

Las bases moleculares de la estructura de las biomembranas

POR

JUAN CARMELO GOMEZ FERNANDEZ

*Departamento Interfacultativo de Bioquímica
Universidad de Murcia*

SUMMARY

The present consensus view of biomembrane structure is that they are based on a lipid bilayer into which and around which the various proteins are situated. Most cell membranes are fluid at physiological temperatures. Cholesterol modulates this fluidity when present in the membrane. The inclusion of proteins in the bilayer leads to lipid perturbation, which increases when protein concentration is increased. Below the lipid phase transition, eutectic mixtures are formed, as proteins are segregated to protein-rich patches by the crystallising lipid.

INTRODUCCION

Fue Overton, en 1895, quien primero señaló la naturaleza lipídica de las membranas celulares. Sin embargo, hasta 1925, con los trabajos de Gorter y Grendel (1925), no se llegó a la conclusión de que los lípidos

ABREVIATURAS UTILIZADAS

DMPC: dimiristil fosfatidilcolina; DPPC: dipalmitil fosfatidilcolina; DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno; DSC: calorimetría diferencial de barrido; ESR: resonancia electrónica de espín; NMR: resonancia magnética nuclear.



están dispuestos en la membrana en una forma de bicapa. El primer modelo en el que se tomó en consideración tanto las proteínas como los lípidos fue el de Danielli y Davson (1935).

En el momento actual se admite generalizadamente que la bicapa lipídica forma la matriz esencial de la estructura de la membrana biológica. Las proteínas están asociadas con esta bicapa bien de forma extrínseca o intrínseca. En la mayoría de los casos, aunque no en todos, la matriz lipídica se encuentra en un estado fluido, donde los fosfolípidos están por encima de su temperatura de transición (T_c) y son capaces de difundir a lo largo de la bicapa. Dentro de esta matriz fosfolipídica se encuentran también colesterol y proteínas intrínsecas, lo que perturba la matriz lipídica hasta cierto punto (ver la revisión al respecto de Chapman y colaboradores, 1979).

Si examinamos la estructura de los fosfolípidos veremos que son biomoléculas anfifílicas con un grupo polar (hidrofílico) y dos cadenas hidrocarbonadas (grupo hidrofóbico). Está clara la semejanza en estructura de estos tipos de moléculas con algunos detergentes y sugiere la posibilidad de formación de micelas en solución acuosa. Son mayoría, sin embargo, los tipos de fosfolípidos que no forman micelas en agua, sino capas bimoleculares; tal es el caso de las lecitinas, que son los fosfolípidos más comunes en biomembranas animales, y que a casi todas las concentraciones forman estructuras en bicapa (Chapman y col., 1967). Normalmente aparecen como multicapas bimoleculares separadas por agua, aunque también se pueden obtener vesículas de una sola capa bimolecular. Estas estructuras al orientarse espontáneamente lo hacen de forma que los grupos hidrofílicos polares interaccionan con el agua, mientras que las cadenas hidrocarbonadas se orientan hacia el interior para producir una capa lipídica bimolecular. Ciertos fosfolípidos pueden formar en agua otros tipos de estructuras, tales como hexagonal, cúbica, etc. (Luzzati y col., 1968).

Las biomembranas están basadas sobre una capa lipídica bimolecular similar a la adoptada por las lecitinas en agua. En el interior se sitúan las restantes moléculas, como el colesterol y las proteínas intrínsecas. Se puede considerar que la molécula de colesterol es anfifílica habida cuenta de su estructura anular hidrocarbonada, su cola alquílica y su grupo OH. Esta molécula se orienta de manera que este grupo OH queda en la fase acuosa y la estructura anular entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.

Se ha obtenido una gran cantidad de información sobre la movilidad molecular de los lípidos dentro de la bicapa mediante el uso de técnicas físicas, como la calorimetría diferencial de barrido (Differen-

tial Scanning Calorimetry, o DSC), difracción de rayos X y métodos espectroscópicos. Esta información ha permitido conocer los procesos moleculares que tienen lugar en el interior de la bicapa lipídica de las membranas celulares y proponer el importantísimo concepto de la fluidez de las membranas (Chapman y col., 1966).

Muchos de estos sistemas lipídicos tienen una transición de fase a una temperatura característica (Chapman, 1975). Por debajo de esta temperatura las cadenas lipídicas se disponen en forma ordenada o cristalina. Por encima de esta temperatura las cadenas son «fluidas». En este estado se dan isómeros rotacionales en los enlaces carbono-carbono de la cadena. Se ha estudiado el parámetro de orden a lo largo de la cadena, usando para ello técnicas espectroscópicas como RMN, ESR, espectroscopia de infrarrojo y de laser-Raman. Se deduce de todos estos estudios que el desorden aumenta gradualmente a lo largo de la cadena hidrocarbonada, siendo máximo en el extremo metílico.

Se ha señalado ya, previamente, la relación importante que existe entre el comportamiento físico de los fosfolípidos en disposición de bicapa y en la de monocapa. Se relacionan así la transición térmica que tiene lugar al pasar de una monocapa condensada a una expandida con la transición térmica que tiene lugar en la bicapa (Phillips y Chapman, 1968). En algunas biomembranas naturales se dan también fenómenos de transición de fase que ocasionan, a veces, agregaciones de proteínas.

FLUIDEZ DE MEMBRANAS Y COLESTEROL

Mediante el uso de una gran variedad de técnicas se ha demostrado que la presencia de colesterol dentro de la matriz lipídica modula la fluidez del lípido (Ladbrooke y col., 1968) y por tanto afecta la permeabilidad para el agua de la bicapa lipídica. Cuando el lípido se encuentra por encima de su temperatura de transición y por tanto en estado fluido, la presencia del colesterol ocasiona una inhibición del isomerismo rotacional de los grupos metileno de la cadena. Esto produce una estructura más rígida y un aumento de microviscosidad (fig. 1).

A alta concentración, el colesterol elimina la transición de fase del lípido impidiendo la cristalización de las cadenas lipídicas. La presencia del colesterol en la bicapa lipídica provoca que el fosfolípido adopte una estructura de «fluidez intermedia» (Williams y Chapman, 1970).

Los estudios calorimétricos muestran que el endotermo lipídico principal queda eliminado al incrementarse las cantidades de colesterol. Los primeros estudios (Ladbrooke y col., 1968) sugirieron que la tran-

sición detectada por calorimetría quedaba eliminada con una proporción molar de colesterol del 50 %, mientras que estudios posteriores (Hinz y Sturtevant, 1972) sugerían que esto ocurriría con 33 %. Esta última conclusión hizo pensar que el colesterol formaría un complejo con los fosfolípidos, con una relación molar de 2 : 1 fosfolípido a colesterol (Engelman y Rothman, 1972). En este modelo, cada molécula de colesterol estaría rodeada por una capa fosfolipídica.

