



Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Papel de la N-nervonil esfingomielina en la organización lateral y la estabilidad nanomecánica de bicapas lipídicas

Autora:

Itziar Ibone Areso Zubiaur

Director:

Dr. Félix M. Goñi Urcelay

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
Membranas celulares: propiedades y funciones	1
Esfingolípidos.....	2
Dominios lipídicos. Interacciones lípido-lípido.....	2
OBJETIVOS.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
Materiales.....	4
Microscopía confocal de fluorescencia	4
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	5
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	6
RESULTADOS	7
Segregación lateral en mezclas de DOPC/SM/CHO y Cer	7
Comportamiento termotrópico de mezclas lipídicas que contienen 24:1SM	9
Microscopía de fuerza atómica	10
DISCUSIÓN.....	12
CONCLUSIONES	14
REFERENCIAS.....	15

RESUMEN

Los lípidos de las membranas biológicas no son perfectamente miscibles entre sí, con frecuencia dan origen a “dominios” bidimensionales separados lateralmente cuando se resuspenden en agua. Las mezclas esfingomielina/dioleilfosfatidilcolina/colesterol dan origen con frecuencia a dominios, pero esto no ocurre cuando la esfingomielina es insaturada (p. ej. N-nervonil esfingomielina). En este trabajo se han aplicado técnicas calorimétricas y estructurales para estudiar el comportamiento de mezclas N-nervonil esfingomielina/dioleilfosfatidilcolina/colesterol/ceramida. En presencia de ceramida y de N-nervonil esfingomielina se observa formación de dominios laterales, al contrario de lo que ocurría en ausencia de ceramida.

INTRODUCCIÓN

Membranas celulares: propiedades y funciones

Una de las propiedades fundamentales de las células es su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales muy diversas. Esta característica depende en gran medida de la presencia de membranas. La membrana biológica principal es la membrana plasmática, que es una barrera semipermeable que separa el citoplasma del medio extracelular (Gorter y Grendel, 1925) y protege así a la célula. La membrana plasmática consiste en una matriz hidrofóbica formada por una bicapa lipídica orientada, en la que se encuentran proteínas insertadas que colaboran con los lípidos en multitud de procesos celulares.

Las membranas celulares no son sólidas ni estáticas, sino que presentan cierta fluidez (Singer y Nicolson, 1972). Los lípidos y proteínas están en constante movimiento y difunden a lo largo del plano de la membrana. Este modelo de “mosaico fluido” ha evolucionado en los últimos años. Se ha visto que la organización y composición de las membranas es más compleja de lo que se creía. Diversos estudios han demostrado por ejemplo que la densidad proteica es mayor que la del modelo de Singer y Nicolson, o que existen movimientos lipídicos transmembrana localizados (flip-flop) (Goñi, 2014). Actualmente, está ampliamente aceptado que las membranas presentan heterogeneidad lateral (Engelman, 2005). Existe una segregación de los componentes de la membrana, que se organizan en plataformas transitorias enriquecidas en lípidos y/o proteínas específicas. Simons e Ikonen (1997) propusieron la existencia de “lipid rafts”, microestructuras lipídicas enriquecidas en esfingolípidos y colesterol que servirían como plataformas para el reclutamiento local de proteínas durante la transducción de señales celulares. Se ha observado que estructuras

lateralmente segregadas con este tipo de composición presentan mayor rigidez que el resto de la membrana, lo que podría restringir parcialmente la movilidad lipídica y proteica.

Esfingolípidos

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de las interacciones lípido-lípido entre esfingolípidos, lo cual tiene numerosas conexiones con la inducción de los mecanismos de apoptosis (Morales y cols., 2007). Los esfingolípidos están basados estructuralmente en la esfingosina. Aunque durante años se ha creído que eran componentes inertes de la membrana plasmática, actualmente ciertos esfingolípidos como la esfingomielina (SM) y la ceramida (Cer) son considerados moléculas bioactivas y se supone que participan como mensajeros secundarios en muchas vías de señalización.

El esfingolípidido más abundante de las membranas plasmáticas de animales es la SM. Las distintas SMs se clasifican en función de la cadena acídica unida a la esfingosina, las más comunes en las membranas plasmáticas son las que tienen un ácido graso largo y saturado (C16, C18 o C24). Sin embargo, se ha descubierto recientemente que la 24:1^{Δ15} también es una cadena acídica común en las SMs naturales (Slotte, 2013). A día de hoy se cree que las SMs tienen dos funciones principales. Por un lado, se ha observado que se segregan lateralmente en dominios líquido-ordenados estrechamente asociadas con colesterol en sistemas modelo de membranas en presencia de un fosfolípido fluido como la fosfatidilcolina (Sot y cols., 2008). Así, formarían los dominios de membrana que actúan como intermediarios clave en procesos de señalización. Por otro lado, la SM es un precursor de la formación de Cer en membranas. La generación de la Cer ocurriría tras la activación enzimática de esfingomielinasas, que hidrolizan la SM a fosforilcolina y Cer (Goñi y Alonso, 2002). Se ha observado que esta Cer generada es un mensajero secundario de varios procesos como la apoptosis, lo que podría estar relacionado con la formación de segregaciones laterales lipídicas de SM comentadas anteriormente.

Las Cer representan una clase de esfingolípidos que constituyen la estructura hidrofóbica básica de la SM y de esfingolípidos más complejos. Actualmente son considerados lípidos bioactivos con gran actividad en la señalización celular como mensajeros secundarios. Se ha demostrado que la inducción de la muerte celular programada está asociada con un aumento de los niveles de Cer en la célula (Haimovitz-Friedman y cols., 1994)

Dominios lipídicos. Interacciones lípido-lípido

Está ampliamente aceptado que las membranas celulares no son homogéneas, sino que presentan heterogeneidad lateral. Los dominios de membrana son regiones segregadas

lateralmente que tienen una composición y unas propiedades distintas del resto de la membrana, y en los que se reclutan lípidos y proteínas específicas. La generación de dominios de membrana está muy relacionada con interacciones lípido-lípido, que dependerán en gran medida de las propiedades físicas de los lípidos.

