

REAL ACADEMIA DE MEDICINA DEL PAÍS VASCO
EUSKAL HERRIKO MEDIKUNTZAREN ERREGE AKADEMIA



DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO

ILMO. SR. PROF. DR.

D. FÉLIX MARÍA GOÑI URCELAY

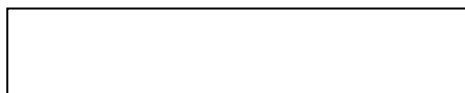
ESTUDIOS BIOFÍSICOS SOBRE LAS MEMBRANAS CELULARES

Y DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO

EXCMO. SR. PROF. DR.

D. FRANCISCO RUBIÁ VILA

(ACADÉMICO NUMERARIO RANM)



BILBAO MMXVI

REAL ACADEMIA DE MEDICINA DEL PAÍS VASCO
EUSKAL HERRIKO MEDIKUNTZAREN ERREGE AKADEMIA



DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO

ILMO. SR. PROF. DR.

D. FÉLIX MARÍA GOÑI URCELAY

ESTUDIOS BIOFÍSICOS SOBRE LAS MEMBRANAS CELULARES

Y DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO

EXCMO. SR. PROF. DR.

D. FRANCISCO RUBIÁ VILA

(ACADÉMICO NUMERARIO RANM)



BILBAO MMXVI

Edita: RAMPV/EHMEA

ISBN:

Deposito Legal:

ÍNDICE

PRÓLOGO	7
1. BASE DINÁMICA Y ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS CELULARES: UNA ACTUALIZACIÓN DEL MODELO DE SINGER-NICOLSON	11
2. PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LA ESFINGOSINA, LA CERAMIDA Y OTROS ESFINGOLÍPIDOS	31
3. FOSFOLIPASAS C Y ESFINGOMIELINASAS: LÍPIDOS COMO SUSTRATOS Y MODULADORES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	43
4. CONCLUSIÓN	75
5. BIBLIOGRAFÍA	77

Excelentísimo Señor Presidente,
Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades,
Ilustrísimos Señores Académicos,
Señoras, Señores,

Como Eneas en presencia de Dido subo emocionado al podio desde el que voy a pronunciar mi discurso de recepción. Pero el motivo de mi alteración anímica es muy distinto. El hijo de Venus recordaba las fatigas pasadas desde su salida de Troya, y yo tengo en mi mente, sobre todo, las alegrías, no exentas de dificultades, que me han proporcionado cuarenta años de dedicación profesional a la bioquímica y la biofísica.

Estudié medicina en la Universidad de Navarra y allí, en el primer curso, año académico 1968-69, tuve la rara fortuna de encontrarme con la asignatura de Bioquímica, de la que hasta entonces ignoraba casi hasta su existencia, y con un profesor excepcional, Don José María Macarulla. La impresión producida por esta asignatura y por este profesor fue tal que, antes de acabar aquel primer curso, yo ya había decidido hacer de la bioquímica mi profesión. No dudé, sin embargo, en continuar mis estudios en la Facultad de Medicina, decisión de la que no me arrepiento. Pude complementar las asignaturas médicas con otras de la Facultad de Ciencias (Genética, Química Orgánica, Química Física) y con ello adquirí una formación básica que me ha resultado más que suficiente para mi dedicación investigadora. El Profesor Macarulla fue desde entonces, y hasta su fallecimiento en 2012, la referencia invariable, el amigo fiel y el maestro que todos hubiéramos querido tener. Primero en Pamplona, luego, desde 1976, en Bilbao, Don José María Macarulla estuvo a mi lado, y yo al suyo. Descanse en paz.

En mi formación científica hay, además, otros tres personajes inolvidables. Por una parte, mi director de tesis, D. Esteban Santiago, que me introdujo en el campo de los fosfolípidos. Por otra, D. Nicolás van Uden, director de los Estudios Avanzados de Oeiras, de la Fundación Gulbenkian. Tuve la suerte de asistir a una serie de cursos teórico-prácticos en Oeiras, y el Dr. Van Uden me abrió los ojos a la biofísica, que más tarde sería parte sustancial de mi trabajo científico. En tercero, pero no último lugar, el profesor Dennis Chapman, uno de los creadores de la biofísica de membranas, que me acogió en su laboratorio de Londres para mis estudios postdoctorales. Con él pude vislumbrar algo de la “gran ciencia”, si bien no tuve luego, ni de lejos, su talento para penetrarla. Hasta su fallecimiento en 1999 Dennis me ofreció su amistad y apoyo desinteresados, y sobre todo su enorme perspicacia para adivinar los caminos nuevos y prometedores por donde podrían transitar mis pasos de investigador.

Con respecto a la dignísima Corporación que hoy me acoge, es imposible omitir, e innecesario recordar, la figura del profesor D. Juan Manuel de Gandarias Bajón, su creador y primer presidente. Fue también él quien inauguró los estudios bioquímicos en Vizcaya. Desde mi llegada a Bilbao me distinguió con su amistad y me otorgó su protección. Aún recuerdo la llamada telefónica en la que me ofreció el gran honor de pertenecer a esta Real Academia, aunque mi recepción se haya retrasado más de la cuenta sin ningún motivo específico. Juan Manuel nos dejó en 2009. Yo lo recuerdo como un caballero a la antigua, culto y amable, con un algo del doctor Iturriz y un algo del marqués de Bradomín.

Como es natural, no sólo mis profesores, sino también mis colegas y alumnos han contribuido a hacer de mi persona y de mi trabajo lo que tenga de bueno. Su lista es muy larga, afortunadamente, pero hoy no quiero ni puedo omitir los nombres de quienes contituyeron el grupo germinal de lo que luego sería la Unidad de Biofísica, José Ignacio García-Gurtubay, Alicia Alonso, y José Luis R. Arrondo. Ellos tres representan el epítome de la amistad generosa y de la entrega a una tarea. Estoy verdaderamente orgulloso de tenerlos por colegas y amigos.

En mi discurso haré referencia a los aspectos que han centrado mi investigación científica en los últimos años. Haré primero un esbozo de nuestra visión actual sobre la estructura y dinámica de las biomembranas, seguiré resumiendo algunos estudios recientes sobre ceramidas y otros esfingolípidos sencillos, y terminaré hablando de las esfingomielinasas, cuya actividad genera ceramidas, y de sus parientes cercanos, las fosfolipasas C.

Abreviaturas: aSMase, esfingomielinasa ácida; Cer, ceramida; Cer-1-P, ceramida-1-fosfato; Chol, colesterol; DAG, diacilglicérido; DEPE, dielaidil fosfatidiletanolamina; DiIC18, 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato; DMPC, dimiristil fosfatidilcolina; DPH, difenilhexatrieno; DPPC, dipalmitil fosfatidilcolina; DPPS, Dipalmitil fosfatidilserina; DSC, calorimetría diferencial de barrido; FRET, fluorescencia la transferencia de energía de resonancia; GPI, glicosil fosfatidilinositol; GUV, vesículas unilamelares gigantes; H_{II}, fase hexagonal invertida; IP3, 1,4,5-trifosfato de inositol; L_α, fase lamelar fluida o líquida cristalina; L_β, fase lamelar gel; Lc, fase bicapa cristalina; L-H, transición de fase lamelar a hexagonal; LmPLC, *Listeria monocytogenes* fosfolipasa C / esfingomielinasa; LUV, vesículas unilamelares grandes; nSMase, esfingomielinasa neutra; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PC-PLC, fosfolipasa C preferente de fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; PH, homología de plekstrina (dominio); PI, fosfatidilinositol; PI-PLC, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol; PIP2, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PME fosfatidilmetanol; POPC, 1-palmitil-2-oleil fosfatidilcolina; Sph-1-P, esfingosina-1-fosfato; PS, fosfatidilserina; γSA, gamma arreglo específico (en fosfolipasa Cy); SM, esfingomielina; SMase, esfingomielinasa; SUV, vesículas unilamelares sonicadas.

1. BASE DINÁMICA Y ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS CELULARES: UNA ACTUALIZACIÓN DEL MODELO DE SINGER-NICOLSON*

* Adaptación del trabajo de F.M. Goñi [158]

INTRODUCCIÓN

Las membranas biológicas constituyen los contornos celulares y los contornos de los orgánulos celulares. Están constituidas por una matriz hidrofóbica, formada por una doble capa de fosfolípidos orientados (en plantas glicolípidos) a la cual se unen las proteínas de diferentes maneras. Las membranas existen en estado condensado y es contradictorio el extendido concepto de que todas las reacciones bioquímicas ocurren en solución acuosa. Una parte muy importante de los procesos bioquímicos que son esenciales para la célula ocurren en la membrana celular, es decir: en estado condensado. Esto queda demostrado por la proporción de enzimas celulares que existen en una forma ligada a la membrana, mucho más alta en organismos más complejos, y de hasta un cuarto en la especie humana.

Nuestro punto de vista actual sobre la dinámica y estructura de las membranas biológicas está delimitado por el modelo de "mosaico fluido" de Singer y Nicolson de 1972 [1]. De hecho, éste había sido influenciado por el modelo previo de Danielli y Davson (1935) [2], quienes ya habían propuesto la bicapa de fosfolípidos como el elemento base estructural de las biomembranas (Fig. 1). El modelo de Nicolson fue un éxito inmediato, porque incorporaba de una manera simple y racional un número muy amplio de observaciones experimentales e ideas concebidas en los 50 y 60, muchas de las cuales parecían irreconciliables hasta ese momento. El éxito no sólo fue muy rápido, sino que también y desde entonces, después de cuatro décadas, el esquema de Singer y Nicolson aparece intacto en los capítulos de Membranas de cada libro de texto de Bioquímica o Biología Celular.

De hecho, el modelo de mosaico fluido ha resistido muy bien el paso del tiempo, y esto en un campo donde la investigación ha sido muy activa, en el que entre tanto han aparecido y desaparecido nuevas hipótesis. Como consecuencia nuestro punto de vista de la estructura de biomembranas no sigue siendo el mismo que hace cuarenta años. Se han establecido en este periodo un número de conceptos fundamentales que complementan y amplían el modelo original sin destruir sus cimientos. Lo que sigue tiene como objetivo resumir algunos de estos aspectos novedosos de la estructura y la dinámica de las biomembranas (novedosos con respecto a 1972).

Las membranas según Singer y Nicolson

Como punto de partida puede ser útil revisar brevemente las principales características del modelo de Singer y Nicolson. Para comenzar, el "mosaico fluido" se debe por una parte a la similitud obvia de la cabeza polar del lípido en la Fig. 1B con las teselas en un mosaico romano y

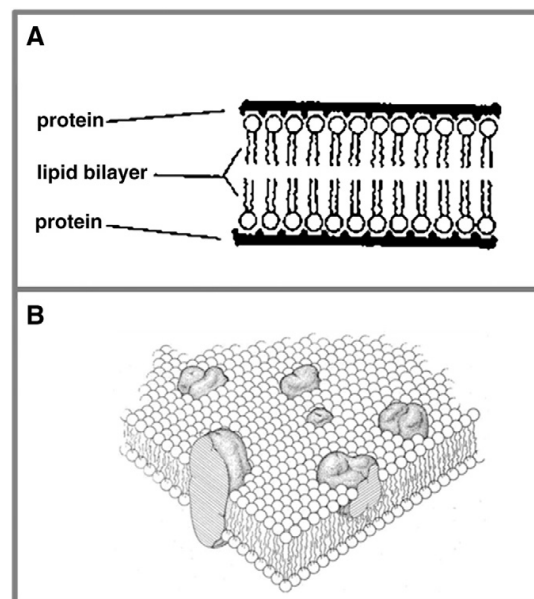


Fig. 1. Modelos de estructuras de biomembranas. (A) Modelo de Danielli-Davson (1935). (B) Modelo de Singer y Nicolson (1972).

por otra parte al hecho, subrayado por Singer y Nicolson, de que, a diferencia de los mosaicos antiguos, en las membranas celulares tanto los lípidos como las proteínas están en constante movimiento, difundiéndose a lo largo del plano de la membrana o en rotación alrededor de un eje perpendicular al plano de la membrana. Entre las características específicas del modelo deberíamos mencionar:

- a) Los lípidos están organizados en una doble capa o bicapa [3]. Los lípidos de las membranas son anfipáticos, es decir, poseen un residuo hidrofóbico y uno hidrofílico. Esto sucede en los fosfolípidos, los glicolípidos y los esteroides. Debido a su carácter anfipático, en un medio acuoso éstos se organizan en ambas caras de un plano imaginario, con las partes hidrofóbicas enfrentadas entre sí y los residuos polares orientados hacia el espacio acuoso externo. De hecho, cuando se añade agua a lípidos secos, espontáneamente se organizan entre sí en una bicapa, por ejemplo durante la formación de liposomas. (Nótese sin embargo que ciertos lípidos no forman espontáneamente una bicapa, son los denominados "lípidos no-lamelares", véase más adelante). La bicapa en un medio acuoso proporciona un modo sencillo para la estabilización termodinámica de una población de moléculas que no son ni enteramente hidrofóbicas ni enteramente hidrofílicas. Como fue mencionado anteriormente, Singer y Nicolson rescataron el concepto de bicapa de Danielli y Davson, después de que la idea hubiese sido criticada severamente en los años 60.
- b) Las proteínas de membrana pueden asociarse tanto a la cabeza polar de la bicapa lipídica (proteínas periféricas) como a la matriz hidrofóbica (proteínas integrales). La unión de proteínas a la región más externa de la bicapa había sido propuesta por Danielli y Davson, pero la idea de proteínas incluidas en un ambiente hidrofóbico, respaldada mediante experimentación hacia finales de los años 60 y principios de los 70, nunca antes había sido propuesta de una forma clara y explícita. De hecho, las proteínas periféricas (o extrínsecas) y las integrales (o intrínsecas) [4] fueron definidas independientemente de un modo puramente operacional: proteínas periféricas serían aquéllas que pueden ser removidas de la membrana utilizando métodos relativamente suaves, como cambios en el pH o la fuerza iónica del tampón, mientras que las proteínas integrales serían moléculas anfipáticas que requerirían el uso de agente más drásticos como, por ejemplo, detergentes o disolventes orgánicos. En la práctica, la correspondencia entre estos dos grupos de proteínas clasificados por sus propiedades de solubilización y las dos formas de asociación de proteínas a la bicapa del modelo de Singer-Nicolson han llevado a una identificación casi siempre precisa de los dos tipos de proteínas en el modelo con los dos grupos correspondientes de proteínas solubilizadas diferencialmente en el tubo de ensayo.
- c) Tanto los lípidos como las proteínas están en constante movimiento (de ahí el nombre mosaico fluido antes mencionado). En principio se pueden considerar tres modos principales de movimiento: rotacional, traslacional y transbicapa, pero este último está prohibido en el modelo. El movimiento *rotacional* ocurre esencialmente en torno al eje perpendicular al plano de la membrana. Tanto los lípidos como las proteínas en condiciones fisiológicas rotan alrededor de su eje longitudinal a frecuencias en el orden

de $10^8 - 10^9 \text{ s}^{-1}$ (lípidos) y $10^3 - 10^5 \text{ s}^{-1}$ (proteínas). La rotación de proteínas había sido considerada en el modelo original pero sin prestarle demasiada atención. Esto fue demostrado experimentalmente por Chapman y colaboradores [5]. Más tarde fue encontrado que todas las proteínas, inclusive aquellas ancladas al citoesqueleto, rotan, y cuando la rotación es bloqueada de alguna manera, las proteínas pierden su funcionalidad. La *difusión traslacional* de los lípidos y las proteínas ocurre a lo largo del plano de la membrana, sin obstáculos (en el modelo original) por barreras difusionales. La difusión traslacional (o lateral) ocurre como una difusión molecular convencional (*e.g.* solutos en agua) sólo en dos dimensiones. Los coeficientes de difusión de los lípidos están en el rango de $10^{-8} - 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y los de proteínas integrales de membrana entre $10^{-9} - 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [6]. Finalmente la difusión transbicapa (o *flip-flop*), aunque en teoría es posible, no se produciría debido a la barrera energética presentada por la región hidrofóbica de la bicapa a los grupos polares de los lípidos y proteínas.