En estudios recientes (Mabrey y col., 1978) se ha usado un calorímetro diferencial de barrido muy sensible que ha confirmado el modelo original de que la entalpía de la transición deja de observarse con una relación molar de fosfolípido a colesterol 1 : 1 (Ladbroke y col., 1968). En estos estudios recientes se sugiere que existen dos picos superpuestos en el registro calorimétrico, de los que uno correspondería a la transición de regiones de lípido puro y el otro a una transición que tendría lugar de una forma difusa, en un amplio rango de temperaturas, y que estaría asociada con una fase rica en colesterol. Los resultados de estos estudios recientes no están de acuerdo con el modelo de complejo fosfolípido-colesterol con proporción molar 2 : 1. Se ha sugerido recientemente que sería suficiente con formular una disposición al azar de fosfolípidos y colesterol para explicar los datos disponibles (ver Chapman y col., 1979, y las referencias allí mencionadas).

INTERACCIONES ENTRE PROTEINAS INTRINSECAS Y FOSFOLIPIDOS

Cuando se concluyó que las proteínas intrínsecas se disponen en el interior de la bicapa lipídica surgió la problemática de conocer cuál es el efecto perturbador de tales proteínas sobre su entorno lipídico y la significación que este efecto pudiese tener sobre la estructura y función de las biomembranas.

Al alcanzarse una comprensión profunda sobre las bases moleculares de la fluidez lipídica, es decir, sobre las rotaciones isoméricas de las cadenas fosfolipídicas de tipo «gauche»-«todo anti», se pudo pensar de forma inmediata en que el colesterol y las proteínas inhibirían estos procesos (Chapman, 1968). Siguiendo estas ideas se propusieron en la última década una serie de modelos sobre la perturbación de la capa lipídica adyacente a las proteínas intrínsecas.

Se han usado varios términos para describir este lípido perturbado, tales como «capa lipídica fronteriza» (Jost y col., 1973), «halo lipídico» (Trauble y Overath, 1973) y «lípido anular» (Warren y col., 1975). En



todos estos modelos se supone que existiría una capa lipídica inmobilizada que separaría la proteína intrínseca de las regiones fluidas de la bicapa adyacentes. Se sugirió por algunos autores que esta capa tendría un único fosfolípido de espesor (Jost y col., 1973); Hesketh y col. (1976), desarrollando más esta idea, sugirieron que los lípidos situados en esta capa permanecerían en ella durante un tiempo largo, teniendo parcialmente inhibida la capacidad de movimientos que desarrollarían los fosfolípidos de la bicapa; además este lípido anular excluiría al colesterol (Warren y col., 1975). Argumentaron para ello que la velocidad de intercambio entre los lípidos anulares y los demás de la bicapa sería lenta incluso cuando el resto de esta bicapa estuviese en estado fluido.

Se sugirió por otros autores que la extensión de la perturbación se extendería a tres capas de lípidos alrededor de la proteína (Marcelja, 1976); otros argumentaron que lo haría hasta la sexta o la séptima (Curatolo y col., 1978). La mayoría de los datos experimentales que apoyarían estas conclusiones se obtuvieron de estudios de resonancia de espín electrónico (ESR).

Sin embargo, no tardaron en surgir críticas a estas conclusiones, sobre todo en relación a los largos períodos de tiempo que, según estos modelos, habrían de permanecer unos fosfolípidos determinados formando parte de los «ánulos» o «lípidos fronterizos». Se basaron estas críticas en que los datos de ESR se observan, generalmente, con sistemas de membrana en los que la relación proteína: lípido es muy alta, extrapolándose estos resultados a sistemas de mayor contenido lipídico (Chapman y col., 1979). Por otra parte, se han conseguido resultados, recientemente, usando RMN de ^1H (Brown y col., 1978), ^{19}F (Gent y Ho, 1978), ^2H (Oldfield y col., 1978) y ^2H y ^{31}P (Rice y col., 1979) que disienten grandemente de los modelos que suponen la existencia de diferentes variedades lipídicas durante tiempos relativamente largos, tanto en modelos como en membranas naturales. Por ejemplo, en citocromo *c* oxidasa, reconstituida con fosfatidilcolinas sintéticas marcadas con ^2H específicamente en el carbono metílico del ácido graso en posición 2, no se encuentran estos dos tipos de lípido (Oldfield y col., 1978). Por el contrario, la presencia de la proteína ocasiona un decrecimiento en el desplazamiento cuadrupolar (o parámetro de orden) del grupo metílico de las cadenas lipídicas. Estos autores sugieren que la citocromo *c* oxidasa tiene el efecto de impedir la cristalización de las cadenas hidrocarbonadas por debajo de T_c , mientras que por encima de esta temperatura desordena las cadenas lipídicas.

En la fig. 2 se incluyen espectros de ESR y ^2H NMR correspondientes a tres estados lipídicos, que son el de bicapa de fosfatidilcolina pura

en estado fluido o líquido cristalino, el de lípido con proteína incluida (citocromo *c* oxidasa) y lípido en estado de gel cristalino. Según la ESR, el estado de gel rígido de la fosfatidilcolina por debajo de T_c es similar en propiedades moleculares al «lípido fronterizo» que se detectaría en el espectro de la mezcla de lípido y citocromo *c* oxidasa. Sin embargo, según los resultados de NMR, la «capa fronteriza» está incluso más desordenada que el lípido por encima de T_c .

La discrepancia de resultados entre ambas técnicas se puede resolver si tenemos en cuenta la diferencia en cuanto a escala de tiempo de los fenómenos de que nos informan ambas técnicas. Así, mientras que esta escala es de 10^{-7} a 10^{-8} s para ESR, lo es de 10^{-3} a 10^{-4} s para $^2\text{H-NMR}$. Hay que advertir que la mayoría de los fenómenos biológicos ocurren en esta escala de tiempo de la NMR. Así, el número de recambio de la mayoría de los enzimas es de 10^{-1} a 10^{-3} s, y por tanto los resultados de NMR son más pertinentes a los fenómenos biológicos estudiados que los de ESR.