Los lípidos con cadenas acídicas saturadas que tienen una transición de fase gel-fluido a temperaturas elevadas tienden a formar dominios. La palmitil-esfingomielina (16:0SM) pura tiene una transición alrededor de los 40 °C, a una temperatura mayor que la mayoría de los fosfolípidos naturales. Por tanto, a temperatura fisiológica, la 16:0SM pura tenderá a estar en fase gel y tendrá una mayor propensión a generar dominios de membrana, que tienen característicamente mayor rigidez. Además, la SM tiene una interacción fuerte y preferente con el colesterol (CHO), de manera que tenderá a combinarse con éste, generando dominios ricos en CHO y SM (Slotte, 1999). Tanto el CHO como la SM tienen grupos receptores y donantes de puentes de hidrógeno, lo cual, sumado a la estructura hidrofóbica plana y extendida del CHO, promueve el estrecho empaquetamiento de estos dos lípidos formando una fase líquido-ordenado (L_o) (Quinn y Wolf, 2009). La fase L_o es un estado físico intermedio que está estrechamente empaquetado, de manera similar a la fase gel (L_β), pero que a su vez presenta velocidades de difusión lateral que son sólo ligeramente menores que las de la fase líquido-desordenado (L_d), fluida (Giocondi y cols., 2010).

En un trabajo reciente en nuestro laboratorio se ha estudiado cómo la naturaleza de la cadena acídica de la SM influye sobre su distribución lateral en una mezcla lipídica ternaria con CHO y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC). Se demostró que la 24:1SM, al contrario de lo que ocurre con la 16:0SM y la 24:0SM, no induce segregación de fase en mezclas lipídicas ternarias con DOPC y CHO, e incluso evita la formación de dominios L_o por parte de la 16:0SM (Maté y cols., 2014).

De manera similar a lo que ocurre con el CHO y la SM, la Cer en mezclas binarias con SM da lugar a la formación de dominios lipídicos muy ordenados. Dominios en fase gel ricos en Cer fueron descritos en mezclas de SM de huevo y Cer (Sot y cols., 2006). Estos dominios son mucho más rígidos que los de SM/CHO, debido a que la 16:0Cer pura tiene una alta temperatura de transición, alrededor de 90 °C. En mezclas ternarias de SM, CHO y Cer, la Cer compete con el CHO para formar dominios con la SM. Se observó que la Cer tiene la capacidad de desplazar al CHO de los dominios L_o (Megha y London, 2004). Estudios posteriores han confirmado ese desplazamiento, así como la posible coexistencia de dominios gel de SM/Cer con fases L_o de SM/CHO (Sot y cols., 2008; Chiantia y cols., 2006).

OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la N-nervonil-esfingomielina (24:1SM) en la segregación lateral en modelos de membrana de mezclas cuaternarias con 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DOPC), colesterol y palmitil-ceramida (16:0Cer), con y sin 16:0SM. Siguiendo la línea de un trabajo reciente en el grupo (Maté y cols., 2014), se pretende comprobar si la 24:1SM es capaz de impedir la formación de dominios de Cer del mismo modo que evita que se formen dominios líquido-ordenado SM/CHO. Para este fin, se caracterizan y comparan dos muestras lipídicas modelo: DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1) +30% 16:0Cer y DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer (todas las cantidades en proporciones molares) mediante microscopía confocal, calorimetría diferencial de barrido y microscopía de fuerza atómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los lípidos 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DOPC), N-palmitil-D-*eritro*-esfingosilfosforilcolina (16:0SM), N-nervonil-D-*eritro*-esfingosilfosforilcolina (24:1^{Δ15}SM) y la N-palmitil-D-*eritro*-esfingosina (16:0Cer) fueron comprados a Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, EEUU). El colesterol (CHO) y el nafto[2,3a-]pireno (NAP) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). La N-(Lisamina Rodamina B sulfonil) dioleilfosfatidiletanolamina (Rho-PE) se compró a Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, EEUU).

Microscopía confocal de fluorescencia

Preparación de la muestra: GUVs

Se prepararon vesículas unilamelares gigantes (GUVs) mediante electroformación siguiendo el protocolo descrito por Montes y cols. (2010) sobre un par de alambres de platino montados sobre unos pocillos de PTFE especialmente diseñados. Las disoluciones de lípidos en stock fueron preparadas en cloroformo/metanol 2:1 (v/v) a una concentración de 0.2 mM y se mezclaron los volúmenes apropiados de cada una. El marcaje se llevó a cabo pre-mezclando las sondas fluorescentes escogidas con los lípidos en el disolvente orgánico. Se usó Rho-PE a una concentración de 0.3 mol% como marcador de las fases líquido-desordenado y NAP a una concentración de 0.6 mol% como marcador de las fases líquido-ordenado. Se depositaron 3 y 2 μ l de la mezcla lipídica que contiene las sondas fluorescentes respectivamente sobre cada uno de los alambres de platino y se dejaron al vacío durante 90 min para eliminar el disolvente

orgánico, obteniéndose una fina capa de lípido seco en el fondo del tubo. Los pocillos se montaron en una cámara específica a la que se le pegó con pegamento epoxi previamente un cobre-objetos. La cámara se equilibró durante 15 min a 65 °C y después se añadieron 400 µl de tampón de ensayo (PIPES 20mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, pH 7.4) preparado con agua de alta pureza (Millipore SuperQ) previamente calentado. Las unidades se cubrieron con sus tapas específicas y los alambres de Pt se conectaron a un generador TG330 (Thurlby Thandar Instruments, Huntingdon, Inglaterra). Se aplicó corriente alterna en tres pasos, todos ellos a 65 °C y 500Hz de frecuencia: 1) 210 mV (33 V/m) durante 6 min, 2) 2.5 V (330 V/m) durante 20 min y 3) 7.8 V (770V/m) durante 90 min. La temperatura usada para la formación de los GUV es tal que todos los lípidos se encuentran en fase fluida. Antes de obtener las imágenes, las cámaras se dejaron enfriar durante 1 h a temperatura ambiente.

Microscopía

Las imágenes de los GUVs fueron tomadas mediante microscopía confocal usando un sistema confocal Nikon D-eclipse C1 (Nikon Corporation, Tokio, Japón). Las longitudes de onda empleadas para la excitación fueron 457 nm para el NAP y 561 nm para la Rho-PE. La emisión de fluorescencia fue recogida entre 465 y 505 nm para el NAP y entre 573 y 613 nm para la Rho-PE. Las imágenes fueron tomadas a temperatura ambiente.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Preparación de la muestra: MLVs

Se pipetearon las cantidades necesarias de las disoluciones stock de lípido puro en cloroformo/metanol 2:1 (v/v) a un tubo de ensayo de vidrio y el disolvente orgánico se evaporó colocando la disolución bajo un flujo de nitrógeno gaseoso. A continuación, para eliminar cualquier traza de disolvente orgánico que pudiera quedar, se desecó la muestra al vacío durante 2 h. La mezcla lipídica se hidrató después añadiendo cantidades crecientes de tampón (PIPES 20mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, pH 7.4) a 70 °C, por encima de la temperatura de transición de la muestra y facilitando la mezcla removiendo la muestra con una varilla de vidrio. Finalmente, las vesículas multilamelares (MLVs) generadas se homogenizaron haciendo pasar la muestra 100 veces por un tubo estrecho (10 cm de largo y 0.5 mm de diámetro interno) entre dos jeringas.

