

Biofísica de membranas

Membranas

Características generales

Las membranas biológicas desempeñan un papel fundamental en la estructura y en la función de todas las células, tanto procariotas como eucariotas (**Figura 1**). La membrana plasmática participa en una infinidad de procesos celulares (reconocimiento, señalización...). Además envuelve y delimita la célula, creando así una barrera de permeabilidad selectiva para la mayoría de los solutos. Esta permeabilidad permite a la célula un intercambio de materia, energía e información con el medio extracelular. Además, en organismos eucariotas, los diferentes compartimentos celulares como son el núcleo, mitocondrias, cloroplastos, retículo plasmático y aparato de Golgi entre otros están igualmente delimitados por una membrana.

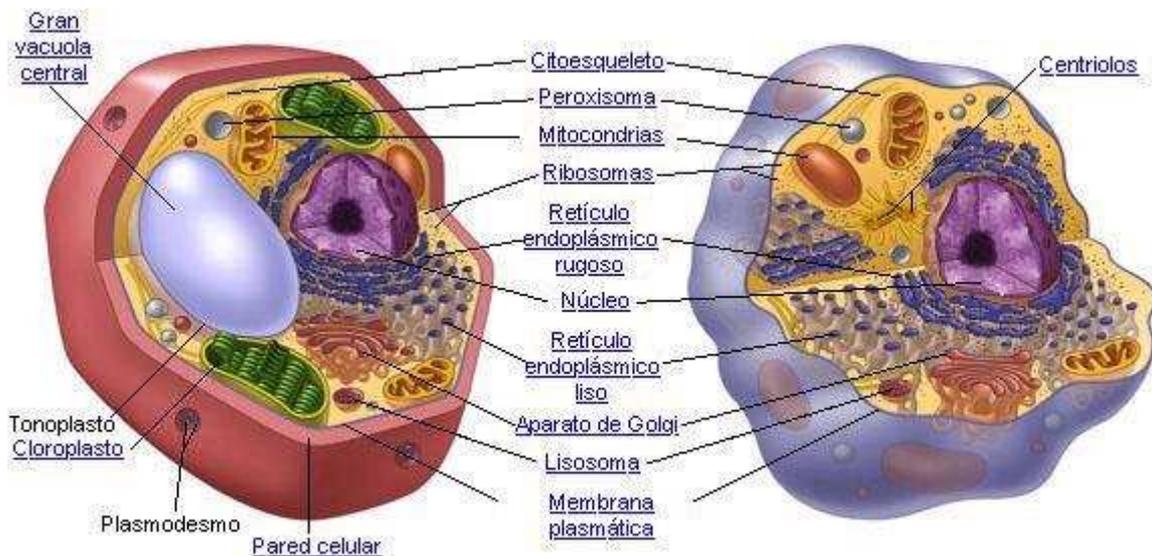


Figura 1 Imagen de una célula vegetal y una célula animal.

Composición de las membranas biológicas

Su estructura básica consta de una bicapa lipídica, formada por fosfolípidos, que actúa como un soporte en el cual se insertan numerosas moléculas como canales iónicos, receptores químicos, transportadores, bombas iónicas, enzimas que generan segundos mensajeros, proteínas de reconocimiento y de conexión con otras células, o proteínas que sirven de

soporte a elementos del citoesqueleto. Esta construida de diferentes elementos, proteínas, fosfolípidos y esteroides. Los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidiletalona, fosfatidilserina y la esfingomielina constituyen más del 50 % de los fosfolípidos de la mayoría de las biomembranas. Los esteroides, como el colesterol, tienen un papel importante en la regulación de las propiedades físico-químicas de las membranas biológicas regulando su resistencia y fluidez. La cantidad relativa de estos componentes y también los tipos de lípido varía de membrana a membrana.

Modelos propuestos

Los primeros trabajos que se hicieron para conocer las características de la membrana se remontan al año 1895 [Overton, 1895] por Ernest Overton. Éste observó que había una difusión de sustancias no polares a través de la membrana celular y por eso postuló que la célula estaba envuelta por una estructura lipídica. Ya en 1925, Gorter y Grendel [Gorter, 1925] observaron que el área ocupada en una superficie de agua por los lípidos extraídos de eritrocitos era el doble del área calculada para la superficie celular, por lo que dedujeron que la membrana está formada por una bicapa lipídica. Diez años más tarde James Danielli y Hugh Davson [Danielli y Davson, 1935] propusieron el modelo de “sándwich” donde describían a la membrana como una bicapa lipídica rodeada por sendas monocapas de proteínas globulares.

El modelo actual que describe la organización estructural de la membrana plasmática fue propuesto en 1972 por los científicos Jonathan Singer y Garth Nicolson [Singer y Nicolson, 1972]. Este modelo describe la membrana plasmática como un mosaico fluido que contiene diversas proteínas insertadas en una matriz de fosfolípidos. Los fosfolípidos en la membrana forman una bicapa lipídica con las cabezas polares dirigidas hacia el exterior y las colas hidrofóbicas hacia el interior de la bicapa. Tiene un grosor aproximado de 75 Å, por ello no es posible visualizarla al microscopio óptico pero sí con el microscopio electrónico, a través del cual la membrana plasmática se muestra, cuando se utilizan técnicas de tinción positiva, como una estructura formada por dos líneas oscuras laterales y una central más clara.

Propiedades de la membrana

La membrana plasmática es un mosaico de diferentes tipos de proteínas (generalmente glicoproteínas) insertadas en una bicapa de fosfolípidos. El conjunto se mueve en el plano de la membrana como si fuera un fluido, de ahí

el nombre que recibe este modelo de estructura: mosaico fluido (**Figura 2**). Así pues, todas las membranas biológicas son entidades dinámicas, es decir, estructuras fluidas, pues la mayoría de sus lípidos y proteínas son capaces de moverse en el plano de la membrana, además de sufrir un continuo recambio de componentes. Así, existen cuatro tipos de movimientos de lípidos a través de la bicapa: difusión lateral, rotación sobre el eje mayor, flexión y flip-flop.

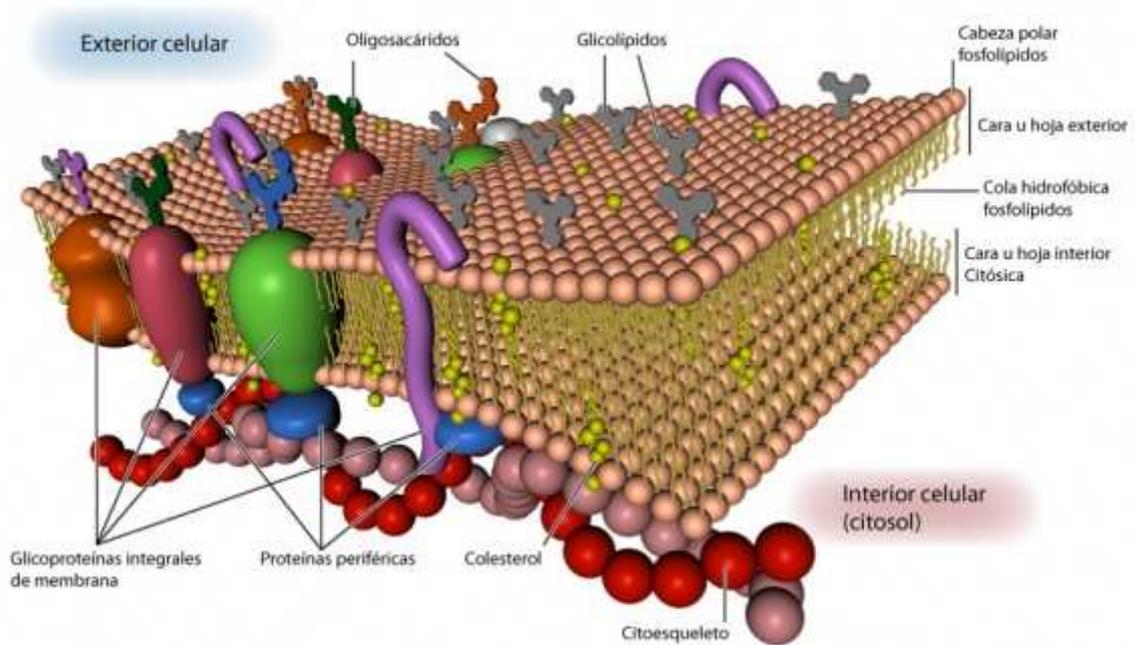


Figura 2 Modelo de mosaico fluido de la membrana plasmática.

La membrana plasmática es una estructura asimétrica formada por dos monocapas lipídicas. La monocapa externa que está orientada hacia el medio extracelular y la monocapa interna, orientada hacia el citosol, tienen distinta composición, distribución de fosfolípidos y colesterol y la organización de las proteínas asociadas a la membrana también puede variar. La cara externa de la membrana plasmática está compuesta principalmente de fosfatidilcolina y esfingomiélin, mientras que la fosfatidietilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol son los fosfolípidos predominantes de la cara interna o citosólica. Los oligosacáridos unidos a lípidos (glicolípidos) y a las proteínas integrales de membrana (glicoproteínas) se orientan siempre hacia el exterior celular.

Modificaciones

En los últimos años se han propuesto unas modificaciones al modelo de Singer y Nicolson [Singer y Nicolson, 1972] (**Figura 3**). (i) La densidad proteica de la membrana parece que es mayor de la que Singer y Nicolson propusieron. (ii) La distribución de los lípidos y proteínas de la membrana no es homogénea, sino que existen interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína que favorecen ciertas interacciones y además favorecen la formación de dominios proteolípídicos. (iii) La membrana no es tan fluida como se pensaba sino que la difusión lateral de proteínas y lípidos está restringida por los dominios y por interacciones con el citoesqueleto. (iv) Existen proteínas que atraviesan la membrana y cuya zona hidrofóbica es mayor que la bicapa de fosfolípidos. El modelo actual plantea que no son las proteínas las que se adaptan al grosor de la membrana sino que son los lípidos los que principalmente se adaptan al grosor que imponen las proteínas.

