

CAPÍTULO 9

INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA

Jorge L. Pórfido y Valeria Silva

Introducción

Las interacciones lípido-proteína son de gran importancia en muchos procesos que resultan fundamentales para la vida en nuestro planeta. A modo de ejemplo, cabe destacar que gran parte de los procesos de la fotosíntesis y la respiración celular son llevados a cabo por proteínas que se encuentran formando parte de membranas biológicas. Asimismo, el transporte de triglicéridos y colesterol a través del plasma sanguíneo sería imposible si no se formaran las lipoproteínas encargadas de solubilizar y direccionar dichos lípidos a los órganos correspondientes. A la luz de lo antes mencionado, es evidente que resulta importante contar con herramientas que permitan el estudio de este tipo de interacciones, lo cual representa el objetivo central de este capítulo.

Antes de adentrarnos en las técnicas empleadas para el estudio de las interacciones entre lípidos y proteínas, es útil hacer un repaso de los distintos tipos de proteínas involucradas en este tipo de interacciones.

1. Proteínas de membrana
2. Lipoproteínas plasmáticas
3. Proteínas solubles que unen lípidos

Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: proteínas periféricas y proteínas integrales de membrana, tal como se muestra

en el esquema de la Figura 9.1. Aquellas proteínas pertenecientes al primer grupo se encuentran vinculadas con las membranas celulares mediante interacciones no covalentes con las cabezas polares de los fosfolípidos que componen la membrana, o bien con las regiones hidrofílicas de las proteínas integrales de membrana que se extienden por fuera de la bicapa lipídica. Por otro lado, las proteínas integrales se caracterizan por interactuar con las regiones hidrofóbicas de la bicapa lipídica, en algunos casos llegando a atravesar a la misma por completo (proteínas transmembrana). Considerando las características hidrofóbicas del interior de la bicapa fosfolipídica, es claro que la estructura nativa de las proteínas transmembrana debe consistir en un arreglo “inverso” al que presentan las proteínas hidrosolubles, es decir, los aminoácidos menos polares deben quedar expuestos para interactuar con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, mientras que los aminoácidos polares deben agruparse alejados de la fase hidrofóbica. Cabe destacar que las estructuras de proteínas de membrana resueltas hasta el momento muestran que las mismas presentan dos tipos básicos de plegamiento: un haz de α -hélices o un barril- β . Dichos plegamientos presentan, a su vez, una correlación con la localización de dichas proteínas: mientras que los haces de α -hélices se encuentran principalmente formando parte de canales iónicos y receptores de membrana plasmática o de retículo endoplásmico, los barriles- β se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram-negativas, mitocondrias y cloroplastos. El hecho de que las proteínas integrales de membrana posean los motivos antes mencionados se debe a que ellos satisfacen los puentes de hidrógeno que pueden formarse entre los grupos amino y carbonilo de la cadena peptídica, al tiempo que minimizan la exposición de los aminoácidos polares hacia el ambiente hidrofóbico del interior de la membrana. Los segmentos transmembrana de una proteína pueden llegar a predecirse teniendo en cuenta la composición aminoacídica de la secuencia, ya que se ha visto que las características de la membrana imponen ciertas restricciones al plegamiento de las proteínas transmembrana. Se ha observado que las hélices transmembrana requieren de al menos 15 aminoácidos, predominantemente hidrofóbicos, para poder atravesar la bicapa

lipídica. Las hojas β , por su parte, consisten en secuencias de más de diez aminoácidos, en donde los polares y los hidrofóbicos se van alternando. Por otro lado, ciertos segmentos que no atraviesan la membrana (quedan del lado citosólico) y conectan dos segmentos transmembrana han demostrado estar enriquecidos en aminoácidos cargados positivamente (Punta, 2007; Smith, 2011).

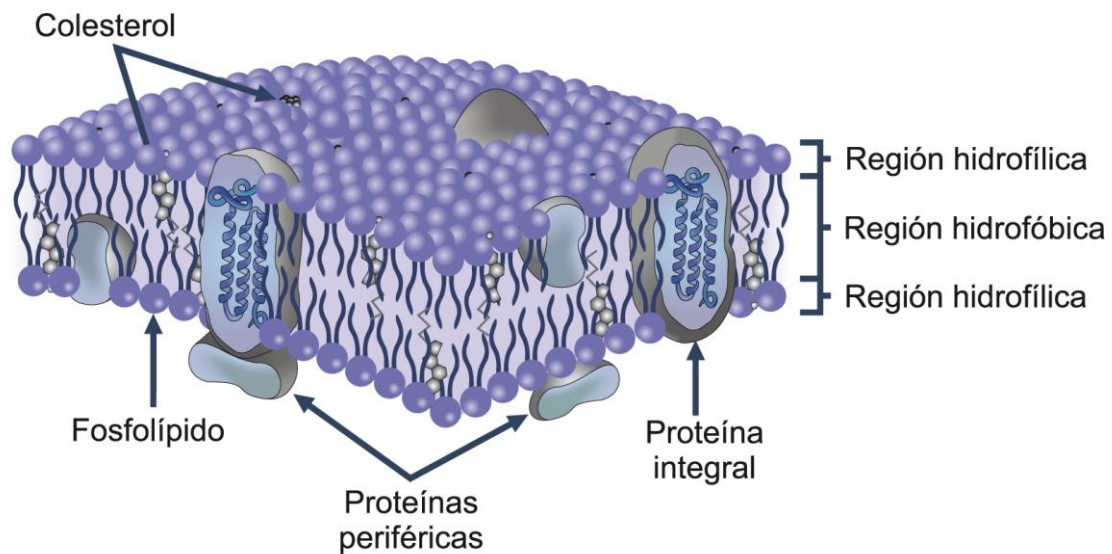


Figura 9.1. Esquema de una membrana biológica y sus proteínas.

Lipoproteínas plasmáticas

En vertebrados, así como en insectos, las lipoproteínas son las encargadas de solubilizar y transportar por la circulación diversos lípidos tales como colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. En líneas generales, las lipoproteínas consisten en partículas globulares que contienen un centro hidrofóbico compuesto por lípidos no polares como triglicéridos y ésteres de colesterol recubiertos por una capa anfifílica de proteínas, conocidas como apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol no esterificado (ver Figura 9.2). En los mamíferos, las lipoproteínas plasmáticas son sintetizadas en el hígado y en el intestino, y en circulación su estructura y composición son altamente dinámicas. En este entorno, las

lipoproteínas pueden sufrir modificaciones enzimáticas de sus componentes lipídicos, transferir sus lípidos o sus apolipoproteínas solubles hacia otras lipoproteínas, y por consiguiente sufrir cambios conformacionales en respuesta a estas modificaciones en su composición. Luego de estas modificaciones, las lipoproteínas son catabolizadas en el hígado, en el riñón y/o en los tejidos periféricos, generalmente vía endocitosis mediada por receptor. La interacción con estos receptores, así como el metabolismo, la estructura y el armado de las distintas partículas lipoprotéicas en circulación, está determinado en gran parte por sus apolipoproteínas. Si bien existen varias apolipoproteínas diferentes, la mayoría de ellas se caracterizan por poseer una gran proporción de α -hélices anfipáticas, es decir α -hélices que tienen una cara no polar que puede establecer interacciones hidrofóbicas con los lípidos no polares del interior de las lipoproteínas; y una cara polar que puede establecer interacciones con los lípidos polares que están en la superficie de las partículas lipoprotéicas y/o con el agua. Es por ello que algunas de estas apolipoproteínas son relativamente solubles en agua, aún en su forma libre de lípidos, y de hecho suelen ser sintetizadas en su forma apo para luego adquirir los lípidos en circulación. Por otro lado, frente a distintos estímulos, estas apolipoproteínas solubles pueden ser transferidas con relativa facilidad de una partícula lipoprotéica a otra, es por eso que también reciben el nombre de apolipoproteínas intercambiables. Las apolipoproteínas intercambiables suelen ser proteínas relativamente pequeñas, aunque sus tamaños pueden variar desde 6 hasta 45 kDa. Las apolipoproteínas intercambiables se agrupan en distintas familias: Apo A, Apo C, Apo D y Apo E, muchas de las cuales poseen varios miembros. Por otro lado, existe otro grupo de apolipoproteínas no intercambiables, que se caracterizan por ser muy insolubles en agua en su forma libre de lípidos y, de hecho, deben unirse a sus ligandos a medida que son sintetizadas en el retículo endoplásmico en las células del hígado o del intestino. Si bien la estructura de estas apolipoproteínas no ha podido ser determinada en forma libre de lípidos debido a su baja solubilidad en agua, ensayos llevados a cabo con las partículas lipoprotéicas o con fragmentos de apolipoproteínas solubilizados en detergentes han revelado que tienen un alto contenido de

hojas β conjuntamente con α -hélices anfipáticas. Las apolipoproteínas no intercambiables son la Apo B48 y la Apo B100, las cuales tienen un peso molecular mucho mayor, siendo de 212 kDa en el caso de la Apo B48 y de 512 kDa en el caso de la Apo B100.

