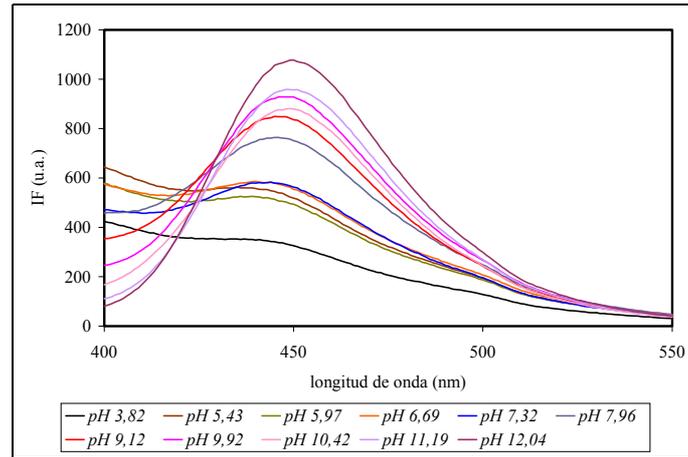


Figura 44. Variaciones en los espectros de fluorescencia de la sonda fluorescente HHC en función del pH de la solución.

La densidad de carga presente en la membrana altera el potencial electrostático de superficie (ψ), dando lugar a una variación del pH local de la misma y por tanto alterando el pK aparente de la sonda fluorescente. El pK aparente se relaciona con el potencial electrostático de superficie según la ecuación (Fernández y Fromherz, 1977 y Fernández, 1981),

$$\Delta pK = \Delta pK_0 - \frac{F\Delta\psi}{2,303RT} \quad (7)$$

teniendo en cuenta que,

$$\Delta pK = pK_{muestra} - pK_{HHC} \quad (8)$$

$$\Delta pK_0 = pK_{referencia} - pK_{HHC} \quad (9)$$

$$\Delta\psi = \psi_{muestra} - \psi_{referencia} \quad (10)$$

donde pK es el valor correspondiente a la molécula situada en la superficie de la membrana, y pK_0 es el valor correspondiente a la membrana de referencia, F es la constante de Faraday, R la constante de los gases ideales y T la temperatura absoluta.

La desviación estándar del $\Delta\psi$ se obtuvo mediante el cálculo de la propagación de errores (Sánchez et al., 1996) a partir de la ecuación (7),

$$(d\Delta\psi)^2 = \left(\frac{\partial\Delta\psi}{\partial pK_0} \right)_{pK}^2 (\partial pK_0)^2 + \left(\frac{\partial\Delta\psi}{\partial pK} \right)_{pK_0}^2 (\partial pK)^2 \quad (11)$$

tras el desarrollo de la ecuación (11) se obtiene,

$$(d\Delta\psi)^2 = \left(\frac{2,303RT}{F} \right)^2 [(\partial pK_0)^2 + (\partial pK)^2] \quad (12)$$

donde $d\Delta\psi$ es la desviación estándar de $\Delta\psi$, ∂pK_0 es la desviación estándar del pK_0 y ∂pK es la desviación estándar del pK .

Las muestras, para el cálculo del pK , fueron preparadas a una LPR de 50 y a una concentración final de 50 μM , de la forma descrita en el apartado 4.12. La sonda fluorescente fue incorporada en la muestra en cantidad suficiente para obtener una concentración final de la misma de 1 μM y fue incubada durante 30 minutos a 37 °C. Paralelamente, se preparó una muestra de referencia de la misma forma que la muestra problema, pero sin la sonda fluorescente, con el fin de eliminar la dispersión producida por las vesículas. Tras la incubación, las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante unos 30 minutos más, antes de la lectura en el espectrofluorímetro.

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas con un espectrofluorímetro SLM Aminco 8100. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 333 y 450 nm, respectivamente. Las medidas se hicieron a 37 °C, a diferentes valores de pH, controlados mediante un pHmetro, por adición de pequeños volúmenes de KOH 2M (el volumen total añadido, en ningún caso superó el 10 % del volumen de la muestra). Para cada pH se realizó la correspondiente medida de la referencia (muestra en ausencia de HHC), la cual fue restada del valor obtenido en la muestra problema. Cada una de las muestras fue realizada por triplicado.

El pK se determinó mediante el ajuste no lineal del grado de disociación (α) de la HHC respecto al pH. El valor de α se calculó mediante la relación de la intensidad de fluorescencia medida a cada pH respecto a la intensidad de fluorescencia cuando la

sonda está completamente disociada ($\text{pH} > 12$). El grado de disociación de la sonda fluorescente fue calculado para cada valor de pH . El valor de pK corresponde al valor de pH cuando $\alpha = 0,5$ (Fernández, 1981). Un ejemplo del cálculo del pK empleando esta sonda fluorescente se muestra en la figura 45.

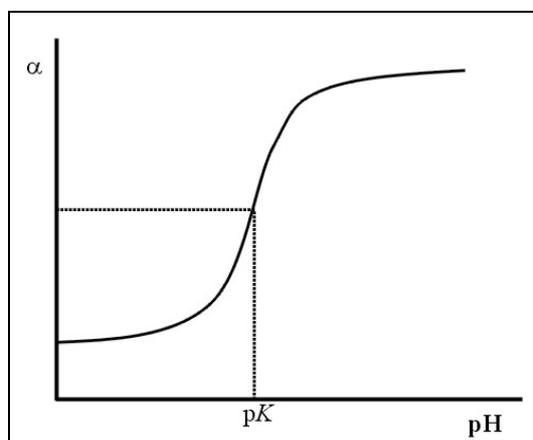


Figura 45. Curva representativa de la disociación de la sonda HHC respecto al pH .