Recientemente se han realizado estudios sobre ATPasa transportadora de Ca^{+2} reconstituida con lípidos sintéticos como dimiristil fosfatidilcolina (DMPC) y dipalmitil fosfatidilcolina (DPPC) (Gómez-Fernández y col., 1979 y 1980; Rice y col., 1979; Hoffman y col., 1980). A los resultados obtenidos se les ha dado una interpretación basada en suponer que cuando el lípido es fluido, es decir, por encima de T_c , existe una distribución al azar de lípidos y proteínas en el plano de la bicapa membranar, sin interacciones lípido : proteína muy duraderas. Con cantidades crecientes de proteína aumentará la microviscosidad de la bicapa (figuras 3 y 4). Lo mismo sucede con otras proteínas, como bacteriorrodopsina obtenida de *Halobacterium halobium* (fig. 5) y con el polipéptido gramicidina (fig. 6).

Por debajo de la temperatura de la transición principal (T_c) del lípido puro, al cristalizar las cadenas lipídicas, la presencia de la proteína intrínseca crea defectos de empaquetamiento (Chapman y col., 1979) y las moléculas de proteína se juntan en agregados lipoproteicos de alto contenido en proteínas (ver fig. 7; donde se muestra esto de forma esquematizada). Estos agregados tienen propiedades eutécticas, de manera que baja la temperatura de fusión del lípido en ellos atrapado con relación a la T_c del lípido puro. Este proceso de agregación producirá dos regiones, una que está formada por lípido cristalino, sin apenas proteínas, y otra que incluiría los agregados de alto contenido en proteínas. Si se incluyese más proteína en el sistema lipídico, aumentaría el tamaño del agregado a costa del resto de la región cristalina del lípido. Como consecuencia tendrá lugar una reducción de entalpía (fig. 8).

En el interior de los agregados eutécticos lipoproteicos la microviscosidad es alta, pero será menor que en las regiones lipídicas cristalinas. Un ácido graso marcado con una sonda de espín electrónico, que se sitúa en esta región de alto contenido proteico, mostrará un «componente inmóvil» debido al marcado efecto de la proteína sobre este «lípidio atrapado» (fig. 9). Si la proteína tiene actividad enzimática, la movilidad y actividad enzimática quedará limitada por este entorno muy viscoso.

Cuando la temperatura aumenta, los lípidos en el agregado (en la mezcla eutéctica) ganarán movilidad, y lo mismo sucederá con las sondas de espín electrónico o de fluorescencia y con el enzima. Se apreciará un cambio brusco a la temperatura T_e (del eutéctico) que es menor que T_c . Sin embargo, cuando quede aún suficiente lípidio cristalino, libre de proteínas, a la temperatura T_c tendrá lugar la desaparición de los agregados lipoproteicos ricos en proteínas y se observarán nuevos efectos en las sondas fluorescente y de espín electrónico, e igualmente en la actividad enzimática. Esta interpretación está de acuerdo con los resultados experimentales encontrados (Gómez-Fernández y col., 1979, y Hoffmann y col., 1980), y es de gran importancia el tener en cuenta estos hechos para comprender apropiadamente la interacción entre fosfolípidos y proteínas intrínsecas en biomembranas.

Para finalizar hay que destacar la gran importancia del conocimiento a nivel molecular de procesos de membrana por su implicación en situaciones normales y patológicas. Los progresos que se hacen constantemente en este importante campo de la Biología permiten suponer que en un plazo no muy largo podamos utilizar nuestros conocimientos sobre las biomembranas para modularlas a nuestra voluntad y para utilizarlas en nuestro beneficio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BROWN, M. F.; MILJANICH, G. P., y DRATZ, E. A. (1977), *Biochemistry*, 16, 2640.
- CHAPMAN, D.; BYRNE, P., y SHIPLEY, G. G. (1966), *Proc. Roy. Soc.*, 290, 115.
- CHAPMAN, D.; WILLIAMS, R. M., y LADBROOKE, B. D. (1967), *Chem. Phys. Lipids*, 1, 445.
- CHAPMAN, D. (1968), en *Biological membranes: physical fact and function* (ed. D. Chapman), Academic Press, London.
- CHAPMAN, D. (1975), *Q. Rev. Biophys.*, 8, 185.
- CHAPMAN, D.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C., y GOÑI, F. M. (1979), *FEBS Lett.*, 98, 211.
- CURATOLO, W.; SAKURA, J. D.; SMALL, D. M., y SHIPLEY, G. G. (1977), *Biochemistry*, 16, 2313.
- DANIELLI, J. F., y DAVSON, H. (1935), *J. cell. comp. physiol.*, 5, 495.
- ENGELMAN, D. M., y ROTHMAN, J. E. (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 3694.
- GENT, M. P. N., y HO, C. (1978), *Biochemistry*, 17, 3023.
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; GOÑI, F. M.; BACH, D.; RESTALL, C. J., y CHAPMAN, D. (1979), *FEBS Lett.*, 211, 224.
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; GOÑI, F. M.; BACH, D.; RESTALL, C. J., y CHAPMAN, D. (1980a), *Biochim. Biophys. Acta*, 598, 502.
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; GOÑI, F. M.; RESTALL, C. J., y CHAPMAN, D. (1980b), resultados no publicados.
- GORTER, E., y GRENDEL, F. (1925), *J. Exp. Med.*, 41, 439.
- HESKETH, T. R.; SMITH, G. A.; HOUSLAY, M. D.; MCGILL, K. A.; BIRDSALL, N. J. M.; METCALFE, J. C., y WARREN, G. B. (1976), *Biochemistry*, 15, 4145.
- HINZ, H. J., y STURTEVANT, J. M. (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 3697.
- HOFFMANN, W.; SARZALA, M. G.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; GOÑI, F. M.; RESTALL, C. J.; CHAPMAN, D.; HEFFELER, G., y KREUTZ, W. (1980), *J. Mol. Biol.*, 141, 119.
- JOST, P. C.; GRIFFITH, O. H.; CAPALDI, R. A., y VANDERKOOI, G. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 480.
- KANG, S. Y.; GUTOWSKY, H. S.; HSUNG, J. C.; JACOBS, R.; KING, T. E.; RICE, D., y OLDFIELD, E. (1979), *Biochemistry*, 18, 3257.
- LADBROOKE, B. D.; WILLIAMS, R. M., y CHAPMAN, D. (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 333.
- LUZZATI, V. (1968), en *Biological membranes: physical fact and function* (ed. D. Chapman), Academic Press, London.
- MABREY, S.; MATEO, P. L., y STURTEVANT, J. M. (1978), *Biochemistry*, 17, 2464.
- MARCELJA, S. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 1.
- OLDFIELD, E.; GILMORE, R.; GLASER, M.; GUTOWSKI, H. S.; HSHUNG, J. C.; KANG, S. Y.; KING, T. E.; MEADOWS, M., y RICE, D. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4657.
- OVERTON, E. (1895), *Zeitschr. naturf. Ges. Zurich*, 40, 159.
- PHILLIPS, M. C., y CHAPMAN, D. (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 301.
- RICE, D. M.; MEADOWS, M. D.; SCHEINMAN, A. O.; GOÑI, F. M.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; MOSCARELLO, M. A.; CHAPMAN, D., y OLDFIELD, E. (1979), *Biochemistry*, 18, 5893.
- TRAUBLE, H., y OVERATH, P. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 307, 491.
- WARREN, G. B.; HOUSLAY, M. D.; METCALFE, J. C., y BIRDSALL, N. J. (1975), *Nature*, 255, 684.
- WILLIAMS, R. M., y CHAPMAN, D. (1970), en *Progress in the Chemistry of fats and other lipids* (ed. R. T. Holman), vol. 2, Pergamon Press, New York.