Calorimetría diferencial de barrido

Todas las medidas se llevaron a cabo en un microcalorímetro de barrido VP-DSC de alta sensibilidad (MicroCal, Northhampton, MA, EEUU). Tanto las disoluciones de tampón como las de muestra fueron desgasificadas durante 30 min antes de cargar las celdas correspondientes

del calorímetro. En primer lugar se cargaron tanto la celda muestra como la referencia con tampón (el mismo usado para hidratar la muestra) y se realizaron dos barridos de temperatura, para obtener el termograma referencia que posteriormente se substrajo al último barrido. Una vez concluidos, mientras las celdas se enfriaban y equilibraban antes del tercer barrido, el tampón de la celda muestra se recogió y se añadió 1 mM de la muestra lipídica en forma de MLVs. Se llevaron a cabo cinco barridos de temperatura entre 10 y 100 °C a una velocidad de 45 °C/h. Al terminar, se recogió la muestra y se determinó su concentración cuantificando colorimétricamente el fósforo de los lípidos de la muestra (protocolo modificado de Fiske y SubbaRow, 1925). La concentración obtenida se usó junto con los datos del último barrido para obtener los termogramas normalizados. Se utilizó el software Origin 7.0 (MicroCal), provisto con el calorímetro, para determinar los diferentes parámetros de los barridos.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Preparación de la muestra: Bicapas planas apoyadas (supported planar bilayers) (SPBs)

Las SPBs fueron preparadas en soportes de mica de alta calidad V-2 (Asheville-Schoonmaker Mica CO., Newport News, VA, EEUU), previamente adheridas a un cubre-objetos redondo de vidrio de 24 mm utilizando una resina epoxi. Las SPBs se obtuvieron mediante la técnica de adsorción de vesículas (Jass y cols., 2000). Para ello, en primer lugar se prepararon MLVs mezclando las cantidades apropiadas de los lípidos puros necesarios disueltos en cloroformo/metanol 2:1 (v/v), incluyendo 0.5 mol% de Rho-PE para poder obtener imágenes de epifluorescencia. Como se ha explicado anteriormente, el disolvente orgánico se evaporó con nitrógeno gaseoso y la muestra se desecó en una bomba de vacío durante 2 h. A continuación el lípido se hidrató en tampón de ensayo (PIPES 20mM, NaCl 150mM, 1mM, EDTA pH 7.4) preparado con agua muy pura (Millipore Super Q) mientras que se agitaba fuertemente a 70 °C, a una temperatura superior a la transición de fase de la mezcla. Al preparar la muestra de DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer, las vesículas multilamelares (MLVs) generadas espontáneamente se homogenizaron haciendo pasar la muestra 100 veces por un tubo estrecho (10 cm de largo y 0.5 mm de diámetro interno) entre dos jeringas. Después, la muestra se introdujo en un ultrasonador de baño FB-15049 (Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU) y se sometió a ultrasonidos a 70 °C durante 1 h. De esta manera, se generó una proporción de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs). Las SUVs tienen un menor tamaño y un mayor estrés de curvatura que las MLVs, por lo que son más inestables, favoreciéndose así la adsorción y su posterior extensión sobre la mica. Una vez terminada la sonicación, se añadieron 120 µl de tampón de ensayo que contenía CaCl₂ para favorecer la

extensión sobre una mica de 1.2 cm² recién exfoliada y montada sobre una BioCell para medidas de AFM en líquidos (JPK Instruments, Berlín, Alemania). A continuación se añadieron 60 µl de las vesículas sonicadas sobre la mica. La concentración final de lípido fue de 150 µM. La muestra se calentó lentamente hasta los 70 °C y se dejó adsorber y extender 30 min a esta temperatura. Tras este tiempo se dejó estabilizar la muestra a temperatura ambiente durante 20 min y se lavó 10 veces con tampón de ensayo sin CaCl₂ para retirar las vesículas que no hubieran sido adsorbidas. Se dejó una pequeña cantidad de tampón sobre el soporte en todo momento para mantener las SPBs hidratadas. Por último, la BioCell se ajustó a 23 °C y las SPBs se dejaron equilibrar otros 30 min antes de comenzar las medidas.

Imagen mediante AFM

Las medidas se realizaron en “modo de contacto” o “modo de contacto intermitente”, según convenía, en un AFM NanoWizard II (JPK Instruments, Berlín, Alemania) a una temperatura controlada de 23 °C. Se utilizaron voladizos (*cantilevers*) MLCT de nitruro de silicio (Veeco Instruments Inc., Plainview, NY, EEUU) con una constante de fuerza de 0.1 y/o 0.5 N/m. Se obtuvieron imágenes con una resolución de 512 x 512 píxeles con una velocidad de barrido de entre 1 y 1.5 Hz. Las líneas se ajustaron mediante el software JPK Data Processing. Además, también se usó el microscopio de epifluorescencia acoplado al AFM para obtener imágenes.

Espectroscopía de fuerza mediante AFM

Se realizaron experimentos de indentación sobre las SPBs según lo descrito por García-Manyes y Sanz (García-Manyes y Sanz, 2010). Se llevaron a cabo curvas de espectroscopía de fuerza a una velocidad de 1 µm/s sobre las áreas previamente analizadas por imagen, usándose por tanto voladizos de 0.1 y/o 0.5 N/m también. Las fuerzas de rotura se determinaron manualmente para cada una de las curvas fuerza-desplazamiento del piezo-elemento como un salto de 4-6 nm en la señal extendida. Los histogramas resultantes se generaron a partir de ensayos distintos con voladizos diferentes.

RESULTADOS

Segregación lateral en mezclas de DOPC/SM/CHO y Cer

Para estudiar el efecto de la 24:1SM sobre la organización lateral de las mezclas con DOPC, SM, CHO y Cer, se formaron GUVs y se observaron por microscopía confocal. La identificación de la heterogeneidad de las membranas lipídicas en GUVs mediante microscopía de fluorescencia se basa en el uso de marcadores de membrana con diferente coeficiente de partición entre las distintas fases. En este caso se utilizó Rho-PE y NAP. La Rho-PE marca

preferentemente las fases líquido-desordenado (L_d) (de Almeida y cols., 2005), y es excluida de las fases líquido ordenada (L_o) y gel (L_β). El NAP, aunque se puede incorporar tanto en fases L_d como en fases L_o , marca preferencialmente las fases L_o (Juhasz y cols., 2010), y es excluido de las fases gel (L_β).