4.15.2. Anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia, así como la polarización de la fluorescencia son dos parámetros directamente relacionados con la fluidez de las bicapas lipídicas. El origen del fenómeno de la anisotropía se basa en la existencia de momentos de transición para la excitación y la emisión, que están orientados según direcciones específicas en la estructura del fluoróforo. La anisotropía se encuentra afectada por los cambios en la orientación de las moléculas fluorescentes debido al movimiento de tipo rotacional de las mismas.

La anisotropía (r) y la polarización (P) de la fluorescencia, se definen por las ecuaciones (13) y (14), respectivamente (Lakowicz, 1999),

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (13)$$

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad (14)$$

donde, I_{VV} y I_{VH} corresponden a la intensidad de radiación polarizada vertical y horizontal, respectivamente, cuando la radiación de excitación es polarizada verticalmente. El parámetro G es un factor de corrección instrumental definido por la relación $G = I_{HV}/I_{HH}$, donde, I_{HV} y I_{HH} corresponden a la intensidad de radiación polarizada vertical y horizontal, respectivamente, cuando la radiación de excitación está polarizada horizontalmente.

En los ensayos de anisotropía de fluorescencia, la concentración de las muestras de extracto lipídico de *E. coli* fue de 100 $\mu\text{g/mL}$ y de 100 μM para el resto de las composiciones lipídicas.

Para estos estudios se utilizaron dos sondas fluorescentes diferentes: DPH y TMA-DPH (figura 46a). El DPH se sitúa en la región apolar de la bicapa lipídica, pudiendo adoptar una orientación perpendicular o paralela a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, como se muestra en la figura 46b. El derivado catiónico TMA-DPH, se coloca en la región polar de la bicapa, ya que presenta un grupo trimetilamonio en uno de sus anillos fenilo.

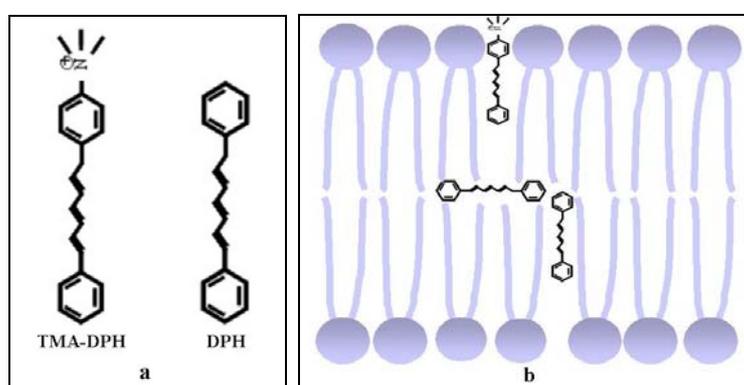


Figura 46. Sondas fluorescentes utilizadas para estudios de anisotropía de fluorescencia: **(a)** Estructura química del TMA-DPH y del DPH. **(b)** Localización de las sondas en la bicapa.

Las medidas de anisotropía de estas sondas fluorescentes, unidas a la membrana, se han utilizado para estimar el efecto de la composición lipídica en la temperatura de transición de fase de la membrana y la viscosidad interna de la misma.

Estas sondas fluorescentes pueden ser incorporadas en la estructura del liposoma o proteoliposoma de dos formas: mediante secado conjunto del lípido y la sonda bajo corriente de nitrógeno, o por incubación de la sonda en la muestra ya preparada (liposomas o proteoliposomas), a una temperatura superior a la de transición de la composición lipídica considerada.

Se preparó una mezcla de fosfolípido y sonda fluorescente en una relación 650:1 (mol:mol) en una solución de cloroformo y metanol al 50 % (v/v) en un tubo de vidrio. La solución clorofórmica fue evaporada bajo corriente de nitrógeno hasta la completa formación de la película lipídica. Ésta, fue resuspendida en solución de Tris-HCl 10 mM y NaCl 150 mM (pH 7,40) en volumen suficiente para conseguir la concentración deseada. El proceso de resuspensión se realizó mediante ciclos consecutivos de calentamiento por encima de la T_m de la mezcla lipídica considerada y agitación mecánica. Los liposomas MLV fueron utilizados inmediatamente.

Ambas sondas fluorescentes presentan longitudes de onda (λ) máximas de excitación y emisión comunes, siendo éstas de 381 nm y 426 nm, respectivamente. Las medidas se realizaron por cuadruplicado.

Para facilitar la interpretación de los datos obtenidos, se realizaron representaciones gráficas de los valores de r normalizados a 1, en el caso de la sonda fluorescente TMA-DPH y a 0,5 para DPH. La normalización de los datos se realizó asignando al primer valor obtenido de r la unidad, o en el caso del DPH, el valor 0,5. El resto de datos obtenidos se refirieron al primer valor, según sea 1 o 0,5.