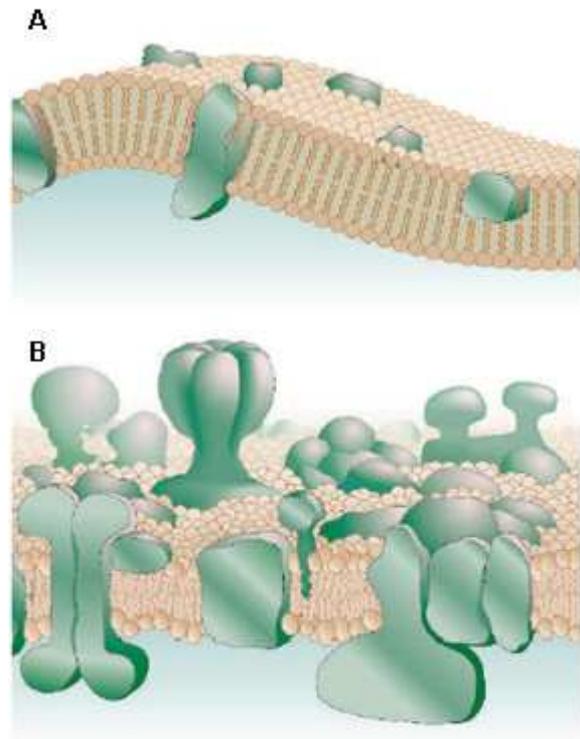


Figura 3 Modelos de estructura de la membrana. (A) Modelo de mosaico fluido de Singer-Nicolson. **(B)** Modelo Singer-Nicolson modificado. Adaptado de [Engelman, 2005].

Proteínas de membrana

La cantidad relativa de los componentes varía de membrana a membrana (**Tabla 1**). Las membranas tienen entre un 20-80 % (p/p) de proteína, que es el componente que desempeña la mayoría de las funciones activas de la membrana.

En el artículo de Singer y Nicolson sobre el modelo de mosaico fluido se hizo una clasificación de proteínas de membrana que perdura hasta la actualidad y que se basa en la facilidad con la que se disocian las proteínas de la bicapa lipídica. Existen dos grupos: las periféricas y las integrales. Las periféricas son proteínas que están débilmente ancladas a la membrana y que se disocian de la misma con tratamientos suaves como es la adición de algún

agente quelante o el incremento de la fuerza iónica del medio. Las proteínas integrales requieren tratamientos más drásticos, como el uso de detergentes, sales biliares o disolventes orgánicos.

Tabla 1 Composición de algunas membranas biológicas

Membrana	Proteína (%)	Lípido (%)	Carbo-hidrato (%)	Relación proteína/lípido
Membranas plasmáticas				
Células hígado de ratón	46	54	2-4	0,85
Eritrocitos humanos	49	43	8	1,1
Ameba	52	42	4	1,3
Envoltura nuclear de hígado de rata	59	35	2	1,6
Membrana mitocondrial externa	52	48	2-4	1,1
Membrana mitocondrial interna	76	24	1-2	3,2
Mielina	18	79	3	0,23
Bacteria Gram positiva	75	25	10	3
Membrana de <i>Halobacterium</i>	75	25		3

También existe otra clasificación de proteínas de membrana teniendo en cuenta la manera en que están unidas a ella (**Figura 4**):

1.- Proteínas transmembranales, son aquellas que atraviesan completamente la bicapa. Pueden poseer un solo segmento transmembrana como en el caso de la glicoforina, o varios como el centro de reacción fotosintético bacteriano [White y Wimley, 1999].

2.- Proteínas que se unen a la membrana mediante un anclaje. Existen proteínas que poseen ácidos grasos (ácido mirístico, ácido palmítico) o fosfolípidos (glicosilfosfatidilinositol) unidos covalentemente y a través de los cuales se anclan a la membrana. Ejemplos de este tipo son la esfingomielinasa neutra de tipo 2 (nSMasa2) [Tani y Hannun, 2007] y la escramblasa [Zhao y cols., 1998], ambas con residuos de cisteína palmitilados. También existen otras proteínas que se unen a la membrana por medio de un segmento de aminoácidos apolares, como la proteína TrwB de *Escherichia coli* [Hormaeche y cols., 2004].

3.- Proteínas que interaccionan con la superficie de la bicapa. Esta interacción puede ser electrostática, como la proteína básica de la mielina [Cajal y cols., 1997] o hidrofóbica como las esfingomielinasas bacterianas [Ago y cols., 2006] y la α -hemolisina de *E. coli* [Sanchez-Magraner y cols., 2006].

4.- Proteínas que interaccionan con otras proteínas unidas a la membrana, como ocurre con la porción F_1 de la ATP sintasa que se une a la porción transmembranal F_0 [Weber, 2006] o la proteína del citoesqueleto espectrina que se ancla a la monocapa interna por medio de la unión a otras proteínas de la membrana eritrocitaria [Goodman y cols., 1988].

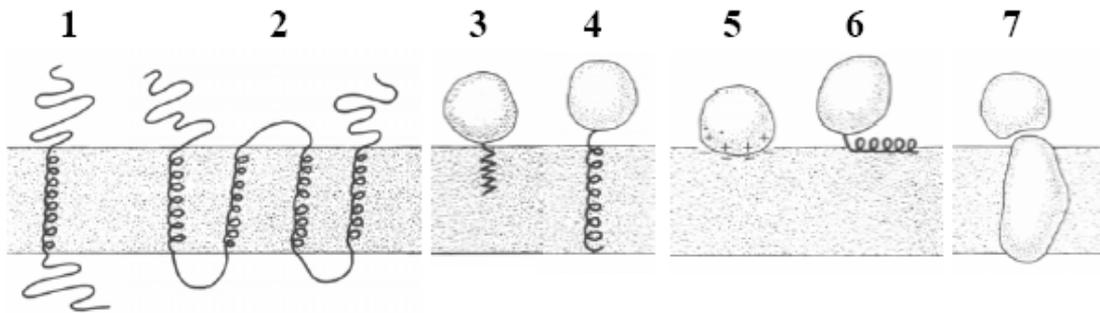


Figura 4 Esquema de las distintas formas de unión de las proteínas a la membrana. (1) Proteínas transmembranales con uno o (2) varios segmentos transmembranales. (3) Proteínas que se anclan a la membrana por medio de un lípido unido covalentemente o (4) a través de una porción hidrofóbica de la propia proteína. (5) Unión a la superficie de la membrana mediante fuerzas electrostáticas, (6) mediante interacciones hidrofóbicas o (7) mediante la interacción con otra proteína. Adaptada de [Gennis, 1989].

5.- Proteínas que se unen transitoriamente a la membrana, por lo general son proteínas solubles y en condiciones específicas se insertan y/o se translocan a la membrana. El contacto con la membrana puede ser irreversible como la toxina bacteriana aerolisina [Parker y Feil, 2005] o reversible como la quinasa activada por la ceramida [Yan y cols., 2001]. Por otro lado, teniendo en cuenta el tipo de interacción puede ser débil, como la TrwD [Jaken y Parker, 2000], o fuerte con modificaciones covalentes en los lípidos como las fosfolipasas [Davies y cols., 2001], o fuerte pero sin modificaciones covalentes, como es el caso de la toxina RTX [Wang y cols., 2000].

Lípidos

-Características generales:

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Tienen como característica principal el ser insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como la bencina, el alcohol, el benceno y el cloroformo.

Los lípidos son biomoléculas muy diversas; unos están formados por cadenas alifáticas saturadas o insaturadas, en general lineales, pero algunos tienen anillos, los aromáticos. Algunos son flexibles, mientras que otros son rígidos o semiflexibles hasta alcanzar casi una total flexibilidad molecular; algunos comparten carbonos libres y otros forman puentes de hidrógeno.

La mayoría de los lípidos tiene algún tipo de carácter polar, además de poseer una gran parte apolar o hidrofóbico. De una molécula que posee una región hidrófoba y otra hidrófila se dice que tiene carácter anfipático. La región hidrófoba de los lípidos es la que presenta sólo átomos de carbono unidos a átomos de hidrógeno, como la larga "cola" alifática de los ácidos grasos o los anillos de esteroide del colesterol; la región hidrófila es la que posee grupos polares o con cargas eléctricas, como el hidroxilo ($-OH$) del colesterol, el carboxilo ($-COO^-$) de los ácidos grasos, el fosfato ($-PO_4^-$) de los fosfolípidos, etc.

Las diferencias en la composición lipídica entre diferentes membranas biológicas como se muestra en la siguiente **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición lipídica de algunas membranas biológicas

Lípido	Eritrocito humano	Mielina (humano)	Mitocondria corazón bovino	E. coli
PA	1,5	0,5	0	0
PC	19	10	39	0
PE	18	20	27	65
PG	0	0	0	18
PI	1	1	7	0
PS	8,5	8,5	0,5	0
CL	0	0	22,5	12
SM	17,5	8,5	0	0
Glicolípidos	10	26	0	0
Chol	25	26	3	0

-Clasificación de los lípidos de membrana:

Los principales lípidos que forman parte de las membranas biológicas son los glicerofosfolípidos, los glicoglicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides.

