

ESTUDIO ACOPLADO “SPR-AFM” DE LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DE BICAPAS LIPÍDICAS SOPORTADAS CON CARACTERIZACIÓN TOPOGRÁFICA Y NANOMECAÁNICA

M. Antonieta Daza Millone (1), María Elena Vela (1), Eduardo Prieto (1), Vanesa Herlax (2), Sabina Maté (2).

(1) INIFTA (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. (2) INIBIOLP (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.
e-mail: dazamillone@inifta.unlp.edu.ar

Introducción

Las membranas plasmáticas constituyen la barrera que separa el medio intracelular del espacio extracelular, desempeñando un rol clave en la mayoría de las funciones celulares, sean estas mecánicas, eléctricas, de señalización, de transporte, entre otras. La comprensión de la estructura y dinámica de estas membranas es de suma importancia para la biología, la medicina, la tecnología y las aplicaciones biomédicas. Las bicapas lipídicas soportadas (SLBs) y las vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) son sistemas que se emplean como modelo de membranas celulares para la realización de estudios biofísicos tendientes a caracterizar la estructura y función de membranas. Una gran variedad de técnicas se ha desarrollado durante los últimos años para investigar tanto los lípidos de membrana como las proteínas asociadas en sus estados nativos. Entre éstas, la resonancia de plasmones superficiales (SPR) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM), se han convertido en técnicas muy ventajosas para el estudio de las interacciones biomoleculares y de la organización nanoscópica de las membranas^[1]. Sin embargo, el éxito de tales determinaciones depende en gran medida de la preparación de los sistemas modelo de membranas, comprendiendo un reto tecnológico que involucra muchas variables (como la modificación de la superficie del sustrato, la composición de los lípidos y buffers empleados, la reconstitución de dichas superficies para su reutilización). Contar con modelos de membrana, sencillos de reproducir y adaptables a distintos sistemas, brindaría un gran avance para estudios posteriores de interacción de fármacos y nanotoxicidad.

Objetivo del trabajo

Poner a punto la metodología de trabajo para la funcionalización de chip sensores de oro de SPR con el objeto de inmovilizar SUVs o formar SLBs. Se pretende también acoplar la técnica de AFM para la caracterización tanto topográfica como nanomecánica de dichas superficies.

Procedimiento experimental

Se prepararon vesículas de fosfolípidos puros (DMPC, POPC y DOPC) de 0,5 mg/mL o bien de mezclas binarias (DOPC/Cho) o ternarias (DOPC/24:1SM/Cho y DOPC/16:0SM/Cho) de 0,4 mg/mL. Los lípidos fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids y se emplearon sin purificación adicional. Primeramente se prepararon MLVs y luego mediante sonicación se obtuvieron SUVs para realizar los experimentos.

Como superficies se emplearon chips de oro de 50 nm de espesor adquiridos de Bionavis™ (SPR102 AU). Previamente a su uso se lavaron con NH₃:H₂O₂ durante 10 segundos a ebullición, se enjuagaron con agua MilliQ y secaron con N₂.

Formación de monocapas autoensambladas: los chips de oro se modificaron con una monocapa autoensamblada (SAM) de alcanotiol por inmersión de los chips durante en solución etanólica de MUA. Para los ensayos se emplearon ácido 11-mercaptopundecanoico (MUA), 11-mercaptopundecanol (MUOH) y diotiotreitol (DTT).

El chip modificado *ex situ* se ingresó en el MP-SPR (Bionavis, Tampere, Finlandia).

Ensayos SPR: La inyección de las SUVs se realizó a 10 µL/min durante 20 min en un flujo de buffer fosfato (PB) 10 mM pH 7.4 o alternativamente con PBS 100 mM pH 7.4. La regeneración de la superficie, para realizar un nuevo experimento conservando la SAM, se realizó mediante un pasaje de Triton X-100 1% en PBS a un flujo de 10 µL/min durante 1 min.