Podría ser útil en este punto esclarecer la diferencia entre "fluidez" y "orden". Ambos son conceptos ampliamente empleados en el campo de las membranas pero, como no son verdaderos parámetros físicos, con dimensiones definidas, pueden ser confundidos. *Fluidez* se refiere al conjunto de movimientos moleculares en la membrana. Es usualmente estimado a través de la polarización de la emisión de fluorescencia de sondas hidrofóbicas, tales como DPH. El *orden* refleja principalmente la proporción de conformeros rotacionales *gauche* y anti (o *trans*) en las cadenas acílicas de los lípidos: a mayor proporción de rotámeros anti, mayor grado de orden. Los parámetros de orden son usualmente derivados de espectros de NMR, EPR o IR. Orden también puede aplicarse a proteínas en la membrana en, por ejemplo, complejos funcionales, agregados de proteínas funcionales, proteínas virales, etc.

- d) Las membranas son asimétricas. Esto es consecuencia directa de la falta de movimiento a través de la bicapa que acabamos de mencionar y su importancia fue subrayada por Singer y Nicolson. La asimetría significa que los dos lados de una membrana no son idénticos. Los lípidos presentan una asimetría relativa, es decir, la proporción de un lípido dado en una de las monocapas es diferente a su proporción en la otra. Un conocido ejemplo es la fosfatidilserina, que se encuentra casi en su totalidad en el lado interior de las membranas de glóbulos rojos humanos. Por el contrario, la mayoría de la fosfatidilcolina, pero no toda, se encuentra en la monocapa externa [7]. (Incidentalmente, el estudio de la asimetría de los lípidos presenta dificultades técnicas, y ello puede explicar la carencia de los datos necesarios en este campo). La asimetría de proteínas es absoluta, cada molécula individual de proteína en una membrana tiene exactamente la misma orientación. Las proteínas integrales son ancladas a uno o ambos lados de la membrana inmediatamente después de su síntesis e inserción en la bicapa. La unilateralidad de las proteínas tiene consecuencias funcionales obvias, de hecho es la base molecular de lo que ha sido denominado "el metabolismo vectorial".

¿Qué hay de nuevo?

Se han producido miríadas de datos experimentales en los últimos cuarenta años relacionados con la estructura y la dinámica de las biomembranas. También han aparecido nuevos conceptos

en el campo, junto, o a veces en paralelo, a los datos experimentales. Algunos de ellos han resistido la confrontación experimental, otros no. Es en última instancia una cuestión de elección personal cuáles de entre los primeros deben ser incluidos en una revisión dirigida a una amplia audiencia. Los siguientes siete son sin duda importantes, pero están lejos de constituir un catálogo exhaustivo.

- a) *Alta densidad de proteínas transmembrana.* En el modelo original (Fig. 1B) sólo una proteína parece atravesar la bicapa lipídica. Desde nuestro punto de vista actual una multitud de proteínas transmembrana apenas deja una fracción de la bicapa sin perturbar.
- b) *Proteínas que se unen a las membranas ocasionalmente.* Tradicionalmente se considera que las proteínas de las células existen ya sea unidas a membrana o en forma soluble. Sin embargo, ahora se acepta que existe un continuo entre proteínas que nunca hacen un contacto funcional significativo con una membrana, y las que están permanentemente ancladas a la membrana. Esto deja un amplio espacio para las proteínas que existen a tiempo parcial en el citosol, y a tiempo parcial unidas a una membrana
- c) *Significados fisiológicos novedosos para las fases lipídicas.* En el campo de las membranas sólo las fases lamelares líquido-cristalino habían sido consideradas funcionalmente relevantes. Sin embargo, otras fases, *e.g.*, líquido-ordenadas, cúbicas, y otras, han demostrado tener interés fisiológico.
- d) *Desviaciones del equilibrio: estructuras no lamelares.* Como se describió anteriormente el modelo de Singer-Nicolson exige que los lípidos estén organizados en forma de bicapa. Sin embargo, muchas observaciones experimentales apoyan la idea de que, en determinadas circunstancias, una pequeña región de una membrana celular puede adoptar transitoriamente una arquitectura no bicapa.
- e) *Las membranas están curvadas.* A pesar de la apariencia plana del dibujo modelo de Singer-Nicolson, las membranas celulares están generalmente curvadas, y su curvatura depende de la geometría y las propiedades mecánicas de los lípidos y las proteínas.
- f) *La heterogeneidad lateral de las membranas.* La bicapa Singer-Nicolson no presenta grandes heterogeneidades en su superficie, aparte de los "baches" causados por las proteínas. Sin embargo, el concepto actual de las membranas considera la bicapa formada por parches heterogéneos ("dominios"), con diámetros que probablemente se encuentran entre 0.1 y 1 μm , enriquecidos en ciertos lípidos y proteínas que les proporcionan propiedades funcionales características. Esta heterogeneidad lateral es al mismo tiempo estructural y funcional.
- g) *Las desviaciones del equilibrio: movimientos de lípidos transbicapa.* También contrario al modelo en su forma primitiva, todo un conjunto de datos experimentales indican que, bajo condiciones espacio-temporales restringidas, los lípidos de membrana pueden someterse a un rápido movimiento transbicapa o flip-flop.

Debe ser mencionado antes de terminar esta sección que algunos de los "datos novedosos" ya fueron discutidos por Nicolson en 1976 [8], en particular las restricciones de la membrana a la movilidad lateral, y la heterogeneidad lateral.

Aglomeración de proteínas en las membranas

En 2005 D.M. Engelman [9] escribió una actualización de 3 páginas del modelo de Singer y Nicolson, como una introducción a una serie de revisiones sobre estructura de membrana. Un tratamiento más claro y conciso de la materia es difícil de imaginar. Una de las principales ideas novedosas que se presentan en ese artículo magistral es que las proteínas transmembrana son tan frecuentes en la membrana que, de hecho, casi ninguna molécula de lípido en la bicapa queda imperturbada (Fig. 2). En 1972 la idea de una proteína en contacto directo con el residuo hidrofóbico del lípido había sido revolucionaria. Singer y Nicolson fueron lo suficientemente

cautelosos como para incluir un solo ejemplo en su representación. Sin embargo, cálculos y experimentos posteriores (por ejemplo, microscopía de crio-fractura) han mostrado que las verdaderas bicapas están en realidad penetradas por muchos dominios de proteínas transbicapa [8], [10], [11]. En el modelo original (Fig. 2A) los lípidos no son perturbados por la presencia de proteínas, y la relación lípido:proteína es tan grande que en la práctica la bicapa entera no se ve afectada por las proteínas. Nuestro punto de vista actual es muy diferente, como se muestra en la Fig. 2B.

Además de la presencia muy frecuente de proteínas transbicapa, la Fig. 2B representa otras tres características que ahora se considera que están presentes, si no en todas las membranas celulares, en la mayoría; a saber, la existencia de voluminosos dominios proteicos extramembrana, los frecuentes

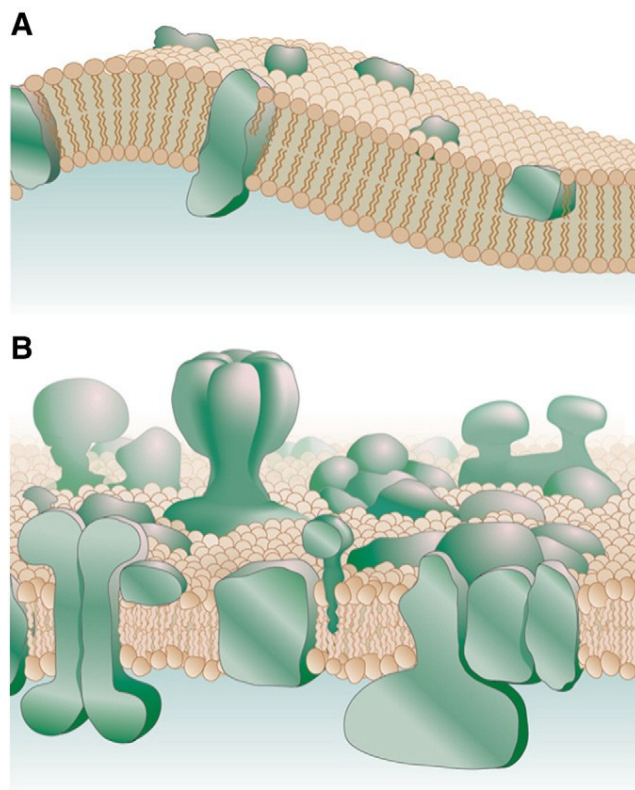


Fig. 2. El modelo de Singer y Nicolson. (A) El modelo propuesto originalmente. (B) Una versión modificada y actualizada, de acuerdo a Engelman [9].

contactos entre proteínas y el espesor irregular de la bicapa lipídica. Según se conoce la estructura tridimensional de más proteínas de membrana [12] cada vez es más claro que en muchas proteínas integrales, un dominio transmembrana relativamente pequeño, a menudo formado por unas pocas α -hélices, está acompañado por voluminosos dominios extramembrana. La H^+ -ATPasa mitocondrial [13] es un ejemplo típico. La combinación de una alta densidad de proteínas integrales de membrana con dominios extra-bicapa voluminosos y proteínas periféricas

que interactúan tanto con lípidos como con dominios polares de proteínas integrales conduce a una situación en la que la difusión lateral de las proteínas está severamente restringida, algo que Singer y Nicolson no podían prever en 1972. En palabras de Engelman, "las membranas son más mosaico que fluido" [9]. Téngase en cuenta también que, si bien no se muestra explícitamente en la Fig. 2B, los voluminosos dominios de las proteínas extramembranales están relacionados a menudo unidos a cadenas de hidratos de carbono.

Los contactos entre proteínas integrales no ocurren en el modelo de 1972, e incluso una década después, muchos científicos en el campo todavía recelaban de la idea (pero no todos, ver [8] y sus referencias). Hoy en día tales interacciones proteína-proteína se dan por hecho en múltiples eventos, por ejemplo la señalización mediada por la proteína-G, en la que un receptor proteico, tras la unión del efector, interactuará físicamente con una proteína-G que, a su vez, se unirá transitoriamente y activará una adenilato ciclasa, desencadenando así una respuesta celular a la señal [14]. Otro caso relevante de contactos proteína-proteína es proporcionado por la estructura del complejo respiratorio mitocondrial, de los cuales NADH:ubiquinona reductasa, o complejo I, es un buen ejemplo [15].

Debido a que las porciones transmembrana de las proteínas intrínsecas de membrana presentan una superficie rugosa y los dominios enteros tienen un tamaño no crítico con respecto a los lípidos, los lípidos de membrana son perturbados por las proteínas. Esta perturbación se manifiesta por, al menos, tres fenómenos: la difusión lateral de los lípidos es obstaculizada por las proteínas (de lo que se hablará más adelante), las cadenas acílicas de lípidos están desordenadas, por ejemplo, se incrementa la proporción de rotámeros *gauche* [16], [17] y el espesor de la bicapa se hace desigual. Este último fenómeno se debe a la frecuente falta de coincidencia entre la longitud de las "barras" hidrófobas (α -hélices) de los dominios transmembrana de proteínas y la longitud de los grupos alquilo de las cadenas lipídicas. En principio, esto podría resolverse inclinando las largas α -hélices hasta que toda la porción hidrófoba estuviese inmersa en los lípidos, y estirando las más cortas de modo que sus extremos polares saliesen de la bicapa. Se conocen ejemplos de proteínas de membrana que pueden flexionar sus hélices transmembrana para compensar el desajuste hidrofóbico [18]. Sin embargo, razones energéticas evitan casi siempre este tipo de comportamiento, y es el lípido quien se debe acomodar. Al aumentar o disminuir la proporción de rotámeros *gauche* las cadenas acílicas lipídicas pueden disminuir o aumentar su longitud. También se puede imaginar una selectividad relativa para cadenas más largas o más cortas, en términos del número de átomos de C, en contacto con las proteínas, siempre teniendo en cuenta el carácter efímero de estos contactos. El resultado global es que el espesor de la bicapa fluctúa continuamente en el espacio y en el tiempo como resultado de las interacciones proteína-lípido [19]. Por otra parte, en el caso frecuente de las proteínas cuya masa está asimétricamente distribuida entre ambas monocapas, la perturbación también será asimétrica, tal vez incluso alterando puntualmente la curvatura de la membrana [20], [21]. Se ha sugerido que, recíprocamente, la distribución asimétrica de los lípidos podría afectar varias estructuras cargadas en membranas, por ejemplo las cargas que abren o cierran (*gating*) algunos canales nerviosos [22].

El campo de las interacciones lípido-proteína fue objeto de disputas acaloradas en los años inmediatamente posteriores al artículo de Singer y Nicolson. Se propuso que los lípidos en

contacto directo con las proteínas ("lípidos de contorno") formasen un anillo de lípidos de larga duración que proporcionase a la proteína un entorno lipídico específico. Sin embargo estudios de espectroscopía ^2H NMR y otras mediciones han mostrado que todos los lípidos en la membrana se intercambian libremente en la escala de tiempo (10^{-3} - 10^{-5} s) relevante para los tiempos de recambio catalíticos de proteínas de membrana [23 y sus referencias], por lo tanto el contorno lipídico no debería modificar significativamente la estructura de la membrana más allá de las fluctuaciones en el espesor de la bicapa antes mencionadas. Una importante excepción a esta regla son los lípidos que, en pequeño número, por ejemplo, 1 ó 2 por proteína, están firmemente unidos a ciertas proteínas de membrana y son esenciales para su estructura y/o función. Se conocen más de 100 sitios específicos de unión a lípidos en proteínas de membrana, en los cuales los lípidos no están unidos covalentemente [24].

Cuando las proteínas vienen como visitantes

La membrana de Singer-Nicolson es un sistema *aislado* en el sentido termodinámico: no está permitido el intercambio de materia o energía con el entorno. Por supuesto, la situación en la célula es muy diferente, dado que todo tipo de señales metabólicas y otras moléculas llegan y abandonan las membranas. También hay proteínas que contactarán con la membrana sólo bajo ciertas condiciones, y posteriormente permanecerán o unidas a ésta o retornarán al medio acuoso. Éstas fueron llamadas por Nicolson [8] proteínas asociadas a membrana, y de hecho la posibilidad de este tipo de proteínas fue ya mencionada en el documento de 1972, en el contexto de la endocitosis y la agregación de los receptores.

El tema de las proteínas que pueden existir ya sea libres o unidas a la membrana ha sido estudiado por varios autores en el pasado. Wilson [25] las llamó "proteínas ambicuas (*ambiquitous*)", y fue quizás el primero en presentar de una manera sistemática la idea de que la variación en la distribución intracelular puede representar un mecanismo de regulación para adaptarse a un cambio metabólico determinado. Burn [26] introdujo el concepto de "proteínas anfitrópicas" para abarcar el amplio grupo de proteínas que se asocian reversiblemente con membranas bajo ciertas condiciones fisiológicas. Más tarde, Bazzi y Nelsestuen [27] ejemplificaron en las proteína quinasas C y anexinas el paradigma de las proteínas que se encuentran tanto en forma soluble como unidas a la membrana, teniendo su cambio de ubicación importantes consecuencias fisiológicas. El artículo de Wimley y White [28] merece una atención especial en este contexto. Estos últimos autores lograron una descripción cuantitativa de la partición de los péptidos en las interfaces de membrana mediante la construcción de una escala de "hidrofobicidad interfacial" que ha encontrado después importantes aplicaciones. También señalaron que la partición en membrana promueve la formación de una determinada estructura secundaria en el péptido y calcularon el acoplamiento de la formación de la estructura a la partición.