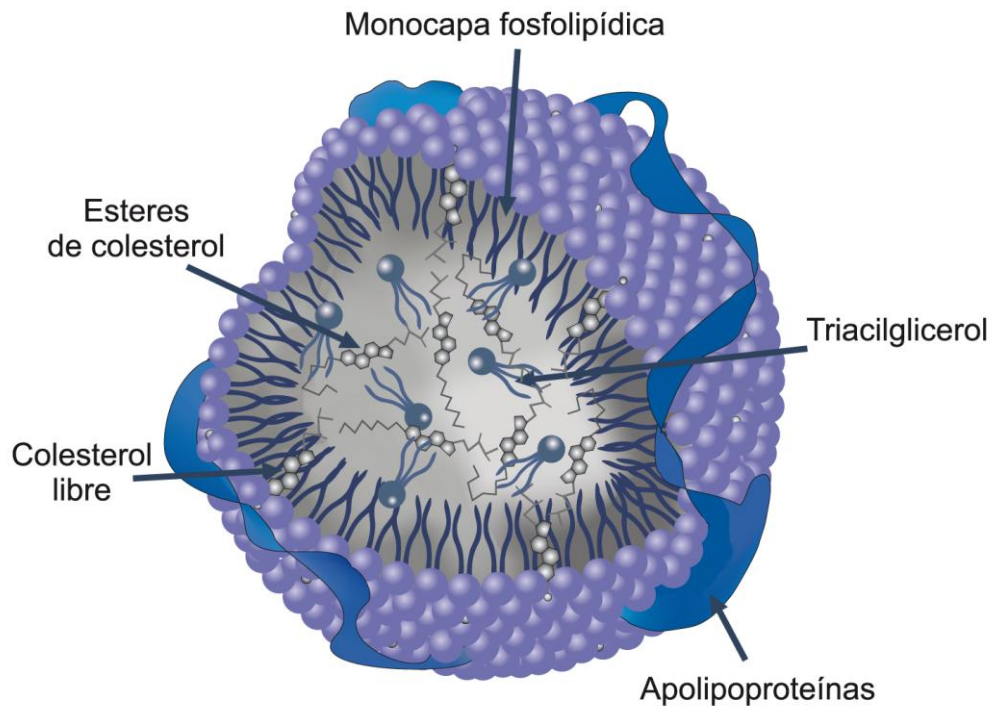


Figura 9.2. Esquema representativo de una lipoproteína y sus componentes.

Además de variar en la composición de apolipoproteínas, conteniendo apolipoproteínas intercambiables o no intercambiables, las distintas lipoproteínas plasmáticas de mamíferos se clasifican de acuerdo a su densidad. Esta clasificación denomina a las lipoproteínas como quilomicrones, VLDL (del inglés *Very Low Density Lipoprotein*), LDL (del inglés *Low Density Lipoprotein*) y HDL (del inglés *High Density Lipoprotein*). Su densidad varía debido a su contenido de lípidos respecto al de proteína, siendo los quilomicrones las partículas menos densas, puesto que su porción proteica constituye tan solo el 1-2 % de su peso, mientras que en el caso de las HDL la porción proteica constituye el 50 % de su masa. Asimismo, el diámetro de las lipoproteínas se correlaciona inversamente con su densidad, siendo de 6000 Å para los quilomicrones hasta 70 Å para las partículas de HDL más pequeñas.

Las funciones específicas de estas lipoproteínas no serán tema de estudio del presente capítulo. Brevemente sólo mencionaremos que los quilomicrones son sintetizados en el intestino y son las partículas encargadas de transportar los triglicéridos provenientes de la dieta, mientras que las partículas de VLDL son sintetizadas en el hígado para transportar los triglicéridos endógenos. Las partículas de LDL derivan de los cambios metabólicos que sufre la VLDL en circulación y su función es la de transportar principalmente los esteres de colesterol hacia los tejidos periféricos y hacia el hígado. Las partículas de HDL son sintetizadas en el hígado y en el intestino, y también son formadas a partir de los cambios metabólicos de otras lipoproteínas en circulación. Su función es la de transportar el exceso de colesterol desde los tejidos hacia el hígado para su remoción y excreción (Vance, 2008).

Proteínas solubles que unen lípidos

En esta sección se tratará un grupo heterogéneo de proteínas que no están relacionadas evolutivamente, pero sí comparten ciertas características: todas son proteínas relativamente pequeñas, solubles y que tienen la capacidad de unir ligandos hidrofóbicos.

Dentro de dicho grupo, las más estudiadas son las que se conocen como iLBP (del inglés *intracellular Lipid Binding Proteins*), las cuales incluyen tanto a las FABP (del inglés *Fatty Acid Binding Proteins*) como a las CRBP (del inglés *Cytosolic Retinoid Binding Proteins*) (Schaap, 2002). A pesar de que el conjunto de las iLBP difiere en el tipo y número de ligandos que unen, y se proponen distintas funciones para cada una de ellas, todas coinciden en gran medida en su estructura tridimensional. La misma consiste en un barril- β formado por diez hebras β antiparalelas, coronado con dos α -hélices a modo de tapa del barril, como se muestra en la Figura 9.3 para la FABP de intestino (IFABP). Si bien las funciones de las iLBP aún no son del todo claras, se ha propuesto que participarían en la solubilización y transporte de compuestos hidrofóbicos en el interior de la célula, así como en el direccionamiento de

dichos compuestos hacía diversas organelas. Asimismo, se han propuesto para algunas de estas proteínas funciones de regulación de enzimas y de genes involucrados en el metabolismo lipídico, así como su participación en vías de señalización (Furuhashi, 2008; Storch, 2008).

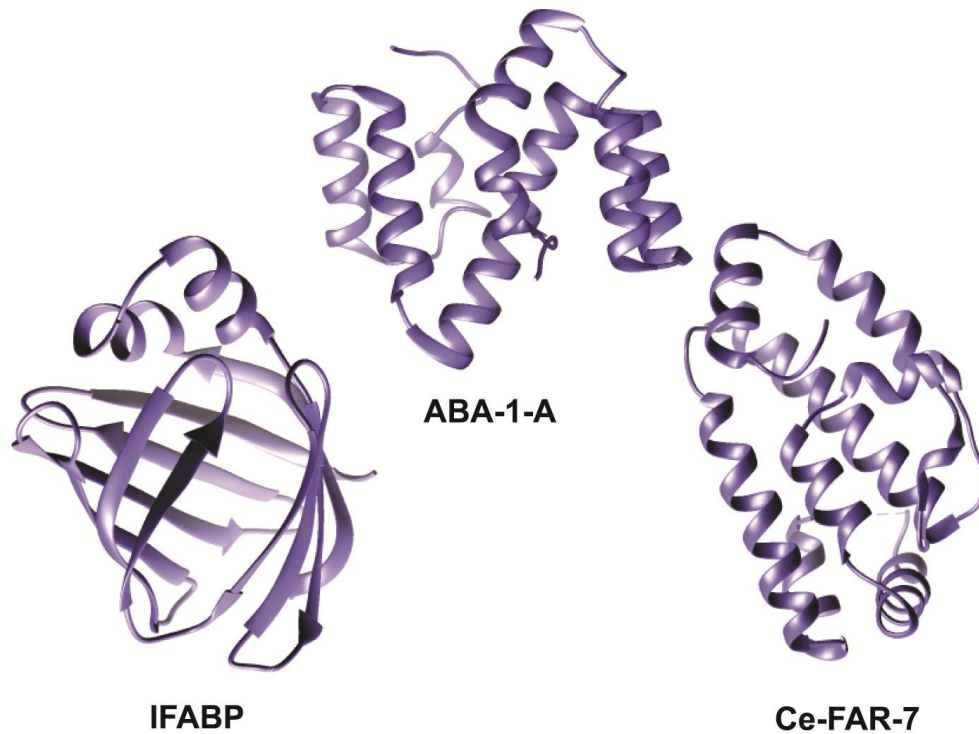


Figura 9.3. Esquemas de cintas de distintas proteínas solubles que unen lípidos: IFABP (PDB: 1KZW); ABA-1-A (PDB: 2XV9) y Ce-FAR-7 (PDB: 2W9Y)