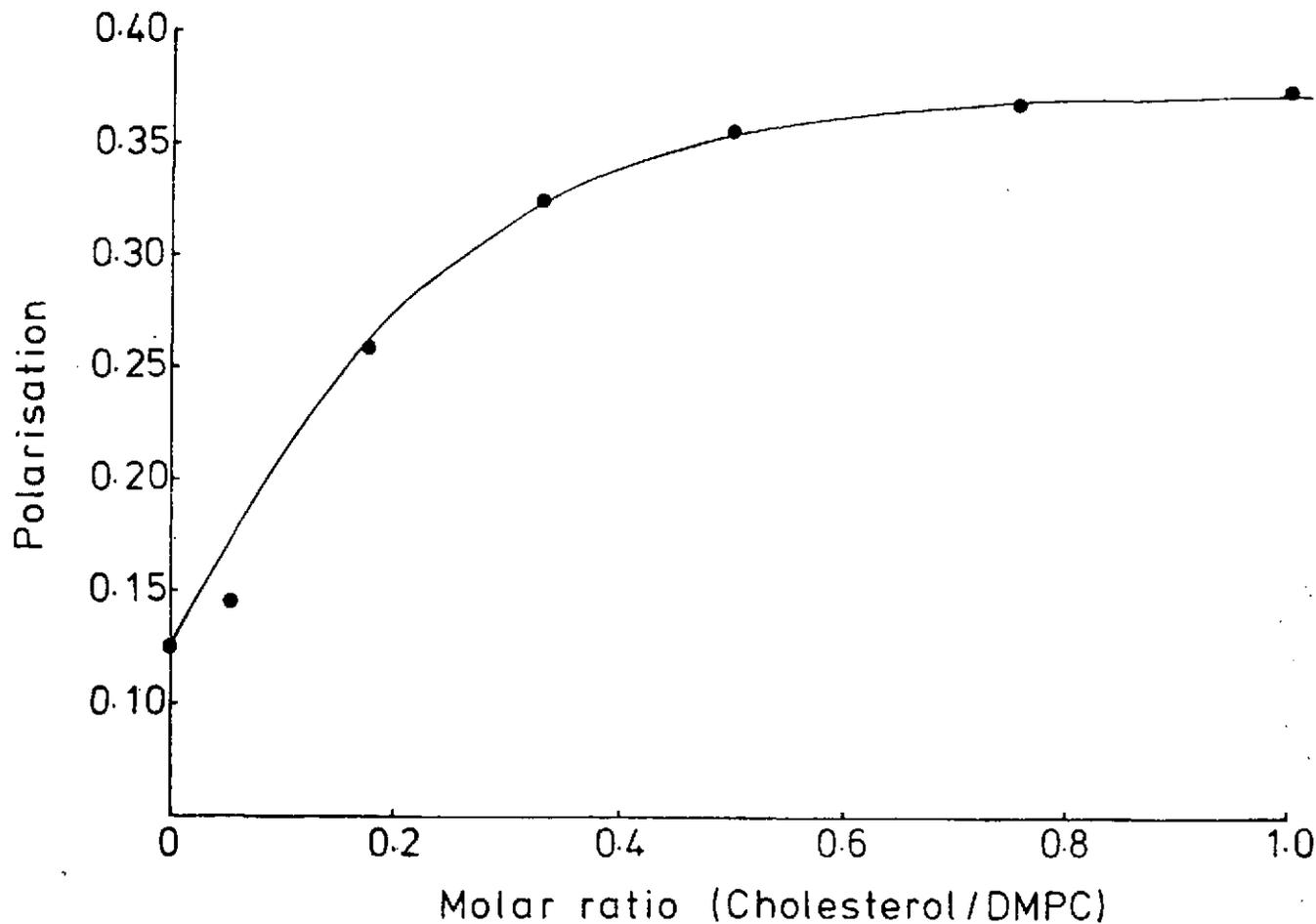


Figura 1. Estudio del efecto del colesterol sobre la despolarización de fluorescencia de DPH en liposomas de DMPC, a 36° C (Gómez-Fernández y col., 1980b)