Ensayos AFM: Se realizaron experimentos paralelos *ex situ* para su caracterización en un AFM Nanoscope V (Veeco, Santa Barbara, California) con una punta de constante nominal de Si₃N₄ 0.06 N/m. Se tomaron imágenes

4° Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC 2016)

topográficas en modo contacto en una celda de fluidos y se registraron las curvas de fuerza para identificar los eventos de rupturas característicos de la interacción entre vesículas enteras o bien fusionadas al formar bicapas^[2].

Resultados

Según los resultados de SPR, la formación de las bicapas se logró en general, independientemente de la naturaleza del lípido, sobre monocapas de DTT de 30min de incubación empleando PBS 100 mM. EL DTT provee una superficie hidrofílica que permite la fusión [3] pero además es necesario contar con una fuerza iónica elevada provista por PBS 100 mM. El empleo de MUA o MUOH, permite la fusión en mezclas simples, pero en mezclas ternarias sólo se logra inmovilización de vesículas (Fig. 1a). En este caso se puede promover la fusión mediante el agregado de Ca^{2+} 1mM. Por otro lado, para evitar la fusión se empleó PB 10mM como buffer de preparación.

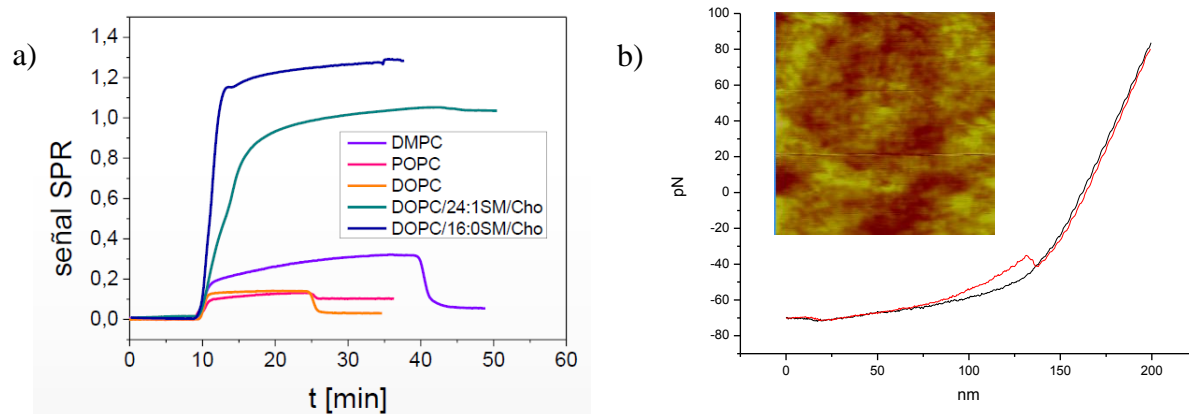


Figura 1. a) Sensorgramas SPR de inyección de mezclas lipídicas sobre monocapas de DTT en flujo de PBS. b) Curva de fuerzas con evento de ruptura de una bicapa de DOPC/Cho (inset: imagen 1 μm x 1 μm).

Con los ensayos optimizados por SPR, se caracterizaron vesículas y bicapas preparadas con la misma metodología. Los chips de oro SPR son policristalinos, sin embargo las bicapas son capaces de cubrir, copiando la morfología de la superficie (Fig 1b, inset) o bien se pueden observar las vesículas de 100 nm de diámetro promedio. Además de imágenes, se realizaron histogramas para evaluar los eventos de una ruptura o dos en cada caso.

Conclusiones

Se lograron optimizar las condiciones de inmovilización de vesículas o formación de bicapas según la composición lipídica de las vesículas. Las condiciones son reproducibles y permitieron su caracterización mediante AFM.

REFERENCIAS

- [1] Cooper, M. (2009) "Label-Free Biosensors: Techniques and applications" London, Cambridge University Press
- [2] Baró, A. and Reifenberger, R. (2012) "Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Application" Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- [3] Crecynski-Pasa, T. et al. (2009) "Self-assembled dithiothreitol on Au surfaces for biological applications: phospholipid bilayer formation" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11, 1077-1084

AGRADECIMIENTOS

CONICET, ANPCyT, CIC, UNLP