Existen otras proteínas pequeñas de unión a lípidos exclusivas de nematodos que se conocen como FAR (del inglés *Fatty Acid and Retinol binding proteins*) y NPA (del inglés *Nematode Polyprotein Antigens/Allergens*). Aparte de ser exclusivas de nematodos, las proteínas pertenecientes a estos dos grupos tienen en común la característica de ser secretadas al medio por los organismos que las producen, y de estar compuestas en su mayor parte por estructuras α -helicoidales. En la Figura 9.3 se muestran las estructuras de dos proteínas miembros de estas familias, la proteína ABA-1-A perteneciente a la familia de las NPA y la proteína Ce-FAR-7, una proteína de la familia de las FAR. Asimismo, se ha demostrado que ambos grupos son capaces de unir tanto ácidos grasos como retinol *in vitro*. Las NPA tienen a su vez la

característica de ser sintetizadas como poliproteínas, es decir como un polipéptido de 10-11 subunidades en tándem que son cortadas post-traduccionalmente para dar origen a las proteínas funcionales. En algunos organismos todas las subunidades sintetizadas en el tándem son iguales, mientras que en otros difieren unas de otras. La función de estas proteínas es aún desconocida, aunque se propone su participación en la adquisición de nutrientes y el control de la respuesta inmune del hospedador para el caso de las NPA producidas por parásitos (Kennedy, 2011)

Finalmente, existe también un grupo de proteínas que es exclusivo de cestodos, las HLBP (del inglés *Hydrophobic Ligand Binding Proteins*) (Alvite, 2012). Cabe destacar que, a diferencia de las demás proteínas que se han mencionado previamente, las HLBP están compuestas por subunidades proteicas de 7-11 kDa que forman oligómeros de mayor peso molecular y son capaces de unir una gran diversidad de clases lipídicas, incluyendo lípidos polares y lípidos neutros. Por este motivo son consideradas lipoproteínas y en base a su composición y proporción lipídica, se ha propuesto que en algunos casos podría tratarse de lipoproteínas con estructura similar a las lipoproteínas plasmáticas de mamíferos (Obal, 2012).

9.1. Lípidos en la Estabilización y Regulación de Proteínas

Las últimas décadas han traído un cambio de paradigma respecto a los modelos de estructura de las membranas biológicas. El modelo del mosaico fluido va dando paso lentamente a un modelo más complejo, donde los lípidos y las proteínas no están distribuidos homogéneamente, sino que pueden estar organizados en microdominios que difieren unos de otros en su composición lipídica y proteica. Este hecho ha puesto de relevancia la importancia de los lípidos en la estabilización y regulación de ciertas proteínas. Tal es así, que existen en la actualidad grupos de investigación en todo el mundo estudiando estas relaciones. Como frutos de dichos estudios han surgido varios modelos que intentan explicar la formación de dominios en las membranas biológicas.

Dichos modelos difieren en las fuerzas que dirigen la formación y el reclutamiento de los componentes de membrana necesarios para formar los microdominios. Uno de los modelos propone que los dominios pueden formarse por interacciones proteína-proteína específicas. Otro modelo pone de manifiesto la importancia de las interacciones lípido-lípido, las cuales iniciarían la formación de subdominios de composiciones lipídicas definidas, que atraerían posteriormente a las proteínas de membrana mediante interacciones proteína-lípido específicas. Los complejos lípido-proteína resultantes luego se unirían para formar complejos mayores.

Las interacciones de las proteínas de membrana con los lípidos pueden clasificarse en distintos grupos de acuerdo al tiempo de residencia relativo de un determinado lípido en la interfase proteína-lípido. Los lípidos considerados "*bulk lipids*", es decir, que forman parte del seno de la membrana biológica, son aquellos que presentan una baja interacción con los dominios transmembrana de las proteínas. El tiempo de residencia de un lípido junto a la superficie de la proteína puede verse modificada por interacción de aminoácidos específicos de la proteína con la cabeza polar del lípido, por interacciones hidrofóbicas con las cadenas hidrocarbonadas del lípido, o por ambas. Este tipo de interacciones puede hacer que un lípido pase del seno de la membrana a formar parte de una estructura tipo anillo (o cáscara) alrededor de la proteína de membrana. Claramente, esto involucra un aumento en los tiempos de residencia de dichos lípidos alrededor del segmento transmembrana en cuestión. Los lípidos que tienen una tasa de recambio aún menor (esto es, tiempos de residencia mayores) se denominan lípidos no-anulares. Con frecuencia residen dentro de grandes complejos de proteínas de membrana o dentro de proteínas que poseen varios dominios transmembrana. Contribuyen no sólo a estabilizar las estructuras proteicas, sino que también pueden funcionar como moduladores alostéricos de las mismas o influir incluso en su localización intracelular.

Existen varios factores que influyen sobre la interacción de las proteínas de membrana con los lípidos. Entre ellos se encuentran el espesor hidrofóbico de la bicapa lipídica, la presión lateral que ejerce la membrana, la distribución de cargas en la interfase lípido-proteína y la presencia de algunos aminoácidos

estratégicamente ubicados dentro de la proteína. El espesor hidrofóbico es la distancia entre las cabezas polares de los lípidos que componen ambas caras de la membrana. Esta propiedad está determinada principalmente por la composición lipídica de la bicapa. El perfil de presiones laterales de membrana es un factor importante que influencia la estructura, y función, de las proteínas de membrana. La misma es mayor en la interfase entre regiones hidrofóbicas e hidrofílicas. Estas presiones estarían influenciadas por el grado de orden de los lípidos que rodean a la proteína de membrana en estudio, así como por el grado de *mismatch* hidrofóbico en la interfase lípido-proteína. Se conoce como *mismatch* hidrofóbico a cualquier desviación de la compatibilidad hidrofóbica ideal que exista entre un dominio transmembrana y los lípidos que lo rodean.

La disponibilidad creciente de estructuras de proteínas de membrana resueltas por cristalografía de rayos X ha permitido profundizar los conocimientos sobre las interacciones entre los lípidos y las proteínas. En la mayoría de las estructuras publicadas, las interacciones lípido-proteína están estabilizadas principalmente por interacciones polares entre aminoácidos específicos y las cabezas de los lípidos. Los aminoácidos aromáticos también suelen estar involucrados en la estabilización de la unión con lípidos. Los residuos de tirosina que están presentes en la interfase interactúan con los grupos fosfatos de los lípidos (por interacción iónica o puente hidrógeno), a veces en combinación con aminoácidos cargados positivamente. Del mismo modo, los residuos de triptófano suelen ubicarse en la región interfásica, con su grupo indol apuntando al centro de la bicapa lipídica. Puede observarse puentes de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno del grupo indol y el grupo fosfato de los fosfolípidos. Por otro lado, interacciones no polares entre las cadenas hidrofóbicas de los lípidos y los dominios transmembrana de las proteínas estabilizan la unión proteína-lípido.

Tal como se ha mencionado previamente, se ha propuesto que las interacciones lípido-proteína serían críticas para la inserción, plegamiento y función de las proteínas de membrana. Tal es así que hay quienes proponen que se llame lipochaperonas a los lípidos que intervienen en este tipo de interacciones. Más allá de las confusiones que podrían surgir con el uso de

dicho término (denominaciones similares se han empleado para referirse a las proteínas transportadoras de lípidos), cabe destacar que algunos estudios han demostrado que la situación planteada no estaría lejos de la realidad. Por ejemplo, se ha visto que la fosfatidiletanolamina es fundamental para la función del transportador de lactosa LacY (lactosa permeasa) de *Escherichia coli*. En ausencia de dicho fosfolípido, la proteína puede incorporarse en la membrana, pero no es funcional. La disminución de la actividad de transporte en ausencia de fosfatidiletanolamina se debe a que en esas condiciones algunos dominios transmembrana se encuentran invertidos. Se ha observado que la adición de fosfatidiletanolamina luego de la inserción de la proteína en la membrana es capaz de restaurar la actividad transportadora de la lactosa permeasa (Contreras, 2011)

9.2. Estrategias para el Estudio de las Interacciones Lípido-Proteína

En esta sección describiremos diversas estrategias experimentales para el análisis de la interacción lípido-proteína. Como comentamos en las secciones anteriores este tipo de interacciones pueden ser muy variadas, dependiendo si se trata de proteínas integrales o periféricas de membrana, si son parte de una lipoproteína o si son proteínas solubles de unión a lípidos. Para analizar las interacciones lípido-proteína, en el caso de las proteínas de membrana primeramente realizaremos una breve revisión de los métodos para su obtención, ya que se aplican métodos más drásticos respecto a los métodos tradicionales de purificación de proteínas.

Estrategias para el estudio de proteínas de membrana.