4.15.2.i. Proceso de incorporación de proteínas de membrana

Los experimentos se realizaron siguiendo las pautas establecidas para la formación de proteoliposomas, mediante adición del surfactante, incubación y posterior extracción del mismo con esferas adsorbentes Bio-Beads[®] SM-2.

- Lectura inicial de la anisotropía de los liposomas reconstituidos, a una temperatura de 4 °C.

- Adición de surfactante (2 % (p/v) de OG o 0,5 % (p/v) de DDM) a la muestra, seguido por la adición de cantidad suficiente de LacY para una LPR de 0,5, cuando fuese necesario. Incubación de la muestra en agitación constante a 4 °C.
- Adición de cantidad suficiente de Bio-Beads[®] SM-2 (0,2 g) a la cubeta. Incubación de la muestra durante 2 horas en agitación constante a 23 °C.

Durante todo el proceso se tomaron lecturas del valor de anisotropía cada 10 minutos.

Como proteínas de referencia se utilizaron Cyt c y MLT, las cuales se añadieron a los liposomas recién resuspendidos en una cantidad suficiente para obtener una LPR de 0,5. La muestra de proteoliposomas se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos a 23 °C y se realizó la lectura de r por cuadruplicado.

4.15.2.ii. Proceso de cristalización 2D de proteínas de membrana

Los experimentos se realizaron siguiendo las pautas de extracción de surfactante establecidas para la cristalización 2D, siendo éstas:

- Lectura inicial de la anisotropía de la muestra de liposomas a 4 °C.
- Adición de un 0,5 % (p/v) de DDM a la muestra de liposomas, adición de cantidad suficiente de LacY para conseguir una LPR de 0,5 e incubación de la muestra en agitación continua durante 1 hora a 4 °C.
- Adición de 0,1 g de Bio-Beads[®] SM-2 e incubación de la muestra en agitación constante durante 4 horas a 4 °C.
- Adición de 0,1 g de Bio-Beads[®] SM-2 e incubación de la muestra en agitación constante durante una noche a 23 °C.

Durante todo el proceso se tomaron lecturas de anisotropía cada 10 minutos.

4.16. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

Todas las observaciones hechas por microscopía de fuerza atómica fueron realizadas mediante un microscopio Digital Instruments® (Santa Bárbara, CA, USA) situado en las instalaciones de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

4.16.1. Microscopio de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica utilizado (Digital Instruments®) y presentado en la figura 47 consta de diferentes partes, que son:

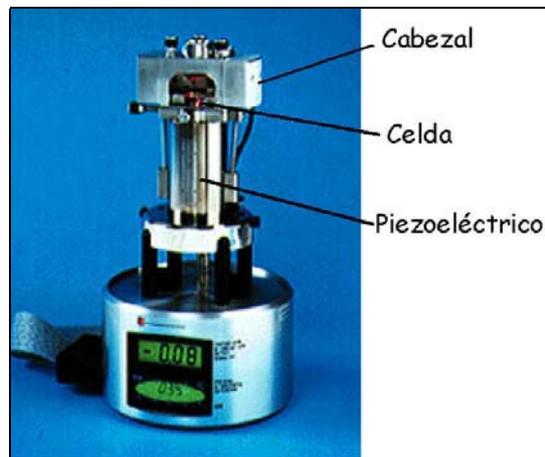


Figura 47. Microscopio de fuerza atómica. Imagen obtenida de Digital Instruments®.

- Cabezal: El cabezal es el lugar donde se encuentra todo el sistema óptico del microscopio. En el cabezal se encuentra situado el diodo emisor del láser y el fotodiodo detector del mismo, una vez éste ha sido reflejado sobre la palanca.
- Celda: La celda es el soporte donde se encuentra situada la palanca.
- Piezoeléctrico: El piezoeléctrico es un cilindro que presenta la capacidad de moverse en los ejes x , y , z , y mover la muestra con él. La parte superior del piezoeléctrico se encuentra imantada sirviendo como punto de fijación de la muestra mediante la utilización de un disco metálico conductor.

4.16.1.i. Palanca y punta

La sonda de AFM es una punta afilada que permite rastrear la superficie de una muestra. La punta presenta una estructura de pirámide invertida con una altura de aproximadamente $10\ \mu\text{m}$ que finaliza en un vértice redondeado de entre 20 y 40 nm de diámetro. Las puntas de AFM suelen estar formadas por silicio o nitruro de silicio, materiales fácilmente funcionalizables.

La punta se encuentra unida al extremo de una palanca flexible y reflectante, que permite la oscilación de la punta a frecuencias determinadas y dependientes de la constante y de la masa de la palanca. En la figura 48 se presenta la imagen de unas palancas de AFM de diferente constante.

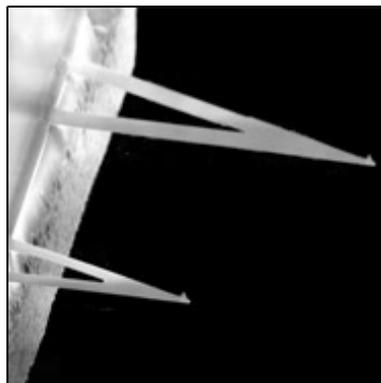


Figura 48. Palancas de diferente constante y puntas. Imagen obtenida de Veeco Instruments®.