1. Los glicerofosfolípidos o fosfoglicerolípidos (GPLs):

Están formados por una molécula de glicerol-3-fosfato con dos ácidos grasos esterificados en el carbono C1 y C2. El grupo fosforil contiene un grupo X polar que es generalmente un derivado de un alcohol y que da lugar a los diferentes tipos de glicerofosfolípidos (X= agua: ácido fosfatídico; X= etanolamina: fosfatidiletanolamina; X= colina: fosfatidilcolina (lecitina); X= serina: fosfatidilserina; X= *myo*-inositol: fosfatidilinositol; X= glicerol: fosfatidilglicerol y X= fosfatidilglicerol: difosfatidilglicerol (cardiolipina)) (**Figura 5**).

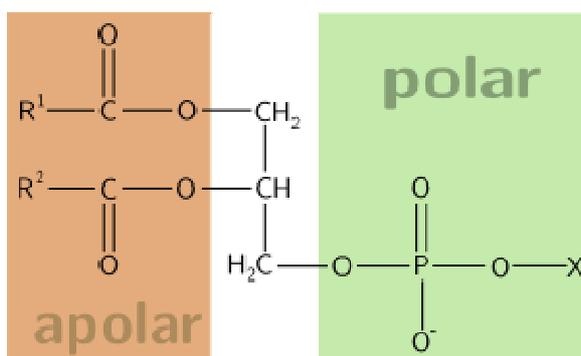


Figura 5 Estructura de un glicerofosfolípido.

Los GPL son componentes muy importantes de la membrana plasmática. En la membrana se orientan de tal forma que el grupo polar queda hacia fuera de la membrana y el grupo apolar hacia el interior. Atendiendo a la longitud y al número de insaturaciones de las cadenas acílicas se pueden formar diferentes tipos de moléculas con propiedades biofísicas determinadas. En la **Tabla 3** se muestran los principales ácidos grasos que se encuentran en los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y gliceroglicolípidos.

Tabla 3. Ácidos grasos habitualmente presentes en membranas biológicas.

Símbolo	Nombre común	T fusión (°C)
Ácidos grasos saturados		
12:0	Ácido láurico	44.2
14:0	Ácido mirístico	52
16:0	Ácido palmítico	63.1
18:0	Ácido esteárico	69.6
20:0	Ácido araquídico	75.4
22:0	Ácido behénico	81
24:0	Ácido lignocérico	84.2
Ácidos grasos insaturados (todos los dobles enlaces son cis)		
16:1 Δ9	Ácido palmitoleico	-0.5

18:1 Δ 9	Ácido oleico	13.4
18:2 Δ 9,12	Ácido linoleico	-9
18:3 Δ 9,12,15	Ácido α -linolénico	-17
18:3 Δ 6,9,12	Ácido γ -linolénico	
20:4 Δ 5,8,11,14	Ácido araquidónico	-49.5
24:1 Δ 15	Ácido nervónico	39

Datos tomados de [Voet y Voet, 2004].

Los plasmalógenos son fosfoglicéridos en los que el glicerol fosfato tiene unido en el C1, mediante un enlace tipo éter, un alcohol de cadena larga. Comúnmente, la parte polar de los plasmalógenos es etanolamina, colina o serina.

2. Los glicoglicerolípidos

Son lípidos compuestos por glicerol, ácidos grasos y un azúcar. En ellos, el glicerol está esterificado en los C1 y C2 a ácidos grasos (el ácido linolénico es uno de los más abundantes). El grupo OH del C3 del glicerol está esterificado con un grupo OH de un azúcar. Uno de los más abundantes es el β -galactosildiacylglicerol, que está presente en las membranas de los cloroplastos.

3. Los esfingolípidos

Están compuestos por un alcohol nitrogenado llamado esfingosina. La esfingosina aparece normalmente N-sustituida, formando un enlace amida con un ácido graso que generalmente está insaturado. Esta N-acil esfingosina recibe el nombre de ceramida. La esfingosina tiene una gran analogía estructural con un monoacylglicerol, ya que posee una cadena larga hidrofóbica de 15 carbonos unida a un extremo polar con tres carbonos, con dos funciones hidroxilo y una función amina. La ceramida, asimismo, es análoga del diacylglicerol, con dos cadenas largas hidrofóbicas y un residuo polar tricarbonado, que recuerda al glicerol. Los lípidos que contienen ceramidas se clasifican en dos grupos: los glicoesfingolípidos y los fosfoesfingolípidos. En los glicoesfingolípidos la ceramida está unida mediante un enlace β -glicosídico a un monosacárido o a un oligosacárido.

En los fosfoesfingolípidos, la ceramida se une a un ácido fosfórico, que a su vez se une mediante enlaces éster a alcoholes nitrogenados (colina, etanolamina, etc.). Los más abundantes son los análogos estructurales de la fosfatidilcolina y de la fosfatidiletanolamina, que se llaman

flexible [Yeagle, 1985]. El grupo hidroxilo es la parte polar del colesterol y la que le da carácter anfipático a la molécula.

Una de las funciones más importantes del colesterol es su habilidad para modular las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares [Chen y Rand, 1997; Hung y cols., 2007; Wang y cols., 2007]. Además se sabe que juega un papel muy importante en la organización lateral de la membrana. Así, en mezclas con fosfatidilcolinas saturadas y esfingomiélinina forma la denominada fase líquida ordenada (L_o), mientras que cuando se une con fosfatidilcolinas insaturadas se forma la fase líquida desordenada (L_d) [de Almeida y cols., 2003; van Duyl y cols., 2003; Crane y Tamm, 2004; Veatch y cols., 2004]. Además se conoce que se mezcla mejor con lípidos saturados o con aquellos que tienen pocas insaturaciones [Armstrong y cols., 2003; Stillwell y Wassall, 2003; Wassall y cols., 2004; Stillwell y cols., 2005; Wassall y Stillwell, 2008]. La paradoja del colesterol consiste en que tiene la capacidad de formar dominios ordenados, con baja curvatura (de tipo "raft") y al mismo tiempo es capaz de llevar a cabo numerosos procesos de fusión que requieren, por el contrario, máxima flexibilidad e intermediarios estructurales no lamelares [Nieva y cols., 1995; Siegel y Kozlov, 2004; Tenchov y cols., 2006].

-Polimorfismo lipídico:

El polimorfismo lipídico es un factor a tener en cuenta a la hora de estudiar la estructura de la membrana (**Figura 7**). Los lípidos de la membrana adoptan una morfología diferente dependiendo del pH, la temperatura, la presión, la fuerza iónica y la forma del mismo lípido [Cullis y de Kruijff, 1979; Gruner y cols., 1985; Cullis y cols., 1986]. En procesos tales como la fusión de membranas, tráfico de proteínas mediado por vesículas, el movimiento de macromoléculas a través de la bicapa y la estabilización de complejos de proteínas de membrana, el polimorfismo lipídico es un fenómeno a tener en cuenta.

Para el estudio de estas estructuras lipídicas se utilizan tres técnicas principalmente: difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear y criomicroscopía electrónica [Frederik y Hubert, 2005].

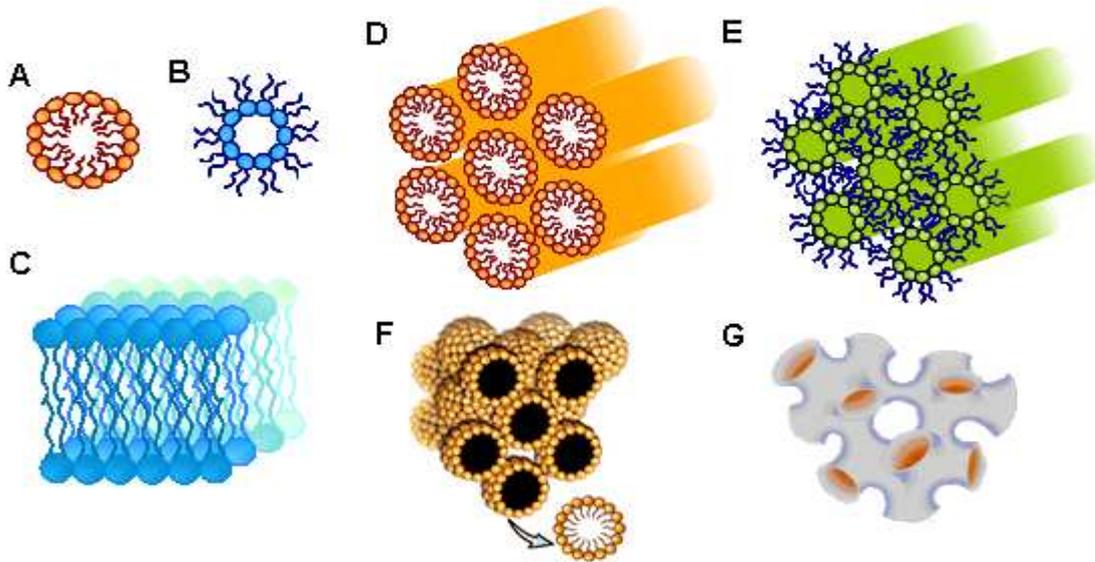


Figura 7 Polimorfismo lipídico. (A) Micela normal (tipo I). **(B)** Micela invertida (tipo II). **(C)** Estructura lamelar (L_{α}). **(D)** Hexagonal normal (H_I). **(E)** Hexagonal invertida (H_{II}). **(F)** Cúbica micelar normal (Q_I). **(G)** Cúbica invertida bicontinua (Q_{II}).