Se ha propuesto una taxonomía de estas proteínas de membrana no-permanentes [29]. Se pueden clasificar bien de acuerdo con la reversibilidad del contacto con la membrana, bien con la naturaleza (fuerza) de la interacción. Siguiendo el criterio anterior, las proteínas de membrana no-permanentes pueden: (a) interactuar de forma reversible con la membrana, por ejemplo,

proteínas de transferencia de lípido [30] o (b) mostrar contactos de muy larga duración (irreversibles), como en el caso de los factores de coagulación sanguíneos [31].

Las proteínas no permanentes de membrana pueden, además, ser clasificadas entre las que interactúan débilmente y aquellas que interactúan fuertemente con la membrana. Las proteínas que interaccionan débilmente con la membrana están unidas a través de fuerzas no covalentes distintas del enlace hidrofóbico. Las fuerzas electrostáticas y polares son las más relevantes en este caso. Como ejemplo, muchas proteínas activadas por ceramida y diacilglicerol implicadas en la señalización celular pertenecen a este grupo [32]. Las proteínas no permanentes que interactúan fuertemente con la membrana están unidas, aunque no exclusivamente, a través de fuerzas hidrofóbicas. En este grupo de proteínas es muy importante distinguir entre (a) proteínas cuya interacción no conduce a la modificación covalente de la membrana lipídica, como es el caso de las toxinas de ciertas anémonas [33] o bacterianas [34], y (b) las proteínas cuya interacción con membranas conduce a la modificación covalente de los lípidos, de las cuales las fosfolipasas [35]–[37] y otras enzimas del metabolismo de los lípidos son un buen ejemplo.

En general, desde 1972 nuestra visión de la estructura y la dinámica de las membranas celulares se ha ampliado para incluir el creciente número de proteínas que, formando sólo transitoriamente parte de la membrana, deben ser consideradas como proteínas de membrana debido a su función y su mecanismo de acción.

Fases lipídicas, y su importancia

Una fase se define como una región del espacio a lo largo de la cual todas propiedades físicas de un material son uniformes. "Fase" es sinónimo de "estado de la materia". Por ejemplo, el agua puede existir en fase sólida, líquida o vapor. Las fases son conceptos termodinámicos, es decir, entidades ideales a las que los objetos reales se asemejan más o menos. La condición de uniformidad incluida en la definición debe entenderse macroscópicamente, al menos en la escala micrométrica, en el contexto de las membranas lipídicas.

A lo largo del siglo pasado se identificaron una serie de fases con propiedades intermedias entre líquido y sólido. Son colectivamente conocidas como *mesofases*. Un ejemplo bien conocido es la fase líquido-cristalina, en la que parecen existir la mayoría de las membranas celulares, que se caracteriza por exhibir una fluidez de tipo líquido, aunque sus moléculas están orientadas de una manera similar al cristal. Los lípidos dispersos en agua pueden adoptar una rica variedad de mesofases, dependiendo de la estructura química de los lípidos, temperatura, presión, cantidad de agua, y otras variables. Los lípidos se dice que son mesomórficos [38].

El mejor método para describir una fase lipídica en medio acuoso es la dispersión de rayos X [39]–[41]. En algunos casos la ^{31}P NMR puede también proporcionar información útil [42]. Además, en casos favorables una transición de fase puede ser producida por el aumento o la disminución de la temperatura (transiciones de fase termotrópicas). El método escogido para detectar este último tipo de transiciones es la calorimetría diferencial de barrido [43], [44]. Las principales fases (mesofases) que adoptan los lípidos de membrana puros cuando son dispersados en agua son (Fig. 3):

- *Lamelar* (L), que consta de dos capas de lípidos cuyos motivos apolares están en contacto y alejados del agua. Esta es la disposición adoptada espontáneamente por la mayoría de los fosfolípidos y glicolípidos.

- *Micelar* (M), en la que los lípidos forman gotas esféricas cuya superficie está formada por los grupos de cabeza polares de lípidos mientras que las colas hidrófobas proporcionan un núcleo oleoso. Los gangliósidos y lisofosfolípidos dan lugar a dispersiones micelares en agua.

- *Hexagonal invertida* (H_{II}), formada por tubos de lípidos cuya sección transversal forma una red hexagonal. Los tubos están llenos de agua, y están formados por cabezas polares de lípidos, mientras que las colas hidrófobas llenan el espacio entre los tubos. (Por convención fases invertidas son aquellas que consisten en una dispersión "agua-en-aceite"). La fosfatidiletanolamina, en ciertas condiciones, se hidrata como una fase H_{II} .

- *Cúbica Invertida* (Q_{II}). Hay varias fases que se organizan tridimensionalmente como redes cúbicas. Una de ellas (Q^{224} , grupo espacial $Pn\ 3m$) consiste en una bicapa lipídica bicontinua curvada en tres dimensiones, que separa dos redes similares de canales de agua. Puede ser formada fácilmente a partir de monooleína [45]. Una fase cúbica diferente (Q^{227} , grupo espacial $Fd\ 3m$) está formada por micelas invertidas situadas en los vértices y centros de un cubo ideal [46], [47]. Se han encontrado otros tipos de fases cúbicas formadas por lípidos puros o mezclas sencillas de lípidos [48].

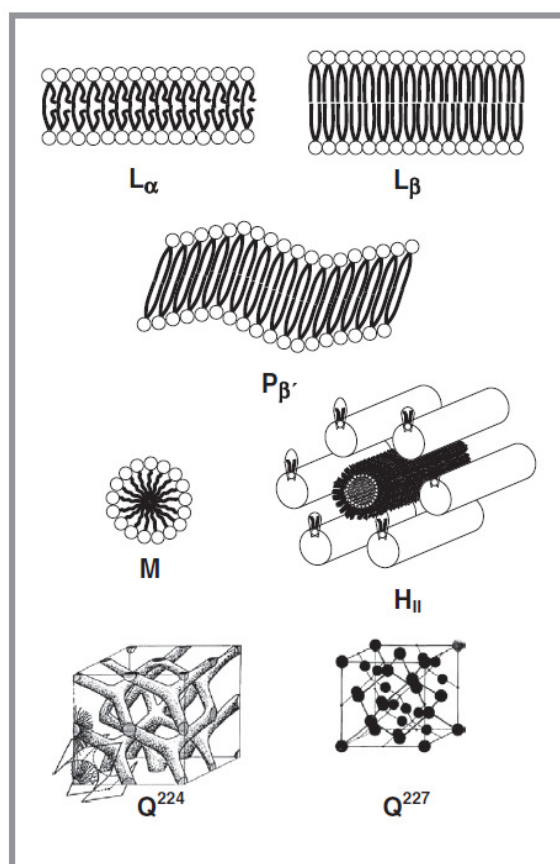


Fig. 3. Ejemplos de fases lipídicas en exceso de agua. L_{α} , lamelar líquido cristalina; L_{β} , lamelar gel; $P_{\beta'}$, lamelar ondulada; M, micelar; H_{II} , hexagonal invertida; Q^{224} , fase cúbica invertida bicontinua; Q^{227} , fase cúbica invertida discontinua.

Se conocen varias fases lamelares relevantes en el estudio de las membranas celulares (Fig. 3). La mayoría de los lípidos de membrana saturados puede dar lugar a una fase gel (o sólido) L_{β} a una temperatura dada, y a una fase fluida L_{α} (o líquido cristalina) a una temperatura superior. En la fase L_{α} , pero no en la L_{β} , los lípidos presentan transición y difusión rotacional sin impedimentos (cadena acílicas desordenadas). Por ejemplo, la dipalmitilfosfatidilcolina existe en la fase $L_{\beta'}$ por debajo de 35 °C y en la fase L_{α} por encima de 41 °C. (El símbolo "prima" (') en $L_{\beta'}$ indica que en

esta fase las cadenas de ácidos grasos están inclinadas en lugar de perpendiculares a la membrana. Esto sucede en ciertas clases de fosfolípidos, entre los cuales están las fosfatidilcolinas saturadas.) Entre 35 °C y 41 °C estos fosfolípidos dan lugar a una fase lamelar P_{β} , cuya superficie se encuentra más rugosa que plana y en la que las cadenas de ácidos grasos están inclinadas. Nótese que sólo unos pocos lípidos que pueden existir en fases L_{β} o L_{α} también pueden dar lugar a una P_{β} : la mayoría de ellos pasa directamente de L_{β} a L_{α} al calentarse, y viceversa, al enfriarse. También se han observado fases lamelares subgel a temperaturas más bajas.

Una fase lamelar *líquido-ordenada* [49], que se forma presencia de algunos fosfolípidos y colesterol, ha sido descrita más recientemente. En esta fase las moléculas de lípidos tienen la difusión lateral libre, es decir, es fluida, pero la rotación alrededor de las cadena alquilo de los enlaces C - C está restringida (cadenas de ácidos grasos ordenadas). La nomenclatura para la fase líquido-ordenado, o fluido-ordenado, no está clara: L_o o I_o son de uso frecuente. Desgraciadamente, la existencia de una fase líquido-ordenada ha llevado a llamar a L_{α} fase "líquido desordenada" (L_d , o I_d) con la confusión correspondiente.

Aunque muchas de las fases anteriores ya habían sido descritas antes de 1972, el modelo de Singer-Nicolson consagró la fase líquido-cristalina L_{α} como el paradigma al cual las membranas celulares se adaptarían. Hoy esto sigue siendo esencialmente cierto, excepto que algunos *dominios* en las membranas celulares (véase más adelante) podrían existir en estado líquido ordenado. Hay solo indicios de que algunos microdominios en la fase L_{β} también podrían estar presentes [49]. Además, las fases no lamelares pueden ser todavía biológicamente relevantes, como se explica en la siguiente sección. En cualquier caso, las estructuras de lípidos *in vitro* observadas con sólo uno o pocos lípidos pueden no corresponder a la situación de la membrana celular, donde cientos de diferentes formas lipídicas coexisten.

Estructuras (transitorias) no lamelares

No hay duda de que en el estado de equilibrio (si este término puede ser aplicado para una estructura viva) las membranas celulares existen en forma lamelar. Sin embargo los datos teóricos y experimentales ofrecen indicios claros de que, al menos transitoriamente, deben existir intermediarios estructurales no lamelares. Un claro ejemplo está dado por la fusión de membranas, durante la cual dos bicapas se unen para originar una sola [50]–[53]. La estructura lamelar debe abandonarse en algún momento, aunque sea transitoriamente, [54]. El intermediario de fusión no lamelar que conecta las dos membranas originales se denomina "tallo" de fusión (*stalk*) [51]–[56]. Varias estructuras no lamelares han sido propuestas para el tallo, en particular la fase romboédrica [57], muy sensible al grado de hidratación del sistema [58] y la fase tetragonal [59]. La fisión de membrana, el proceso en que dos vesículas se forman a partir de una, no es exactamente el caso reflejo de fusión, pero también está garantizada la presencia de intermediarios no lamelares [60].

En un contexto diferente se ha demostrado que ciertos lípidos que promueven la formación de la fase lamelar, específicamente diacilglicerol, un potente inductor de fases hexagonales y cúbicas invertidas [61], favorecen también la inserción de las proteínas de membrana [62]. Esto puede sugerir que los intermediarios no lamelares se forman transitoriamente en el proceso de

inserción de la proteína. Cabe destacar aquí que, como se ha dicho, estrictamente las fases son idealizaciones. Una membrana de la célula no es una fase lamelar, sino un objeto real cuya estructura corresponde más o menos a una fase lamelar. Por la misma razón, una toxina bacteriana dada no se inserta en la membrana a través de una fase no lamelar, ni dos membranas se fusionan a través de una fase romboédrica. Más bien estos eventos se producen a través de estructuras lipídicas que adoptan transitoriamente arquitecturas que asemejan fases romboédricas, cúbicas invertidas u otras. En resumen la bicapa lipídica inmutable mostrada en el modelo de Singer-Nicolson representa la situación mostrada por una foto fija, un video molecular probablemente nos muestre sólo alejamientos ocasionales de la estructura lamelar.

Forma y curvatura

El modelo de Singer-Nicolson muestra una membrana plana, o más bien, sucede que la curvatura no sería significativa en esa escala de tamaño. Sin embargo las membranas en las células están generalmente curvadas, y esa curvatura puede ser a veces muy alta, como en las vesículas de secreción, o en el cuello de un evento de fisión. La curvatura a menudo requiere la presencia de proteínas específicas, por ejemplo, clatrina [63], o dinamina [64]. El dominio de la proteína BAR es un módulo de unión a membrana que puede tanto producir como detectar la curvatura de la membrana [65]–[67]. BAR tiene forma de plátano y se une a membranas a través de las interacciones electrostáticas con las cargas positivas en su cara cóncava. La unión del dominio BAR a la membrana es continuada por una agregación lineal de proteínas y la formación de mallas proteicas sobre la superficie, lo que conduce finalmente a la deformación y remodelación de la membrana [65].

La curvatura no es un parámetro fijo, sino que está modulado dinámicamente por los cambios en la composición lipídica, la unión y la inserción de proteínas. Además, la curvatura de la membrana fluctúa, y las ondulaciones térmicas no pueden ser explicadas únicamente por los modos de flexión de Helfrich, y pueden estar involucrados otros modos híbridos dilatación-curvatura [68]. Se conocen varias enzimas cuya actividad está regulada por la curvatura de la bicapa [69], [70]. Hay una concienciación creciente de que la curvatura de la membrana es un factor importante para la comprensión del crecimiento, división y movimiento celular [71].

La geometría molecular de los lípidos es importante para la curvatura de la membrana. Tres conceptos diferentes son relevantes en este contexto, a saber, el empaquetamiento lipídico, la curvatura intrínseca de la monocapa y la curvatura intrínseca de la membrana. El concepto de curvatura intrínseca (espontánea) en las membranas fue introducido en 1973 por W. Helfrich [72] en un artículo verdaderamente seminal que inauguró el campo de la mecánica de membranas. La curvatura en una membrana, usualmente definida como el radio recíproco, requiere asimetría entre ambos lados, lo cual puede ser logrado por ciertas proteínas como se mencionó en el párrafo anterior, por diferentes composiciones del medio acuoso en ambos lados, y/o por la curvatura intrínseca de las monocapas [73]–[75]. A su vez, la curvatura intrínseca de la monocapa es esencialmente el resultado de la geometría molecular de los lípidos que la componen, lo que dictamina el empaquetamiento de los lípidos.

La hipótesis de que las formas de las moléculas son el origen de los diferentes modos de empaquetamiento lipídico y, por lo tanto, de las diferentes curvaturas de la monocapa, fue introducido por J. Israelachvili [76], y ha demostrado ser de gran utilidad. Sobre esta base D. Marsh [77] propuso un parámetro geométrico de empaquetamiento más realista para describir la forma de los lípidos. Este parámetro está dado por $V / A \cdot l$, donde V es el volumen de toda la molécula de lípido, l es su longitud, y A es el área del grupo de cabeza polar del lípido en la interfase lípido-agua. $V / A \cdot l = 1$ corresponde a una forma cilíndrica, y en este caso se forman estructuras lamelares (Fig. 4). Los lípidos con parámetro de empaquetamiento geométrico ≈ 1 se

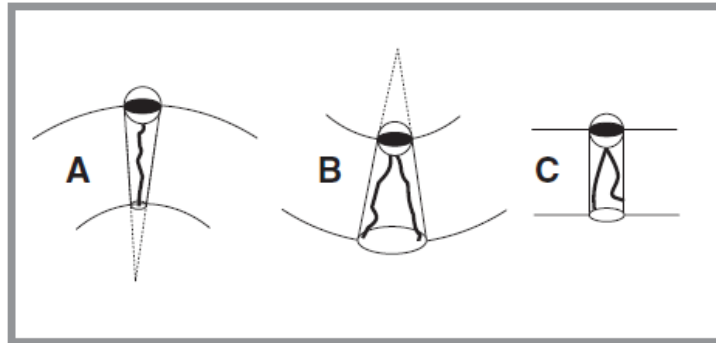


Fig. 4. Curvatura de lípido y monocapa intrínseca. A, curvatura positiva; B, curvatura negativa; C, curvatura cero.

consideran como "lípidos lamelares". Para $V / A \cdot l \neq 1$ (lípidos no lamelares) se obtienen monocapas curvas, dando lugar a fases no lamelares. $V / A \cdot l > 1$ da lugar a fases invertidas (agua en aceite), tales como H_{II} (ver arriba). A su vez $V / A \cdot l < 1$ origina fases no lamelares normales, por ejemplo micelar (Fig. 4). Se define el radio de curvatura R_0 positivo para estructuras invertidas y negativo para estructuras normales. Es

importante destacar que las dimensiones características V , A y l de los componentes lipídicos individuales en una monocapa mixta pueden ser sumados linealmente para predecir el R_0 de la monocapa. Una colección completa de valores experimentales de curvaturas de monocapa y de membrana se puede encontrar en [78]. A su vez, un parámetro mecánico elástico de la bicapa, el módulo de flexión, está relacionado con la curvatura espontánea [79].