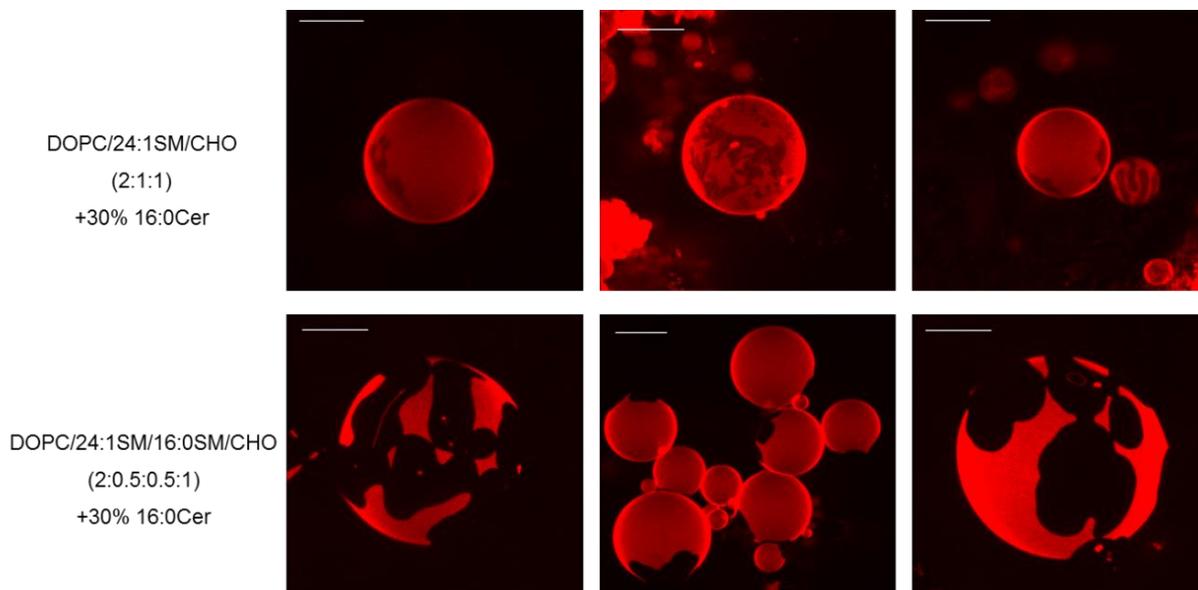


Figura 1. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de GUVs marcadas con Rho-PE. La composición lipídica de las vesículas fue DOPC/SM/CHO (2:1:1) +30% 16:0Cer, con SM 24:1SM en una muestra y una combinación de 24:1SM/16:0SM (0.5/0.5) en la otra. Proporciones molares en todos los casos. Escala: 10 μ m.

Cuando la mezcla contiene únicamente 24:1SM se puede observar (Fig. 1) que, aunque la Rho-PE se inserta en ambas fases, lo hace en mayor medida en una de ellas, la más desordenada, indicando la presencia de dominios. Estos dominios varían en tamaño entre los distintos GUVs debido a la heterogeneidad asociada a la formación de los mismos, ya que unas vesículas contendrán ligeramente mayor proporción de unos lípidos que otras. Por tanto, existen dos fases en la mezcla DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1) +30% 16:0Cer pero es probable que no haya gran diferencia en la fluidez entre ambas. La Fig. 2 muestra que el NAP se inserta de igual manera en toda la mezcla, sin diferenciar ninguna fase. Esto quiere decir que los dominios menos marcados por Rho-PE no son fases L_o , ya que de lo contrario estarían marcados preferencialmente por NAP y por consiguiente lo más probable es que sean fases gel.

En el caso de las vesículas que contienen tanto 24:1SM como 16:0SM, también se detecta la presencia de dominios. Sin embargo, su aspecto difiere de los de la mezcla anterior. En una de las fases de los GUVs de DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer tanto el NAP como la Rho-PE son completamente excluidos (Fig. 2). Esta observación indica que estos dominios son muy rígidos, probablemente en fase gel; tienen un nivel de empaquetamiento tan alto que no dejan que el NAP se inserte, de manera que éste

únicamente marca la fase continua más desordenada, que también queda marcada por la Rho-PE (Fig. 1).

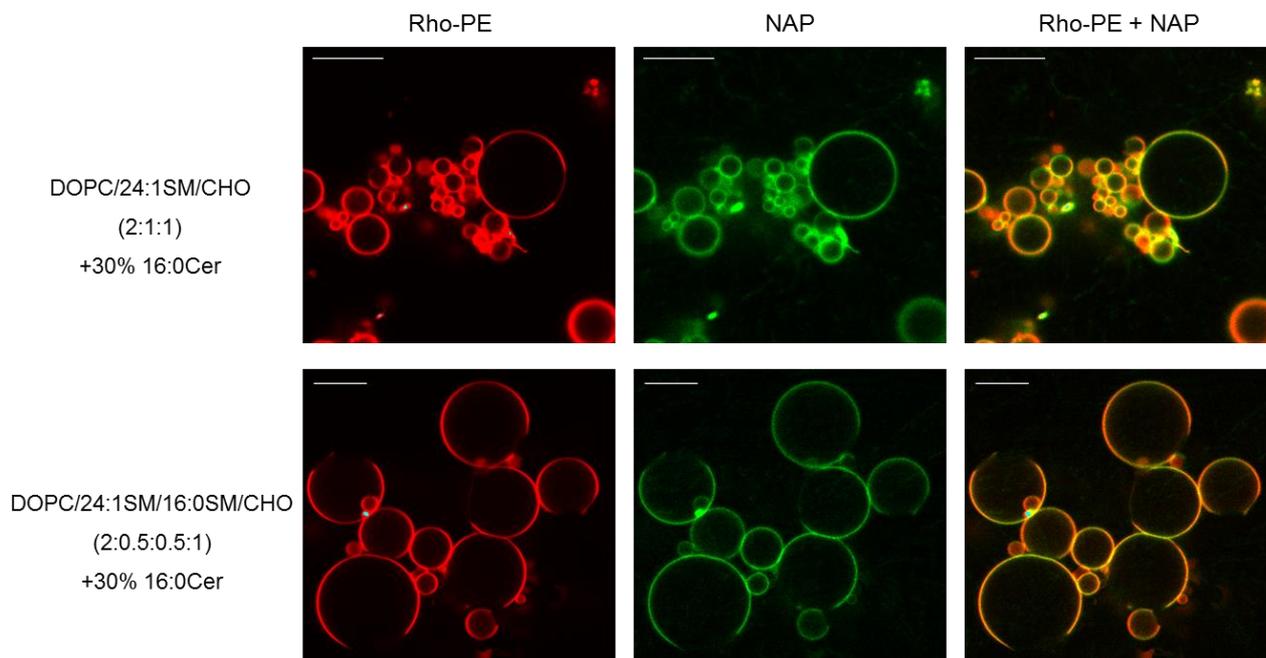


Figura 2. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de **GUVs** marcadas con Rho-PE y NAP. La composición lipídica de las vesículas fue DOPC/SM/CHO (2:1:1) +30% 16:0Cer, con SM 24:1SM en una muestra y una combinación de 24:1SM/16:0SM (0.5/0.5) en la otra. Proporciones molares en todos los casos. Escala: 10 μ m.