4.16.1.ii. Celda

La celda es el soporte en el que se coloca la palanca para realizar el rastreo de la muestra. Existen diferentes tipos de celdas según la aplicación para las que se usen, en general, pueden ser agrupadas en dos tipos: aire y líquido. Las celdas de aire se utilizan básicamente como soporte de la palanca, mientras que las celdas de líquido se emplean como soporte de la palanca y como posible sistema de conducción de líquido, a través de ellas, hacia la muestra. Un ejemplo de celdas se presenta en la figura 49.

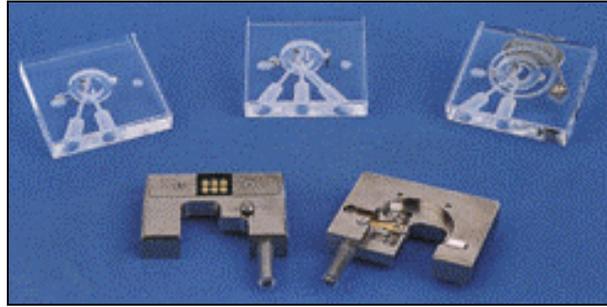


Figura 49. Celdas de aire y de líquido. Imagen obtenida de www.che.utoledo.edu.

4.16.1.iii. Láser

El láser es un haz coherente y monocromático de fotones muy focalizado. El láser se focaliza hacia la palanca, reflejándose en su superficie e incidiendo en el detector. A partir de las variaciones de posición del láser en el detector se corrige la posición de la muestra.

2.4.2.iv. Fotodiodo

El detector del microscopio de fuerza atómica es un fotodiodo que se encuentra dividido en cuatro cuadrantes, de la forma esquematizada en la figura 50. El láser reflejado por la palanca incide en el fotodiodo en un punto concreto, determinado por la diferencia de señal recibida entre los cuadrantes. Las variaciones de posición de la palanca son detectadas al provocar un cambio en el punto de incidencia original del láser.

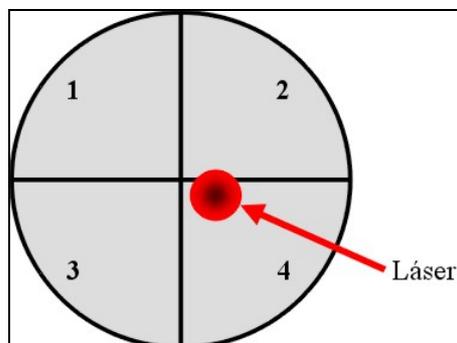


Figura 50. Fotodiodo en el que incide el láser.

4.16.1.v. Piezoeléctrico

El piezoeléctrico o escáner es un sistema de control de la posición de la muestra respecto a la punta. Está formado por un material piezoeléctrico que permite mover la muestra en los ejes x , y , z . El movimiento de la muestra se produce al aplicar un campo eléctrico oscilante en el piezoeléctrico, que lo hace oscilar a la misma frecuencia de excitación del campo eléctrico. La amplitud llega a ser máxima en algunas frecuencias, llamadas *frecuencias de resonancia*.

El movimiento controlado de la muestra se produce debido a la forma del piezoeléctrico, que está constituido por dos cilindros concéntricos. El cilindro exterior se encuentra dividido en cuatro cuadrantes, que controlan el movimiento horizontal de la muestra mediante la aplicación selectiva de un voltaje en un cuadrante determinado. El movimiento vertical de la muestra se produce al aplicar voltaje en el cilindro interior.

4.16.1.vi. Sistema de retroalimentación

El sistema de retroalimentación o *feedback* es un circuito cerrado entre la muestra y el detector, que permite la corrección de la posición de la muestra a partir de las variaciones detectadas en la palanca.

La finalidad del sistema de retroalimentación es mantener constante la señal de reflexión del láser en el fotodiodo.

4.16.1.vii. Registro de señal

La señal obtenida se registra mediante un ordenador, con el *software* apropiado (Nanoscope[®], en este caso). Este *software* recoge y procesa la información recibida obteniéndose finalmente una imagen, generalmente topográfica. Otras imágenes que pueden obtenerse directamente podrían ser la deflexión, la amplitud o la fase.

4.16.2. Modos de funcionamiento

El microscopio de fuerza atómica presenta diferentes modos de funcionamiento, que se muestran en la figura 51, dependiendo de la acción que realice la punta sobre la superficie de la muestra.

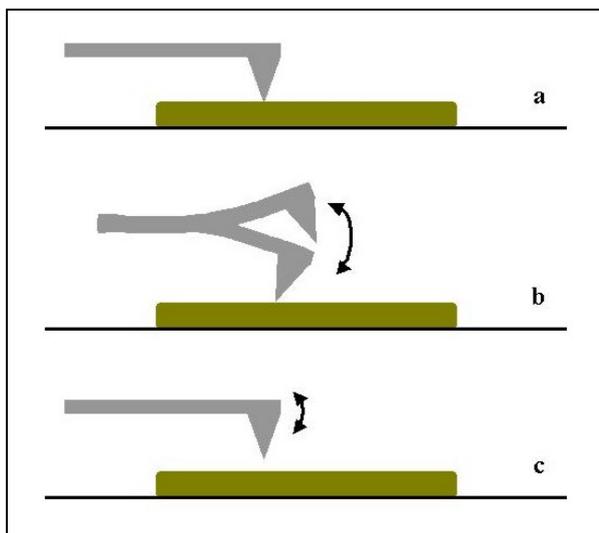


Figura 51. Modos de funcionamiento del AFM.