En las membranas celulares coexisten tanto lípidos lamelares como no lamelares. Los estudios descritos en esta sección enriquecen el modelo de Singer-Nicolson. S.M. Gruner [74] observó que cuando coexisten lípidos lamelares (R_0 grande) y no lamelares (R_0 pequeño) en una bicapa el R_0 resultante es el límite crítico de la estabilidad de bicapa, por lo tanto la estructura lamelar puede ser perturbada fácilmente en el tiempo y el espacio, al menos localmente, por una variedad de eventos (inserción de proteínas, gradientes eléctricos o químicos, etc). Esto hace a las membranas celulares sensible a los estímulos. Las membranas biológicas no son simples paredes, sino también, como sabemos, la sede de eventos importantes en la fisiología y la patología celular. Una membrana compuesta exclusivamente de lípidos lamelares sería un aislante óptimo, pero no compatible con la función celular, es decir, la vida.

Como resultado de nuestro mayor conocimiento sobre el papel de los lípidos en las membranas, el campo de la mecánica de membrana ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años desde sus inicios a principios de los años setenta [72][80]–[82]. Ahora se entiende que muchos fenómenos celulares que implican cambios de forma se ven afectados por la flexibilidad

intrínseca de la membrana plasmática. La tensión efectiva de la membrana plasmática tiene una componente intrínseca, conocida como tensión en el plano de la membrana, o la fuerza necesaria para estirar una bicapa lipídica, y una componente derivada de las proteínas de membrana y de la unión de la membrana al citoesqueleto. La tensión de la membrana plasmática regula la forma y el movimiento celular, por ejemplo en la exocitosis, endocitosis mediada por clatrina, la generación de caveolas y la contractilidad celular. Un número de canales mecanosensibles y proteínas sensibles a la curvatura permiten a la célula detectar la tensión de la membrana plasmática [80].

Heterogeneidad lateral: dominios

El modelo de Singer-Nicolson no prevé inhomogeneidades en el plano de la membrana que no sean defectos de empaquetamiento a escala nanométrica o irregularidades debido a la convivencia de los lípidos y las proteínas. Sin embargo, en los años 80 y 90 del siglo pasado se encontraron una cantidad contundente de evidencias que apoyaron la existencia de regiones diferenciadas en el plano de la membrana, de tamaños en el orden de cientos de nanómetros, que se caracterizan por una composición química relativamente específica y, presumiblemente, una función definida. Engelman [9] mencionó la idea que la membrana celular estaba hecha de "petachos", y vio los "petachos" como un rasgo característico de la membrana. Estas heterogeneidades laterales han recibido una variedad de nombres, de entre los cuales "dominios" es probablemente el más ampliamente aceptado.

La heterogeneidad lateral es la consecuencia de las diferentes propiedades de las proteínas y los lípidos ya discutidas en esta revisión, a saber, los contactos proteína-proteína, las interacciones lípido-proteína, la aglomeración de proteínas y los parámetros de empaquetamiento lipídico. Sin embargo, en este contexto merecen un comentario separado dos aspectos particulares del comportamiento de los lípidos y las proteínas: la segregación lateral de los lípidos y las restricciones de las proteínas a la difusión lateral.

No todos los lípidos de membrana son miscibles entre sí. Ya en 1970 Chapman *et al.* [83] observaron, mediante calorimetría diferencial de barrido, que ciertas especies de fosfatidilcolinas saturadas eran inmiscibles. Sankaram y Thompson encontraron más tarde que la presencia de colesterol podría dar lugar a fases fluidas inmiscibles [83]. Desde entonces un conjunto muy grande de evidencias ha confirmado estas observaciones. Diagramas de fase triangulares de mezclas de fosfolípidos y colesterol, contruidos usando técnicas distintas [84]–[87], sugieren la presencia de múltiples fases que coexisten a una temperatura dada, por ejemplo: $L_d + L_o$, $L_d + L_o + L_\beta$, $L_o + L_\beta$. En dominios en los que coexisten varias fases, formados por mezclas de colesterol, una fosfatidilcolina saturada y dos insaturadas, el tamaño del dominio líquido aumenta con la diferencia de espesor de la bicapa entre las bicapas L_o y L_d [88].

La coexistencia de fases en sistemas de lípidos puros e incluso en muestras naturales (Fig. 5) ha sido observada por microscopía confocal de fluorescencia [89]–[91]. Las observaciones de microscopía confocal son llevadas a cabo generalmente en vesículas unilamelares gigantes (GUV).

En estos sistemas, el diámetro de los dominios está habitualmente en el rango de 1-10 μm , mayor de lo que se espera que se produzca en las células, como se discute a continuación. Cabe destacar

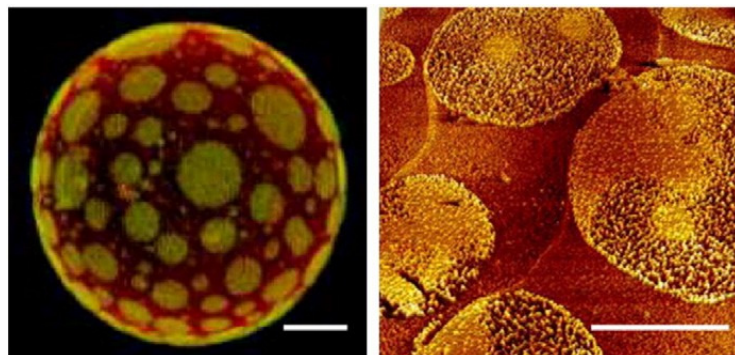


Fig. 5. Imágenes de bicapa de surfactante pulmonar por microscopía de fluorescencia confocal (izquierda) y microscopía de fuerza atómica. Los dominios redondeados en el panel izquierdo de la foto corresponden a fases fluido-desordenadas rodeados de una fase continua fluido-ordenada. Nótese que los dominios lipídicos amplios mostrados pueden ser la excepción, más que la regla, en membranas biológicas [77].

que la formación de grandes dominios en GUVs o monocapas en la interfaz aire-agua puede no reflejar con exactitud la situación en las membranas celulares donde la formación de los dominios puede ser más difícil debido a la gran variedad de lípidos presentes, además de las proteínas intrínsecas y extrínsecas. Sin embargo, está ampliamente aceptado que la escasa miscibilidad de ciertos lípidos en las bicapas puede ser un factor importante en el origen de los dominios de membrana celular.

Para el caso de diferentes dominios lipídicos que coexisten en fases fluidas, McConnell [92] propuso una teoría, ampliamente apoyada por experimentos posteriores [93], [94], según la cual la forma y el tamaño de un dominio dado serían el resultado de un equilibrio entre la tensión lineal y las interacciones electrostáticas dipolo-dipolo. La tensión lineal, que tiene unidades de fuerza, es el equivalente lineal de la tensión superficial (unidades de fuerza/longitud) para una interfaz unidimensional, es decir, representa la energía interfacial. La tensión lineal elevada favorece dominios grandes con formas compactas (idealmente circulares), mientras que fuerzas de repulsión dipolo-dipolo grandes favorecen dominios pequeños y/o dominios con formas extendidas, por ejemplo, en forma de flor.

No menos importante que la inmiscibilidad de los lípidos, es una serie de propiedades de las membranas que coinciden en la restricción de la movilidad (difusión traslacional) de las proteínas. La mayoría de ellas ya han sido mencionadas: los choques debidos al hacinamiento de proteínas integrales entre ectodominios de proteínas, y las interacciones proteína-proteína, incluyendo las interacciones entre proteínas integrales y periféricas. En este contexto es de importancia especial el anclaje de proteínas integrales de membrana a proteínas del citoesqueleto, que impide la difusión traslacional (pero no rotacional) de las primeras. Teniendo en cuenta que cada una de estas proteínas ancladas puede interactuar con varias más, además de la obstaculización general de la difusión debida al hacinamiento en bicapa, y la unión ocasional y preferencial de un lípido dado a una cierta proteína, así como la inmiscibilidad lipídica discutida anteriormente, es comprensible que la formación de dominios de membrana sea la regla más que la excepción. Existe evidencia experimental sólida de que la difusión lateral de las proteínas está restringida a determinados dominios o "corrales"[95].

Los dominios de membrana pueden ser muy heterogéneos en tamaño, desde (tal vez) menos de 100 nm (véase más adelante el apartado sobre balsas (*rafts*) de membrana) hasta micras. Estos últimos se refieren a menudo como "plataformas". Ejemplos de éstos son los dominios de gran tamaño que contienen ceramida formadas tras la degradación de esfingomielina por esfingomielinasa ácida en respuesta a una señal de estrés, que a su vez inicia una cascada de eventos de señalización que conducen a la apoptosis [96], [97], o las agrupaciones de antígenos de superficie producidos por anticuerpos bivalentes [1]. No está claro en la actualidad si como regla existen dominios discretos dentro de una fase continua, o bien toda la membrana consiste de un conjunto de dominios en una estructura de parches. Por supuesto la situación puede variar con el tipo de membrana de la célula, tejido u orgánulo.

Las *balsas de membrana (rafts)* son un tipo especial de dominio. Su existencia hipotética fue propuesta por Simons y Ikonen en 1997 [98], y es probablemente la hipótesis que ha provocado el mayor número de estudios en el campo de las membranas. Se ha propuesto que las balsas son dominios *pequeños y transitorios*, enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, relacionados con el transporte intracelular de lípidos y tal vez con algunos eventos de señalización celular. Desgraciadamente, debido a un excesivo entusiasmo por la idea, se originaron muchos artefactos conceptuales y experimentales, mientras que al mismo tiempo la vaga naturaleza de estas microestructuras de corta duración (≈ 100 ms) resistió su descripción exacta y mucho más su aislamiento. Para el año 2006 se había acordado que las "balsas de membrana son pequeños (10-200 nm) dominios heterogéneos, altamente dinámicos, enriquecidos en esfingolípidos y esterol, que compartimentan procesos celulares" [99]. También se esclareció la identificación engañosa de las balsas con membranas resistentes a los detergentes [100]. Así, las balsas de membrana deben ser consideradas sólo como un tipo de dominio de membrana caracterizado, como cualquier otro dominio, por cierta composición y propiedades funcionales [101].

Para terminar este apartado sobre los dominios de membrana, se debe mencionar la posibilidad de que la interfaz entre los dominios proporcione un entorno atractivo para ciertas proteínas que podrían hallar una conformación de baja energía en la línea de frontera, tal vez aprovechando los defectos estructurales intrínsecos o un posible desajuste de espesor entre dominios. Esta posibilidad ha recibido confirmación experimental al menos para una toxina de anémona dirigida a las membranas plasmáticas eucariotas [34].

Movimiento lipídico transbicapa (flip-flop)

Según el modelo de Singer-Nicolson, y en consonancia con extensa evidencia experimental, ni los lípidos ni las proteínas se mueven a través de la bicapa después de su biosíntesis y localización a una velocidad fisiológicamente relevante. Esto puede ser debido a la sanción energética impuesta por el interior hidrofóbico de la membrana al paso de los grupos polares de lípidos y proteínas. En las células, la asimetría de lípidos transbicapa tiene un origen dinámico [102]. Datos más recientes, sin embargo apoyan la idea de que, local y transitoriamente, se produciría "scrambling" lipídico entre las monocapas, y la asimetría se perdería [103]. Esto sería incluso un evento generalizado en circunstancias apoptóticas, cuando la fosfatidilserina, generalmente situada en la monocapa interna, es expuesta al exterior, señalizando así la eliminación de las células apoptóticas por los macrófagos. El "scrambling" lipídico ocurre a menudo como un evento

catalizado por proteínas, pero también puede tener lugar en ausencia de proteínas. En particular, se ha demostrado que la ceramida causa flip-flop incluso de lípidos con un grupo polar voluminoso, como los gangliósidos [104] (Fig. 6).

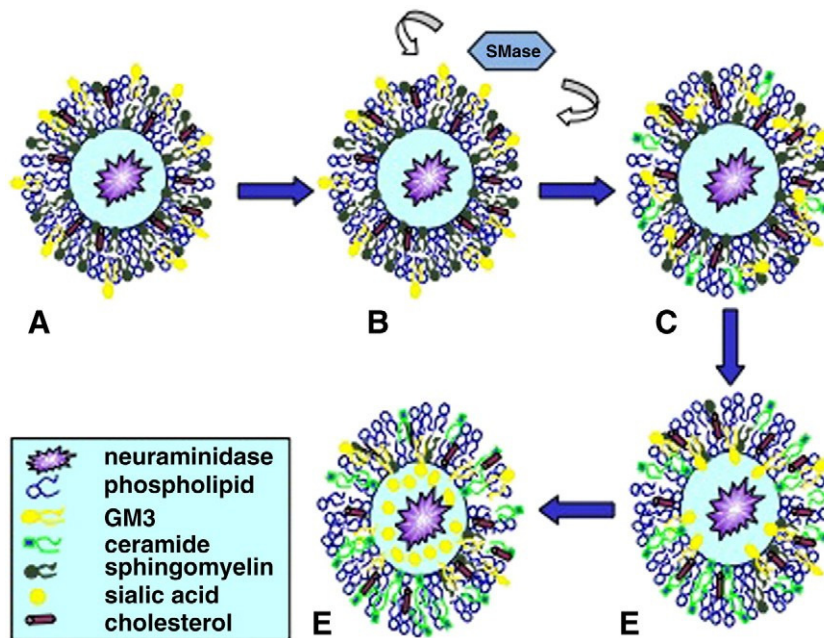


Fig. 6. Movimiento lipídico transbicapa (flip-flop) inducido por la generación de ceramida de la hidrólisis de esfingomielina. Los liposomas contienen sialidasa encapsulada, que degrada gangliósidos. Inicialmente los gangliósidos están localizados exclusivamente en la parte externa de las vesículas. La degradación de la esfingomielina por esfingomielinasas da lugar a ceramida y la ceramida causa flip-flop [104].

Comentarios finales

Lo que se llamó, ya sea con afecto o críticamente, el “cartoon” de Singer y Nicolson, visto en perspectiva histórica, aparece muy estático a pesar de la fluidez implicada por el nombre del modelo. Se ha dicho que representa una membrana en equilibrio, pero el verdadero equilibrio termodinámico se consigue en estructuras vivas sólo después de muerte. Incluso las llamadas “condiciones de estado estacionario” se refieren a una estabilidad (es decir, propiedades constantes) en el tiempo, si no en el espacio, pero durante las últimas cuatro décadas hemos aprendido que, incluso en la escala de tiempo de los eventos moleculares, tal estabilidad temporal es ilusoria. El “cartoon” es de hecho sólo un simple fotograma de una película de animación en la que nuevos personajes entran y salen todo el tiempo mientras se mueven de forma caótica. Paradójicamente, si todo estos movimientos fuesen promediados a lo largo de un cierto tiempo, ¡bien podríamos terminar con algo similar al antiguo dibujo de 1972!