Una fase es un concepto termodinámico que corresponde a cada uno de los diferentes estados estructurales de la materia que pueden coexistir en equilibrio, como por ejemplo el agua líquida y el hielo. Por lo tanto una fase lipídica es la conformación que adoptan los lípidos en una solución acuosa. Las fases lipídicas se clasifican utilizando tres criterios: (i) según el tipo de red, (ii) según el orden de las cadenas acílicas y (iii) según la curvatura adoptada por la estructura. La nomenclatura que se utiliza es de Luzzati [Luzzati y cols., 1968], que corresponde a una letra mayúscula y un subíndice. El tipo de red puede ser: (i) unidimensional, como la lamelar (L) o la micelar (M); (ii) bidimensional como la hexagonal, H; (iii) tridimensional como la cúbica, Q; (iv) tridimensional cristalina, C. Dependiendo del orden de las cadenas acílicas, se utiliza un subíndice: (i) c, para el cristalino; (ii) α , cuando las cadenas hidrocarbonadas están desordenadas, lo cual permite un mayor movimiento de los lípidos; (iii) β , cuando las cadenas están ordenadas y perpendiculares al plano de la membrana, por ello el movimiento de los lípidos es muy difícil; (iv) β' , cuando las cadenas además de estar ordenadas están inclinadas respecto al plano de la membrana, en este caso el movimiento de los lípidos también es difícil.

Finalmente las fases lipídicas también se pueden clasificar dependiendo de la curvatura: (i) tipo I cuando las cadenas acílicas están orientadas hacia el

interior; (ii) tipo II o invertida, cuando las cadenas acílicas están orientadas hacia fuera. Las estructuras que tienen una curvatura de tipo II son muy importantes en procesos de fusión de membranas, ya que se ha visto que durante el proceso de fusión se forman estructuras intermedias (“stalk”) que tienen una curvatura invertida.

Las fases lipídicas más importantes desde un punto de vista biológico son las que aparecen en la **Tabla 4**:

Tabla 4. Estructuras lipídicas de importancia biológica

Estructuras lamelares (L)
L_{β} Fase gel
L_{α} (o L_d) Fase fluida o líquida cristalina
L_o Fase líquida ordenada
Estructura hexagonal invertida (H_{II})
Estructuras cúbicas invertidas (Q_{II})

Las estructuras lamelares (L). Este tipo de fase se forma cuando los lípidos se organizan formando una bicapa. Dentro de la fase lamelar pueden adoptar distintas fases dependiendo del ordenamiento de las cadenas acílicas. A temperaturas bajas las cadenas están ordenadas, formando una estructura rígida donde el movimiento de los lípidos está impedido [Marsh, 1980]. En estos casos se dice que es una fase gel (L_{β}). Esta fase es adoptada cuando la hidratación es baja o cuando la temperatura es baja. Un ejemplo es la que forma la esfingomielina y la ceramida cuando forman dominios en la membrana [Sot y cols., 2008].

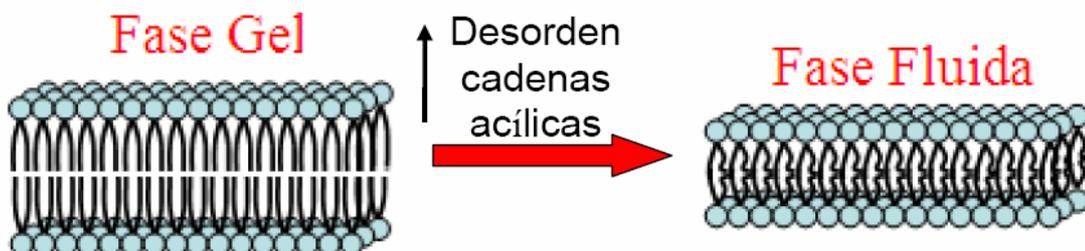


Figura 8 Fase lamelar gel y fase lamelar fluida. Se puede observar un aumento del desorden de las cadenas.

Cuando se calienta una mezcla lipídica que esta en fase gel, las cadenas acílicas se desordenan y el área de sección por cadena aumenta significativamente, formándose así otro tipo de fase lamelar, denominada fase fluida o líquida cristalina (L_α). Por otro lado, a la temperatura a la cual ocurre este cambio de fase gel a fase fluida se le llama temperatura de transición (T_m) (**Figura 8**).

En mezclas lipídicas donde hay un alto contenido de colesterol, SM y otro GPL como la PC se forman otras dos fase lamelares, la L_o y la L_d . La L_o se forma cuando hay una coexistencia de PCs saturados, SM y colesterol. Esta fase tiene una difusión de lípidos menor que la L_α y mayor que la L_β ; mientras que cuando hay PCs insaturadas y colesterol se forma la L_d (o L_α) [Tenchov y cols., 2006].

Fase hexagonal (H). A temperaturas altas los lípidos adoptan estructuras bidimensionales fluidas. Estas estructuras consisten en cilindros indefinidamente largos en vez de bicapas.

Reciben el nombre de hexagonal debido a la simetría que tienen, es decir, alrededor de cada cilindro hay 6 cilindros. Las fases hexagonales más conocidas son la H_I (normal) y H_{II} (invertida) (**Figura 9**). La H_{II} es común en presencia de lípidos como la fosfatidiletanolamina, con cabeza polar pequeña y débilmente hidratada [de Kruijff, 1997; Epanand, 1998].

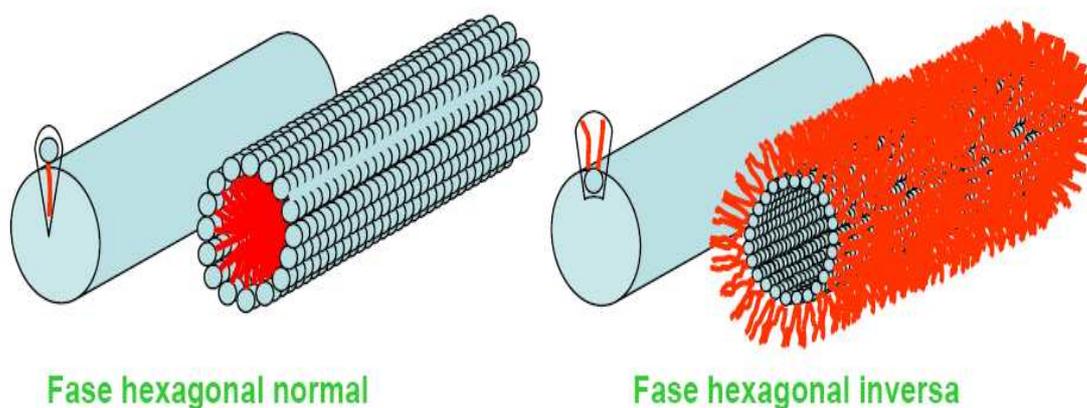


Figura 9 Fase hexagonal normal y fase hexagonal inversa.

Fase cúbica (Q). Este tipo de fase adopta estructuras tridimensionales. Hasta ahora se conocen 7 tipos de fase cúbicas [Mariani y cols., 1988; Vargas y cols., 1992; Luzzati y cols., 1993; Nieva y cols., 1995; Luzzati, 1997]. Se

diferencian dos clases: las de tipo I y las de tipo II. La de tipo I poseen las cabezas polares orientadas hacia fuera y las colas hacia dentro, siendo la matriz polar. Las de tipo II es al revés, por lo que tienen una matriz apolar.

Además, las fases cúbicas se pueden clasificar como micelares o bicontinuas. Dentro de las micelares la más importante es la fase cúbica micelar invertida, que consiste en micelas invertidas, con la cabeza polar orientada hacia el centro de la esfera, mientras que las colas hidrocarbonadas miran hacia fuera formando así la matriz hidrocarbonada. La fase Q_{227} (Fd3m) es la única que se conoce en este grupo. Dentro de la fase micelar también se ha descrito la fase micelar normal o Q_{223} (Pm3n), donde las cabezas polares están orientadas hacia fuera.

El término bicontinua hace referencia a que la fase lipídica y la acuosa son continuas en el espacio. Todos los que hasta ahora se han encontrado son de tipo II. Estas estructuras consisten en dos laberintos polares separados por una hendidura apolar. Los lípidos pueden adoptar distintas organizaciones dentro de la fase bicontinua invertida, las dos más importantes son la Q_{224} (Pn3m) y Q_{230} (Ia3d) (**Figura 10**).

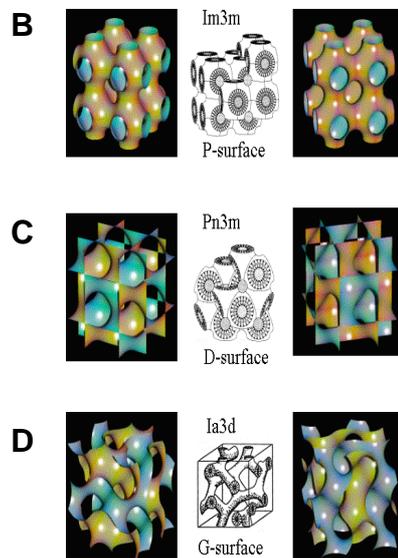
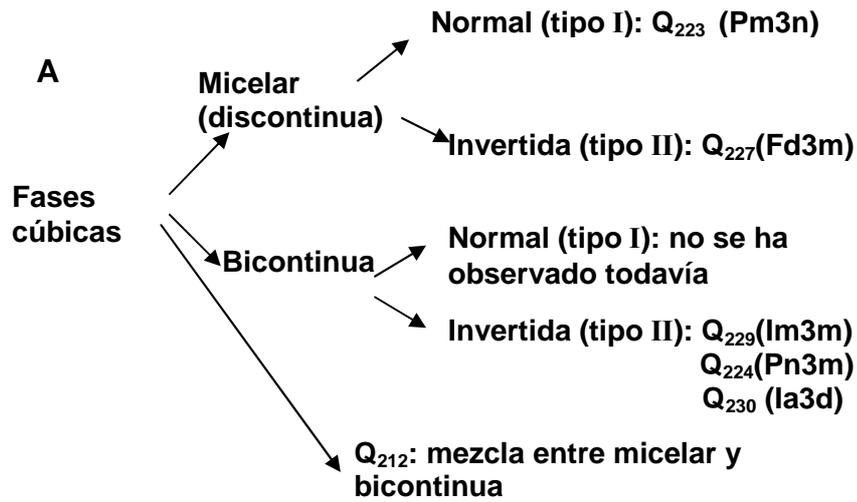