Comportamiento termotrópico de mezclas lipídicas que contienen 24:1SM

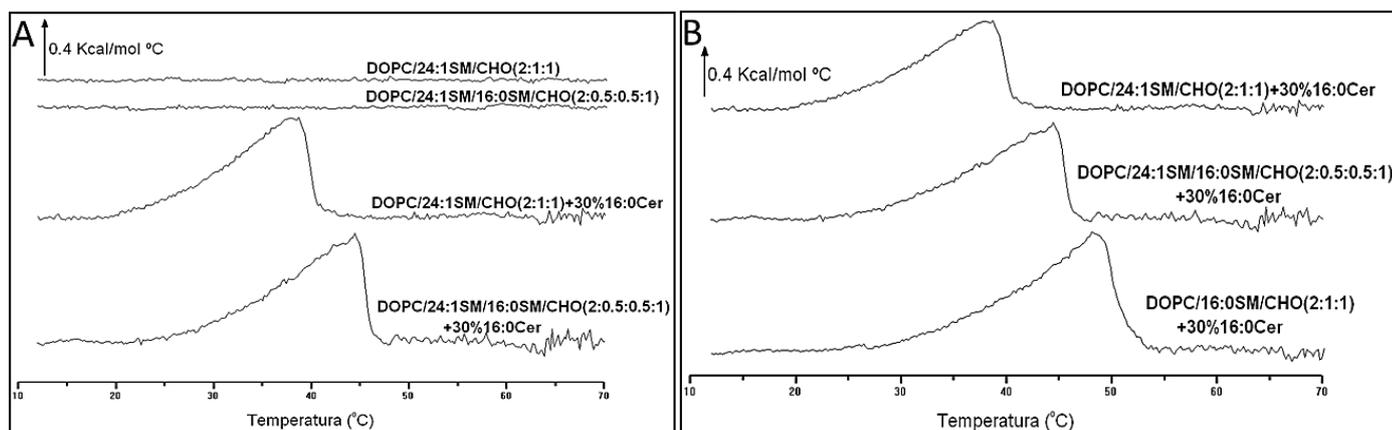


Figura 3. Termogramas de DSC de muestras de DOPC/SM/CHO en ausencia y presencia de 30% de Cer. La mezcla de DOPC/SM/CHO (2:1:1) contenía 24:1SM, 16:0SM o una combinación equimolar de ambas. La composición de la mezcla se indica a la derecha del termograma correspondiente. Proporciones molares en todos los casos.

Se utilizó la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para analizar las propiedades termotrópicas de mezclas de DOPC/SM/CHO en presencia y ausencia de un 30% de 16:0Cer y así comprobar el efecto de las distintas SMs. Todas las mezclas que contienen Cer exhiben señales endotérmicas, mientras que las que no tienen Cer no presentan ninguna transición (Fig. 3A). La temperatura a la que ocurre esa transición (T_m) varía dependiendo de cuál es la SM

presente en la mezcla. La T_m es de 38,7 °C para la mezcla que contiene 24:1SM, 48,6 °C para la de 16:0SM y 44,5 °C para la mezcla que contiene 24:1SM y 16:0SM en una proporción molar 1:1 (Fig. 3B).

Microscopía de fuerza atómica

Con el fin de caracterizar con mayor detalle las muestras anteriormente analizadas, se realizaron experimentos de AFM. Esta técnica permite el estudio de la topografía de la superficie de bicapas lipídicas en ambientes acuosos con una resolución lateral nanométrica, de manera que se pueden visualizar dominios segregados lateralmente (Connel y Smith, 2006). En general se puede decir que cuanto más ordenada sea una región, más altura tendrá.

La Fig. 4A ilustra la topografía de las SPBs preparadas con DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1) y 30% de 16:0Cer. Se observan dominios que sobresalen de la fase continua, como se puede comprobar en el corte seccional que se muestra en la Fig. 4E, lo que se corresponde con los resultados obtenidos mediante las otras técnicas. Dada la buena extensión que se obtuvo, la punta no pudo resolver bien los pocos agujeros que se formaron en la bicapa y por tanto no se pudo medir la altura total de los dominios. Sin embargo, se calculó el grosor relativo de éstos con respecto a la fase continua, que era de $0,76 \pm 0,04$ nm (Fig. 4F). Además, la presencia de dominios en esta mezcla, que se marcó con Rho-PE, también se corroboró mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 4B). Se observa la segregación de fases, ya que la Rho-PE no se inserta en los dominios que se detectan más altos por AFM.

Por otro lado, en la Fig. 4C se puede ver la topografía de la superficie de las bicapas de DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer. En este caso también se detectan dominios de mayor altura que la fase continua, según lo esperado. Las zonas más oscuras que se observan en la Fig. 4C corresponden a agujeros en la SPB, en los que se observa directamente la mica. Estos agujeros son de 4-5 nm, como se observa en perfil de altura de la Fig. 4G, que se corresponde con el grosor de la bicapa. La presencia de estos agujeros indica una extensión menos eficiente que en la muestra anterior. Esto revela que la rigidez de la membrana de los SUVs que se extienden es mayor y por tanto se impide una óptima extensión, como se comprueba a continuación mediante la espectroscopía de fuerzas (Fig. 5). El grosor relativo de éstos respecto a la fase continua es de $1,1 \pm 0,12$ nm (Fig. 4H). En comparación con los dominios de la muestra anterior, los dominios de esta mezcla con 24:1SM y 16:0SM son más altos con respecto a la fase continua. La segregación lateral de esta muestra también se observó mediante microscopía de epifluorescencia ya que los dominios excluían la Rho-PE (Fig. 4D).