Otro punto de vista sobre este mismo tema es que las membranas parecen ser objetos metaestables. Se ven estables hasta que un pequeño estímulo provoca una perturbación local de

la que, de alguna manera, se "recupera" poco tiempo después y el sistema retorna a su estado original. La multiplicidad de moléculas y geometrías, los muchos grados de libertad concedidos a cada una de ellas, junto con la enorme estabilización energética de los lípidos en forma de bicapa explica esta estabilidad a largo plazo con eventos desestabilizadores continuos. Las membranas viven al borde del abismo, pero, al parecer, se las arreglan para permanecer, en última instancia, en el lado seguro del precipicio.

2. PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LA ESFINGOSINA, LA CERAMIDA Y OTROS ESFINGOLÍPIDOS*

* Adaptado del trabajo de F.M. Goñi y cols. [324]

INTRODUCCIÓN

Los esfingolípidos han conocido, desde su descubrimiento por Johann L.W. Thudichum en 1884 [105], cuatro momentos principales de interés por parte de los científicos. Uno fue el descubrimiento de las estructuras tridimensionales, a las cuales I. Pascher [106], [107] hizo distinguidas contribuciones. El metabolismo de los esfingolípidos fue el segundo polo de atracción para los bioquímicos: se describieron las principales vías, así como varias enfermedades de almacenamiento de esfingolípidos o esfingolipidosis [108], [109]. La tercera gran área de investigación sobre esfingolípidos fue su rol en la señalización celular, inaugurado por los estudios de Hannun, Merrill, Kolesnick y sus colaboradores [110]–[112]. Un cuarto y más reciente campo principal de exploración de esfingolípidos ha sido el de sus propiedades biofísicas. Desde este punto de vista, es conveniente distinguir entre los glicoesfingolípidos complejos [113] y los simples, a saber, esfingosinas, ceramidas y sus derivados 1-fosforilados [114]. El presente capítulo está dedicado a la caracterización biofísica de estos últimos, principalmente cuando están incorporados en bicapas de fosfolípidos.

El pilar básico de los esfingolípidos es la esfingosina (2S, 3R, 4E)-2-amino-4-octadeceno-1,3-diol en la nomenclatura sistemática actual. De acuerdo a una más antigua pero muy usada notación, su configuración es D-eritro-*trans* (Fig.7). El éster C1-fosfato de esfingosina es también una molécula importante, denotada comúnmente como esfingosina 1-fosfato (Sph-1-P; Fig.7). Las ceramidas son N-acil-esfingosinas y se sabe también que sus formas C1-fosforiladas, las

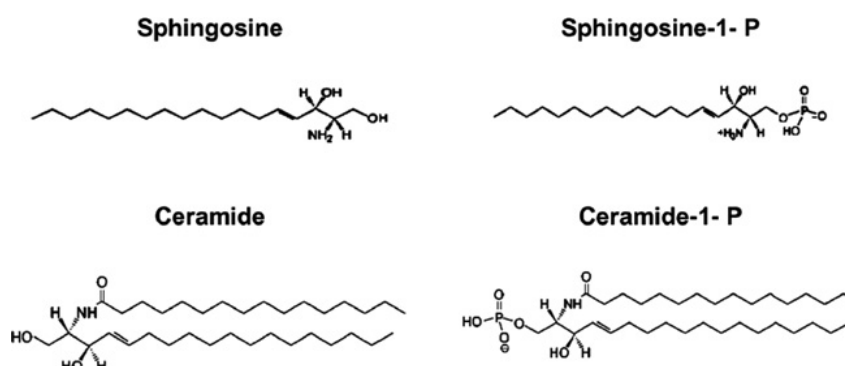


Fig. 7. Estructuras moleculares de esfingolípidos simples.

ceramidas 1-fosfato (Cer-1-P), existen en membranas celulares (Fig. 7). Las ceramidas se han encontrado en la naturaleza con ácidos grasos que contienen de 2 a 28 átomos de carbono, tanto saturados como monoinsaturados, o con un grupo hidroxilo tanto en C'2 (ácidos grasos α -hidroxilo) como en el átomo de carbono terminal (ácidos grasos ω -hidroxilo). Ocasionalmente un segundo ácido graso puede estar esterificado a un grupo OH de esfingosina o una base relacionada. Las ceramidas constituyen la cadena principal hidrofóbica para todos los esfingolípidos complejos que le siguen: esfingomielinas, cerebrósidos y gangliósidos.

Esfingosinas

Hannun *et al.* [110] fue el primero que encontró que la esfingosina tenía un efecto biológico: describió la inhibición de la proteína quinasa C en plaquetas humanas causada por el más simple

Tabla 1. Principales propiedades biofísicas de esfingolípidos simples.

Esfingolípido	Propiedad	Referencia(s)
Esfingosina	Carga neta positiva a pH fisiológico	[117,118]
	Incrementa la permeabilidad de la membrana	[116,122,224,225]
	Rigidifica las cadenas acílicas de bicapa	[116,224]
	Facilita la formación de la fase cúbica (con lípidos cargados negativamente)	[225]
Sph-1-P	Algo soluble en agua (cmc 12 mM)	[130]
	Estabiliza la estructura lipídica lamelar	[130]
Ceramida	Incrementa el orden de cadena lipídica	[137-139]
	Se segrega lateralmente en dominios rígidos	[137,139,142-146]
	Incrementa la permeabilidad de membrana	[107,150-154]
	Induce movimiento flip-flop de lípidos	[154-156]
Cer-1-P	Facilita la formación de fase HII	[143,149]
	Forma bicapas espontáneamente	[156]
	pKa muy sensible a la composición de fosfolípidos	[156]

de los esfingolípidos. Los parámetros moleculares (área molecular, potencial superficial, presión de colapso y contribución al momento dipolar) de la esfingosina en monocapas en la interfaz aire/agua fueron medidos por Perillo *et al.* [115]. La esfingosina se comporta como un anfífilo activo en superficie [116]. En su forma totalmente protonada, a pH 6, la esfingosina pura exhibe una transición termotrópica ordenada-desordenada centrada a 30°C. Esta transición ocurre a 39 °C a pH 10 [117].

El pK_a reportado de la esfingosina abarca un rango de 8.9-9.1 [117] a 6.6 [118], dependiendo quizás del tampón o el entorno lipídico. Sasaki *et al.* [118] indicaron, además, la dependencia del pH en la transición estructural de la red de uniones de hidrógeno de esfingosina, desde intra- a intermolecular, según el pH variaba entre 6.7 y 9.9. Suponiendo una naturaleza parcialmente catiónica, la esfingosina ha sido usada a pH neutro en la preparación de liposomas cargados positivamente para el estudio de unión a membrana de varias macromoléculas, incluyendo DNA y varias enzimas [119]. La inusual carga neta positiva (en un lípido) (Tabla 1) podría ser además biológicamente relevante cuando interacciona con fosfolípidos de membrana cargados negativamente, teniendo en cuenta que procesos tales como la fusión sensible al pH [16] y las consecuencias de la formación de pares iónicos por lípidos aniónicos y catiónicos parecen ser importantes en varios eventos celulares [120]. En este contexto es también relevante el posible interés de las interacciones electrostáticas entre la esfingosina y lípidos cargados negativamente que pueden ser particularmente abundantes en ciertas membranas como, por ejemplo, fosfatidilserina en la monocapa interna.

En mezclas con el lípido aniónico dipalmitil fosfatidilserina (DPPS), se vio que la esfingosina rigidifica la membrana. Los experimentos de ^{31}P -NMR mostraron una fase lamelar a relaciones molares más bajas que 1:1 para DPPS/esfingosina, mientras que a relaciones molares más altas se detectó un componente isotrópico [117]. La interacción de la esfingosina con el lípido zwitteriónico dipalmitil fosfatidilcolina (DPPC) fue bastante similar a la de DPPS: se encontró que la esfingosina incrementa de la misma manera la temperatura de transición de fase gel-fluido (T_m), es decir, rigidifica la membrana. A diferencia de la DPPS, sin embargo, con DPPC la esfingosina da lugar a fases lamelares en todo el rango de concentraciones, según los datos de ^{31}P -NMR [121].

Una propiedad interesante de la esfingosina es su habilidad para permeabilizar membranas a solutos pequeños (Tabla 1). Esto fue mostrado por Siskind *et al.* [122] usando métodos electrofisiológicos, y por Contreras [116] estudiando la salida inducida por esfingosina de solutos acuosos de liposomas y membranas “ghost”. En este último caso, los autores interpretaron este efecto como el resultado de las propiedades de rigidificación de la bicapa de esfingosina, como se ha descrito anteriormente [117], [121]. La rigidificación estabilizaría los dominios gel en membranas, aumentando su temperatura de fusión e incrementando la cooperatividad en la transición. Por lo tanto, la coexistencia de dominios gel y fluido en la membrana plasmática daría lugar a permeabilización.

Estudios posteriores que utilizan vesículas unilamelares gigantes (GUVs) han revelado que la esfingosina da lugar a diferentes patrones de dominios dependiendo de la matriz lipídica circundante [123]. En una matriz de glicerofosfolípidos, la esfingosina se segrega en dominios tipo-gel, de acuerdo con Contreras *et al.* [116], mientras que el colesterol incrementa la miscibilidad por fusión de los dominios gel de un modo dependiente de la concentración [123]. Dos artículos recientes han arrojado luz sobre el fenómeno de permeabilización de membrana inducido por la esfingosina. Usando técnicas de fluorescencia Zupancic *et al.* [124] encontraron que la esfingosina ayudó en la formación de dominios gel, es decir, rigidificó bicapas formadas por fosfatidilcolina o mezclas de fosfolípido/colesterol. Interesantemente estos autores encontraron que, con liposomas que mimetizan el ambiente de membrana de lisosomas ácidos se requirieron concentraciones altas de esfingosina (o temperaturas bajas) para la formación de gel [124]. La otra contribución, de nuestro laboratorio [125], muestra que la interacción de la esfingosina con fosfolípidos cargados negativamente (por ejemplo bicapas que contienen ácido fosfatídico junto con lípidos zwitteriónicos y colesterol) da lugar a una liberación de los contenidos vesiculares más rápida que con bicapas eléctricamente neutras. Además, datos de ^{31}P -NMR y rayos-X demuestran la capacidad de la esfingosina de facilitar la formación de intermediarios no-lamelares (fase cúbica) en membranas cargadas negativamente. En resumen, la esfingosina parece inducir la permeabilización de membrana siguiendo un mecanismo que depende del conjunto de la carga eléctrica de los lípidos que la acompañan en la membrana, siendo los lípidos cargados negativamente los que permiten una liberación más eficiente.

Niemann-Pick tipo C1 es una enfermedad que causa el almacenamiento de esfingosina en lisosomas y endosomas tardíos con homeostasis de calcio alterada [126]. Estas membranas son ricas en lípidos cargados negativamente, en particular PI(3,5)P₂ y ácido lisofosfatídico [127]. Los

datos en [125] proporcionan un mecanismo patogénico posible para la desregulación de calcio inducido por esfingosina en esta enfermedad.

Esfingosina-1-fosfato

Se sabe que este lípido bioactivo regula el crecimiento y la proliferación celular [128] y tiene un efecto esencial en el control de la respuesta inmune celular [129]. Poco es conocido acerca de las propiedades biofísicas de este lípido. García-Pacios *et al.* [130] encontraron que, a diferencia de otras esfingosinas derivadas que son muy hidrofóbicas, la Sph-1-P puede ser encontrada tanto en dispersiones acuosas como en ambientes de bicapa (Tabla 1). Este lípido se comporta en medio acuoso como un anfifilo soluble, del tipo de lisofosfatidilcolina o del "factor activador de plaquetas", con una concentración micelar crítica de $\approx 12 \mu\text{M}$. Por ende, como cualquier otro anfifilo soluble en presencia de membrana, Sph-1-P existirá en la célula en equilibrio entre el citosol y la membrana, siendo la concentración citosólica cercana a $12 \mu\text{M}$.

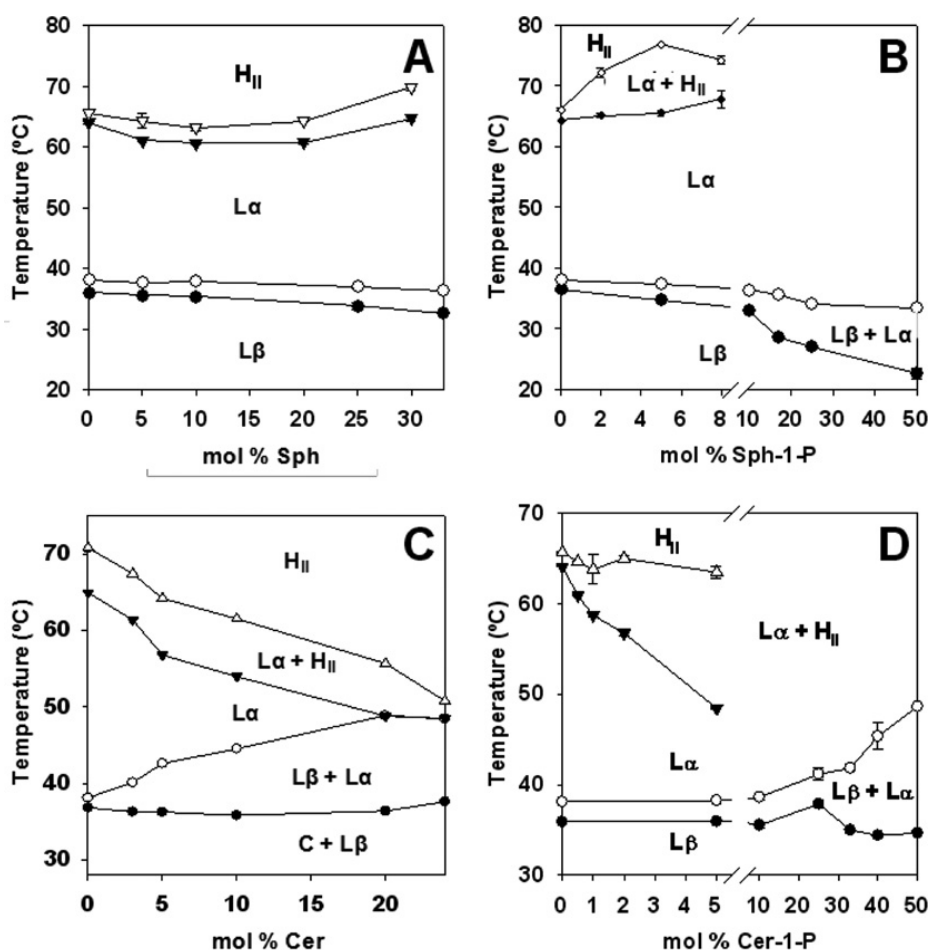


Fig. 8. Diagramas composición-temperatura ("diagramas de fase") para varios sistemas DEPE:esfingolípidos en exceso de agua. C, fase cristalina lamelar. (A) DEPE:esfingosina [116]. (B) DEPE:Sph-1-P [130]. (C) DEPE:ceramida [149]. (D) DEPE: Cer-1-P [157].

Estudios de Sph-1-P en mezclas con fosfolípidos revelan que su efecto sobre las propiedades de membrana es moderado [130]. Las transiciones gel-fluido de fosfolípidos saturados son desplazadas hacia temperaturas más bajas y las contribuciones entálpicas correspondientes disminuyen. En bicapas con lípidos como DEPE, que da lugar a estructuras de tipo hexagonal invertida (H_{II}) por encima de 65 °C, la Sph-1-P incrementa la temperatura de transición y de hecho impide la transición a > 10 mol% (Figura 8B). La espectroscopía infrarroja de Sph-1-P natural con [$U\text{-}^2\text{H}$]DPPC demostró la existencia de interacciones moleculares entre el esfingo- y el glicerolípido a nivel del grupo de cabeza polar, las cuales favorecen la hidratación del grupo carbonilo de la fosfatidilcolina. García-Pacios *et al.* [130] fueron capaces de construir un diagrama temperatura-composición, que resume las propiedades de diferentes mezclas de Sph-1-P y glicerofosfolípidos y facilita la comparación de las propiedades de éste y otros esfingolípidos. En resumen, dos diferencias importantes entre la esfingosina y su derivado fosforilado son que este último (a) estabiliza la estructura lipídica de bicapa y (b) puede existir en dispersiones acuosas en el citosol a concentraciones fisiológicas relevantes.