(a) Modo de contacto. (b) Modo de contacto intermitente. (c) Modo de no contacto.

4.16.2.i. Modo de contacto

En el modo de contacto (figura 51a), la punta se mantiene siempre en contacto con la superficie de la muestra. Las principales fuerzas que actúan en este modo de funcionamiento son de tipo repulsivo.

El modo de contacto permite obtener imágenes de la superficie de la muestra a resolución atómica, aunque puede dar lugar a destrucción de la muestra, debido a la fricción que la punta realiza sobre la misma. El rango de fuerzas habitual en este modo de trabajo se sitúa entre 10^{-7} y 10^{-6} N.

Existen dos formas de visualizar la superficie de una muestra en el modo de contacto (Dufrêne y Lee, 2000), dependiendo del microscopio utilizado:

- Modo de deflexión constante: El sistema de retroalimentación, utilizado para mantener constante la deflexión de la palanca, se encuentra conectado. Se analiza el movimiento vertical del piezoeléctrico.
- Modo de altura constante: Se analiza la deflexión producida por la palanca conforme la sonda realiza el rastreo de la superficie. El sistema de retroalimentación se encuentra desconectado.

4.16.2.ii. Modo de contacto intermitente

En el modo de contacto intermitente (figura 51b) o modo de *Tapping*[®] (desarrollado por Digital Instruments[®]), la punta entra en contacto con la superficie de la muestra de manera intermitente debido a la oscilación de la palanca.

Cuando punta y muestra entran en contacto, la fuerza aplicada por la punta resulta en una variación de la frecuencia de resonancia de la palanca y de la amplitud de vibración de la misma. Este efecto produce una reacción del sistema de retroalimentación, que da lugar al movimiento del piezoeléctrico.

La resolución obtenida con el modo de contacto intermitente es inferior a la que se obtiene con el modo de contacto, aunque se evita la destrucción de la muestra debido a la importante reducción de las fuerzas de fricción entre la punta y la superficie de la muestra.

4.16.2.iii. Modo de no contacto

En el modo de no contacto (figura 51c), la palanca oscila sin que la punta llegue a tocar nunca la superficie de la muestra. La amplitud utilizada en este modo es muy inferior a la del modo de contacto intermitente. La imagen es obtenida mediante la medida de la deflexión de la palanca, debida a las variaciones detectadas entre las fuerzas atractivas y repulsivas ejercidas sobre la misma. La fuerza aplicada sobre la muestra en este caso es de 10^{-12} N.

La resolución obtenida en este modo de funcionamiento, es inferior a la del modo de contacto intermitente y por tanto muy inferior a la del modo de contacto. Este modo, sin embargo, no realiza ninguna fricción sobre la superficie de la muestra y permite el rastreo de superficies extremadamente deformables.

4.16.3. Curvas de fuerza

El trabajo con muestras biológicas en medio acuoso presenta una limitación debida a los electrolitos presentes en este medio. Las macromoléculas biológicas y la mayoría de los soportes usados para AFM presentan carga neta superficial en ambiente acuoso, debido a la disociación de sus grupos funcionales. El signo de esta carga neta superficial dependerá del pH de la solución. Estas cargas de superficie son rodeadas por contraiones presentes en la solución. Esta nube de contraiones puede provocar un efecto de repulsión sobre la punta del AFM provocando alteraciones en los parámetros a determinar, como podrían ser las medidas de altura de la muestra (Müller y Engel, 1997) y dificultad para la visualización de muestras a alta resolución (Müller et al., 1999).

Es indispensable realizar un estudio previo de la interacción producida por el electrolito presente en el medio de visualización y la punta, para minimizar el efecto de repulsión. Este estudio se realiza a través de las curvas de fuerza.

La curva de fuerza se puede definir como la monitorización de la fuerza aplicada por la punta, en función de la separación entre punta y muestra y la correspondiente deflexión de la palanca. Cada etapa de la curva proporciona información sobre las propiedades físicas y químicas de la muestra.

En la figura 52 se presenta el esquema de una curva de fuerza. La región de aproximación de la curva (a) puede ser utilizada para caracterizar las propiedades de superficie, como pueden ser las fuerzas que actúan entre la punta y la muestra, permitiendo la visualización de posibles repulsiones detectadas por la misma. Una vez la punta ha entrado en contacto con la superficie de la muestra (b), la curva de aproximación varía su pendiente (c), permitiendo la determinación de propiedades

mecánicas de la muestra. La curva de retorno puede mostrar una histéresis (d), debida a las fuerzas de adhesión entre la punta y la muestra, que finaliza en una liberación de la punta (e) y un retorno de la curva a valores similares a los hallados en la etapa de aproximación (Dufrêne y Lee, 2000).