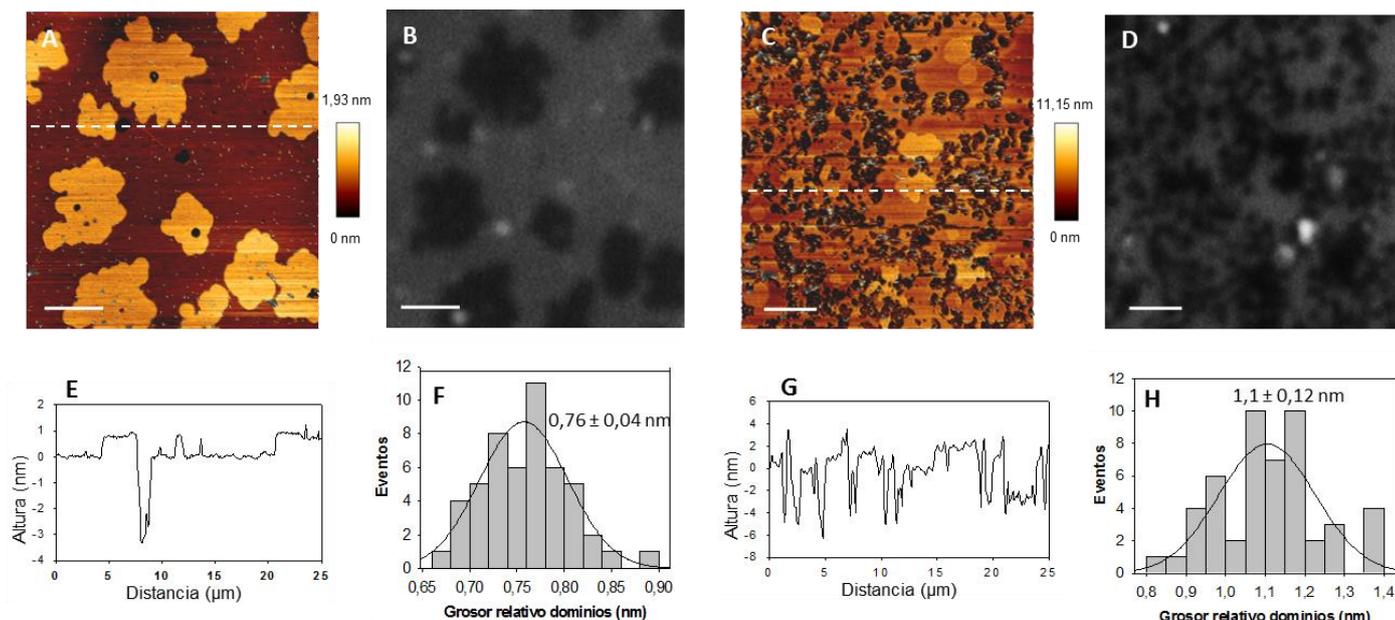


Figura 4. Información topográfica de bicapas planas apoyadas obtenida por AFM. Información topográfica de SPBs de dos mezclas lipídicas: DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1) +30% 16:0Cer (A, B, E y F) y DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer (C, D, G y H). (A y C) Imágenes de AFM de las SPBs. (B y D) Imágenes de epifluorescencia de las mezclas marcadas con Rho-PE. (E y G) Secciones de corte (perfiles de altura) de las líneas punteadas de las imágenes A y B. (F y H) Histogramas de los grosores relativos de los dominios respecto a la fase continua. Valores medios \pm DS ($n = 50$ en ambos casos). Escala: $5\mu\text{m}$.

Para estudiar las propiedades nanomecánicas de las muestras descritas arriba, se llevaron a cabo experimentos de espectroscopía de fuerza por AFM. Para ello se realizaron indentaciones en las bicapas, que proporcionaron curvas de fuerza. La fuerza de rotura (F_b) es una propiedad de las bicapas que depende en gran medida de la composición química de la bicapa y representa la fuerza máxima que la bicapa soporta antes de romperse, por lo que se usa como medida de la estabilidad mecánica (García-Manyes y Sanz, 2010).

La Fig. 5A muestra las curvas de fuerza representativas que se obtuvieron para las dos fases de la mezcla de DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1) y 30% de 16:0Cer. A partir del ajuste gaussiano de los datos se obtuvo la fuerza de rotura media de cada fase, $2,54 \pm 0,37$ nN para la fase continua y $10,2 \pm 0,7$ nN para los dominios (Fig. 5C). La mayor F_b de las regiones más altas refleja el mayor empaquetamiento de esta fase. En las bicapas de DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer se midió una F_b de $5,29 \pm 2,1$ nN para la fase continua y $49,1 \pm 3,62$ nN para los dominios (Fig. 5D), cuyas curvas modelo se muestran en la Fig. 5B. Estos resultados reflejan la mayor rigidez de los dominios de la mezcla que contiene 24:1SM y 16:0SM con respecto de la que tiene solamente 24:1SM. Además, también la fase continua de la muestra con 24:1SM y 16:0SM es menos fluida que la que tiene 24:1SM como única SM. Estos resultados corroboran lo dicho anteriormente.

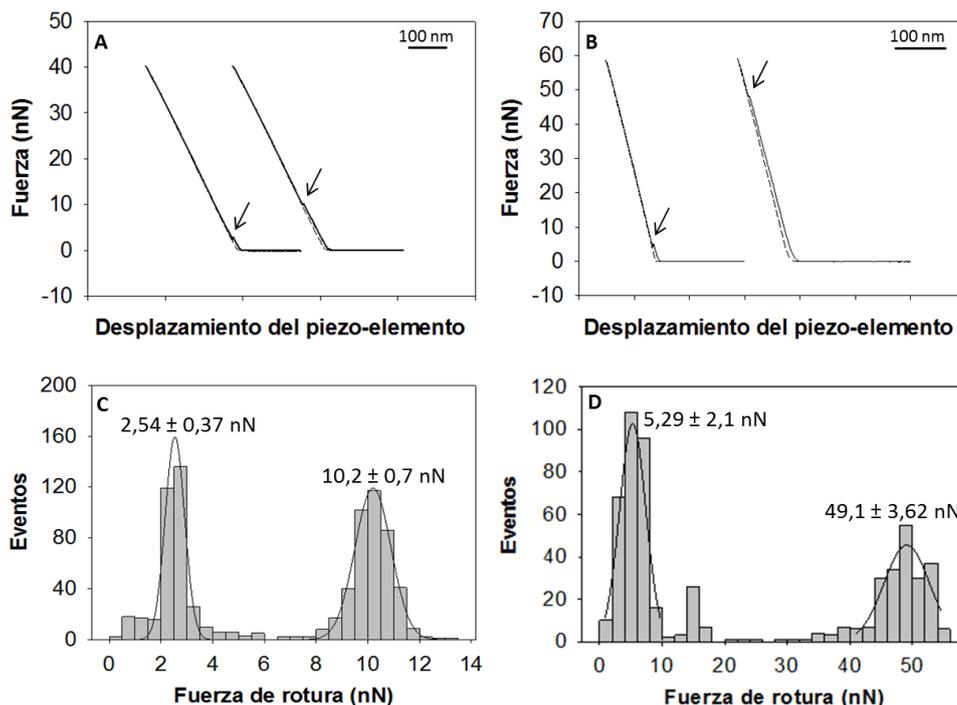


Figura 5. Propiedades nanomecánicas de bicapas planas apoyadas obtenida mediante espectroscopía de fuerza por AFM. Curvas de fuerza representativas de SPBs de DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1) +30% 16:0Cer (A) y DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer (B). Histogramas de la distribución de la fuerza de rotura de las bicapas de DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1) +30% 16:0Cer ($n = 794$) (C) y DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer ($n = 561$) (D). Las cifras corresponden a valores medios \pm DS.