Ceramida

Las ceramidas que se encuentran más comúnmente, esto es, aquellas con una cadena de ácidos grasos de 16 carbonos o más, están entre los lípidos menos polares y más hidrofóbicos de la membrana. De hecho, su hidrofobicidad explica su abundancia en el *stratum corneum*, la barrera que previene la evaporación de agua a través de la piel [131]. Su solubilidad en agua es insignificante, por lo tanto, las ceramidas libres no pueden existir en solución en fluidos biológicos o en el citosol. Estudios detallados sobre la posible correlación entre las propiedades físicas y los efectos biológicos de la ceramida han sido publicados previamente por nosotros, tanto solos como en colaboración con R. Kolesnick [132]–[134]

Las propiedades biofísicas de las ceramidas puras han sido revisadas recientemente [114], [132] y, a excepción del trabajo de Jiménez-Rojo *et al.* [135], han aparecido pocos datos novedosos. En este último estudio las propiedades termotrópicas de ceramidas y esfingomielinas con cadenas N-acílicas de entre 6 a 24 carbonos fueron exploradas de modo sistemático, revelando una variación no lineal de la temperatura de fusión o entalpías con la longitud de las cadenas o la presencia de endotermas complejas. La interdigitación parcial de las cadenas y los estados cristalinos metaestables fueron considerados responsables del comportamiento complejo que contrasta con la estructura relativamente simple de estos lípidos. La complejidad de las propiedades puede a su vez estar relacionada con la multiplicidad de especies de ceramida en la célula [136].

Las ceramidas tienen dos efectos principales cuando son mezcladas con monocapas o bicapas de fosfolípidos: aumentan el orden molecular de los fosfolípidos y dan lugar a la separación lateral de fases y formación de dominios. Las ceramidas en bicapas tienen además los efectos de inducir permeabilización en la membrana, movimientos de lípidos transbicapa (flip-flop) y la transición a las fases no lamelares (Tabla 1).

Efecto sobre el orden lipídico. El grado de orden de la cadena lipídica se estima frecuentemente utilizando la sonda de fluorescencia difenilhexatrieno (DPH). La polarización de fluorescencia de

DPH aumenta con el incremento del orden molecular (disminución de la fluidez). Se observó que las ceramidas naturales (tanto con ácidos grasos de cadena larga α -hidroxi como no-hidroxi) aumenta el orden de la cadena de acilo en una forma dependiente de la dosis en bicapas de dimiristil fosfatidilcolina en fase lamelar fluida [137]. Silva *et al.* [138] han demostrado que la polarización de la fluorescencia del ácido *trans*parinárico en bicapas fluidas de 1-palmitil-2-oleil fosfatidilcolina (POPC) es mucho más sensible que el DPH al efecto de orden de la ceramida, siendo detectable un aumento ya con 2 mol% ceramida, y alcanzando la saturación a 20 mol%. El tiempo de vida media fluorescente del ácido *trans*parinárico también aumenta claramente con la concentración de la ceramida. El aumento de los tiempos de vida, en principio, daría lugar a una disminución de la anisotropía, pero la rigidez impuesta por la ceramida es tal que el aumento de los tiempos de correlación rotacional compensa los tiempos de vida elevados [138].

Huang *et al.* [139] utilizaron espectroscopia de ^2H NMR para mostrar que, tanto la ceramida de cerebro bovino como la ceramida C16 sintética inducían grandes aumentos en los parámetros de orden de las cadenas de acilo de DPPC totalmente deuterado ($[\text{U-}^2\text{H}]\text{DPPC}$) cuando éste estaba en el estado fluido. Anteriormente Hsueh *et al.* [140] habían observado, mediante ^2H -NMR, que las cadenas de acilo de POPC totalmente deuteradas ($[\text{U-}^2\text{H}]\text{POPC}$) en fase fluida eran ordenadas por la presencia de ceramida. También fueron capaces de detectar que, en esas condiciones, el orden de la cadena de ceramida fue mayor que la de POPC. El efecto de orden de la ceramida está de acuerdo con las monocapas de ceramida altamente condensadas descritas por Carrer y Maggio [141].

Formación de dominios. La separación en dominios ricos en ceramida fue observada por primera vez por Huang *et al.* [139], quienes examinaron la estructura de bicapas compuestas de $[\text{U-}^2\text{H}]\text{DPPC}$ y ceramida de cerebro bovino usando espectroscopia ^2H NMR. Estos autores observaron que la adición de ceramida a bicapas de fosfolípidos fluidas indujo separación de fase lateral en regiones de fases gel y líquido-cristalina; la ceramida particiona en gran medida en la fase de gel de $[\text{U-}^2\text{H}]\text{DPPC}$. Además, estudios de ^2H NMR realizados por Leung *et al.* [142], en combinación con datos calorimétricos, proporcionaron una descripción completa de miscibilidad e inmiscibilidad esfingomielina/ceramida en un amplio rango de temperaturas y composiciones. El uso de un fosfolípido marcado con pireno, una sonda fluorescente que es sensible a la movilidad lateral y a la concentración local de fluoróforo en la membrana, permitió a Holopainen *et al.* [137] detectar microdominios enriquecidos en ceramida en membranas fluidas de fosfatidilcolina (Tabla 1).

La formación de dominios por ceramidas también fue descrita por una combinación de calorimetría diferencial de barrido y espectroscopia IR, usando ceramidas naturales (cerebro y huevo) y varios fosfolípidos sintéticos [143]. Se usó calorimetría para detectar transiciones de gel a fluido. Los diferentes dominios, una vez formados, 'funden' a diferentes temperaturas, de modo que pueden ser fácilmente detectados. La separación lateral de los dominios ricos en ceramida fue observada con tan solo 5 mol% de ceramida. Chiantia *et al.* [144] utilizaron un enfoque combinado de microscopía de fuerza atómica, espectroscopia de fluorescencia de correlación e imágenes de fluorescencia confocal para observar dominios tipo-gel enriquecidos en ceramidas en bicapas soportadas de esfingomielina/DOPC/colesterol/ceramida en estado líquido ordenado.

Estudios en monocapas han revelado aspectos interesantes de la formación de dominios de ceramida en películas monomoleculares de fosfolípido. Estudios de epifluorescencia de monocapas de esfingomielina degradada por esfingomielinasa añadida a la subfase acuosa indican en tiempo real que la formación de ceramida altera inicialmente la topografía superficial mediante la inducción de separación de fase en dominios condensados (enriquecidos en ceramida) y expandidos (enriquecidos en esfingomielina) [145]. La fase enriquecida en ceramida crece continuamente a medida que la reacción progresa a una velocidad constante, hasta el "punto de percolación", cuando los dominios condensados se unen en un continuo que contiene ahora la fase discontinua expandida. En este punto, la velocidad de reacción cae rápidamente, mostrando que la organización supramolecular de dominios influye en la actividad enzimática a nivel molecular local. También es significativa la observación [145] de que la topografía superficial derivada de la reacción catalizada por la esfingomielinasa es diferente de la obtenida por la premezcla de esfingomielina y de ceramida en la misma proporción, lo que indica que la información contenida depende de la manera en la que se generó la superficie.

Sot *et al.* [146] han descrito dominios enriquecidos en ceramidas en vesículas con bicapas de esfingomielina/ceramida, en lugar de monocapas, utilizando principalmente calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía de fluorescencia. Los datos de DSC mostraron para esfingomielina de huevo pura una transición bastante estrecha centrada a 39 °C. La ceramida de huevo, incluso a bajas proporciones (5 mol %), tuvo el efecto de ensanchar la transición de fase, desplazándola a temperaturas más altas. Más importante, las endotermas de muestras que contenían ceramidas tenían una forma claramente asimétrica, lo que indica la formación de dominios de ceramida/esfingomielina de alta temperatura de fusión. Además, se llevaron a cabo una serie de observaciones en GUVs utilizando microscopía de fluorescencia. Las vesículas fueron dopadas con la sonda fluorescente 1,1-dioctadecil-3,3,3'-tetrametilindocarbocianina perclorato (DiI_{C18}) que particiona preferentemente en las regiones más fluidas de la membrana. La sonda marcó uniformemente vesículas de esfingomielina pura, mientras que las que contenían ceramida de huevo mostraron zonas oscuras, correspondientes a dominios rígidos ricos en ceramida. Concentraciones de ceramida crecientes causaron un aumento paralelo en las zonas oscuras, las cuales cambiaron su forma de circular a elongadas tipo gusanos. El fenómeno de separación de ceramida en dominios laterales de los fosfolípidos ha sido revisado por nosotros en detalle [147].

Comportamiento de fase y formación de fases no lamelares. Se han propuesto diagramas de composición de fase para mezclas binarias de ceramida/fosfolípidos en exceso de agua [141] para ceramida de cerebro bovino, ceramida C16:0/POPC [138], ceramida C16:0/dimiristil fosfatidilcolina [148], ceramida C16:0/DPPE [149] y ceramida C16:0/ esfingomielina [142] entre otros. El panorama general que se plantea para las concentraciones de ceramida de hasta ~20 mol%, es que, a bajas temperaturas, en la fase de gel, la ceramida se mezcla mal con el fosfolípido. La ceramida se mezcla algo con el fosfolípido en la fase fluida, incluso idealmente en ciertas condiciones. Como resultado, aparece una región en la que coexisten diversos dominios lamelares a muy bajas concentraciones de ceramida, que se extiende a temperaturas mayores a medida que las concentraciones de ceramida aumentan.

El fosfolípido DEPE exhibe una transición de fase reversible lamelar- H_{II} a 65 °C. Se cree que fases H_{II} , junto con fases cúbicas invertidas, están involucradas en los procesos de fusión y fisión de la membrana. Usando una combinación de DSC, ^{31}P -NMR y dispersión de rayos X, Sot *et al.* [149] exploraron sistemáticamente la región no lamelar (H_{II}) del diagrama de fase ceramida C16:0/DEPE. La ceramida fue solubilizada en DEPE fluido y tuvo el efecto de disminuir la transición lamelar-hexagonal (L-H) de un modo dosis-dependiente. A ≈ 20 mol% de ceramida el inicio de la transición L-H se solapó con la finalización de la transición gel-fluido a ≈ 48 °C, de modo que en esta región del diagrama de fase (> 20 mol% ceramida) no existió fase lamelar fluida pura y fue posible una transición directa de gel a H_{II} (Figura 8C).

Permeabilización de la membrana por ceramidas. Una posible implicación de las ceramidas en la permeabilidad de la membrana ya fue insinuada por Pascher en sus primeros trabajos estructurales [107]. Ruiz-Argüello *et al.* [150] utilizaron vesículas unilamelares grandes (LUVs) que estaban formadas por esfingomielina, fosfatidiletanolamina y colesterol en una relación molar 2:1:1 y contenían sondas fluorescentes encapsuladas en solución. Tras el tratamiento con esfingomielinasa, se produjo ceramida y simultáneamente la filtración de los contenidos acuosos de la vesícula (Tabla 1). Se detectó, además, fuga a distintas velocidades tras la adición de esfingomielinasas en otras composiciones lipídicas basadas en esfingomielina y fosfatidiletanolamina y también en "fantasmas" de eritrocitos cargados con sonda fluorescente y resellados. Por otra parte, la salida de contenido acuoso de las vesículas ha sido detectado sólo en la presencia de Ca^{2+} como resultado de la actividad de una fosfolipasa C/esfingomielinasa, PlcHR₂, de *Pseudomonas aeruginosa* [151]. Montes *et al.* [152] encontraron, en otros estudios utilizando esfingomielinasa de *Bacillus*, que la formación de ceramida en LUVs cargados con dextranos derivatizados con fluoresceína dio lugar a la liberación de dextranos de masa molecular ≈ 20 kDa, es decir, más grande que el citocromo c. Los mismos autores compararon el flujo de salida de los contenidos vesiculares causados por esfingomielinasa y los causados por ceramidas de cadena larga añadidas externamente a las vesículas preformadas. En ambos casos se observó liberación del contenido de las vesículas, aunque la misma proporción de ceramidas generadas por esfingomielinasa indujo un flujo de salida más rápido y mayor que cuando se añadió en solución orgánica a las vesículas preformadas [152].

El origen de la permeabilización de la membrana inducida por ceramida en las condiciones anteriores no ha sido explicado totalmente. El fenómeno puede estar relacionado con la generación de "islotes" o microdominios ricos en ceramida. Los sitios ricos en ceramida constituirían microdominios ordenados y rígidos en un "mar" de lípidos fluido (para la tendencia de las ceramidas a separarse en dominios véase la sección "*Formación de dominios*"). La situación de coexistencia de dominios ordenados y desordenados en una bicapa es similar a la que prevalece en la temperatura de transición (T_c) gel-fluido de fosfatidilcolinas. Se sabe que las vesículas compuestas de DMPC o DPPC puro son particularmente permeables en la T_c y las interfaces entre las regiones ricas y pobres en ceramida permitirían la liberación de contenidos en vesículas tratadas con esfingomielinasa.

Movimiento transmembrana de lípidos (flip-flop). Los estudios realizados por Bai y Pagano [153] utilizando un análogo fluorescente de ceramida han proporcionado valores para los tiempos

medios de difusión flip-flop transbicapa de la ceramida. La velocidad de flip-flop de la ceramida tuvo un $t_{1/2}$ de aproximadamente 22 min, mucho más rápido que los fosfolípidos, pero considerablemente más lento que el análogo diacilglicerol (70 ms). López-Montero *et al.* [154] estudiaron el movimiento flip-flop de ceramida con un enfoque diferente. Estos autores observaron que la incorporación de un pequeño porcentaje de ceramidas (~0,1% del total de lípidos) a la hemicapa externa de GUVs de fosfatidilcolina de huevo fue suficiente para desencadenar un cambio de vesículas alargadas a vesículas en forma de pera. La difusión de lípidos transmembrana fue inferida por la observación de la reversibilidad de este cambio de forma. López-Montero *et al.* [154] encontraron un $t_{1/2}$ de menos de 1 min a 37 °C para flip-flop de ceramida sin marcar. La difusión rápida de ceramidas en una bicapa de fosfatidilcolina fue confirmada por experimentos de flip-flop con un análogo de ceramida con un marcador de spin incorporado en vesículas unilamelares grandes.

Estudios relacionados de nuestro laboratorio [104], [155] han demostrado, usando procedimientos muy diferentes, que las ceramidas inducen movimiento flip-flop generalizado en membranas celulares y modelo (Tabla 1). La generación de ceramida se llevó a cabo *in situ* a través de la acción de una esfingomielinasa añadida a liposomas o vesículas de membranas celulares en suspensión. Se desarrollaron dos ensayos nuevos diferentes para detectar movimiento transbicapa. Uno de los ensayos requirió la preparación de vesículas que contenían gangliósidos sólo en la monocapa externa y neuraminidasa encapsulada. La actividad de la esfingomielinasa indujo la hidrólisis de gangliósido en condiciones en las que la neuraminidasa no fue liberada de las vesículas. El segundo ensayo consistió en la preparación de liposomas o de eritrocitos fantasma marcados con un donante de energía fluorescente en sus hemicapas internas. La hidrólisis de esfingomielina fue acompañada por transferencia de energía fluorescente a un receptor impermeable en el medio acuoso externo.

La observación del movimiento flip-flop inducido por ceramida puede explicar de otra manera un aspecto misterioso de la señalización por ceramida en la fisiología celular, a saber, que la esfingomielina, quizás la principal fuente de ceramida en este contexto, se encuentra predominantemente en la monocapa externa de la membrana plasmática, mientras que las proteínas receptoras de ceramida son intracelulares. La esfingomielina en la hemicapa externa parece ser hidrolizada por una forma secretada de la esfingomielinasa ácida. La ceramida resultante, generada originalmente en la hemicapa externa, se distribuiría pronto entre ambas monocapas, siendo por lo tanto capaz de unir a las proteínas intracelulares conectadas a la monocapa interna de la membrana plasmática.