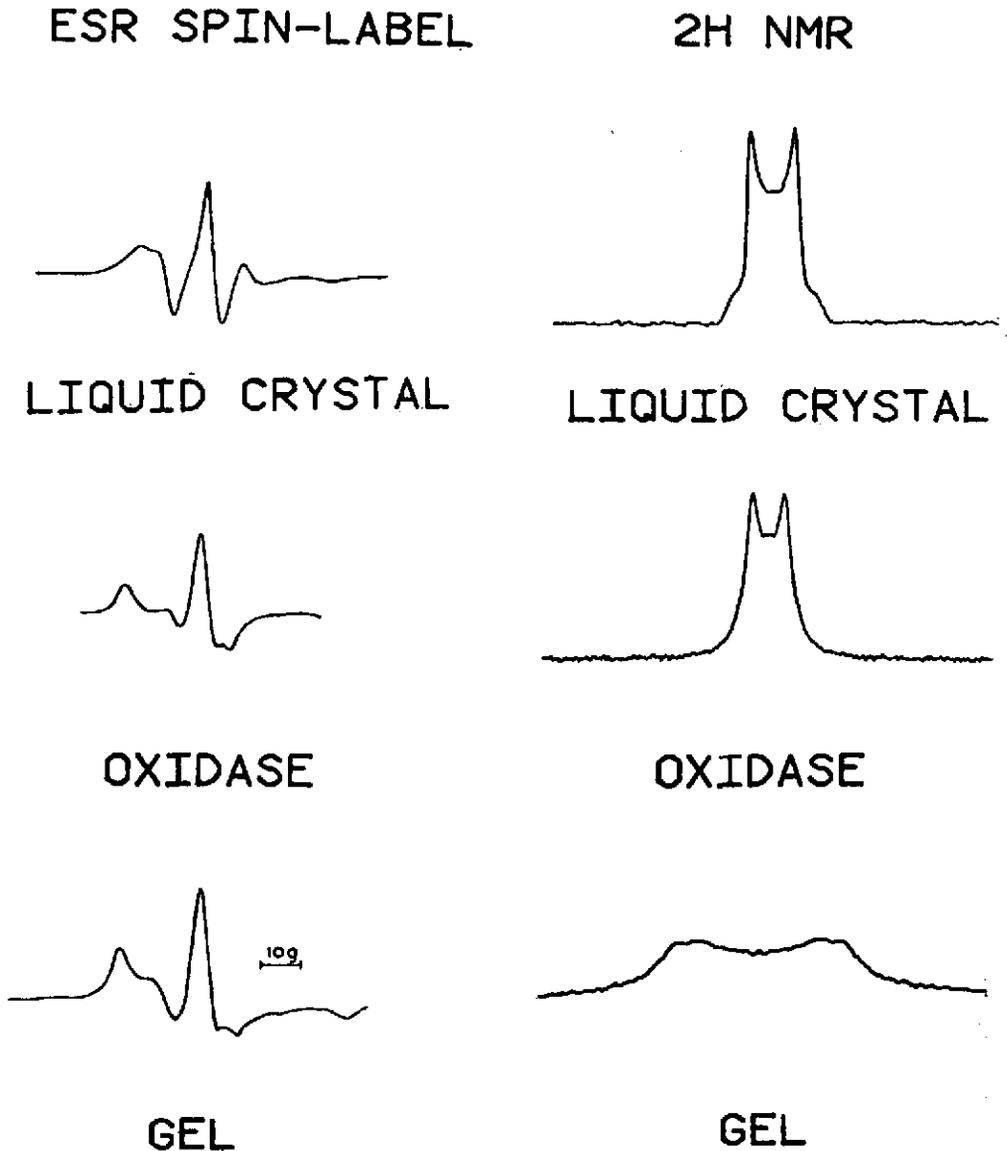


Figura 2. Comparación entre resultados obtenidos con una sonda de espín para ESR y $^2\text{H-NMR}$ (usando una lecitina marcada en el metilo terminal) de diversos estados: cadenas hidrocarbonadas ordenadas, cristal líquido y lípido fronterizo de citocromo *c* oxidasa (Kang y col., 1979)

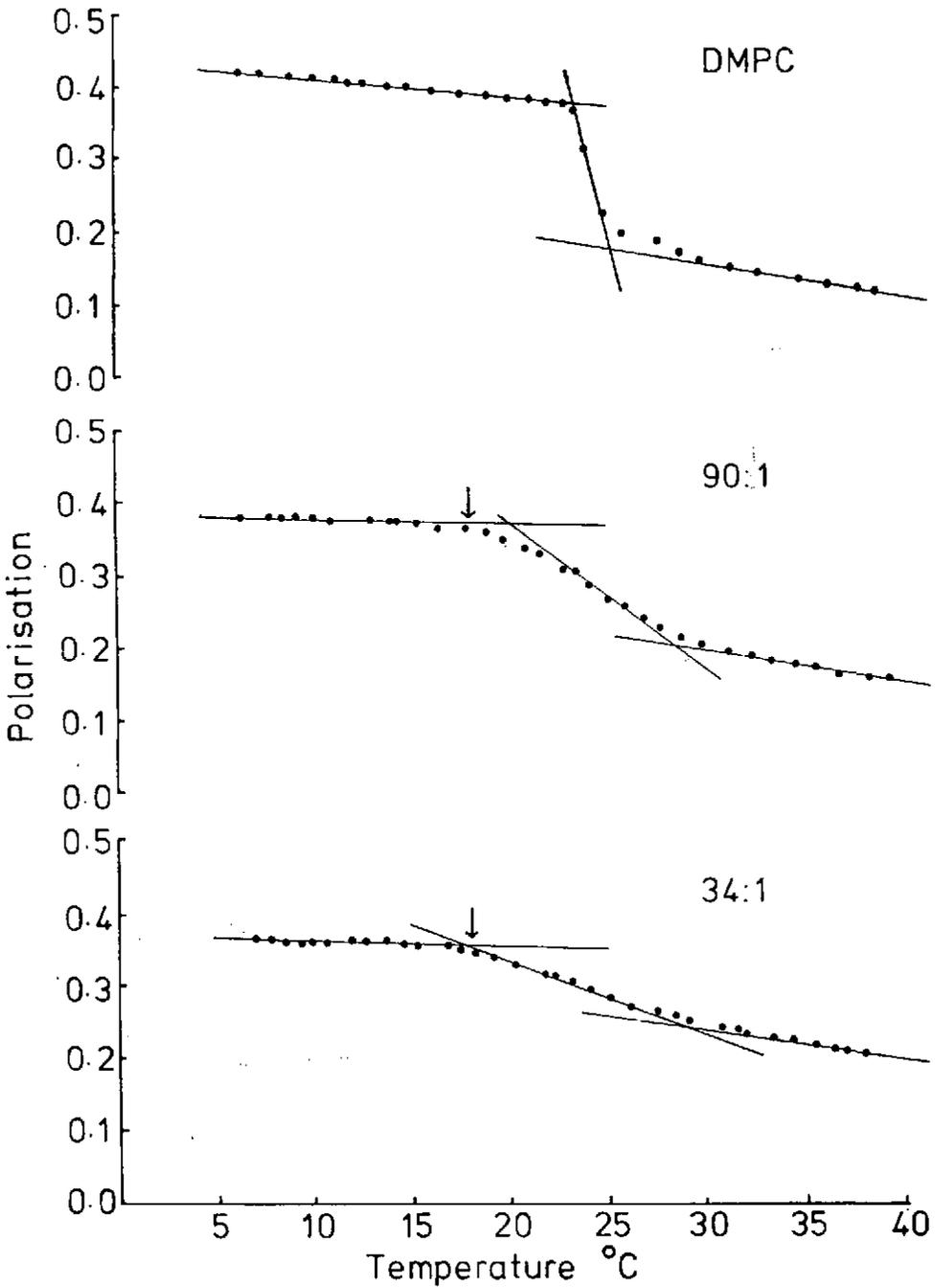


Figura 3. Efecto de la temperatura sobre la despolarización de fluorescencia de DPH en lípidos puros (DMPC) y Ca^{+2} -ATPasa de retículo sarcoplásmico reconstituida con DMPC. Se indica la relación molar DMPC: ATPasa (Gómez-Fernández y col., 1979)