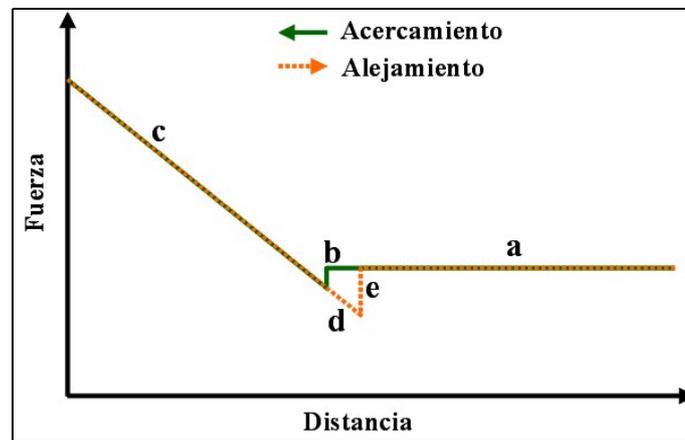


Figura 52. Esquema de una curva de fuerza.

Para la interpretación de las curvas de fuerza, hay que tener en cuenta que la interacción entre punta y muestra es dependiente de la geometría de la punta, de la interacción química entre punta y muestra y de la naturaleza del medio. Por tanto, las medidas de fuerza hechas por AFM no pueden ser directamente relacionadas con otras medidas de fuerza o termodinámicas realizadas por otras técnicas.

4.16.4. Preparación del soporte

El soporte para las muestras utilizado en la técnica de AFM puede ser de diversos tipos, aunque en todos los casos debe ser plano y debe quedar fijado en el piezoeléctrico mediante un disco metálico.

4.16.4.i. Mica muscovita

La mica es un mineral que forma un cristal en capas, cuya exfoliación da lugar a superficies atómicamente planas de varios cientos de μm^2 . Las capas que forman la mica presentan una estructura tetraédrica de $(\text{Si}, \text{Al})_x\text{O}_y$ y se encuentran iónicamente unidas a una lámina central de $\text{Al}_2(\text{OH})_2$. La carga neta negativa de los oxígenos basales

entre estas capas dobles se encuentra compensada por una capa de cationes ordenados hexagonalmente (K^+ en el caso de la mica muscovita). Tras la exfoliación con cinta adhesiva de la mica muscovita, queda expuesto un plano base cubierto de iones K^+ ($0,57 K^+/nm^2$) (Müller et al., 1997). En aire, la capa de iones K^+ queda totalmente neutralizada por la carga negativa del aluminosilicato, mientras que en líquido, los iones K^+ son parcialmente disociados, haciendo que la mica presente carga neta negativa. Los lugares libres de K^+ son reemplazados rápidamente por los cationes del medio.

El soporte de mica fue adherido mediante adhesivo transparente a un soporte cilíndrico de teflón. Una vez unida la mica al soporte de teflón, éste fue adherido a un disco metálico mediante el uso de cinta adhesiva, de la forma mostrada en la figura 53.

La finalidad del disco de teflón es la de evitar la pérdida de líquido de la muestra debido a sus propiedades hidrofóbicas. Es fundamental que el disco de teflón esté completamente limpio, por ello, el disco se sumergió durante 20 minutos en una solución de limpieza agresiva y seguidamente se lavó con abundante agua Milli-Q.

➤ **Solución de limpieza del teflón**

Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)50 % (v/v)

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....50 % (v/v)

4.16.4.ii. Grafito

El grafito (HOPG) es un soporte atómicamente plano, altamente hidrofóbico. Una de las principales características estructurales de este grafito es la presencia de escalones en su superficie.

El soporte de grafito fue adherido directamente sobre el disco metálico, ya que debido a sus características hidrofóbicas evita la extensión de la gota de muestra, por tanto, no es necesaria la utilización del disco de teflón, aunque éste puede ser incorporado para una mayor seguridad. En la figura 53 se muestra un ejemplo de montaje del soporte de grafito para AFM.

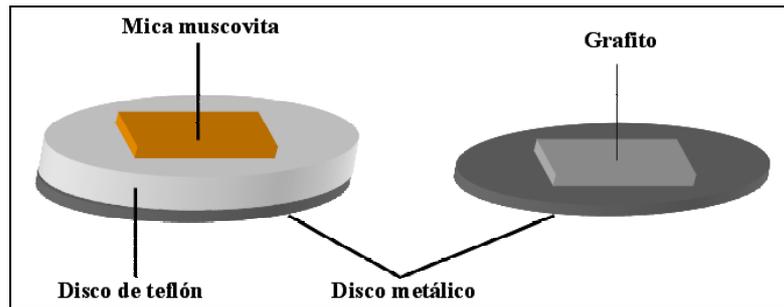


Figura 53. Tipos de soporte utilizados en la técnica de AFM.

En ambos casos, la superficie que será rastreada por la punta será la del soporte de mica o de grafito, independientemente de cómo se hayan sujetado éstos al disco metálico.

4.16.5. Preparación de la muestra

4.16.5.i. Proteínas de membrana

El estudio de proteínas aisladas mediante AFM permite, no solamente su visualización, sino también su posible manipulación. El comportamiento de las proteínas de membrana es diferente en función del medio en el que se encuentran. Se llevó a cabo un estudio comparativo entre las cuatro proteínas presentadas en este trabajo, sobre dos sustratos diferentes, mica y grafito.