Figura 10 (A) Distintos tipos de fases cúbicas. **(B)** Tres imágenes de fase cúbica bicontinua invertida Im3m. **(C)** Tres imágenes de fase cúbica bicontinua invertida Pn3m. **(D)** Tres imágenes de fase cúbica bicontinua invertida Ia3d. Imagen de <http://scattering.tripod.com/xitami/images/cubicph.gif>

La causa de que los lípidos adopten una estructura u otra depende también de la estructura monomérica del mismo lípido. Así, los lípidos se clasifican en tres grupos teniendo en cuenta su forma [Israelachvili y cols., 1980]. Se ha definido un parámetro de empaquetamiento (S):

$$S = \frac{v}{a_o \times l_c}$$

donde v es el volumen de la molécula de lípido, a_o es el área por molécula en la interfase lípido-agua y l_c es la longitud de las cadenas acílicas totalmente extendidas. Para determinar la forma que adopta cada lípido se relacionan los dos extremos de la molécula (a_o y a_h) (**Figura 11**):

Cono invertido: cuando a_o es mayor que a_h . Induce curvatura positiva en la membrana.

Cilindro: cuando a_o es igual que a_h . Induce curvatura cero en la membrana.

Cono: cuando a_o es menor que a_h . Induce curvatura negativa en la membrana.

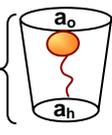
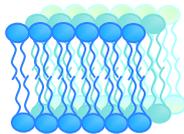
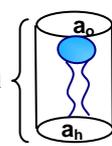
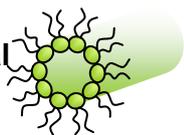
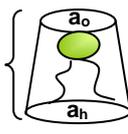
Lípido	Fase	Forma y curvatura
Lisofosfolípidos Detergentes	Micelar 	$S < 1$ Cono invertido Curvatura positiva 
PC SM PS PI PG CL PA	Lamelar 	$S = 1$ Cilindro Curvatura cero 
PE (insaturada) CL -Ca ²⁺ PA -Ca ²⁺ PS (pH<5.0) Ch DAG	Hexagonal (H _{II}) 	$S > 1$ Cono Curvatura negativa 

Figura 11 Relación entre la fase que forman los lípidos, su curvatura y su forma molecular.

En la membrana plasmática la estructura que los lípidos adoptan es la lamelar fluida y con curvatura cercana a cero. Pero hay procesos tales como la fusión de membranas donde se forman intermediarios no lamelares con curvatura negativa [Cullis y cols., 1986; Nieva y cols., 1995]. Hay otros casos donde es necesario la existencia de curvatura positiva en la membrana, como es el ejemplo de la inserción de la proteína proapoptótica de Bax en la membrana [Terrones y cols., 2004].

-Distribución de los lípidos en la membrana: dominios y asimetría:

En la membrana plasmática los lípidos no se encuentran distribuidos homogéneamente. En cada tipo celular, en cada orgánulo y también dentro de la misma membrana la composición lipídica puede variar. En los últimos años se han observado la formación de dominios estructurales ("raft") en la membrana [Simons y Ikonen, 1997]. Estos dominios son estructuras formadas por esfingomielina, glicosfingolípidos y colesterol (**Figura 12**) y son resistentes a detergentes como el Triton X-100. En estos dominios también se encuentran proteínas específicas como las tirosin quinasa de la familia Src. Las proteínas se unen a estos dominios por medio de GPI, ácidos grasos o

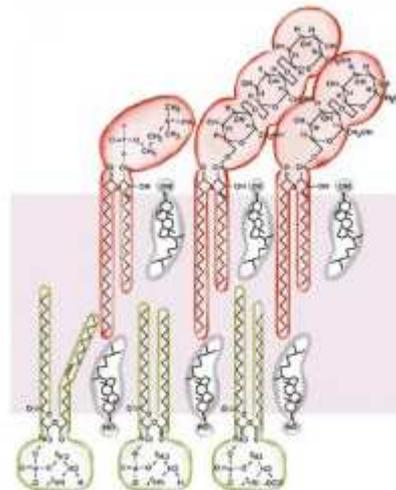


Figura 12 La imagen de un raft. Rojo esfingomielina, verde glicosfingolípidos y gris colesterol.

segmentos hidrofóbicos de las propias proteínas. Estas zonas de la membrana se encuentran en fase L_0 (**Figura 13**), al tener colesterol y esfingomielina la fase que se forma es rígida pero con cierta libertad para rotar y flexionarse. La existencia de estos dominios ha generado un gran debate, algo que ha ocasionado un alto número de estudios en este campo.

En los últimos años se ha estudiado la existencia de distintos dominios en la membrana. Se ha observado la coexistencia de dos fases lipídicas, como es el caso de una fase gel (L_α) y fase fluida en mezclas binarias de dimiristoilfosfatidilcolina y D-eritro-esfingomielina [Bar y cols., 1997] y de fase L_0 y L_α en mezclas de binarias de palmitoil-SM y colesterol [Collado y cols., 2005]. También se han encontrado mezclas donde se ve la coexistencia de tres fases,

como por ejemplo en la mezcla PC:PE:SM:Chol (1:1:1:1) +10 %mol Cer a temperatura por debajo de la temperatura de transición, 37°C. En dichas condiciones se forman tres fases: (i) una fase gel de SM y Cer, (ii) una fase L_0 de SM y Chol, y finalmente (iii) una fase fluida (L_d) de PC y PE [Sot y cols., 2008]. Otro caso en el que también se ha observado la coexistencia de tres fases es en la mezcla POPC: Cer: Chol [Fidorra y cols., 2006].

Por otro lado también existe una distribución heterogénea entre las dos monocapas de una bicapa, es decir, las membranas son estructuras asimétricas. Los fosfolípidos pueden difundir lateralmente por la bicapa y rotar alrededor de su eje, pero raramente migran de una monocapa de la membrana a la otra (movimiento flip-flop). Esta baja frecuencia en el movimiento de flip-flop permite preservar la asimetría de la membrana.

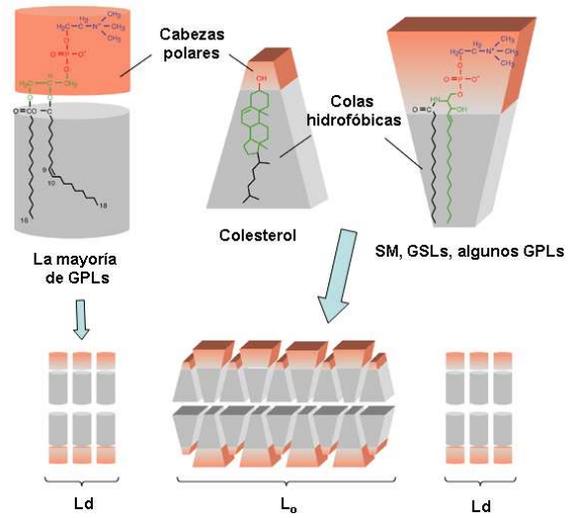


Figura 13 Organización de la SM y Ch en los dominios. El Ch se intercala entre las moléculas de SM rellenando los huecos y dando mayor consistencia a la estructura.

La asimetría es una característica necesaria de todas las membranas celulares para poder ser funcionales. En los eritrocitos humanos (**Figura 14**), por ejemplo, casi todos los lípidos que contienen colina en su cabeza polar, PC y SM, se encuentran en la monocapa externa, mientras que los que tienen un grupo amino, PE y PI, se encuentran en la monocapa interna. Por lo tanto, no sólo la composición sino también la carga eléctrica de las dos hemimembranas es diferente. Además se sabe que la aparición de la PS en la monocapa externa es señal para que las células entren en apoptosis.

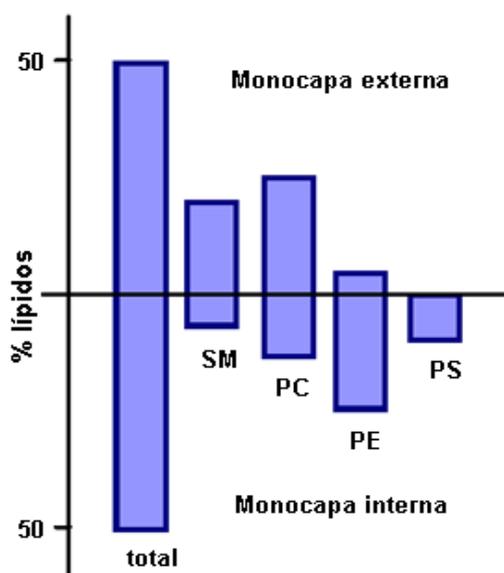


Figura 14 Distribución asimétrica de los fosfolípidos en la membrana de los eritrocitos humanos.

Fusión de membranas

En los procesos de fusión, dos membranas separadas se unen de manera que se conectan los espacios acuosos que delimitan. La estructura lamelar se ve así alterada, momentáneamente y de forma regulada. En los organismos superiores se observan fenómenos de fusión en procesos como la fecundación, división celular, fagocitosis, reciclaje de membranas o secreción de productos sintetizados en la célula por exocitosis. Además, la fusión de membranas es también un paso crítico en procesos patológicos como la infección de virus con envoltura.