DISCUSIÓN

A pesar de que la 24:1SM es una SM común en las membranas naturales, pocos estudios han abordado su interacción con otros lípidos y su efecto sobre la formación de dominios (Slotte, 1999; Björkqvist y cols., 2009; Jiménez-Rojo y cols., 2014). En una reciente investigación en este laboratorio (Maté y cols., 2014), se ha descubierto que la 24:1SM es incapaz de formar dominios L_0 en presencia de DOPC y CHO, evitando además la formación de dominios L_0 por parte de la 16:0SM. La insaturación de la cadena N-acídica es la responsable, al menos en parte, de evitar la segregación de fases. En el presente trabajo, sin embargo, se ha demostrado que, en presencia de 16:0Cer, la 24:1SM no es capaz de impedir la formación de dominios en mezclas con DOPC, CHO. Tanto las imágenes de microscopía confocal como los experimentos de DSC y AFM demuestran la heterogeneidad lateral de las mezclas lipídicas analizadas.

Varios grupos han estudiado el efecto de la Cer sobre dominios L_0 de SM y CHO. Chiantia y cols. (2006) demostraron la coexistencia de 3 fases diferenciadas en mezclas de DOPC/SM/CHO (1:1:1) y más de 4% de 18:0Cer: una fase líquido-desordenada enriquecida en DOPC, dominios L_0 de 18:0SM y CHO y dominios gel ricos en 18:0Cer. Sot y cols. (2008)

obtuvieron resultados similares. Comprobaron que la Cer de huevo desplaza al CHO de los dominios L_0 enriquecidos en CHO y SM de huevo, formando dominios gel insertados en los dominios L_0 . Posteriormente, sin embargo, se vio que la 16:0Cer puede interactuar con el CHO en circunstancias concretas muy saturantes, sin que haya un desplazamiento de un lípido sobre el otro (Busto y cols., 2014). En este trabajo se ha observado que las mezclas tanto de DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1) +30% 16:0Cer como de DOPC/24:1SM/16:0SM/CHO (2:0.5:0.5:1) +30% 16:0Cer se segregan en dos fases.

Las imágenes de microscopía confocal de GUVs de ambas mezclas muestran la presencia de dos fases lipídicas, una más rígida que la otra. Los dominios rígidos de la mezcla que contiene únicamente 24:1SM son más desordenados que los de la mezcla que contiene 24:1SM/16:0SM, ya que excluyen en menor medida la Rho-PE (Fig. 1) y permiten la incorporación del NAP (Fig.2).

La calorimetría diferencial de barrido ha permitido analizar las propiedades termotrópicas de las mezclas lipídicas de DOPC/SM/CHO (2:1:1) y 30%16:0Cer. En la Fig. 3 se puede observar que sólo se detectan picos endotérmicos en las mezclas que contienen Cer. La tendencia que tiene la Cer de formar interacciones con la SM (Megha y London, 2004; Sot y cols., 2006; Sot y cols., 2008; Jiménez-Rojo y cols., 2014) sugiere que esas señales son debidas a la existencia de dominios de SM/Cer. Así, los picos endotérmicos se deberían a la transición gel-fluido de los dominios de SM/Cer. En concordancia con lo observado en GUVs, los dominios de SM/Cer de la mezcla con 24:1SM tienen una T_m menor que los de la mezcla que contiene tanto 24:1SM como 16:0SM (38,7 °C frente a 44,5 °C); lo que indica que son más fluidos. Teniendo en cuenta que la T_m de la mezcla únicamente con 16:0SM es aún mayor (48,5 °C), se puede afirmar que la rigidez de estos dominios de SM/Cer disminuye al aumentar la proporción de 24:1SM.

El estudio de la topografía de las bicapas por AFM (Fig. 4) y los experimentos de espectroscopía de fuerza (Fig. 5) revelan que los dominios de 24:1SM/16:0SM/Cer son más rígidos que los de 24:1SM/Cer. De manera coherente con lo observado en GUVs, en ambas mezclas se detectan dos fases lipídicas. Las dos fases que coexisten son gel y fluido. Estos resultados en conjunto sugieren que la 16:0Cer tiene una interacción preferente con la 16:0SM respecto a la 24:1SM. En concordancia con los resultados anteriores, los dominios de SM/Cer de la mezcla que contiene tanto 24:1 SM como 16:0SM son más rígidos que los de la mezcla con 24:1SM, ya que tienen una mayor altura frente a la fase continua ($1,1 \pm 0,12$ nm frente a $0,76 \pm 0,04$ nm) y una mayor fuerza de rotura ($49,1 \pm 3,62$ nN frente a $10,2 \pm 0,7$ nN). Además, la fase desordenada (continua) de la mezcla con las dos SMs es más rígida que la de la mezcla

en la que sólo hay 24:1SM, al tener una fuerza de rotura de $5,29 \pm 2,1$ nN frente a $2,54 \pm 0,37$ nN. Esto sugiere que el dominio de SM/Cer en la mezcla con ambas SMs estaría enriquecido en 16:0Cer y 16:0SM, quedando parte de la 24:1SM en la fase continua. De hecho, el valor de fuerza de rotura de la fase continua de la mezcla que contiene ambas SMs, $5,29 \pm 2,1$ nN, es un valor similar al obtenido por Maté y cols. (2014) en una mezcla de DOPC/24:1SM/CHO (2:1:1), que fue de $8.0 \pm 2,1$ nN. La diferencia podría deberse a que aunque la Cer tenga una preferencia por la 16:0SM, hay tanta Cer en la mezcla que también se recluta 24:1SM en el dominio, de manera que se reduce la proporción de 24:1SM en la fase continua, reduciendo su rigidez.