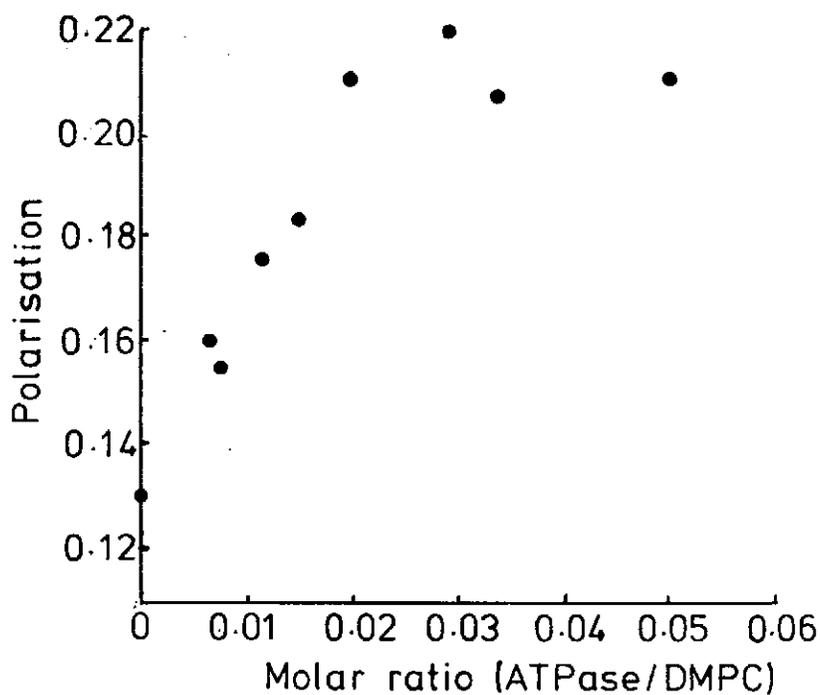


Figura 4. Despolarización de fluorescencia de DPH en mezclas de Ca^{+2} -ATPasa de retículo sarcoplásmico y DMPC a 36°C a varias razones molares (Gómez-Fernández y col., 1979)

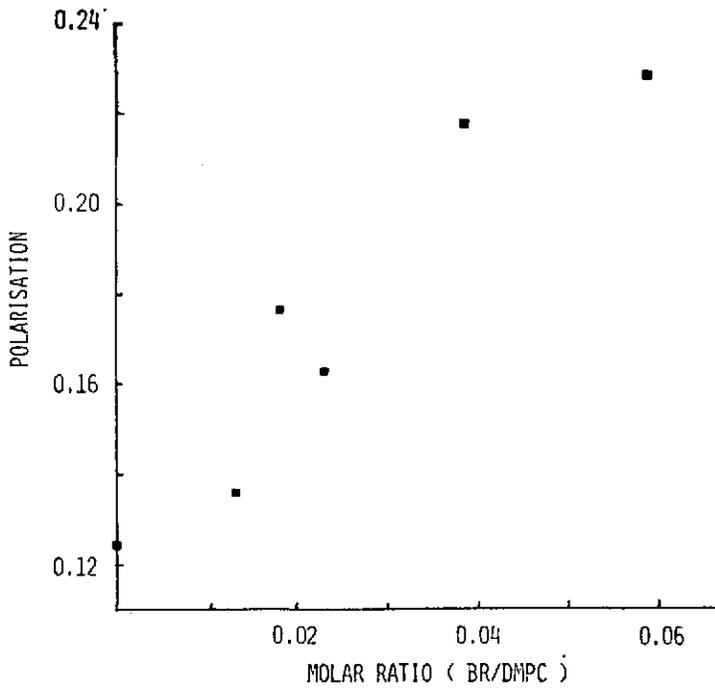


Figura 5. Despolarización de fluorescencia de DPH en mezclas de la proteína bacteriorrodopsina purificada de *Halobacterium halobium* y DMPC, a 36°C a varias razones molares (Gómez-Fernández y col., 1980b)