A pesar de la importancia de estos procesos, todavía se desconocen los mecanismos físicos y moleculares por los que dos membranas llevan a cabo esta complicada operación sin que se altere su continuidad. La fusión de

membranas se puede estudiar a dos niveles: cinéticamente (espectroscopía) y estructuralmente (crio-microscopía y rayos X).

Durante el proceso de fusión de membranas, el primer paso es la unión de las dos membranas, paso que requiere superar la barrera de hidratación de la bicapa. Una vez superada esta barrera, la membrana se desestabiliza sufriendo modificaciones y creando uniones interlamelares (ILA) entre las membranas que se van a fusionar pero sin pérdida de contenido acuoso [Verkleij, 1984; Siegel, 1986b]. En los últimos años se ha relacionado el polimorfismo lipídico con la desestabilización de la membrana. Se ha asociado también la liberación de contenidos acuosos con la formación de fases hexagonales invertidas [Bentz y cols., 1985; Ellens y cols., 1986b, 1986a; Ellens y cols., 1989; Allen y cols., 1990]. Otros estudios han relacionado la fusión con la transición de fase lamelar a no-lamelar [Ellens y cols., 1986b; Siegel, 1986a; Ellens y cols., 1989; Siegel y cols., 1989c; Nieva y cols., 1995; Basáñez y cols., 1996a; Basáñez y cols., 1996b]. Finalmente, en algunos casos se ha propuesto la existencia de un intermediario común para la liberación y para la fusión [Frederik y cols., 1991; Siegel y cols., 1994].

El modelo de fusión de membrana más extendido es el que implica la formación de un intermediario lipídico, con forma semitoroidal o de reloj de arena llamado “stalk” (tallo) (**Figura 15**) que se forma entre las dos membranas que se van a fusionar [Chernomordik y cols., 1987; Siegel, 1993; Chernomordik y cols., 1995b; Chernomordik y Zimmerberg, 1995; Siegel, 1999]. Este intermediario se convierte rápidamente en una estructura más estable y conectando así las dos membranas. El “stalk”, el cual hace posible la hemifusión de las membranas, tiene una alta curvatura y es una estructura no-lamelar, además tiene un tiempo de vida corto. Por ello no se han conseguido obtener observaciones físicas directas de este intermediario, pero existen muchas evidencias de su existencia [Chernomordik y cols., 1993; Vogel y cols., 1993; Kemble y cols., 1994; Chernomordik y cols., 1995a; Chernomordik y Zimmerberg, 1995; Melikyan y cols., 1995]. Bien es cierto que el mecanismo molecular de la fusión de membranas está todavía por dilucidar. Ya que los datos de fusión obtenidos mediante estudios en sistemas modelo de membrana apoyan también el modelo de fusión del stalk y proponen los siguientes estadios por los que se da la fusión entre dos membranas:

- Establecimiento de un contacto cercano entre las dos bicapas.

- Fusión de las hemimembranas cercanas (cis). Este proceso se denomina hemifusión y requiere de la formación de una estructura intermedia no-lamelar llamado stalk.
- Fusión de las hemimembranas distales (trans) y apertura de un poro de fusión.

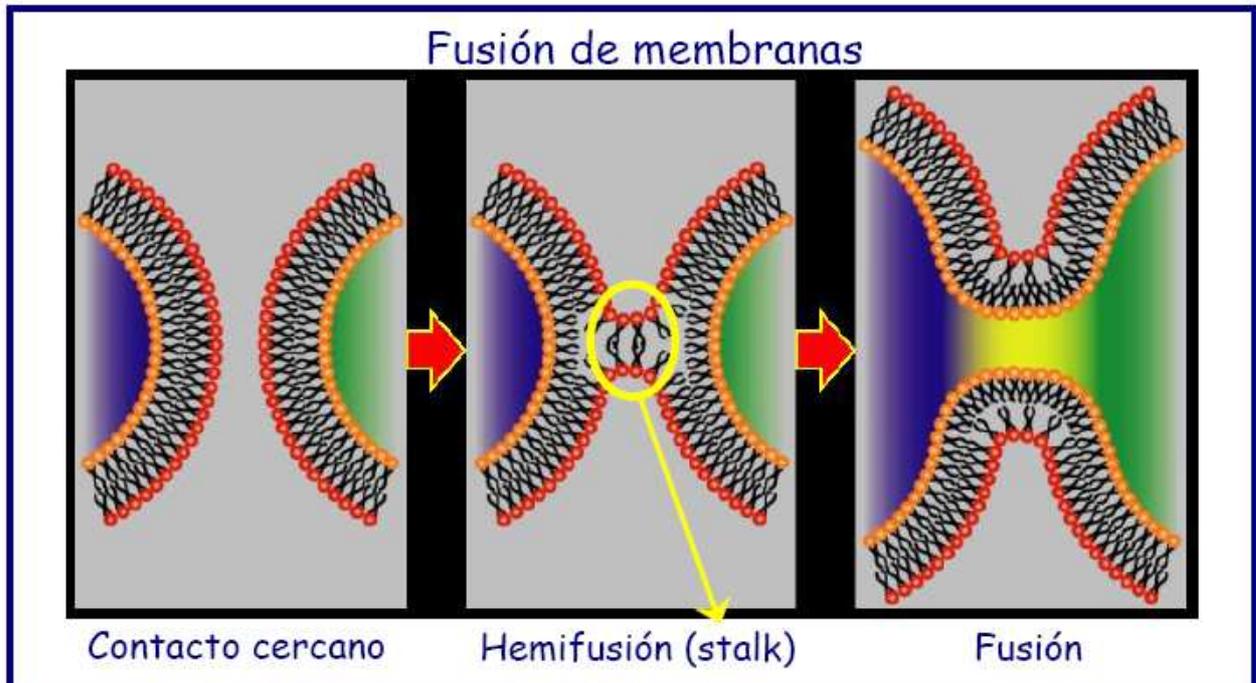


Figura 15 Modelo de fusión del stalk.

La mayor dificultad que hay que superar para que haya fusión entre dos membranas es que éstas entren en contacto, para lo cual se requiere superar la barrera energética de repulsión entre las dos superficies hidratadas [Siegel, 1999]. Este paso se puede ver facilitado por la presencia de lípidos con forma de cono que induzcan una curvatura negativa en la membrana como es el colesterol (Chol) o el diacilglicerol (DAG) que es producido por la actividad fosfolipasa C [Siegel y cols., 1989a; Goñi y Alonso, 1999; Villar y cols., 2001]. Se sabe que estos lípidos con forma de cono (Chol, DAG) son propensos a producir estructuras no-lamelares al inducir curvatura negativa [Tenchov y cols., 2006] y disminuyen la barrera energética de repulsión que hay que superar para que ocurra la fusión de membranas. Por otro lado también se sabe que los lípidos con forma de cono invertido (lisofosfolípidos) inducen una curvatura positiva y por lo tanto inhiben la fusión de membranas [Chernomordik, 1996; Basáñez, 2002].

Fusión de membranas y diacilglicerol

En el año 1973 se identificó el papel del diacilglicerol como lípido fusogénico [Ahkong y cols., 1973]. La generación de DAG en la membrana celular es un paso importante para la activación de la fusión de membranas [Allan y Michell, 1975; Allan y cols., 1978; Basáñez, 2002] debido a la forma de cono que posee este lípido. Mediante la utilización de rayos X Das y Rand [Das y Rand, 1984, 1986] demostraron no sólo que el DAG ayudaba a la transición de fase lamelar a no-lamelar sino que además propusieron que podría inducir la fusión de membranas. En 1989, Siegel y colaboradores [Siegel y cols., 1989a; Siegel y cols., 1989b] describieron los efectos del DAG a niveles fisiológicos en sistemas modelo de fusión de membranas. Utilizaron liposomas de N-metil dioleoilfosfatidiletanolamina en las que la fusión era inducida por 5mM de Mg^{2+} a pH 7.4. En condiciones fusogénicas, este lípido tiene una transición lamelar-hexagonal ($L\alpha$ - H_{II}) a $\approx 66^{\circ}C$ y la fusión se produce a partir de $45^{\circ}C$. Pero cuando se le añade DAG, vieron que la transición $L\alpha$ - H_{II} ocurre a $\approx 46^{\circ}C$ y la fusión se produce a partir de $30^{\circ}C$. Esto se debe a la capacidad que tiene el DAG para disminuir la curvatura de la membrana [Nieva y cols., 1989; Siegel y cols., 1989a; Siegel y cols., 1989b].

Estudios bioquímicos han demostrado que la acción enzimática de la fosfolipasa C induce fusión de LUVs y que esta fusión está modulada por la producción de DAG en la membrana [Goñi y Alonso, 1999, 2000]. La fosfolipasa específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) y la fosfolipasa específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) de *Bacillus cereus* producen agregación y fusión [Nieva y cols., 1993; Ruiz-Arguello y cols., 1996; Villar y cols., 2000; Villar y cols., 2001]. Se ha visto por estudios de criomicroscopia que la PC-PLC de *Bacillus cereus* produce fusión de membranas mediante la generación de DAG, el cual produce estructuras de celda de abeja en la membrana [Basáñez y cols., 1997]. Así, el DAG induce la formación de Q_{224} ($Pn3m$) a concentraciones bajas mientras que produce una Q_{227} ($Fd3m$) a concentraciones altas [Nieva y cols., 1995; Basáñez y cols., 1996b; Basáñez y cols., 1997].

Fusión de membranas y colesterol

Estudios de fusión realizados con virus que poseen membrana han demostrado que la fusión de un virus con una célula requiere o se ve facilitada por la presencia de colesterol y esfingolípidos en la célula huésped o en la membrana del virus [Nieva y cols., 1994; Wilschut y cols., 1995; Lu y cols., 1999]. Sin embargo, no se han encontrado evidencias directas de una relación

entre la presencia de “rafts” y la fusión de membranas. Por otro lado, se sabe que el colesterol produce curvatura negativa en la membrana [Chen y Rand, 1997].