La preparación de las muestras de proteína pura para su visualización por AFM se realizó de la forma detallada a continuación:

- Se diluyó la proteína hasta una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en RB para proteínas. En el caso de la Omp1 y de la LacY se añadió el surfactante adecuado a la solución para evitar la dilución del mismo.
- Se depositaron 30 μL de la muestra sobre el soporte.
- La muestra se incubó durante 20 minutos en un baño de hielo.
- Se lavó la muestra con solución RB para proteínas, libre de cationes divalentes.

Las muestras de proteína fueron visualizadas a temperatura ambiente, empleando el modo de contacto intermitente. Las puntas utilizadas fueron de Si₃N₄ con una constante de palanca de 0,08 N/m.

De las imágenes obtenidas de las proteínas sobre mica y sobre grafito se realizó la medida de parámetros tales como la altura y el diámetro medios. Tras la obtención de las dimensiones de la proteína (altura y diámetro), se calculó su volumen molecular, asumiendo para ello que la proteína adsorbida sobre el sustrato corresponde a un casquete esférico y aplicando la siguiente ecuación (Schneider et al., 1995),

$$V = \frac{\pi h}{6}(3r^2 + h^2) \quad (15)$$

donde h es la altura aparente y r es el radio aparente de la proteína. El cálculo de la desviación estándar del volumen aparente se realizó a partir del cálculo de propagación de errores (Sánchez et al., 1996) a partir de la ecuación (15), obteniéndose,

$$(dV)^2 = \left(\frac{\partial V}{\partial h}\right)_r^2 (\partial h)^2 + \left(\frac{\partial V}{\partial r}\right)_h^2 (\partial r)^2 \quad (16)$$

donde ∂h es la desviación estándar asociada al cálculo de la altura media y ∂r es la desviación estándar asociada al cálculo del radio medio. Del desarrollo y posterior simplificación de la ecuación (16) se obtiene,

$$(dV)^2 = \left[\frac{\pi}{2}(r^2 + h^2)\right]^2 (\partial h)^2 + (\pi hr)^2 (\partial r)^2 \quad (17)$$

El empleo de la ecuación (15) para el cálculo del volumen molecular aparente de las proteínas ha sido utilizado en diferentes estudios de moléculas simples por AFM mediante comparación con el volumen molecular teórico, dado por la expresión (Henderson et al., 1996) (Schneider et al., 1998),

$$V_{prot} = \left(\frac{M}{N} \right) (V_1 + dV_2) \quad (18)$$

siendo M la masa molecular de la proteína en Da, N el número de Avogadro, V_1 el volumen específico parcial de las proteínas ($0,74 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), V_2 el volumen específico parcial del agua ($1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) y d la magnitud de hidratación de la proteína ($0,4 \text{ mol H}_2\text{O/mol proteína}$).

Una vez calculado el volumen teórico del monómero de cada una de las proteínas, se puede estimar el número de moléculas que constituyen los posibles agregados, según la ecuación (Kiselyova et al., 1999),

$$V = n_m V_{prot} \quad (19)$$

donde n_m es el número de monómeros presentes en la agrupación de proteínas.

4.16.5.ii. Extensión de liposomas

Los liposomas se adhieren a la superficie de la mica dando lugar a una bicapa plana o SPB. El mecanismo de formación de estas bicapas planas ha dado lugar a una gran controversia, ya que aún en la actualidad no se conoce con total seguridad el proceso por el cual se pasa de la estructura esférica del liposoma a la estructura plana de la SPB.

La preparación de los liposomas para dar lugar a la formación de SPB se realizó mediante el seguimiento de las etapas descritas a continuación:

- Disolución del lípido o lípidos que darán lugar a los liposomas en una mezcla de metanol y cloroformo (1:1, v:v) en un tubo de vidrio de fondo cónico.
- Secado de la muestra por evaporación del disolvente bajo corriente de nitrógeno, dando lugar a la formación de la película fosfolipídica.
- Resuspensión de la película de fosfolípido en RB para liposomas, dando lugar a una concentración de $250 \mu\text{M}$.

- Formación de liposomas unilaminares mediante el método de extrusión (Hope et al., 1985) en filtros de policarbonato de 400 nm de diámetro de poro. El paso de la muestra por estos filtros se realizó 10 veces.
- Deposición de 60 μ L de la muestra sobre mica recién exfoliada e incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- La muestra se lavó con solución RB para liposomas, libre de cationes divalentes. Este lavado tiene como finalidad la eliminación de todas aquellas partículas que no se hayan adherido fuertemente a la superficie de la mica y que puedan por tanto interferir en el proceso de visualización.
- Visualización de la muestra en el AFM en modo de contacto intermitente, empleando palancas con una constante de 0,08 N/m.

Las muestras de liposomas para la realización de estudios por AFM requieren, generalmente, de la presencia de cationes divalentes para su correcta fusión y extensión en el soporte (Reviakine y Brisson, 2000; Jass et al., 2000).