A. Purificación de proteínas de membrana

El procedimiento a aplicar al momento de purificar una proteína de membrana va a depender, inicialmente, del tipo de proteína de membrana de la cual se

trate: periférica o integral. Esta determinación es empírica, salvo que se posea cierta información de antemano. Es decir, si una vez que la muestra es tratada con la finalidad de solubilizar las proteínas periféricas de membrana, la actividad biológica de interés se conserva en la fracción sedimentable, entonces se considera que la proteína es integral. Teniendo en cuenta las características previamente comentadas de ambos tipos de proteínas, es claro que el procedimiento a seguir para solubilizar y purificar cada una de ellas será diferente.

Las proteínas periféricas pueden solubilizarse empleando métodos suaves, de los mismos utilizados para romper interacciones proteína-proteína (recordar que muchas de ellas se mantienen unidas a las membranas por interacción con proteínas integrales). Una vez que están solubilizadas, puede trabajarse con ellas como si se tratara de proteínas solubles. Algunos métodos utilizados para separar a las proteínas periféricas de las membranas incluyen la extracción salina con agentes caotrópicos, la ultrasonicación, extracción alcalina, etc.

Los tratamientos con alta concentración salina permiten disminuir las interacciones electrostáticas que pueden mantener unidas a las proteínas con ciertos lípidos cargados. Por otro lado, el empleo de ciertos iones caotrópicos como I^- , ClO_4^- y SCN^- ayudan a desorganizar la estructura del agua y, de ese modo, debilitar las interacciones hidrofóbicas que en muchos casos mantienen unidas a las proteínas en los entornos cercanos a las membranas. Cuando estas sales son utilizadas en concentraciones muy altas pueden llegar a desnaturalizar a las proteínas, pero a concentraciones más bajas permiten su solubilización selectiva.

La variación del pH es otra manera de solubilizar proteínas que están unidas a membrana. La titulación de grupos cargados en la membrana puede inducir la disociación de las proteínas que se encuentran interactuando con ellos. Cabe destacar que a pH demasiado alto, si bien se obtiene un alto grado de solubilización, es más probable que ocurra desnaturalización y pérdida de actividad de las proteínas.

Teniendo en cuenta el análisis que se hizo previamente sobre las proteínas de membrana, resulta claro que para poder obtener una proteína integral de

membrana en estado monomérico, es necesario utilizar medios más drásticos, capaces de romper la bicapa lipídica. Por otro lado, para evitar que las proteínas extraídas formen agregados insolubles, es necesario brindarles un entorno hidrofóbico adecuado que haga que su estructura se mantenga termodinámicamente estable. La ruptura de la bicapa lipídica puede lograrse con solventes orgánicos o detergentes, siendo esta última alternativa la más usada.

La extracción con n-butanol utiliza un sistema bifásico donde se aprovecha la baja solubilidad de ese alcohol en agua y su preferencia por entornos lipídicos, que hacen que las proteínas sufran una desnaturalización mínima. De este modo, se solubilizan las proteínas de membrana en *buffers* acuosos diluidos. No obstante, como se mencionó anteriormente, lo más utilizado para solubilizar proteínas de membrana son los detergentes. Los detergentes son moléculas anfipáticas, cargadas o no, capaces de formar micelas (ver capítulo 8). La solubilización de las proteínas se produce, por lo tanto, por la interacción de una parte de la molécula de detergente con las zonas hidrofóbicas de las proteínas, mientras que la otra parte interacciona con el agua. El detergente ideal es aquel que solubiliza adecuadamente a las proteínas sin llegar a desnaturalizarlas. Esa determinación es netamente empírica y depende tanto de las propiedades de las proteínas como de las metodologías que haya que aplicarles subsecuentemente. Generalmente, es necesario probar diversos detergentes, en diferentes concentraciones, durante tiempos de incubación variados, y a distintas temperaturas y concentraciones salinas para poder elegir el compuesto que brinde una solubilización adecuada de nuestra proteína de interés. Al momento de analizar los detergentes es importante prestar atención a la concentración micelar crítica (CMC), que es una característica propia de cada molécula. Esto se debe a que las micelas son las estructuras que permiten la solubilización de las proteínas. Los detergentes cumplen, de este modo, dos funciones: por un lado inhiben las interacciones hidrofóbicas intra- o inter-proteínas, y por otro lado previenen la pérdida de proteínas integrales de membrana por agregación o adsorción. Idealmente, cada proteína (o complejo proteico) debería localizarse en micelas independientes, de modo que se

comportaría como una entidad aislada, susceptible de ser estudiada usando las mismas metodologías que se emplean para proteínas solubles, pero en presencia de concentraciones adecuadas del detergente correspondiente. Cabe destacar, sin embargo, que algunas técnicas ampliamente usadas en la purificación de proteínas no son compatibles con los detergentes. Por ejemplo, el *salting out* con sulfato de amonio hace que el detergente Triton X-100 se separe y forme una capa flotante. Otra característica de los detergentes a tener en cuenta es el peso molecular de las micelas que forma. Este valor puede determinarse experimentalmente y es muy dependiente de la composición del *buffer* con el cual se trabaja. Es importante tener en cuenta que, por ejemplo, un detergente que forme micelas de alto peso molecular será más difícil de remover por diálisis (Smith, 2011).

B. Reconstitución de proteínas de membrana en proteoliposomas.

Ya se ha mencionado la relevancia que tienen las proteínas transmembrana en diversos procesos biológicos, y la importancia de contar con metodología adecuada que permita el estudio de las mismas. Una de las herramientas más útiles para analizar la función de este grupo de proteínas es la reconstitución de las mismas en proteoliposomas. De este modo, es posible tener proteínas purificadas, inmersas en vesículas lipídicas de composición definida, que permiten el análisis de propiedades catalíticas o de transporte de la proteína en estudio sin interferencias de otros componentes de membrana. El principal inconveniente que ha existido respecto al empleo de proteoliposomas radica en la dificultad que hubo de estandarizar una metodología que diera como resultado proteoliposomas reproducibles y de alta calidad.

En lo que respecta a los métodos utilizados para incorporar proteínas de membrana en liposomas, se pueden enumerar cuatro como los principales: métodos mecánicos, congelamiento-descongelamiento, uso de solventes orgánicos y uso de detergentes. A pesar de que las técnicas mencionadas han demostrado ser muy útiles al momento de producir vesículas de fosfolípidos

puros, ciertas complicaciones han surgido al momento de incorporar proteínas a dichas vesículas. Cabe destacar que para el caso de los proteoliposomas se deben tener en cuenta ciertos factores adicionales como la homogeneidad de la inserción de las proteínas en las vesículas, la correcta orientación de las proteínas, la morfología y el tamaño de los proteoliposomas, y su permeabilidad residual.

La aplicación de los métodos mecánicos de reconstitución de proteoliposomas se ha visto desalentada en muchos casos por complicaciones difíciles de evitar. Para el caso de la sonicación por ejemplo, el aumento local de temperatura en la punta del sonicador puede conducir a desnaturalización y degradación de las proteínas. Por otro lado, el pequeño tamaño de los proteoliposomas resultantes (10-20 nm) limita el volumen interno de los mismos, lo cual limita a su vez la cantidad de solutos que pueden acumularse en su interior. Dicha característica es importante si se quieren estudiar proteínas transportadoras.

La aplicación de las técnicas de preparación de liposomas que emplean solventes orgánicos se ha visto limitado a la reconstitución de sólo algunas proteínas de membrana como rodopsinas y bacteriorrodopsina capaces de resistir la desnaturalización que los solventes orgánicos provocan a la mayoría de las otras proteínas anfifílicas de membrana (Darszon, 1979; Rigaud, 1983).

Muchos de los métodos de preparación de liposomas no han podido aplicarse con facilidad a la preparación de proteoliposomas debido a que la mayoría de las proteínas de membrana se purifican mediante el uso de detergentes que interfieren en el proceso de la formación de vesículas. Es por esto que la mayoría de las técnicas exitosas de reconstitución de proteínas de membrana en proteoliposomas se han desarrollado incluyendo el uso de detergentes.

El procedimiento estándar (ver esquema en Figura 9.4) de reconstitución involucra la comicelización de la proteína de membrana purificada con un exceso de fosfolípidos y un detergente adecuado. El detergente debe ser luego removido para dar como resultado la formación de bicapas cerradas en las que se insertan las proteínas. La diferencia entre los distintos procedimientos de reconstitución mediados por detergentes radica únicamente en las técnicas utilizadas para remover el detergente de la solución.