Estudios realizados por Epanand y colaboradores [Epanand y cols., 2003; Epanand y cols., 2004; Epanand y cols., 2005] demostraron que en vesículas formadas por PCs insaturadas con colesterol se formaba una fase hexagonal invertida a altas temperaturas. Tenchov y colaboradores [Tenchov y cols., 2006] vieron mediante difracción de rayos X, que el colesterol induce formación de fases cúbicas a altas temperaturas en mezclas con PCs insaturados, las cuales son estables en condiciones fisiológicas. Por lo tanto el colesterol por un lado puede formar dominios “rafts” al unirse con PCs saturados y esfingolípidos, y por otro lado puede formar dominios fusogénicos al unirse con los PCs insaturados que son excluidos de dominios líquido-ordenado o “rafts”.

Estudios realizados por Nieva y colaboradores [Nieva y cols., 1989] demostraron que la fosfolipasa C de *Bacillus cereus* induce fusión de membranas. Para que hubiera fusión es necesario que haya PE y Chol en la membrana, estos lípidos desestabilizan la membrana y posteriormente la formación de DAG facilitaría la formación de estructuras no-lamelares.

Bibliografía:

- Ago, H., Oda, M., Takahashi, M., Tsuge, H., Ochi, S., Katunuma, N., Miyano, M. and Sakurai, J. (2006) Structural basis of the sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *J Biol Chem* 281, 16157-67.
- Ahkong, Q. F., Fisher, D., Tampion, W. and Lucy, J. A. (1973) The fusion of erythrocytes by fatty acids, esters, retinol and alpha-tocopherol. *Biochem J* 136, 147-55.
- Allan, D. and Michell, R. H. (1975) Accumulation of 1,2-diacylglycerol in the plasma membrane may lead to echinocyte transformation of erythrocytes. *Nature* 258, 348-9.
- Allan, D., Thomas, P. and Michell, R. H. (1978) Rapid transbilayer diffusion of 1,2-diacylglycerol and its relevance to control of membrane curvature. *Nature* 276, 289-90.
- Allen, T. M., Hong, K. and Papahadjopoulos, D. (1990) Membrane contact, fusion, and hexagonal (HII) transitions in phosphatidylethanolamine liposomes. *Biochemistry* 29, 2976-85.

- Armstrong, V. T., Brzustowicz, M. R., Wassall, S. R., Jenki, L. J. and Stillwell, W. (2003) Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosaenoate) phospholipid membranes. *Arch Biochem Biophys* 414, 74-82.
- Bar, L. K., Barenholz, Y. and Thompson, T. E. (1997) Effect of sphingomyelin composition on the phase structure of phosphatidylcholine-sphingomyelin bilayers. *Biochemistry* 36, 2507-16.
- Basañez, G., Ruiz-Argüello, M. B., Alonso, A., Goñi, F. M., Karlsson, G. and Edwards, K. (1997) Morphological changes induced by phospholipase C and by sphingomyelinase on large unilamellar vesicles: a cryo-transmission electron microscopy study of liposome fusion. *Biophys J* 72, 2630-7.
- Basañez, G., Fidelio, G. D., Goni, F. M., Maggio, B. and Alonso, A. (1996a) Dual inhibitory effect of gangliosides on phospholipase C-promoted fusion of lipidic vesicles. *Biochemistry* 35, 7506-13.
- Basañez, G., Nieva, J. L., Rivas, E., Alonso, A. and Goñi, F. M. (1996b) Diacylglycerol and the promotion of lamellar-hexagonal and lamellar-isotropic phase transitions in lipids: implications for membrane fusion. *Biophys J* 70, 2299-306.
- Basañez, G., Ruiz-Argüello, M. B., Alonso, A., Goñi, F. M., Karlsson, G. and Edwards, K. (1997) Morphological changes induced by phospholipase C and by sphingomyelinase on large unilamellar vesicles: a cryo-transmission electron microscopy study of liposome fusion. *Biophys J* 72, 2630-7.
- Basañez, G. (2002) Membrane fusion: the process and its energy suppliers. *Cell Mol Life Sci* 59, 1478-90.
- Bentz, J., Ellens, H., Lai, M. Z. and Szoka, F. C., Jr. (1985) On the correlation between HII phase and the contact-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5742-5.
- Cajal, Y., Boggs, J. M. and Jain, M. K. (1997) Salt-triggered intermembrane exchange of phospholipids and hemifusion by myelin basic protein. *Biochemistry* 36, 2566-76.
- Chen, Z. and Rand, R. P. (1997) The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophys J* 73, 267-76.
- Chernomordik, L., Chanturiya, A., Green, J. and Zimmerberg, J. (1995a) The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition. *Biophys J* 69, 922-9.
- Chernomordik, L., Kozlov, M. M. and Zimmerberg, J. (1995b) Lipids in biological membrane fusion. *J Membr Biol* 146, 1-14.
- Chernomordik, L. (1996) Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chem Phys Lipids* 81, 203-13.
- Chernomordik, L. V., Melikyan, G. B. and Chizmadzhev, Y. A. (1987) Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 906, 309-52.
- Chernomordik, L. V., Vogel, S. S., Sokoloff, A., Onaran, H. O., Leikina, E. A. and Zimmerberg, J. (1993) Lysolipids reversibly inhibit Ca²⁺-, GTP- and pH-dependent fusion of biological membranes. *FEBS Lett* 318, 71-6.
- Chernomordik, L. V. and Zimmerberg, J. (1995) Bending membranes to the task: structural intermediates in bilayer fusion. *Curr Opin Struct Biol* 5, 541-7.

- Collado, M. I., Goni, F. M., Alonso, A. and Marsh, D. (2005) Domain formation in sphingomyelin/cholesterol mixed membranes studied by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry* 44(12), 4911-8.
- Crane, J. M. and Tamm, L. K. (2004) Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys J* 86, 2965-79.
- Cullis, P. R. and de Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 559, 399-420.
- Cullis, P. R., Hope, M. J. and Tilcock, C. P. (1986) Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipids* 40, 127-44.
- Danielli, J. and Davson, H. (1935) A contribution to the theory of permeability of this films. *J Cell Copm Physiol* 5, 495-508.
- Das, S. and Rand, R. P. (1984) Diacylglycerol causes major structural transitions in phospholipid bilayer membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 124, 491-6.
- Das, S. and Rand, R. P. (1986) Modification by diacylglycerol of the structure and interaction of various phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry* 25, 2882-9.
- Davies, S. M., Epand, R. M., Kraayenhof, R. and Cornell, R. B. (2001) Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase activity by the physical properties of lipid membranes: an important role for stored curvature strain energy. *Biochemistry* 40, 10522-31.
- de Almeida, R. F., Fedorov, A. and Prieto, M. (2003) Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys J* 85, 2406-16.
- de Kruijff, B. (1997) Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr Opin Chem Biol* 1, 564-9.
- Ellens, H., Bentz, J. and Szoka, F. C. (1986a) Destabilization of phosphatidylethanolamine liposomes at the hexagonal phase transition temperature. *Biochemistry* 25, 285-94.
- Ellens, H., Bentz, J. and Szoka, F. C. (1986b) Fusion of phosphatidylethanolamine-containing liposomes and mechanism of the L α -HII phase transition. *Biochemistry* 25, 4141-7.
- Ellens, H., Siegel, D. P., Alford, D., Yeagle, P. L., Boni, L., Lis, L. J., Quinn, P. J. and Bentz, J. (1989) Membrane fusion and inverted phases. *Biochemistry* 28, 3692-703.
- Engelman, D. M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438, 578-80.
- Epand, R. M. (1998) Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1376, 353-68.
- Epand, R. M., Hughes, D. W., Sayer, B. G., Borochoy, N., Bach, D. and Wachtel, E. (2003) Novel properties of cholesterol-dioleoylphosphatidylcholine mixtures. *Biochim Biophys Acta* 1616, 196-208.
- Epand, R. M., Epand, R. F., Bain, A. D., Sayer, B. G. and Hughes, D. W. (2004) Properties of polyunsaturated phosphatidylcholine membranes in the presence and absence of cholesterol. *Magn Reson Chem* 42, 139-47.
- Epand, R. M., Epand, R. F., Hughes, D. W., Sayer, B. G., Borochoy, N., Bach, D. and Wachtel, E. (2005) Phosphatidylcholine structure determines