Ceramida 1-fosfato

La Cer-1-P ha surgido de manera reciente como esfingolípido bioactivo involucrado en la proliferación celular, la migración de macrófagos y eventos inflamatorios [156]. Se han publicado estudios biofísicos para Cer-1-P [157]. Este lípido puede formar por sí mismo bicapas y vesículas cerradas (Figura 9). A baja T , Cer-1-P forma una bicapa de fase sub-gel (cristalina) altamente organizada (L_c), que se transforma en una fase gel regular (L_β) a 45 °C; la transición de fase de gel a fluido (L_β - L_α) ocurre a ≈ 65 °C. Cuando está incorporada en bicapas de DEPE, que exhiben la

transición L_β - L_α a 37 °C, Cer-1-P se mezcla bien con el lípido en fase fluida, aunque por debajo de la temperatura de transición de DEPE, Cer-1-P en fase L_c puede coexistir con DEPE casi pura en L_β [157] (Figura 8D). Estas propiedades sugieren que no es probable que se encuentren dominios ricos en Cer-1-P en condiciones fisiológicas.

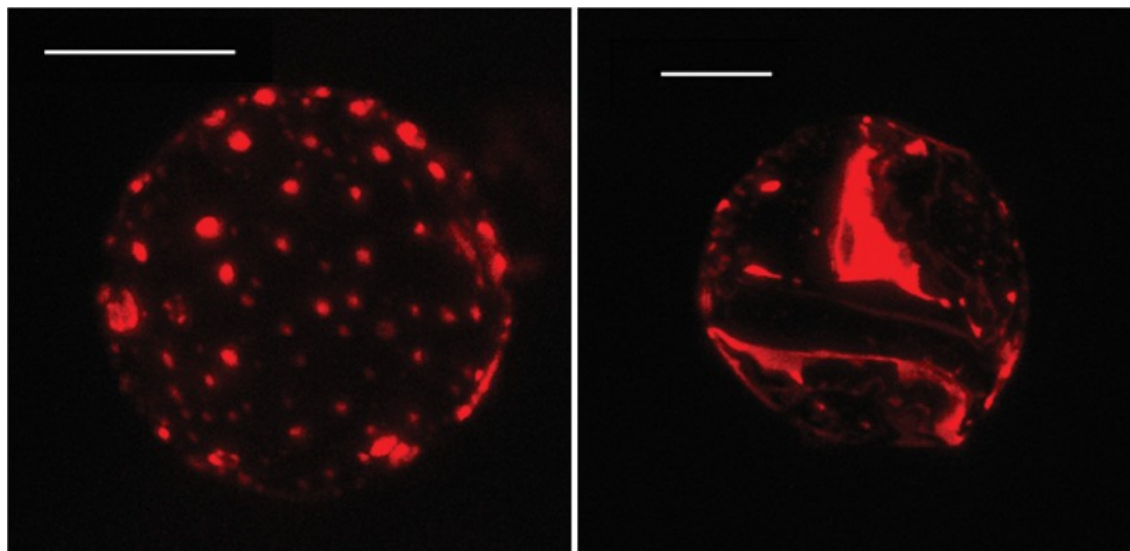


Fig. 9. Imágenes de microscopía de fluorescencia de GUVs formados por Cer-1-P pura y marcados con Dil_{C18}. Dos ejemplos representativos. Barra de escala, 10 μ m (J. Sot, trabajo no publicado).

Observaciones finales

Las observaciones fisicoquímicas anteriores, que se resumen en la Tabla 1, hacen pertinente la cuestión de su significado fisiológico. Dos consideraciones deben tenerse en cuenta en este aspecto. Uno se refiere a la paradoja de que, aunque cantidades sustanciales de estos lípidos, es decir, 5 mol% o superior, son a menudo necesarias para observar los cambios físicos en las membranas, sólo una proporción muy pequeña de ellos parecen existir en las membranas celulares. Como hemos comentado anteriormente al respecto del diacilglicerol [61], la solución a este problema probablemente radica en la formación localizada de señales lipídicas en un momento dado y en un microdominio de membrana determinado. De este modo se pueden producir altas concentraciones locales de segundos mensajeros mientras que las concentraciones medias se mantienen muy bajas. Nuestros estudios biofísicos son equivalentes a examinar pequeñas áreas de la membrana en imágenes ampliadas y fijas, para facilitar la visualización de un sistema que es intrínsecamente dinámico. Para una discusión general sobre la naturaleza transitoria de muchos eventos de membrana véase [158]. El segundo aspecto que hay que tener en cuenta es que, hasta donde conocemos, no hay casi ninguna propiedad física o química de una biomolécula que no haya tenido ninguna función a lo largo de la evolución. Sería excepcional que unas propiedades tan potentes como se describen anteriormente para los esfingolípidos sencillos carezcan de una correlación fisiológica o patológica. El hecho de que tal paralelismo no haya sido encontrado puede reflejar, entre otras cosas, un problema de comunicación entre la fisicoquímica y las ciencias, o quizás los científicos celulares.

3. FOSFOLIPASAS C Y ESFINGOMIELINASAS: LÍPIDOS COMO SUSTRATOS Y MODULADORES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA*

* Adaptado del estudio de F.M. Goñi y cols. [37]

INTRODUCCIÓN

Las fosfolipasas C (PLC) son fosfodiesterasas que hidrolizan el enlace fosfodiéster entre el glicerol y el fosfato en glicerofosfolípidos, produciendo diacilglicerol (DAG) y una base fosforilada, por ejemplo, fosfocolina, o fosfoinositol. Las esfingomielinasas (SMasas) catalizan una reacción similar en los esfingofosfolípidos, produciendo ceramida (Cer) y una base fosforilada, fosforilcolina, cuando el lípido origen es la esfingomielina (SM). Algunos autores se refieren a estas últimas enzimas como "esfingomielinasas C", reservando el nombre de "esfingomielinasas D " para aquellas enzimas que escinden el enlace fosfodiéster entre el fosfato y la colina en SM. En este capítulo consideramos "esfingomielinasa" como sinónimo de "esfingomielinasa C".

Tanto las PLCs como las SMasas tienen en común con las otras lipasas que, a diferencia de la mayoría de otras enzimas, su sustrato no se produce en solución, sino preferentemente en estado agregado. Ello tiene unas consecuencias que hacen que la cinética y la regulación de estas enzimas den lugar a fenómenos únicos. Debido al mesomorfismo extremo de los lípidos (pueden presentarse en varias fases lamelares, además de micelares, tubulares o hexagonales, diversas fases cúbicas, etc.) el sustrato puede exhibir propiedades físicas muy diferentes y éstas pueden a su vez influir en la actividad de la enzima. Además, algunos productos finales de la reacción de PLCs y SMasas, DAG y Cer, respectivamente, son también lípidos pero exhiben propiedades físicas muy diferentes de las de los fosfolípidos de los cuales provienen. Ello tiene como resultado que la actividad de la enzima es modificada por el estado físico del sustrato, que a su vez influirá en cualquier actividad enzimática posterior. Así, las interacciones lipasa-sustrato son extremadamente complejas. Este capítulo pretende aclarar algunas de ellos.

Las enzimas objeto de este estudio fueron consideradas no mucho tiempo atrás meros instrumentos en la degradación de lípidos. Sin embargo, el descubrimiento de las potentes actividades biológicas de DAG y Cer en las últimas décadas ha provocado un renovado interés en PLC y SMasas y su papel en la señalización celular. Para obtener información básica sobre las PLCs remitimos al lector a las revisiones publicadas por Titball [159] y Popoff y Bouvet [160] para PLC bacterianas, y por Suh *et al.* [161], Fukami *et al.* [162], y Bunney y Katan [163] para PLC eucariotas. Excelentes revisiones sobre esfingomielinasas han sido publicadas por Samet y Barenholz [164], Zeidan y Hannun [165], y Clarke *et al.* [166]. También hemos publicado una revisión sobre SMasas [167], de la cual el presente capítulo es, en parte, una actualización.

Fosfolipasas C

Las fosfolipasas C constituyen un grupo grande y heterogéneo de moléculas, con pocos o ningún aspectos estructurales o mecánicos en común. A los efectos del presente estudio las hemos dividido en tres subgrupos principales: la PLC bacteriana que tiene fosfatidilcolina (PC) como uno de sus sustratos, algunas veces llamada PLC PC-preferente, la PLC bacteriana que hidroliza (casi) exclusivamente fosfatidilinositol (PI) o PI-PLC, y la PLC eucariota, también generalmente específica para PI. Desde el punto de vista de sus actividades enzimáticas el Comité de Nomenclatura Enzimática de la IUBMB clasifica ambos subgrupos bacterianos juntos como EC 3.1.4.3 y la eucariota como EC 3.1.4.11, a excepción de la presuntamente eucariota PC-PLC que está clasificada como EC 3.1.4.3.

PLC-PC preferentes bacterianas. La revisión hecha por Titball [159] sigue siendo la fuente sin par de datos sobre PLC bacteriana. Por supuesto muchas nuevas PLCs han sido descritas posteriormente y las publicaciones correspondientes pueden ser fácilmente encontradas en las bases de datos. Nuestro debate se centrará en la interacción de PLC PC-preferentes (PC-PLC) con lípidos en membranas celulares y modelos. El nombre se refiere al hecho de que, mientras que PC es, por lo general, el mejor sustrato para estas enzimas, a menudo son capaces de escindir, con más o menos eficiencia otros fosfolípidos, como por ejemplo: PE, PS o PG [159], [168]. Tal vez la más conocida de estas enzimas es PC-PLC de *Bacillus cereus*, una metaloenzima de zinc [169].

Las interacciones de PC-PLC de *B. cereus* con su entorno lipídico en las membranas no habían recibido mucha atención hasta el artículo de Nieva *et al.* [170] acerca de la fusión de liposomas mediada por la actividad catalítica de esta enzima. En ese informe se demostró que ciertos lípidos, como por ejemplo, PE, que no eran su sustrato natural, o aquellos que no eran sustratos en absoluto, como por ejemplo, colesterol, podrían aumentar notablemente la tasa y el grado de hidrólisis de PC. Se observó actividad óptima con una mezcla PC:PE:Chol (2:1:1, relación molar). La sonicación de vesículas también dio lugar a un gran aumento en la tasa de hidrólisis debida a PC-PLC. El origen de estos efectos activadores no se discutió en su momento, sin embargo, a la luz de resultados más recientes obtenidos principalmente con PI-PLC (véase la siguiente sección PLC bacterianas PI específicas) se puede proponer que el primero es, al menos parcialmente, debido a un aumento de la unión de la enzima o inserción en la bicapa, un fenómeno a menudo asociado a los lípidos con una curvatura espontánea negativa, tal como PE y colesterol [62], [171]. Vesículas sonicadas, con su inherente baja densidad superficial de cabezas polares fosfolipídicas, también pueden facilitar la inserción de PLC [172].

La hipótesis de la activación enzimática debida a la curvatura de los lípidos fue confirmada en otros estudios de Nieva *et al.* [173], en los que se describía cómo la lisofosfatidilcolina, un lípido con una curvatura espontánea positiva, de hecho disminuía la actividad de PC-PLC. En el mismo estudio se incluye un interesante conjunto de observaciones sobre los efectos del producto final de la enzima, DAG. Cuando 5 o 10 mol% de DAG era incorporado en mezclas PC:PE:Chol en el momento de la preparación de liposomas, la actividad hidrolítica de la enzima aumentaba (aunque la fusión de vesículas fue parcialmente inhibida). Esta observación se repitió para PI-PLC [172] (véase sección *PLC bacterianas PI-específicas*). DAG está probablemente ejerciendo un efecto de activación dual, incrementando la propensión a la curvatura negativa (formación de fase invertida no lamelar) y disminuyendo el orden de la bicapa. Ambos efectos podrían facilitar la inserción de la enzima y quizás proporcionar un entorno más adecuado para que la enzima se pudiera someter a movimientos moleculares asociados con su ciclo catalítico. Sin embargo, cuando la concentración de DAG en la bicapa fue >25 mol% la inhibición por producto final superó los efectos activadores [173].

Un estudio cinético de PC-PLC con el sustrato en forma de micelas mixtas PC-detergentes ha recalcado que la unión enzima-lípido que se produce en la interfaz es un proceso activado con una energía libre de activación que depende del empaquetamiento estructural del lípido en la micela [174]. No es necesario mencionar que los detergentes no son componentes inertes o neutrales en el sistema. Ruiz-Arguello *et al.* [175] encontraron que pequeñas concentraciones de colato de sodio en una bicapa de PC de huevo, correspondiente a una proporción molar efectiva

surfactante:lipido por debajo de 0.05, incrementó la velocidad máxima de PC-PLC aproximadamente el triple. Esto fue confirmado más tarde con desoxicolato de sodio por Ranganathan *et al.* [176], quien también observó inhibición de la enzima a altas concentraciones de detergentes.

Se ha demostrado que los gangliósidos son potentes inhibidores de la PC-PLC. Daniele *et al.* [177] pusieron a prueba los efectos de sulfátido y de una variedad de gangliósidos (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) sobre la actividad de la enzima PC-PLC de *B. cereus*, con el sustrato (PC) en forma de monocapas de lípidos, micelas mixtas de PC-gangliósido o pequeñas vesículas unilaminares (SUV). En todos los casos los gangliósidos exhibieron propiedades inhibitorias cualitativamente similares, los gangliósidos disminuyeron la actividad de la enzima independientemente de la organización de la estructura en la que se presentó el sustrato y no afectaron el proceso de adsorción de la enzima. El efecto modulador de los gangliósidos se produce a nivel de la interfaz, que afecta tanto a la tasa máxima de catálisis de la enzima ya adsorbida como a la disponibilidad del sustrato en una organización adecuada para que la catálisis enzimática tenga lugar. Usando vesículas unilaminares grandes (LUV) compuestas de PC:PE:Chol (2:1:1 relación molar) como sustrato [178] se observó que menos de 1 mol% gangliósido fue suficiente para producir una inhibición clara de la actividad de PC-PLC. El efecto inhibitorio de los gangliósidos aumentó con el tamaño de la cadena de oligosacárido en el grupo de cabeza polar, siendo GT1b el más potente de todos los gangliósidos ensayados, con una disminución del 90% en la velocidad de hidrólisis causada por 0.25 mol% de gangliósidos en la bicapa [178]. En general, cuando el sustrato estaba presente en forma de LUV la potencia inhibitoria de los gangliósidos fue mucho mayor que cuando el sustrato lipídico se testeó como pequeñas vesículas sonicadas, o como monocapas de lípidos. Una observación que probablemente está relacionada con lo anterior es la inhibición de la PC-PLC por lípidos conjugados con poli(etilenglicol) descritos por Basañez *et al.* [179]. La presencia de poli(etilenglicol)-PE en relaciones molares $\geq 3\%$ en bicapas de PC:PE:Chol disminuyó marcadamente la velocidad de hidrólisis enzimática. Los autores propusieron que el residuo de poli(etilenglicol) obstaculizaba a la enzima para alcanzar la superficie de la membrana. Es concebible que tanto el poli(etilenglicol) como las partes de azúcar de los complejos de gangliósidos constituyan focos de atracción de agua a la superficie de la membrana, que podrían repeler las regiones hidrofóbicas de la enzima que anclan la PC-PLC a la interfaz lipídica.