Dentro de las técnicas aplicadas para remover los detergentes, la diálisis es la que ha sido más ampliamente usada. El método más simple consiste en colocar la solución de micelas de lípido-proteína-detergente en una bolsa de diálisis de corte 14 kDa y dializarlo contra un volumen grande de *buffer* sin detergente. En estos experimentos, sólo los monómeros de detergente atraviesan la membrana de diálisis. Debe tenerse en cuenta que los detergentes con mayor CMC se remueven más fácilmente por diálisis que los que tienen menor CMC (1 a 2 días contra 1 a 2 semanas). Las ventajas obvias de la diálisis como método para remover el detergente radican en su simplicidad y bajo costo. Sin embargo, este método también posee ciertas desventajas, tales como: baja reproducibilidad, imposibilidad de controlar el grado de diálisis, posible retención de moléculas en la membrana de diálisis, y la duración del experimento, que en algunos casos puede extenderse demasiado tiempo, incluso más de lo que algunas proteínas pueden resistir.

Una alternativa para evitar largos tiempos de contacto entre las proteínas y los detergentes durante los procesos de reconstitución consiste en emplear columnas cromatográficas de exclusión molecular. Esta técnica aprovecha la diferente accesibilidad a los poros del gel que tienen las micelas mixtas respecto a los liposomas puros. A medida que la mezcla es eluida a través de la columna, la dilución resultante de la difusión molecular y del acceso diferencial de los agregados más pequeños a los poros del gel da como resultado la formación de vesículas. La principal ventaja de esta técnica es su rapidez, lo que posibilita reducir el tiempo de contacto de la proteína con el detergente. Esta ventaja, sin embargo, puede ser a la vez la principal desventaja, ya que puede dar como resultado una incorporación incompleta o no homogénea de las proteínas en los liposomas. Por lo tanto, si bien la filtración por geles es una técnica muy usada para la preparación de liposomas, la misma actualmente no es tan utilizada para la reconstitución de proteínas de membranas mediada por detergentes.

Una tercera estrategia para remover el detergente de las micelas mixtas de detergente-lípido-proteína consiste en diluir la muestra con *buffer* libre de detergente. Al diluir la concentración de detergente en la muestra por debajo de

su CMC, el mismo se retira espontáneamente de las micelas, lo que da lugar a la formación de proteoliposomas. Las principales ventajas de la técnica radican en su obvia sencillez, que implica la necesidad de tiempos muy cortos para disminuir la concentración de detergente, y la posibilidad de regular la tasa de dilución mediante adiciones sucesivas de *buffer* empleando bombas adecuadas. Por otro lado, la técnica también presenta desventajas tales como la imposibilidad de remover el detergente por completo (lo cual equivaldría a una dilución infinita), la necesidad de trabajar con detergentes que tengan una CMC alta, y la necesidad de algún paso extra para concentrar los liposomas una vez que se separan del detergente.

Los detergentes que no pueden removerse fácilmente por las técnicas antes mencionadas (por ejemplo, los detergentes con CMC muy baja) pueden ser removidos mediante adsorción hidrofóbica sobre resinas de poliestireno. Las resinas de poliestireno pueden ser utilizadas con buenos resultados en ensayos en *batch* (es decir, agregando directamente las bolitas de poliestireno a la mezcla de proteínas-lípidos-detergentes). Estas resinas han permitido el empleo de detergentes tales como el Triton X-100 para la reconstitución de proteínas en proteoliposomas. Si bien este detergente es adecuado para extraer proteínas de membrana, su baja CMC lo hacía difícil de remover por las técnicas antes mencionadas. Otra ventaja que se plantea a favor del uso de las resinas de poliestireno es que se puede controlar el grado de remoción de detergente regulando la cantidad de resina que se utiliza en el ensayo. Finalmente, el hecho de que esta técnica pueda remover gran parte del detergente presente en soluciones micelares, permite la formación de proteoliposomas con permeabilidad iónica baja; una característica muy buscada al momento de estudiar proteínas de membrana con funciones de transportadores de iones.

Una vez obtenidos los proteoliposomas, los mismos deben caracterizarse. Existen ciertas variables que son muy importantes al momento de evaluar la calidad de los proteoliposomas producidos, algunas de ellas son: actividad de la proteína en estudio, grado de incorporación de las proteínas a los liposomas, orientación de las proteínas, distribución de tamaño y permeabilidad de los

liposomas. Sólo se mencionarán las técnicas empleadas para tales fines, ya que los detalles técnicos pueden ser encontrados en bibliografía más específica.

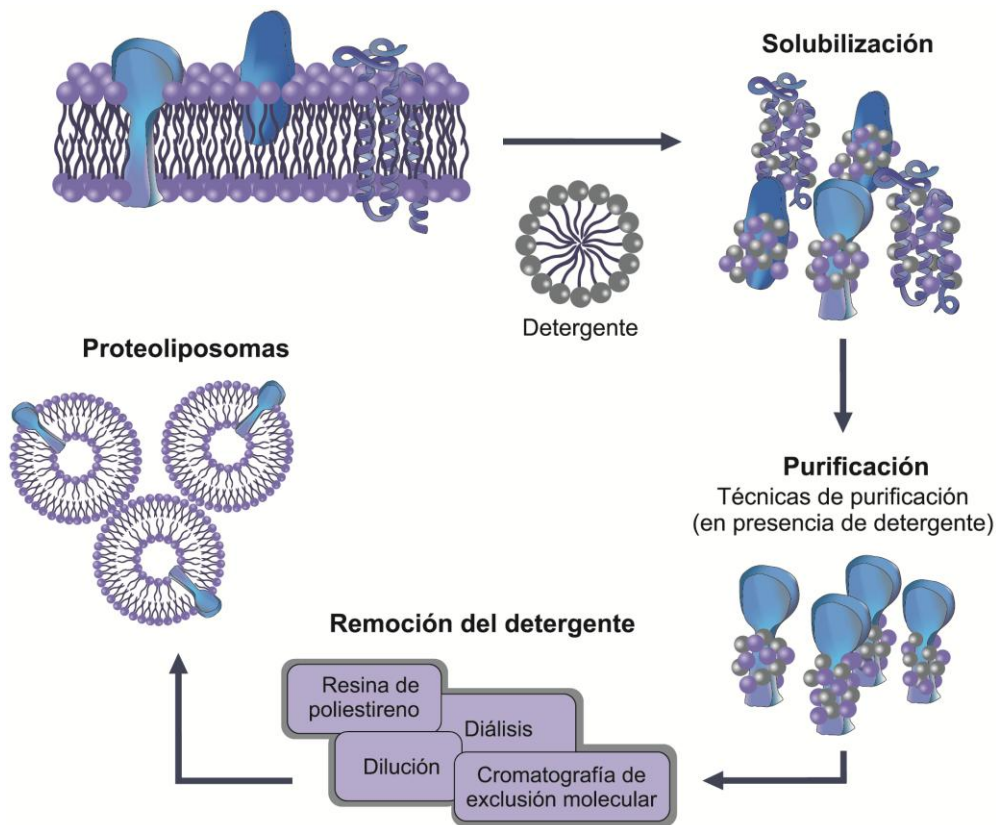


Figura 9.4. Esquema de la reconstitución de proteínas de membrana en proteoliposomas.

Respecto a la medida de actividad de la proteína, la misma dependerá de cuál sea la proteína en estudio. Si bien dicha medida puede dar cierta información sobre la correcta reconstitución de una proteína de membrana en liposomas, podría ocurrir que moléculas de proteína no incorporadas a los liposomas, o incluso agregados proteicos, presentaran actividad, por lo que debe evaluarse la incorporación de las proteínas a los liposomas. Para tal fin, pueden emplearse centrifugaciones en gradientes de densidad, de modo de separar las proteínas no incorporadas de los proteoliposomas bien constituidos. En cuanto a la correcta orientación de las proteínas en los liposomas, una técnica de gran ayuda consiste en emplear SDS-PAGE de muestras antes y después de digestiones enzimáticas con proteasas específicas. El análisis de los patrones de digestión y la cuantificación de los mismos por densitometría permiten

dilucidar la cantidad relativa de proteína que se encuentra bien orientada. Para analizar la distribución de tamaños de los proteoliposomas pueden emplearse técnicas tales como *light-scattering* o cromatografías de permeación por geles, que ya están bien establecidas para el estudio de las distribuciones de tamaños tanto de liposomas puros como de agregados proteicos. La microscopía electrónica puede ser también una técnica útil para estos fines. Finalmente, para analizar la permeabilidad de las membranas, hoy en día se cuenta con técnicas que emplean sondas fluorescentes que han demostrado ser muy útiles para este tipo de aplicaciones (Rigaud, 2003).

Estrategias para el estudio de interacción proteína-ligando

En esta sección describiremos algunas aproximaciones experimentales que pueden utilizarse para abordar el estudio de la interacción entre las proteínas de unión a lípidos y sus ligandos. La aplicación de las distintas técnicas dependerá de la proteína y del tipo de ligando que constituya nuestro sistema de estudio, así como también del tipo de información que estemos interesados en obtener. Aplicando diferentes estrategias, se puede conocer desde la preferencia de una proteína por distintos ligandos hasta la constante de afinidad que ésta tiene por ellos. Para obtener este tipo de información se puede mirar el sistema tanto desde la proteína de interés como desde el ligando. A continuación describiremos en más detalle algunas técnicas que pueden emplearse para seguir el proceso de unión al ligando observando el sistema desde ambos puntos de vista.

