

FRET EN EL ESTUDIO DE HETEROGENEIDADES MEMBRANALES DISTINTAS DE LOS "RAFTS".

Fernández, Marta S. y Vallejo, Alba A., Depto. de Bioquímica, CINVESTAV del I.P.N., Ave. Politécnico 2508, Zacatenco, 07360 México D. F. Fax (55) 57473391; Correo electrónico <msfernandez@cinvestav.mx>.

La visión actual de las membranas biológicas no considera ya a la fase lipídica como un fluido bidimensional uniforme en el que se insertan las proteínas. Cada vez hay más evidencias sobre la organización de los lípidos que da lugar a la microestructuración de las membranas en su perfil lateral. La estructuración lateral de los lípidos tiene que ver con la presencia de heterogeneidades o dominios, los más famosos de los cuales son los "rafts". Sin embargo, recientemente se ha reconocido que aún cuando son muy importantes, no todas las heterogeneidades o dominios son "rafts" de manera que existe ya una categoría que, por exclusion, reconoce la existencia de los "non-raft domains"⁽¹⁾. La definición de las heterogeneidades se maneja operacionalmente. En nuestro laboratorio utilizamos la pendiente de los espectros de polarización generalizada del Laurdan (GPS)⁽²⁾ y el FRET para reconocerlas. La formación de dominios puede ser un proceso dinámico que se origina en la actividad interfacial de enzimas. Trabajamos con la fosfolipasa A₂ que cataliza la hidrólisis del enlace *sn*-2 de los fosfolípidos y que presenta una actividad marcadamente mayor sobre los sustratos organizados respecto a los monoméricos, fenómeno que se conoce como activación interfacial. Los productos de la acción enzimática permanecen en la membrana y pueden sufrir segregación lateral. En este trabajo medimos la eficiencia de la fluorescencia debida a transferencia de energía resonante (FRET) utilizando un donador (D) derivado del NBD y un aceptor (A) derivado de la rodamina. Ninguno de estos fluoróforos es sustrato de la enzima pero uno de ellos, es un análogo del ácido graso generado en la hidrólisis. Cabe señalar que existen estudios de la actividad de la PLA₂ por FRET utilizando sustratos de la enzima marcados con donador y aceptor habiéndose empleado también la PLA₂ marcada. Sin embargo, en nuestro caso, al usar monitores que no son sustrato, cualquier efecto generado por la acción enzimática debe ser indirecto por lo que consideramos que de esta manera estamos separando el fenómeno de reorganización lateral de sustrato y productos, del fenómeno catalítico. Describimos dos métodos para evaluar el significado de los cambios de eficiencia (E) del FRET durante la hidrólisis de liposomas. Un procedimiento simple basado en el uso de una sola relación molar de aceptor/donador (A/D) y otro más completo que evalúa la dependencia de la eficiencia de la transferencia (E) con la relación A/D a concentración constante de donador. Establecemos las condiciones para la correspondencia entre el método sencillo y el complejo. En ambos casos, nuestros resultados sobre el cambio de la relación efectiva de aceptor a donador durante la hidrólisis, son compatibles con la generación de heterogeneidades en la membrana lipídica, Estas heterogeneidades están asociadas a la organización lateral de los productos en la matriz lipídica.

[1] S.R. Shaikh, M.A. Edidin, Chem Phys. Lipids 144 (2006) 1-3.

[2] A.A. Vallejo, J.B. Velázquez, M.S. Fernández, Arch. Biochem Biophys. 466 (2007) 145-154.