4.16.5.iii. Incorporación de proteínas en tiempo real

La incorporación de proteínas en tiempo real se realizó mediante la extensión de una SPB de extracto lipídico de *E. coli* sobre mica y posterior incorporación de proteínas al medio de visualización. El método se describe a continuación:

- Extensión de liposomas de extracto lipídico de *E. coli* sobre mica, de la forma descrita en el apartado 4.16.5.ii.
- Lavado de la SPB mediante flujo con solución 10 mM Tris-HCl (pH 7,40); 150 mM NaCl.
- Visualización de la muestra en el AFM, en modo de contacto intermitente, empleando palancas con una constante de 0,08 N/m.
- Dilución de las proteínas a una concentración de 40 μ g/mL en solución de visualización. A las proteínas que se encuentran en forma de micela mixta, se les añadió el surfactante necesario para evitar su dilución.
- Incorporación de 20 μ L de la solución de proteína a través de la celda de líquidos, con ayuda de una jeringa.

- Visualización, en tiempo real, de la deposición y eventual integración de las proteínas en la estructura de la SPB.

4.16.6. Cristalización 2D de proteínas de membrana

Las proteínas de membrana presentan, en general, una estructura hidrofóbica y flexible. Estas características complican su estudio mediante difracción de rayos X ante la dificultad de obtener cristales capaces de difractar. La obtención de cristales 2D es pues el método directo de elección para su estudio conformacional.

La cristalización bidimensional permite un buen grado de agrupación de estas moléculas debido a la presencia de un soporte lipídico, el cual, además confiere a la muestra un alto grado de biomimetismo y permite asimismo un estudio dinámico de la molécula.

Independientemente del método utilizado para cristalizar las proteínas, tras la eliminación del surfactante se debe realizar una limpieza de los posibles cristales obtenidos. Esta limpieza incluye la eliminación de las posibles micelas mixtas residuales, mediante centrifugación, en una microcentrífuga a 12.000 rpm durante 1 h. El sedimento formado, se resuspendió suavemente en la solución RB para láminas 2D adecuada (ver apartado 4.3.6). La muestra resuspendida se dejó en reposo durante 24 horas.

4.16.6.i. Cristalización 2D de Omp1 de *Serratia marcescens*

La cristalización de la porina Omp1 se realizó mediante eliminación de surfactante por diálisis. El surfactante utilizado fue el OG.

Los fosfolípidos que darán lugar a la matriz lipídica fueron solubilizados en una mezcla de cloroformo y metanol al 50 % (v/v). El disolvente fue evaporado bajo corriente de nitrógeno dando lugar a una fina película lipídica que fue inmediatamente resuspendida en una solución formada por 10 mM Tris-HCl (pH 7,40), 150 mM NaCl y 2 % (p/v) OG, en volumen suficiente para 100 μ M. Tras la resuspensión del lípido, se

incorporó la porina Omp1 solubilizada en un 2 % (p/v) de OG para obtener la LPR deseada. La mezcla así formada se inyectó en un *cassette* de diálisis Slide-A-Lyzer[®] y se realizó un proceso de diálisis de tres días de duración a temperatura ambiente, con cambios periódicos de la solución de diálisis. Finalmente, la muestra fue centrifugada a 12.000 rpm durante 1 h y resuspendida en solución para láminas 2D de Omp1. La muestra fue conservada a temperatura ambiente durante no más de 72 h.

4.16.6.ii. Cristalización 2D de lactosa permeasa de *Escherichia coli*

La cristalización de la LacY se realizó principalmente mediante el método de adsorción, ya que el DDM se extrae con facilidad con Bio-Beads[®] SM-2.

El proceso se inició con la preparación de una solución madre del fosfolípido o fosfolípidos a utilizar en una mezcla de cloroformo y metanol (1:1, v:v). A partir de ésta solución madre se transfirió a un tubo de vidrio, un volumen calculado para obtener una concentración lipídica final de 100 μ M. El disolvente se evaporó bajo corriente de nitrógeno para dar lugar a una fina película fosfolipídica, la cual, una vez seca, se resuspendió en 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0,5 % de DDM. A los fosfolípidos resuspendidos se les añadió cantidad suficiente de LacY con un 0,5 % de DDM para obtener la LPR deseada. La mezcla se incubó durante 1 hora a 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se inicia la primera etapa de eliminación del surfactante mediante adición de 2,5 g/25 mL de Bio-Beads[®] a la muestra y se mantuvo a 4 °C durante 4 horas más. Pasadas estas 4 horas se añadió a la muestra la misma cantidad de Bio-Beads[®] y se mantuvo durante 12 horas a 37 °C.

La muestra se transfirió, libre de Bio-Beads[®], a un tubo *ependorf*[®] para ser centrifugada a 12.000 rpm durante 1 hora y resuspendida en solución RB.

Para la correcta formación de los cristales, la muestra se dejó en reposo un mínimo de 24 horas y un máximo de 72 horas a 37 °C.

4.16.6.iii. Establecimiento de las condiciones de visualización

Una vez obtenido el cristal bidimensional, éste podrá ser observado mediante técnicas como la microscopía electrónica (EM) o la microscopía de fuerza atómica (AFM). En el trabajo que se presenta, la técnica escogida fue la AFM.

La técnica de AFM permite la visualización de la muestra en solución. Este aspecto, que representa una gran ventaja frente a otras técnicas como puede ser la TEM (microscopía electrónica de transmisión), se torna inconveniente al tener en cuenta la repulsión que producen los iones de la solución sobre la punta.

Las condiciones de visualización óptimas se obtuvieron mediante la realización sistemática de curvas de fuerza durante el rastreo de las muestras.