A. Unión proteína-ligando monitoreando cambios en la proteína

La interacción proteína-ligando se puede seguir observando los cambios que ocurren en la proteína tras la unión al lípido. Estos cambios en la proteína se pueden observar utilizando distintas técnicas, algunas de ellas

espectroscópicas y otras bioquímicas. Dentro de las técnicas espectroscópicas, la fluorescencia es una de las más utilizadas (ver capítulo 2), pero su aplicación dependerá de la proteína que estemos analizando. Si la proteína tiene uno o más triptófanos puede ser muy útil, dado que la emisión de los triptófanos es muy sensible al entorno local, mostrando un corrimiento espectral importante en distintos entornos. El máximo de emisión del triptófano es reflejo de su grado de exposición al solvente, en este sentido cuando está en un entorno más apolar, por ejemplo al estar formando parte de un bolsillo hidrofóbico en una proteína su máximo de emisión puede correrse de 350 nm (triptófano en agua) a 335-340 nm. Asimismo si este triptófano se encuentra cercano al sitio de unión de la proteína a un ligando hidrofóbico también pueden observarse cambios en el espectro de emisión de fluorescencia a medida que ésta se une al ligando. Estos cambios son útiles para hacer una titulación de la proteína con concentraciones crecientes del ligando para obtener la constante de afinidad que describe el proceso de unión (Franchini, 2009; De Gerónimo, 2010). En este sentido, es conveniente excitar selectivamente a los triptófanos utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm. Por el contrario, si la proteína no posee triptófanos o si éstos no son sensibles a la unión del ligando también puede utilizarse la emisión de las tirosinas o de las fenilalaninas, dado que estos aminoácidos también contribuyen a la emisión intrínseca de las proteínas. En este caso, se deberá utilizar una longitud de onda de excitación de 280 nm en lugar de 295 nm. Si a través de la medida de la fluorescencia intrínseca no es posible monitorear la unión al ligando, también puede recurrirse a la marcación de la proteína con fluoróforos que sean sensibles al entorno, pero debe considerarse que esto puede afectar la estructura de la proteína y por consiguiente su capacidad de unión al ligando. Sin recurrir a este tipo de modificaciones, también pueden emplearse otras técnicas espectroscópicas que nos permitan analizar la unión. Una de ellas es el dicroísmo circular (ver capítulo 4), principalmente lo que se conoce como medida en el ultravioleta cercano (250 a 350 nm). En esta región los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales del triptófano, la tirosina y la fenilalanina. La asimetría en estos grupos

químicos se debe exclusivamente a su entorno y cómo los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la proteína, por lo que los espectros en esta región son un reflejo de su conformación global. Asimismo las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación. Cuando una proteína se une a su ligando por lo general sufre cambios en dicha conformación, por lo que es posible monitorear la unión del ligando empleando esta técnica e incluso obtener constantes de afinidad a través de este método (Arighi, 2003; Franchini, 2009). La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) es otro método espectroscópico que también puede emplearse para analizar la interacción proteína-ligando (ver capítulo 7). Esta técnica resulta muy sensible, ya que permite analizar en detalle que residuos particularmente participan de la interacción e incluso permite determinar de forma eficiente la estequiometría de la unión. Esto se logra monitoreando los corrimientos químicos de los distintos residuos en ausencia y presencia del ligando (Meenan, 2011). Para ello es necesario marcar la proteína con isótopos activos en RMN (^{15}N o ^{13}C), por lo cual generalmente se puede aplicar a proteínas que puedan ser obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética. Como comentamos anteriormente, además de las técnicas espectroscópicas pueden aplicarse otras técnicas bioquímicas que evidencien la unión del ligando a la proteína siguiendo los cambios que sufre la proteína tras la unión. Uno de estos métodos es la proteólisis parcial, es decir la utilización de proteasas que cortan a la proteína en aminoácidos específicos. Este método permite obtener información acerca de la localización del sitio de unión o de los cambios conformacionales que puede sufrir la proteína tras unirse al lípido, dado que revela la exposición diferencial de los sitios proteolíticos en ausencia o presencia del ligando (Arighi, 2003; Pórfido, 2012). Otro método bioquímico para evidenciar la unión de la proteína al ligando consiste en la utilización de agentes caotrópicos, como por ejemplo el cloruro de guanidinio. Empleando este método se puede determinar si los ligandos son capaces de estabilizar a la proteína, ya que si esto ocurre se requerirá una mayor concentración de cloruro de guanidinio para pasar del estado plegado al desplegado, es decir para que ocurra la desnaturalización de la proteína (Franchini, 2009).

B. Unión proteína-ligando monitoreando cambios en el ligando

Como ya comentamos anteriormente, otra forma de abordar el análisis de la interacción proteína-ligando es mirar el sistema siguiendo los cambios que ocurren en el ligando. Del mismo modo que en el caso anterior, se pueden usar técnicas espectroscópicas o técnicas bioquímicas para monitorear el proceso de unión. De las técnicas espectroscópicas la más comúnmente utilizada es la fluorescencia. Cabe mencionar que la mayoría de los lípidos no son naturalmente fluorescentes, salvo algunas excepciones como el ácido *cis* o *trans*-parinámico, el ácido retinoico, y algunos otros. Por este motivo, la mayoría de estos ligandos hidrofóbicos deben ser modificados químicamente para que se puedan analizar empleando fluorescencia. En este sentido, hay actualmente disponibles una amplia variedad de lípidos modificados con distintos fluoróforos. Tal es el caso de ácidos grasos y sus derivados más complejos modificados con grupos dansilo, pireno, antroilo, NBD (*4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol*) y BODIPY, por mencionar algunos de los fluoróforos más usados (Haughland, 2005). Estos lípidos marcados se pueden utilizar para obtener constantes de afinidad, ya sea mediante titulación directa, es decir agregando concentraciones crecientes de lípido fluorescente a una concentración fija de proteína; o de forma inversa, es decir manteniendo una concentración fija de ligando e incrementando la concentración de la proteína de interés. Cabe destacar que para poder seguir la unión por este método es importante que la sonda modifique su espectro de emisión luego de unirse a la proteína. La mayoría de estas sondas presentan una intensidad de emisión baja en solventes acuosos y cuando se unen a la proteína aumentan su emisión debido al entorno hidrofóbico que ésta le brinda. El grado de aumento en la intensidad variará de acuerdo al sistema en estudio y por lo general puede acompañarse de un corrimiento en el máximo de longitud de onda de emisión. En la mayoría de las sondas este corrimiento se da hacia longitudes de onda menores, lo que se conoce como corrimiento hacia el azul o *blue shift*. Este corrimiento es indicativo de que el ligando está en un entorno más hidrofóbico al unirse a la proteína. Sin embargo, no debemos perder de vista que tanto el aumento de la

intensidad como el corrimiento hacia el azul dependerán del sistema en estudio y siempre deberemos verificar el comportamiento del fluoróforo al unirse a la proteína antes de realizar la titulación propiamente dicha. Puede ocurrir que tras la unión la intensidad del fluoróforo baje en lugar de aumentar, esto no necesariamente indica que no hay unión de la proteína al ligando. Por ejemplo, utilizando antroiloxi-derivados se ha podido observar que dependiendo del tipo de ácido graso que se trate y la posición donde se encuentre la molécula de antroilo la intensidad de fluorescencia puede aumentar o disminuir al unirse a una misma proteína. Tal es el caso de una proteína de la familia de las FABPs (ver introducción en este mismo capítulo) con las sondas 12AS (*12-(9-anthroyloxy) stearic acid*) y 16AP (*16-(9-anthroyloxy) palmitic acid*) (Pórfido, 2012). A través de estos métodos podemos describir la unión de una proteína a un determinado ligando hidrofóbico modificado químicamente con un fluoróforo. Esta información puede ser útil como aproximación experimental para describir la unión de la proteína a sus ligandos, sin embargo, muchas veces nos interesa determinar a que ligandos naturales se une esta proteína y cuáles son sus afinidades por ellos. Para abordar este análisis también podemos valernos de los derivados fluorescentes de los lípidos, pero realizando ensayos de desplazamiento. Esto es, incubar la proteína con un exceso del análogo fluorescente y luego agregar concentraciones crecientes del ligando natural a evaluar y monitorear los cambios en la emisión de la sonda fluorescente. Para este análisis podemos valernos de distintas sondas fluorescentes como los que ya describimos: ácido *cis* o *trans*-parinárico, antroiloxi-derivados, NBD-derivados, dansil-derivados (siendo el *11-(dansylamino)undecanoic acid* o DAUDA y el *dansyl-D,L-alpha-amino-octanoic acid* o DACA los más comunes) o BODIPY-derivados. Otro conjunto de sondas ampliamente utilizadas para estos ensayos son los derivados del 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (1,8-ANS; 2,6-ANS; bis-ANS), ya que tienen la característica de ser sondas muy poco fluorescentes en solvente acuoso y aumentar notoriamente su emisión de fluorescencia al unirse a una proteína (Haughland, 2005). Una vez unido, es posible desplazarlo con distintos ligandos y así determinar cuáles de éstos poseen una afinidad mayor que el ANS por el sitio de unión, e incluso