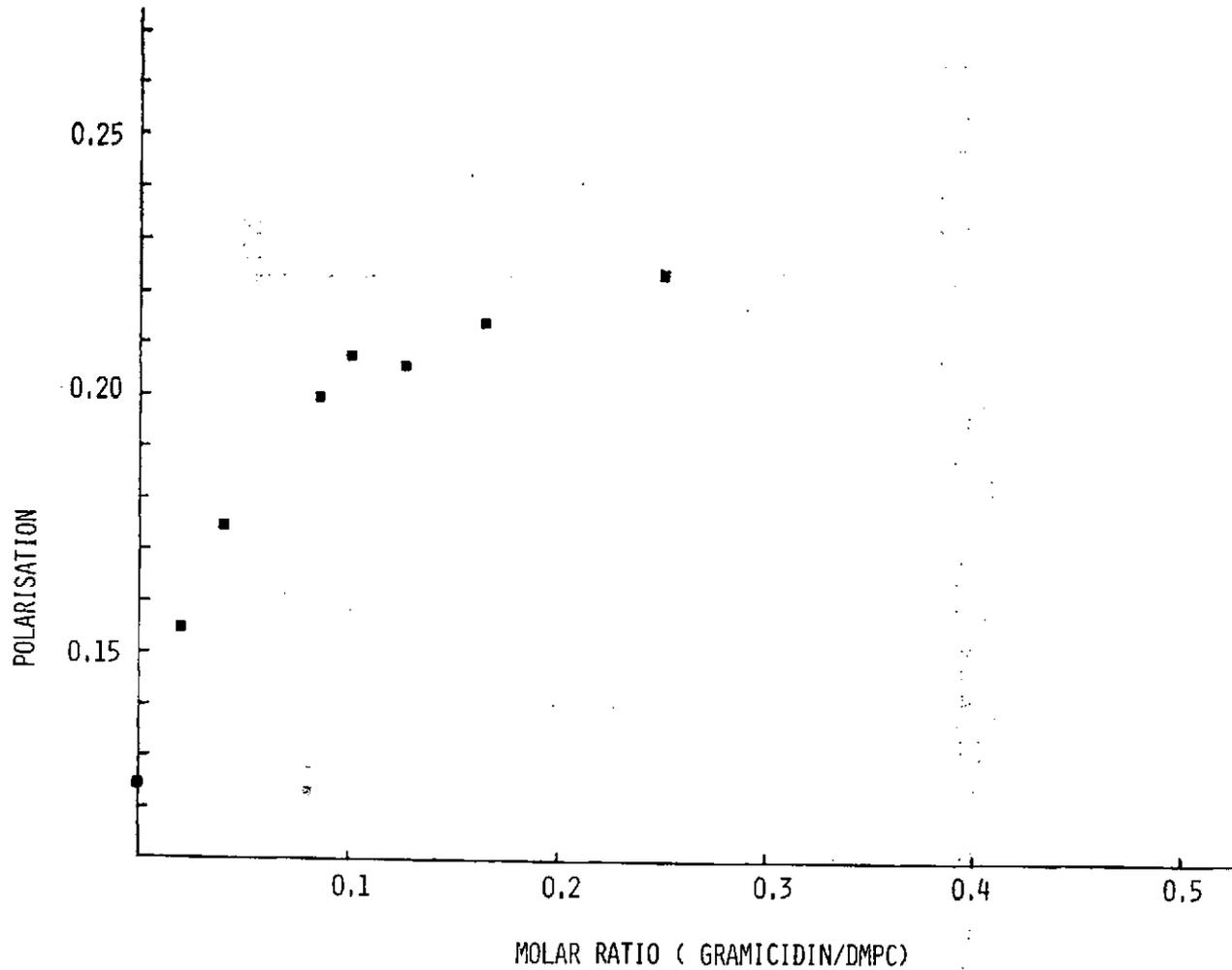


Figura 6. Despolarización de fluorescencia de DPH en mezclas del polipéptido ionóforo gramicidina A y DMPC a diversas razones molares (Gómez-Fernández y col., 1980b)



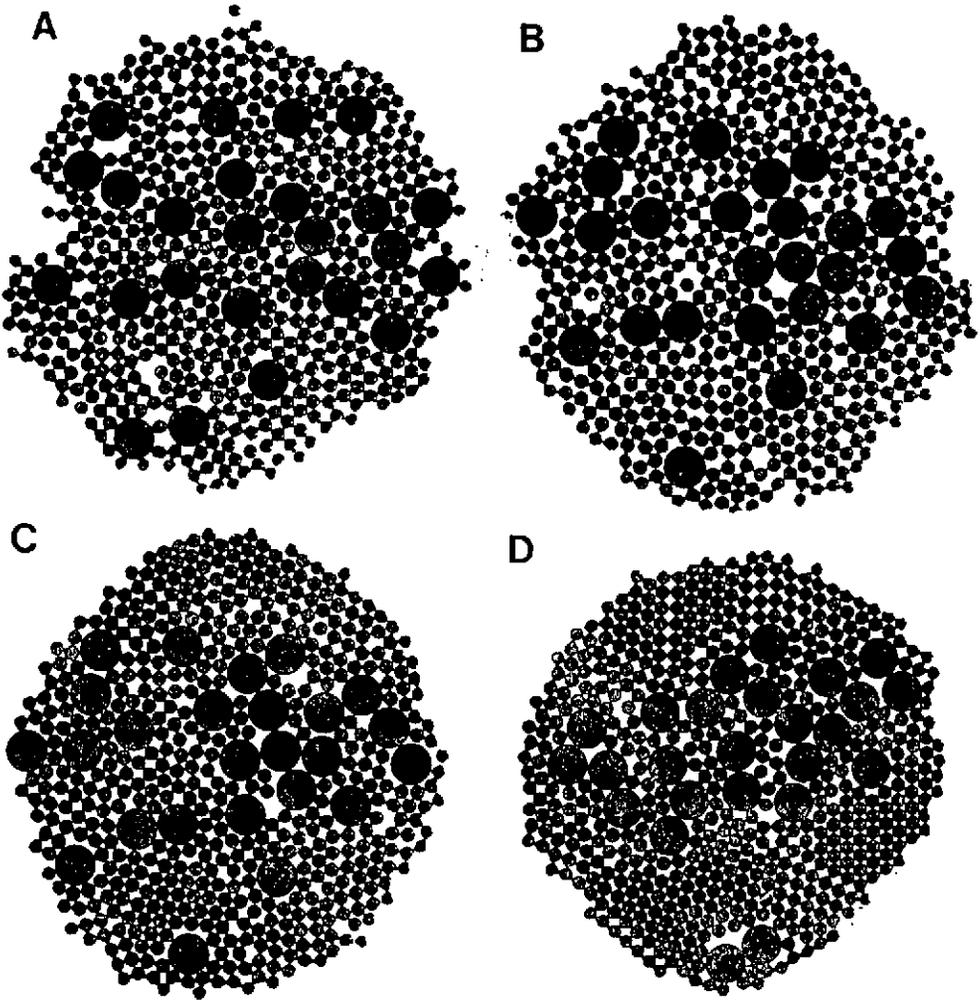


Figura 7. Diagrama esquemático que ilustra cómo la cristalización lipídica puede provocar la agregación de las proteínas. (A): distribución al azar de lípidos (círculos menores) y proteínas (círculos mayores) que evolucionará hacia nucleación y defectos de empaquetamiento en (B) y (C) como consecuencia de la cristalización de ciertas áreas lipídicas. Finalmente en (D) se ha producido agregación de las proteínas (Gómez-Fernández y col., 1979)