Hasta el momento se conoce poco sobre la función de la 24:1SM. Existen algunos tejidos y células animales que han evolucionado de manera que contienen altas proporciones de esta molécula larga e insaturada en sus membranas, como por ejemplo el cerebro bovino (Boegheim y cols., 1983), las células HL-60 (Fitzgerald y cols., 1995) o los eritrocitos de oveja (Slotte, 2013). Puede que en los eritrocitos de oveja, al no tener PC, la 24:1SM sea necesaria para aumentar la fluidez de las membranas. Además, la naturaleza larga e insaturada de la 24:1SM podría tener un efecto significativo en la interacción con las proteínas de membrana. Este interesante lípido podría servir de ejemplo para entender por qué son necesarios esfingolípidos con estructuras complejas (Jiménez-Rojo y cols., 2014).

Para continuar con la línea de estudio y conocer el papel de las SMs insaturadas en la segregación de fases en las membranas celulares, el próximo paso sería realizar estos mismos experimentos con 24:1Cer, que es el subproducto de la 24:1SM, así como con una combinación de 24:1Cer y 16:0Cer. De esta manera se conseguiría imitar mejor las condiciones de las membranas naturales, en las que se genera Cer a causa de la hidrólisis de la SM por parte de las esfingomielinasas en los primeros pasos de la vía de señalización mediante esfingolípidos. Por otro lado, también se podría variar la concentración de Cer en la mezcla, a fin de comprobar si el efecto observado se produce también a concentraciones de Cer menores, similares a las concentraciones fisiológicas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha examinado la influencia de la 24:1^{Δ15}SM en la organización lateral y la estabilidad nanomecánica de membranas modelo. La principal conclusión es que la 24:1SM no impide la formación de dominios gel con la 16:0SM, al contrario de lo que ocurría en mezclas ternarias DOPC/24:1SM/CHO. En presencia de DOPC, CHO y 16:0Cer, se forman

dominios 24:1SM/Cer así como dominios 24:1SM/16:0SM/Cer, y éstos últimos resultan ser más rígidos.

REFERENCIAS

- *Björkqvist YJ, Brewer , Bagatolli LA, Slotte JP, Westerlund B (2009). Thermotropic behavior and lateral distribution of very long chain sphingolipids. *Biochim Biophys Acta*. **1788**: 1310-1320.
- *Boegheim JPJ, van Linde M, op den Kamp JAF, Roelofsens B (1983). The sphingomyelin pools in the outer and inner layer of the human erythrocyte membrane are composed of different molecular species. *Biochim. Biophys. Acta*. **735**: 438-442.
- *Busto JV, García-Arribas AB, Sot J, Torrecillas A, Gómez-Fernández JC, Goñi FM, Alonso A (2014). Lamellar gel (I β) phases of ternary lipid composition containing ceramide and cholesterol. *Biophys J*. **106**: 621-630.
- *Chiantia S, Kahya N, Ries J, Schwille P (2006). Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS. *Biophys J* **90**: 4500-4508.
- *Connell SD and Smith DA (2006). The atomic force microscope as a tool for studying phase separation in lipid membranes. *Mol Membr Biol*. **23**: 17-28.
- *de Almeida RF, Loura LM, Fedorov A, Prieto M (2005). Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J Mol Biol*. **346**: 1109-1120.
- *Engelman DM (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**: 578-580.
- *Fiske CH, SubbaRow Y (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**: 375-400.
- *Fitzgerald V, Blank ML, Snyder F. (1995). Molecular species of sphingomyelin in sphingomyelinase-sensitive and sphingomyelinaseresistant pools of HL-60 cells. *Lipids*. **30**: 805-809.
- *García-Manyès S, Sanz F (2010). Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: a perspective. *Biochim Biophys Acta* **1798**: 741-749.
- *Giocondi MC, Yamamoto D, Lesniewska E, Milhiet PE, Ando T, Le Grimmelc C (2010). Surface topography of membrane domains. *Biochim Biophys Acta*. **1798**: 703-718.
- *Goñi FM (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochim Biophys Acta*. **1838**: 1467-1476
- *Goñi FM, Alonso A (2002). Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett* **531**: 38-46
- *Gorter E, Grendel F (1925). On biomolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med* **41**: 439-443.
- *Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med*. **180**:525-35.
- *Jass J, Tjarnhage T, Puu G (2000). From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J* **79**: 3153-3163.
- *Jiménez-Rojo N, García-Arribas AB, Sot J, Alonso A, and Goñi FM (2014). Lipid bilayer containing sphingomyelins and ceramides of varying N-acyl lengths: A glimpse into sphingolipid complexity. *Biochim Biophys Acta*. **1838**: 456-464.
- *Juhasz J, Davis JH, Sharom FJ (2010). Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of 'lipid raft' mixtures. *Biochem. J*. **430**: 415-423.
- *Maté SM, Busto JV, García-Arribas AB, Sot J, Vázquez RF, Herlax VS, Wolf C, Bakás LS, Goñi FM (2014). N-nervonoylsphingomyelin (C24:1) prevents lateral heterogeneity in cholesterol-containing membranes. *Biophys J*. **106**: 2606-2616.
- *Megha, London E (2004). Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem* **279**: 9997-10004.
- *Montes LR, Ahyayauch H, Ibarguren M, Sot J, Alonso A, Bagatolli LA, Goñi FM (2010). Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures for the Study of Lipid Domains under Physiological Ionic-Strength Conditions. In *Liposomes: Methods and protocols Volumen 2: Biological membrane models. Springer protocols, Methods in Molecular Biology 606, Chapter 9*:105-114. Volkmar Weissig (Ed) Humana Press (EEUU)
- *Morales A, Lee H, Goñi FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC (2007). Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* **12**: 923-939.
- *Quinn PJ, Wolf C (2009). Thermotropic and structural evaluation of the interaction of natural sphingomyelins with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*. **1788**: 1877-89.
- *Simons K, Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
- *Singer SJ, Nicolson GL (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- *Slotte JP (1999). Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes. *Chem. Phys. Lipids*. **102**:13-27.
- *Slotte JP (2013). Molecular properties of various structurally defined sphingomyelins - correlation of structure with function. *Prog Lipid Res*. **52**: 206-219.
- *Sot J, Bagatolli LA, Goñi FM, Alonso A (2006). Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. *Biophys J* **90**: 903-914.
- *Sot J, Ibarguren M, Busto JV, Montes LR, Goñi FM, Alonso A (2008). Cholesterol displacement by ceramide in sphingomyelin-containing liquid-ordered domains, and generation of gel regions in giant lipidic vesicles. *FEBS Lett* **582**: 3230-3236.