determinar y comparar las distintas constantes de afinidad de diferentes ligandos mediante este método (Arighi, 2003; Franchini, 2009). Por otro lado, una de las técnicas bioquímicas que se pueden emplear para monitorear la unión de la proteína al ligando siguiendo el ligando es mediante el uso de resinas hidrofóbicas que permiten separar el lípido unido a la proteína de la fracción no unida. Una de las resinas hidrofóbicas más utilizadas es la Lipidex1000. Esta resina se emplea habitualmente como paso para remover los ligandos de diversas proteínas de unión a lípidos y de este modo obtenerlas de forma libre de éstos ligandos. Sin embargo, se ha determinado que si en lugar de utilizarla a 37°C como se hace normalmente para este fin, se la usa a 0 °C, es posible lograr separar el ligando unido del ligando no unido (Glatz, 1983). De este modo y empleando ligandos marcados radiactivamente (con ¹⁴C, por ejemplo) se puede obtener una medida de la fracción de ligando que permanece unida a la proteína versus el ligando total y determinar así la constante de afinidad que describe el proceso de unión (Glatz, 1983; Lagakos, 2013).

Estrategias para el estudio de interacción proteína-membrana

En este apartado analizaremos técnicas empleadas para el estudio de la interacción proteína-membrana. Todas las técnicas que se abordarán incluyen el empleo de los diferentes tipos de liposomas que se han descrito en el capítulo 8. Variando la composición lipídica de los liposomas y/o la composición de los *buffers* en los cuáles se los prepara, es posible desarrollar una serie de técnicas muy variadas para estudiar la interacción de proteínas con membranas. Algunas de estas técnicas brindan información sobre contacto físico, en el estado estacionario, entre las proteínas y las membranas; mientras que otras nos permiten hacer estudios cinéticos de transferencia de ligandos entre las proteínas y las membranas. A continuación analizaremos algunas de dichas técnicas.

A. Ensayo de unión a liposomas cargados con sacarosa

Los liposomas que se utilizan para esta técnica se preparan en un *buffer* que contiene sacarosa. De este modo, dicho *buffer* queda encerrado en el espacio acuoso del interior de los liposomas, otorgándole a éstos mayor densidad cuando el *buffer* del exterior de los liposomas es cambiado por uno sin sacarosa. Para realizar dicho cambio, se puede agregar un *buffer* isosmótico respecto al que se encuentra dentro de las vesículas, pero sin sacarosa, seguido de ultracentrifugación. De este modo, se pueden sedimentar los liposomas, separarlos del sobrenadante, y volver a resuspenderlos en el *buffer* isosmótico adecuado. Otra técnica que se puede aplicar para hacer el cambio de *buffer* es la cromatografía de exclusión molecular. Una vez preparados los liposomas, se los incuban junto a la proteína en estudio en un *buffer* adecuado, y se procede a centrifugar las muestras a alta velocidad ($\sim 100000 \times g$). Inmediatamente, se separan los sobrenadantes y se los transfieren a tubos nuevos. La presencia de LUVs debe evaluarse tanto en los sobrenadantes como en los sedimentos. Para tal fin, puede incluirse, por ejemplo, algún fosfolípido marcado radiactivamente en la preparación de los liposomas. Por otro lado, debe analizarse también la presencia de la proteína en estudio en ambos grupos de muestras. Esto se puede hacer, por ejemplo, por SDS-PAGE seguido de densitometría. Si el ensayo se realiza para diferentes concentraciones de vesículas, pueden calcularse constantes de disociación (K_D). Lo mismo puede realizarse para diferentes composiciones de vesículas, diferentes concentraciones salinas, temperaturas, etc.; lo cual puede brindar información importante sobre los parámetros que influyen sobre la interacción de las proteínas con membranas fosfolipídicas (Falomir-Lockhart, 2011; y referencias allí incluidas).

B. Ensayo de competencia con citocromo c.

Para realizar este ensayo se aprovecha la capacidad del citocromo c de unirse a vesículas cargadas negativamente. Dicha unión puede evidenciarse haciendo

uso de SUVs (ver capítulo 8) marcadas con dansilfosfatidiletanolamina (de sus siglas en inglés: *DPE*), ya que el grupo hemo del citocromo c es un *quencher* de la fluorescencia del grupo dansilo de la DPE (ver capítulo 2). Dado que se emplean vesículas con cardiolipina, se debe incluir EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en los *buffers* para mantener estables los liposomas. Este ensayo se lleva a cabo incubando las vesículas con concentraciones crecientes de la proteína de interés. Luego se registra la fluorescencia del DPE, y se agrega una cantidad previamente determinada de citocromo c (aquella que produce el máximo *Quenching* de la fluorescencia del DPE en ausencia de otras proteínas). Una vez incubadas las vesículas con el agregado del citocromo c, se vuelve a medir la fluorescencia del DPE. Una inhibición del *Quenching* mediado por citocromo c se interpreta como evidencia de la interacción de la proteína en estudio con las membranas fosfolípídicas. Esto es, la proteína en cuestión estaría compitiendo con el citocromo c por la unión a las vesículas, lo cual se evidencia como un recobro de fluorescencia respecto a las muestras donde se incubaba el citocromo c con vesículas en ausencia de la otra proteína (Pórfido, 2012; Falomir-Lockhart, 2011; y referencias allí incluidas).

C. Ensayo de goteo de terbio

Para el ensayo de goteo de terbio se emplean SUVs cargadas con un complejo fluorescente de Tb^{+3} /DPA (ácido dipicolínico). Las mismas se preparan por sonicación de una suspensión de fosfolípidos en un *buffer* que contiene $TbCl_3$ y DPA, y luego, como en el caso de las vesículas cargadas con sacarosa, se debe cambiar el *buffer* en el cual están suspendidas las SUVs. En este caso, dicho cambio se hace por cromatografía de exclusión molecular. El *buffer* debe ser isosmótico respecto al que está encapsulado en las vesículas, para evitar la ruptura de las mismas. A su vez, debe incluir EDTA, que actúa como quelante del Tb^{+3} . La captura del Tb^{+3} por parte del EDTA causa una disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia.

El ensayo consiste, por lo tanto, en incubar las SUVs con las proteínas en estudio y registrar la fluorescencia del complejo Tb^{+3} /DPA. La interacción de la proteína con la membrana genera una perturbación en la estructura de esta última que permite que se libere el Tb^{+3} (goteo de Tb^{+3}), lo cual hace que el mismo sea secuestrado por el EDTA. Tal como se dijo previamente, esto se traduce como una disminución en la fluorescencia emitida por el Tb^{+3} . El mismo experimento puede realizarse con otros compuestos tales como el par ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico (de sus siglas en inglés: ANTS)/bromuro de p-xilen-bis-piridinio (de sus siglas en inglés: DPX), o carboxifluoresceína. En el caso del par ANTS/DPX, el DPX resulta ser un *quencher* de la fluorescencia del ANTS. Por lo tanto, se puede encapsular el ANTS junto al DPX en las SUVs y trabajar con ellas en un *buffer* sin ninguno de los dos compuestos. De este modo, si por interacción con las proteínas se disrumen las membranas, se libera su contenido y, dado que el DPX es un *quencher* colisional, al diluirse la solución, aumenta la fluorescencia del ANTS. En el caso de la carboxifluoresceína, este compuesto fluorescente tiene la propiedad de *self-quenching*, lo que implica que cuando se encuentra en concentraciones mayores a 100 mM, su fluorescencia se ve disminuida. De este modo, si se encapsulan soluciones concentradas de este compuesto dentro de SUVs, y se elimina el mismo del *buffer* que rodea a las vesículas, se las puede usar para evaluar la interacción de proteínas con SUVs. Si la proteína disrumpe la membrana, la carboxifluoresceína se libera, se diluye en el *buffer* circundante y por ende, aumenta su fluorescencia. En cualquiera de los casos, las vesículas pueden romperse por completo con algún detergente, como Tritón X-100, para determinar el punto final de la reacción (Falomir-Lockhart, 2011; Haughland, 2005).