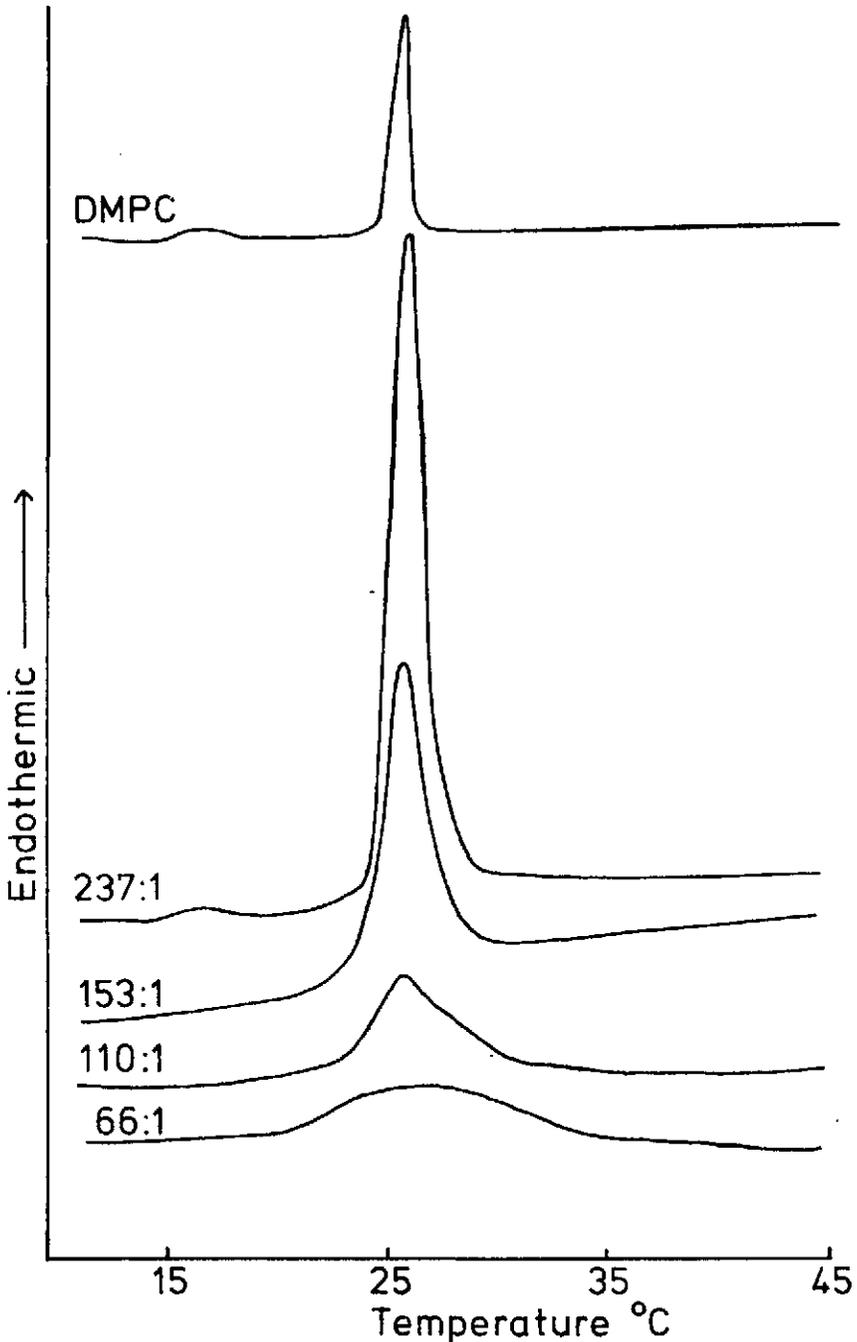


Figura 8. Curvas obtenidas con un calorímetro diferencial de barrido al calentar muestras de DMPC pura y DMPC más ATPasa de Ca^{+2} de retículo sarcoplásmico. Se indican en la curva las razones molares lípido : proteína. Velocidad de calentamiento: $5^\circ \text{C}/\text{min}$. La sensibilidad fue de 2 mcal/s para el lípido puro y 0,5 mcal/s para los sistemas lípido : proteína. La curva del lípido puro corresponde a 1,0 μmol de DMPC mientras que las de las muestras lípido : proteína lo son a 1,4 μmol de DMPC (Gómez-Fernández y col., 1979)

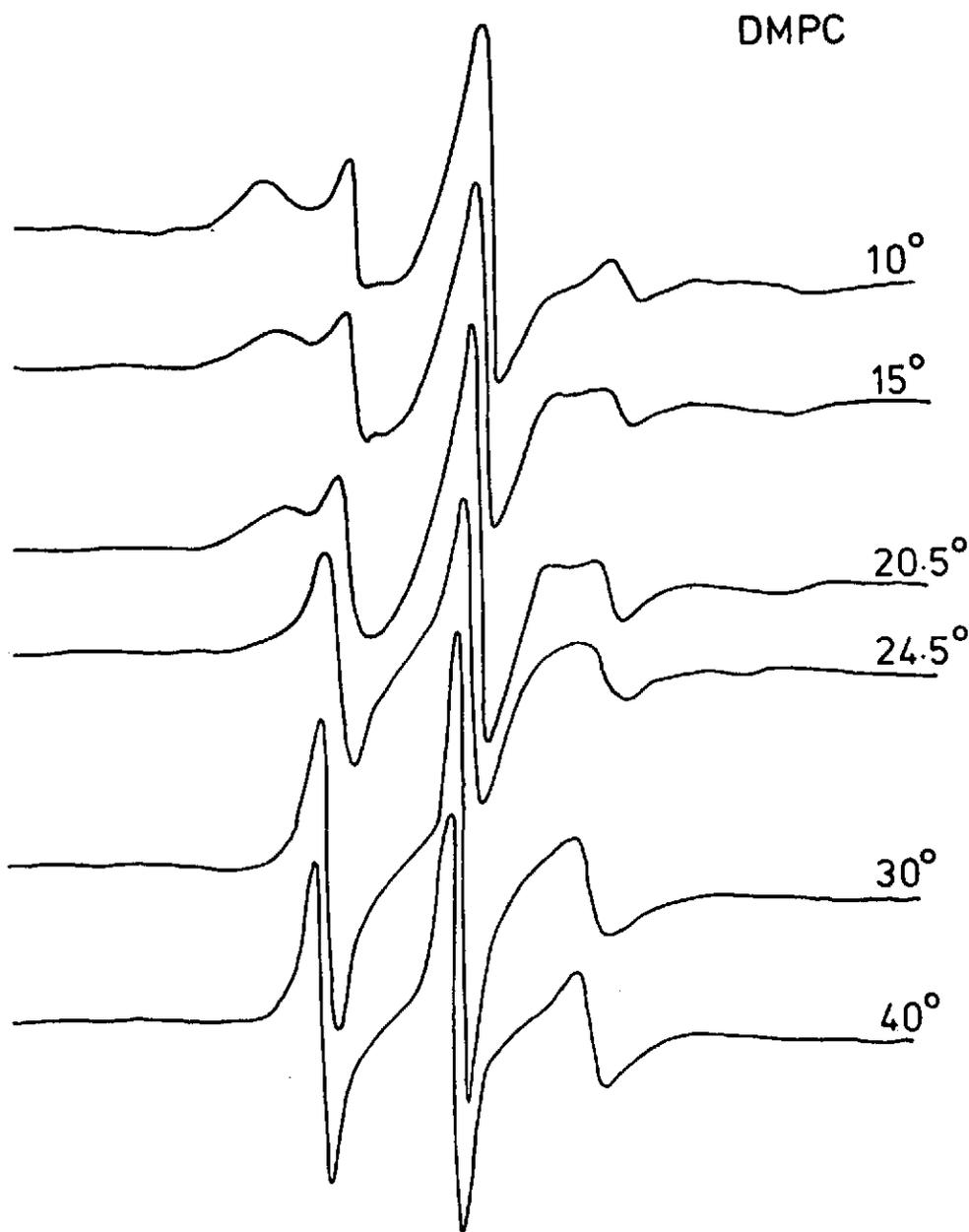


Figura 9. Espectros de Resonancia Electrónica de Espín de la sonda 12-N-oxil-4',4'-dimetiloxazolidina estearato, incluida en liposomas de DMPC puro (a) y en Ca^{+2} -ATPasa de retículo sarcoplásmico reconstituida con DMPC (razón molar lípido a proteína, 32 : 1) (b), a las temperaturas indicadas (Gómez-Fernández y col., 1980b)