- cholesterol solubility and lipid polymorphism. *Chem Phys Lipids* 135, 39-53.
- Fidorra, M., Duelund, L., Leidy, C., Simonsen, A. C. and Bagatolli, L. A. (2006) Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol. *Biophys J* 90, 4437-51.
- Frederik, P. M., Burger, K. N., Stuart, M. C. and Verkleij, A. J. (1991) Lipid polymorphism as observed by cryo-electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1062, 133-41.
- Frederik, P. M. and Hubert, D. H. (2005) Cryoelectron microscopy of liposomes. *Methods Enzymol* 391, 431-48.
- Gennis, R. B. (1989) Biomembranes: Molecular structure and function. *Springer-Verlag, New York*.
- Goñi, F. M. and Alonso, A. (1999) Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Prog Lipid Res* 38, 1-48.
- Goñi, F. M. and Alonso, A. (2000) Membrane fusion induced by phospholipase C and sphingomyelinases. *Biosci Rep* 20, 443-63.
- Goodman, S. R., Krebs, K. E., Whitfield, C. F., Riederer, B. M. and Zagon, I. S. (1988) Spectrin and related molecules. *CRC Crit Rev Biochem* 23, 171-234.
- Gorter, E. a. G., F. (1925) On bimolecular layers of lipoids on chromatocytes of blood. *J Exp Med* 41, 439-443.
- Gruner, S. M., Cullis, P. R., Hope, M. J. and Tilcock, C. P. (1985) Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 14, 211-38.
- Hormaeche, I., Iloro, I., Arrondo, J. L., Goni, F. M., de la Cruz, F. and Alkorta, I. (2004) Role of the transmembrane domain in the stability of TrwB, an integral protein involved in bacterial conjugation. *J Biol Chem* 279, 10955-61.
- Hung, W. C., Lee, M. T., Chen, F. Y. and Huang, H. W. (2007) The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J* 92, 3960-7.
- Israelachvili, J. N., Marcelja, S. and Horn, R. G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys* 13, 121-200.
- Jaken, S. and Parker, P. J. (2000) Protein kinase C binding partners. *Bioessays* 22, 245-54.
- Kemble, G. W., Danieli, T. and White, J. M. (1994) Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell* 76, 383-91.
- Lu, Y. E., Cassese, T. and Kielian, M. (1999) The cholesterol requirement for sindbis virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in cholesterol dependence. *J Virol* 73, 4272-8.
- Luzzati, V., Tardieu, A. and Gulik-Krzywicki, T. (1968) Polymorphism of lipids. *Nature* 217, 1028-30.
- Luzzati, V., Vargas, R., Mariani, P., Gulik, A. and Delacroix, H. (1993) Cubic phases of lipid-containing systems. Elements of a theory and biological connotations. *J Mol Biol* 229, 540-51.
- Luzzati, V. (1997) Biological significance of lipid polymorphism: the cubic phases. *Curr Opin Struct Biol* 7, 661-8.
- Mariani, P., Luzzati, V. and Delacroix, H. (1988) Cubic phases of lipid-containing systems. Structure analysis and biological implications. *J Mol Biol* 204, 165-89.

- Marsh, D. (1980) Molecular motion in phospholipid bilayers in the gel phase: long axis rotation. *Biochemistry* 19, 1632-7.
- Melikyan, G. B., Niles, W. D., Ratinov, V. A., Karhanek, M., Zimmerberg, J. and Cohen, F. S. (1995) Comparison of transient and successful fusion pores connecting influenza hemagglutinin expressing cells to planar membranes. *J Gen Physiol* 106, 803-19.
- Nieva, J. L., Goñi, F. M. and Alonso, A. (1989) Liposome fusion catalytically induced by phospholipase C. *Biochemistry* 28, 7364-7.
- Nieva, J. L., Goñi, F. M. and Alonso, A. (1993) Phospholipase C-promoted membrane fusion. Retroinhibition by the end-product diacylglycerol. *Biochemistry* 32, 1054-8.
- Nieva, J. L., Bron, R., Corver, J. and Wilschut, J. (1994) Membrane fusion of Semliki Forest virus requires sphingolipids in the target membrane. *Embo J* 13, 2797-804.
- Nieva, J. L., Alonso, A., Basanez, G., Goñi, F. M., Gulik, A., Vargas, R. and Luzzati, V. (1995) Topological properties of two cubic phases of a phospholipid:cholesterol:diacylglycerol aqueous system and their possible implications in the phospholipase C-induced liposome fusion. *FEBS Lett* 368, 143-7.
- Overton, E. (1895) Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Thierzelle. *Vierteljahrsschr. Naturforsch. Ges. Zurich* 40, 159-201.
- Parker, M. W. and Feil, S. C. (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88, 91-142.
- Ruiz-Arguello, M. B., Basanez, G., Goni, F. M. and Alonso, A. (1996) Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in phospholipid membrane fusion and leakage. *J Biol Chem* 271, 26616-21.
- Sanchez-Magraner, L., Cortajarena, A. L., Goni, F. M. and Ostolaza, H. (2006) Membrane insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin is independent from membrane lysis. *J Biol Chem* 281, 5461-7.
- Siegel, D. P. (1986a) Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases. II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. *Biophys J* 49, 1171-83.
- Siegel, D. P. (1986b) Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases. I. Mechanism of the L alpha----HII phase transitions. *Biophys J* 49, 1155-70.
- Siegel, D. P., Banschbach, J., Alford, D., Ellens, H., Lis, L. J., Quinn, P. J., Yeagle, P. L. and Bentz, J. (1989a) Physiological levels of diacylglycerols in phospholipid membranes induce membrane fusion and stabilize inverted phases. *Biochemistry* 28, 3703-9.
- Siegel, D. P., Banschbach, J. and Yeagle, P. L. (1989b) Stabilization of HII phases by low levels of diglycerides and alkanes: an NMR, calorimetric, and x-ray diffraction study. *Biochemistry* 28, 5010-5019.
- Siegel, D. P., Burns, J. L., Chestnut, M. H. and Talmon, Y. (1989c) Intermediates in membrane fusion and bilayer/nonbilayer phase transitions imaged by time-resolved cryo-transmission electron microscopy. *Biophys J* 56, 161-9.

- Siegel, D. P. (1993) Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophys J* 65, 2124-40.
- Siegel, D. P., Green, W. J. and Talmon, Y. (1994) The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions: a study using temperature-jump cryo-electron microscopy. *Biophys J* 66, 402-14.
- Siegel, D. P. (1999) The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys J* 76, 291-313.
- Siegel, D. P. and Kozlov, M. M. (2004) The gaussian curvature elastic modulus of N-monomethylated dioleoylphosphatidylethanolamine: relevance to membrane fusion and lipid phase behavior. *Biophys J* 87, 366-74.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-72.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-31.
- Sot, J., Ibarguren, M., Busto, J. V., Montes, L. R., Goñi, F. M. and 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, 3230-6.
- Stillwell, W. and Wassall, S. R. (2003) Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126, 1-27.
- Stillwell, W., Shaikh, S. R., Zerouga, M., Siddiqui, R. and Wassall, S. R. (2005) Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 45, 559-79.
- Tani, M. and Hannun, Y. A. (2007) Analysis of membrane topology of neutral sphingomyelinase 2. *FEBS Lett* 581, 1323-8.
- Tenchov, B. G., MacDonald, R. C. and Siegel, D. P. (2006) Cubic phases in phosphatidylcholine-cholesterol mixtures: cholesterol as membrane "fusogen". *Biophys J* 91, 2508-16.
- Terrones, O., Antonsson, B., Yamaguchi, H., Wang, H. G., Liu, J., Lee, R. M., Herrmann, A. and Basáñez, G. (2004) Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem* 279, 30081-91.
- van Duyl, B. Y., Ganchev, D., Chupin, V., de Kruijff, B. and Killian, J. A. (2003) Sphingomyelin is much more effective than saturated phosphatidylcholine in excluding unsaturated phosphatidylcholine from domains formed with cholesterol. *FEBS Lett* 547, 101-6.
- Vargas, R., Mariani, P., Gulik, A. and Luzzati, V. (1992) Cubic phases of lipid-containing systems. The structure of phase Q223 (space group Pm3n). An X-ray scattering study. *J Mol Biol* 225, 137-45.
- Veatch, S. L., Polozov, I. V., Gawrisch, K. and Keller, S. L. (2004) Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. *Biophys J* 86, 2910-22.
- Verkleij, A. J. (1984) Lipidic intramembranous particles. *Biochim Biophys Acta* 779, 43-63.
- Villar, A. V., Alonso, A. and Goñi, F. M. (2000) Leaky vesicle fusion induced by phosphatidylinositol-specific phospholipase C: observation of mixing of vesicular inner monolayers. *Biochemistry* 39, 14012-8.

- Villar, A. V., Goñi, F. M. and Alonso, A. (2001) Diacylglycerol effects on phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and vesicle fusion. *FEBS Lett* 494, 117-20.
- Vogel, S. S., Leikina, E. A. and Chernomordik, L. V. (1993) Lysophosphatidylcholine reversibly arrests exocytosis and viral fusion at a stage between triggering and membrane merger. *J Biol Chem* 268, 25764-8.
- Wang, W., Yang, L. and Huang, H. W. (2007) Evidence of cholesterol accumulated in high curvature regions: implication to the curvature elastic energy for lipid mixtures. *Biophys J* 92, 2819-30.
- Wang, Y., Bjes, E. S. and Esser, A. F. (2000) Molecular aspects of complement-mediated bacterial killing. Periplasmic conversion of C9 from a protoxin to a toxin. *J Biol Chem* 275, 4687-92.
- Wassall, S. R., Brzustowicz, M. R., Shaikh, S. R., Cherezov, V., Caffrey, M. and Stillwell, W. (2004) Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem Phys Lipids* 132, 79-88.
- Wassall, S. R. and Stillwell, W. (2008) Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. *Chem Phys Lipids* 153, 57-63.
- Weber, J. (2006) ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1162-70.
- White, S. H. and Wimley, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 319-65.
- Wilschut, J., Corver, J., Nieva, J. L., Bron, R., Moesby, L., Reddy, K. C. and Bittman, R. (1995) Fusion of Semliki Forest virus with cholesterol-containing liposomes at low pH: a specific requirement for sphingolipids. *Mol Membr Biol* 12, 143-9.
- Yan, F., John, S. K. and Polk, D. B. (2001) Kinase suppressor of Ras determines survival of intestinal epithelial cells exposed to tumor necrosis factor. *Cancer Res* 61, 8668-75.
- Yeagle, P. L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 822, 267-87.
- Zhao, J., Zhou, Q., Wiedmer, T. and Sims, P. J. (1998) Palmitoylation of phospholipid scramblase is required for normal function in promoting Ca²⁺-activated transbilayer movement of membrane phospholipids. *Biochemistry* 37, 6361-6.