D. Ensayos de “crosslinking” con reactivos fotoactivables

La interacción específica proteína-membrana puede evaluarse también haciendo uso de una combinación de marcación radiactiva y *crosslinking* con

reactivos fotoactivables, los cuales requieren de la activación por luz ultravioleta para reaccionar con sus blancos. Para los estudios de interacción proteína-membrana, en particular, pueden usarse fosfolípidos que tengan en su estructura un grupo fotoactivable, y que a su vez tengan algún isótopo radiactivo (como por ejemplo ^3H), para preparar vesículas. Luego se incuban las vesículas con la proteína de interés y se fotoactivan los lípidos por irradiación con una longitud de onda adecuada. Cabe destacar que los lípidos fotoactivables también pueden usarse en células en cultivo, con la finalidad de que las mismas los metabolicen y los incorporen a lípidos de membrana antes de fotoactivar. El análisis de los datos se hace mediante SDS-PAGE seguido de autorradiografía. El mismo dependerá de la información que se quiera obtener. Si se quiere conocer, por ejemplo, qué subdominio de una proteína es el que interactúa con la membrana, una vez aislada la misma, se la puede digerir con alguna proteasa que corte en sitios específicos, para luego separar los fragmentos y analizar a cuál de ellos se halla unido el lípido marcado (Falomir-Lockhart, 2011). En el caso de trabajar con células en cultivo, la proteína de interés puede separarse por inmunoprecipitación, y mediante SDS-PAGE/autorradiografía se puede visualizar si el lípido usado interacciona o no con nuestra proteína (Thiele, 2000; Haberkant, 2008). Actualmente, existen variaciones de estas técnicas que en lugar de utilizar lípidos fotoactivables radiactivos emplean lípidos bifuncionales, es decir: lípidos que por un lado cuentan con un grupo fotoactivable, y por otro lado, poseen un grupo capaz de reaccionar de manera específica con ciertos grupos funcionales, lo cual permite marcar al lípido con, por ejemplo, biotina. De este modo, se puede detectar fácilmente al lípido fotoactivable (y a lo que haya reaccionado con él) sin tener que utilizar isótopos radiactivos. Para más detalles al respecto se puede consultar el artículo de Haberkant y van Meer (Haberkant, 2009).

E. Ensayo de transferencia de ligando hacia membranas aceptoras

Este ensayo cinético se basa en la técnica de FRET (ver capítulo 2) y ha demostrado ser útil en la caracterización de varias proteínas solubles de unión

a lípidos (Storch, 2008). Para llevarlo a cabo se requiere de algún lípido fluorescente que sea ligando de la proteína en estudio, y que a su vez actúe como donador FRET para algún fosfolípido fluorescente. Con el fosfolípido fluorescente, que actuará como aceptor FRET, se pueden preparar SUVs con diferente composición que se utilizarán para el experimento. Cabe destacar que para establecer las condiciones en las cuáles se hace el experimento, previamente se debe calcular el coeficiente de partición del ligando entre la proteína y las membranas. Brevemente, se incuba la proteína con el ligando y luego se titula fluorimétricamente la mezcla con vesículas que contienen el fosfolípido fluorescente. De este modo, si el ligando se transfiere de la proteína a las vesículas, se producirá FRET y se verá una caída en la fluorescencia del ligando. Como se puede observar, la medida del K_P (coeficiente de partición) es una medida en el equilibrio. Conocer su valor es importante para establecer las condiciones en las cuales se hará el experimento cinético de manera que haya una transferencia unidireccional desde la proteína a las membranas.

Para llevar a cabo la medida cinética de la velocidad de transferencia del ligando hacia las SUVs se hace uso de un dispositivo de mezclado rápido de tipo *stopped-flow* adosado al espectrofluorómetro. Este aparato nos permite realizar la mezcla de la proteína previamente incubada con el ligando y las vesículas de manera casi instantánea, y simultáneamente seguir la fluorescencia del ligando, la cual debe decaer en función del tiempo si el ligando es transferido a las membranas. La medida se debe hacer para distintas relaciones proteína/SUVs, para las cuáles se obtendrán distintas velocidades de transferencia. Si dicha velocidad aumenta de modo proporcional a la concentración de las vesículas, la proteína en estudio emplearía un mecanismo “colisional” para transferir sus ligandos a membrana, mientras que si la velocidad no varía con los cambios de concentración de SUVs, la proteína en cuestión emplearía un mecanismo de tipo “difusional” (Storch, 2008). Variando la composición de las SUVs (por ejemplo, incluyendo fosfolípidos con carga neta diferente) y/o del *buffer* (variando la fuerza iónica) pueden obtenerse datos adicionales sobre el mecanismo de transferencia de ligandos y la naturaleza de las interacciones que sobre él influyen.

Bibliografía

Alvite G, Esteves A. Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. *Front Physiol.* 3:363, 2012.

Arighi CN, Rossi JP, Delfino JM. Temperature-induced conformational switch in intestinal fatty acid binding protein (IFABP) revealing an alternative mode for ligand binding. *Biochemistry. Biochemistry.* 42(24):7539-51, 2003.

Contreras FX, Ernst AM, Wieland F, Brügger B. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(6). pii: a004705, 2011.

Darszon A, Vandenberg CA, Ellisman MH, Montal M. Incorporation of membrane proteins into large single bilayer vesicles. Application to rhodopsin. *J Cell Biol.* 81(2):446-52, 1979.

De Gerónimo E, Hagan RM, Wilton DC, Córscico B. Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein (LFABP) to membranes. *Biochim Biophys Acta.* 801(9):1082-9, 2010.

Falomir-Lockhart LJ, Franchini GR, Guerbi MX, Storch J, Córscico B. Interaction of enterocyte FABPs with phospholipid membranes: clues for specific physiological roles. *Biochim Biophys Acta* 1811(7–8):452–9, 2011.

Franchini GR, Curto LM, Caramelo JJ, Delfino JM. Dissection of a beta-barrel motif leads to a functional dimer: the case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci.* 18(12):2592-602, 2009.

Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 6:489-503, 2008.

Glatz JF, Veerkamp JH. A radiochemical procedure for the assay of fatty acid binding by proteins. *Anal Biochem.* 132(1):89-95, 1983.

Haberkant P, Schmitt O, Contreras FX, Thiele C, Hanada K, Sprong H, Reinhard C, Wieland FT, Brügger B. Protein–sphingolipid interactions within cellular membranes. *J Lipid Res* 49: 251–262, 2008.

Haberkant P, van Meer G. Protein–lipid interactions: Paparazzi hunting for snap-shots. *Biol Chem* 390:795–803, 2009.

Haughland, Richard P. *The Handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies.* Tenth edition. Molecular Probes. Invitrogen Corp, 2005.

- Kennedy MW. The polyprotein allergens of nematodes (NPAs) - structure at last, but still mysterious. *Exp Parasitol.* 29(2):81-4, 2011.
- Lagakos WS, Guan X, Ho SY, Sawicki LR, Corsico B, Kodukula S, Murota K, Stark RE, Storch J. Liver Fatty Acid-binding Protein Binds Monoacylglycerol in Vitro and in Mouse Liver Cytosol. *J Biol Chem.* 288(27):19805-15, 2013.
- Meenan NA, Ball G, Bromek K, Uhrin D, Cooper A, Kennedy MW, Smith BO. Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of *Ascaris* reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(4):e1040, 2011.
- Obal G, Ramos AL, Silva V, Lima A, Batthyany C, et al. Characterisation of the Native Lipid Moiety of *Echinococcus granulosus* Antigen B. *PLoS Negl Trop Dis* 6(5):e1642, 2012.
- Pórfido JL, Alvite G, Silva V, Kennedy MW, Esteves A, Córscico B. Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and phospholipid membranes. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(11):e1893, 2012.
- Punta M, Forrest LR, Bigelow H, Kernytsky A, Liu J, Rost B. Membrane protein prediction methods. *Methods.* 41(4):460-74, 2007.
- Rigaud JL, Lévy D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.* 372:65-86, 2003.
- Rigaud JL, Bluzat A, Buschlen S. Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biochem Biophys Res Commun.* 111(2):373-82, 1983.
- Schaap FG, van der Vusse GJ, Glatz JF. Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol Cell Biochem.* 239(1-2):69-77, 2002.
- Smith SM. Strategies for the purification of membrane proteins. *Methods Mol Biol.* 681:485-96, 2011
- Storch J, Córscico B. The emerging functions and mechanisms of the mammalian fatty acid-binding proteins. *Ann Rev Nutrition* 28:73–95, 2008.
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2: 42–49, 2000.
- Vance D. E, Vance J. E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* 5th Ed. Elsevier B.V, 2008.