Basañez *et al.* [180] examinaron adicionalmente el efecto de los lípidos no-sustrato en la PC-PLC de *B. cereus* mediante la medición de la actividad enzimática en la mezcla altamente hidrolizable PC:PE:Chol (2:1:1, relación molar) en presencia de una variedad de lípidos de cadena simple. Los hidrocarburos no pueden exhibir una orientación preferencial dentro de la bicapa lipídica, tal como hacen los lípidos polares, debido a su carácter puramente no polar. Ello supone que permanecen en gran parte en la región hidrofóbica más interna de la bicapa, o en los intersticios que se producen en algunas fases no-lamelares, ejerciendo un papel de "llenado de vacío" [181], [182]. Basañez *et al.* [180] encontraron que el 2-4 mol% de hexadecano aumentó moderadamente, en 10-20%, la actividad de PC-PLC. La activación por proporciones similares de escualeno estuvo en el rango de 25-30%. Esto es de nuevo un ejemplo de cómo los factores que podrían promover la generación (quizá transitoria y localizada) de estructuras no lamelares facilitan la unión/inserción de la enzima en la membrana, y por lo tanto la actividad enzimática. Otra confirmación de esta hipótesis proviene de estudios con ácidos grasos libres. El ácido

araquidónico (C20:0), que no promueve curvatura negativa ni formación de fase lamelar, no tuvo ningún efecto sobre la actividad de PC-PLC a 10% en concentración molar, mientras que el ácido araquídico (C20:4), que promueve curvatura negativa y desestabiliza la bicapa, tuvo un claro efecto activador [180]. Recíprocamente, los lípidos con una curvatura intrínseca positiva, que estabilizan la fase lamelar (bicapa) en condiciones que de otro modo favorecen la transición lamelar a no lamelar, causaron la inhibición de PC-PLC. Este fue el caso de lisoPC o palmitoilcarnitina [180].

Otro estudio importante de la influencia de la composición lipídica de la bicapa en la actividad de PC-PLC fue desarrollado por Ruiz-Arguello *et al.* [183], quienes ensayaron la enzima en mezclas de complejidad creciente a partir de PC pura añadiendo progresivamente PE, SM y Chol. Estos autores encontraron que, en la mayoría de los casos, la enzima fue capaz de escindir PE aproximadamente a la misma tasa que PC, mientras que SM no se degradó. Tanto en PE como Chol, lípidos de curvatura negativa, la actividad de PC-PLC incrementó de una manera dosis dependiente. A su vez SM, un conocido estabilizador de la fase lamelar (curvatura casi cero) fue un potente inhibidor [193]. La actividad de PLC no estaba directamente influenciada por la formación de estructuras no lamelares, sin embargo, la presencia de lípidos con una tendencia a formar fases no lamelares, tales como PE o Chol, estimularon la enzima incluso en condiciones en las que existen fases puramente lamelares. En todos los casos examinados por Ruiz-Arguello *et al.* [183], la actividad máxima de la enzima fue precedida por un período de latencia. Como regla general, los períodos de latencia más largos fueron asociados a las velocidades máximas de hidrólisis más bajas (sobre períodos de latencia de PLC véase el apartado más abajo).

PLC bacteriana PI-específica. Titball [159] había indicado la presencia de PI-PLC en *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Listeria monocytogenes*, con una amplia similitud en la secuencia de aminoácidos. También señaló que había sido reportada la secuencia homóloga entre PI-PLC de *B. cereus* y PI-PLCs de varios eucariotas, que son hoy clasificadas con la familia δ (véase la sección PLC eucariotas). Finalmente, Titball mencionó la capacidad de PI-PLC bacteriana para escindir el anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI), al cual muchas proteínas de membrana eucariotas se unen, y la no exigencia de cationes divalentes para la actividad de estas enzimas. Desde 1993 se han producido descubrimientos importantes en relación con estas enzimas, algunos de ellos revisados por Griffith y Ryan [184], que incluyen las estructuras cristalinas de las PI-PLCs de *B. cereus* [185], [186], *B. thuringiensis* [187] y *L. monocytogenes* [188], y se han producido avances significativos sobre las interacciones de estas enzimas con lípidos sustrato y no-sustrato. Una comparación de las estructuras cristalinas de PI-PLCs procariota y eucariota revela que ambas contienen barriles $(\beta\alpha)_8$ distorsionados como motivo estructural, con una similitud estructural sorprendentemente grande para la primera mitad del barril, en la cual se encuentran todos los residuos catalíticos, y en particular dos residuos His esenciales [189], [190]. El hecho de que las PI-PLCs de eucariotas, pero no de procariotas requieran Ca^{2+} se explica por la observación de que, en las enzimas bacterianas, un residuo de Arg ocupa la ubicación de Ca^{2+} en los eucariotas [189].

El papel de los lípidos distintos de PI o PC sobre PI-PLC fue examinado por Ahyauch *et al.* [172]. En particular la galactosilceramida y el colesterol inhiben la actividad enzimática de un modo dependiente de la dosis, al menos hasta 35 mol% en la bicapa, a una concentración constante de PI. Mediciones paralelas de la unión interfacial de enzima, estimada por el aumento de la

fluorescencia intrínseca de PI-PLC, mostraron que tanto la galactosilceramida como el colesterol obstaculizaron la unión de PI-PLC a las vesículas sustrato. Mediciones simultáneas de la actividad enzimática, unión interfacial de enzima, y la fluorescencia de diferentes sondas en vesículas de 11 composiciones de lípidos diferentes, revelaron que tanto la unión de la enzima como la actividad disminuyeron con el aumento del orden lipídico, tal como se mide por la polarización de fluorescencia de la sonda hidrófoba difenilhexatrieno. La esfingomielina de huevo, compuesta principalmente por N-palmitil esfingosina, tuvo un efecto dual, hasta 30 mol% (en mezclas PI/SM) aumentó la actividad de PI-PLC, con poco efecto sobre el orden molecular de la bicapa. En proporciones más altas, el aumento en el orden de las cadenas causó una disminución en la actividad enzimática. Estos autores propusieron que SM actuó tanto como un activador alostérico como un potenciador del orden de las cadenas lipídicas, por lo tanto, como un inhibidor, y que los efectos de activación fueron predominantes en concentraciones bajas de SM y los de inhibición en concentraciones altas de SM. Esta hipótesis fue apoyada por el hecho de que el diestearil-PC, un lípido de alta temperatura de fusión con una potente actividad ordenadora de cadenas acilo es sólo un modesto activador de PI-PLC, y la activación se revierte más allá de 60 mol% de diestearil-PC, mientras que dimiristil PC, de baja temperatura de fusión, aumenta notablemente la actividad enzimática incluso a 90 mol% y sin un cambio observable para las cadenas acílicas lipídicas [172].

Aparte del orden molecular de la membrana, otro factor importante que regula la actividad de PI-PLC es la curvatura de la membrana. Qian *et al.* [191] habían encontrado que la enzima exhibía mayor actividad específica con pequeñas vesículas unilaminares (≈ 30 nm de diámetro) que con vesículas de menor curvatura (diámetros ≈ 100 nm). Ahyauch *et al.* [172] confirmaron esta observación con vesículas en un rango de 50-300 nm y, además, encontraron que, con vesículas unilaminares sonificadas de PI puras (≈ 50 nm de diámetro), se observaban dos valores de K_s aparentes para la actividad de la enzima, una en el rango de concentración de 0-2 mM PI y la otra en el rango de concentración entre 2-12 mM PI. Este último (≈ 4.2 mM) correspondía a valores publicados anteriormente [191], mientras que la K_s de baja concentración (0.77 mM) es del mismo orden de magnitud que la K_s aparente medida con LUV por Ahyauch *et al.*, de 0.30 mM. Los dos valores observados de K_s puede corresponder a dos modos de acoplamiento de la enzima a la membrana del SUV, de los cuales sólo uno existiría en LUV. Ahyauch *et al.* [172] proponen que las SUV ofrecerían, además de la superficie de la bicapa "regular", un número de bordes y/o defectos que proporcionarían, a altas concentraciones de vesículas, un segundo sitio significativo para la unión de la enzima. Estas inhomogeneidades estarían ausentes en los más suavizados y menos tensos LUV.

DAG es un lípido interesante porque, además de ser muy potente en la modificación de las propiedades de las bicapas es también un producto final de PI-PLC. Villar *et al.* [192], [193] encontraron que DAG era un activador eficaz de PI-PLC. En estos estudios se utilizaron vesículas compuestas por PI, PE, PC y colesterol, en las que la proporción de PI varió entre 5 y 40 mol%. Cuando se incorporó DAG de huevo en la formulación de liposomas, ya sea 5 o 10% mol adicional, la actividad de la enzima aumentó de un modo dependiente de la dosis. Ha sido demostrado que DAG activa un número de enzimas relacionadas con la membrana (véase la revisión por Goni y Alonso [61]). Villar *et al.* [193] explican la activación observada en términos de un aumento inducido por DAG en la propensión de la bicapa para formar fases invertidas, lo cual se sabe que facilita la inserción de proteínas [62], [171]. También es probable que DAG de huevo disminuya el

orden de membrana [61], lo cual, a su vez, incrementaría la asociación de PI-PLC a la membrana y la actividad catalítica.

La capacidad de PI-PLC de *B. cereus* para escindir uniones GPI fosfodiéster había sido reconocida anteriormente [194]. Esta observación adquirió una nueva importancia con la propuesta de que las proteínas ancladas a GPI estarían localizadas en "balsas" de membrana [98], [195]. Villar *et al.* [196] incorporaron GPI purificado a partir de lípidos de hígado de rata en vesículas (≈ 100 nm de diámetro) de composiciones de lípidos definidas, GPI:PC:PE (1:1:2 mol) o GPI:PC:Chol (1:2:1 mol). En ambos casos la actividad enzimática comenzó inmediatamente sin retraso mensurable, pero en la mezcla que contiene colesterol, tanto la velocidad como el grado de hidrólisis de GPI fueron la mitad de aquellos en los que la mezcla contenía PE en lugar de colesterol. Esto es, probablemente, otro ejemplo de las propiedades inhibitorias del colesterol en PI-PLC, asociada a su efecto de ordenar las cadenas lipídicas [172]. Usando inositolfosfoglicanos sintéticos, Bonilla *et al.* [197] encontraron que PI-PLC fue estereoespecífica para *L-chiro*-glicofosfoinositidos incorporados en membranas de liposomas, siendo las formas *D-chiro* las que no fueron atacadas. Jones *et al.* [198] fueron capaces de fosforilar GPI en la posición 3 del anillo de inositol usando una PI 3-quinasa clase I de mamífero. Cuando GPI fue fosforilada se convirtió en un mejor sustrato para PI-PLC. Los autores proponen que este tipo de eventos de fosforilación podría constituir la base de un mecanismo de transducción de señal no descrito previamente.

PLC eucariotas. Es aceptado en general que todas las PLCs eucariotas son PI-específicas. Ha habido informes de PLCs de mamíferos PC-específicas [199]–[201], pero no aparece ningún fragmento de DNA eucariótico secuenciado que corresponda a tal enzima. Limitaremos nuestra discusión a PI-PLCs. El sustrato fisiológico de PI-PLCs eucariotas es fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), aunque la hidrólisis in vitro de otros polifosfoinositidos haya sido registrada [202]. Como resultado de la actividad PI-PLC se forman dos productos biológicamente activos, a saber, el inositol 1,4,5-trisfosfato soluble en agua (IP₃) y el DAG lipídico. IP₃ es un segundo mensajero movilizador del calcio y DAG es un activador de la proteína quinasa C, entre otras proteínas, y modifica las propiedades físicas de la membrana celular. Las PI-PLCs son actores claves en la regulación del metabolismo celular [162].

Existen por lo menos 13 isoformas de PI-PLC en mamíferos, agrupadas en seis familias (PLC β , γ , δ , ϵ , ζ , y η) (Fig. 10) de acuerdo con su estructura primaria [161], [163]; en cada eucariota parece existir al menos una de las formas de PI-PLC. El dominio de la organización y dendrograma de las isoformas de PLC de mamíferos pueden verse en Hwang *et al.* [203]. A pesar de la diversidad estructural y funcional de PI-PLC eucariota, algunos mecanismos comunes están emergiendo. Bunney y Katan [163] en su excelente revisión han resumido algunas de las características comunes de la interacción PLC-membrana y su relevancia para la regulación de la enzima.

La mayoría de las PLC eucariotas contienen los siguientes dominios, comenzando desde el extremo N-terminal (Fig. 10): un dominio PH ("pleckstrin homology"), un dominio que contiene varias "manos EF" (motivos de unión a calcio), un dominio catalítico y un dominio C2. El dominio catalítico consiste en un barril plegado ($\beta\alpha$)₈ distorsionado, el llamado barril TIM, en el cual se distinguen generalmente dos regiones, la región N-terminal (X-box), que contiene los residuos catalíticos, y la región C-terminal (Y-box), involucrada en el reconocimiento de sustrato. Los cuatro dominios anteriores se encuentran en todas las PLC de mamíferos, excepto PLC ζ , que no

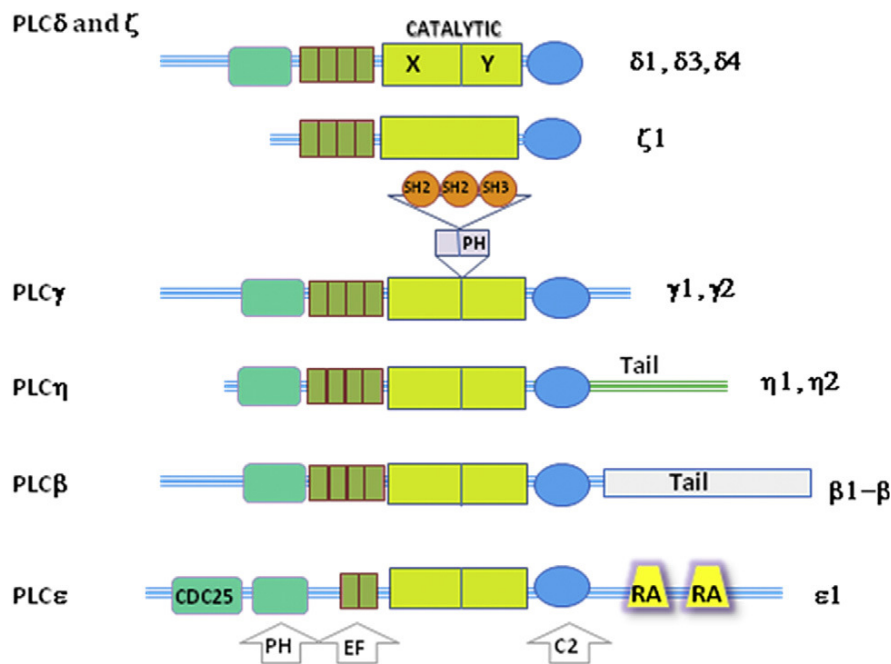


Fig. 10. Organización de dominios de las isoformas de PLC de mamíferos. Los cuatro dominios de PLC δ , dominio PH, mano EF (EF), dominio catalítico (que contienen regiones X e Y altamente conservadas) y el dominio C2 (C2) también están presentes en la mayoría de las isoformas de otras familias de PLC. La región única de PLC γ , insertada a través de un bucle flexible del dominio catalítico, incluye el segundo dominio PH, dos regiones SH2 (Src homología 2) y una región SH3 (Src 3 homología). PLC ϵ contiene un dominio con un factor de actividad de intercambio de nucleótido-guanil (CDC25) y dos dominios predichos RA (asociación de Ras) que están implicados en la unión de pequeñas GTPasas forman la familia Ras. En PLC β , la región única (cola) está presente en el C-terminal. Las secuencias únicas para PLC ϵ (cola) están, como en PLC β , situadas en el extremo C-terminal (Adaptado de [300]).

contiene el dominio PH N-terminal. Las enzimas PLC en plantas no contienen dominios PH reconocibles. Además, PLC β y η contienen una "cola" o extensión C-terminal. PLC γ se caracteriza por un arreglo único de dominios PH, SH2 y SH3, el "arreglo γ -específico" (γ SA) insertado entre las regiones X e Y en el dominio catalítico [163]. Desde el punto de vista mecánico, al menos para PLC δ 1, se ha descrito un mecanismo de dos pasos, que consiste en una reacción fosfotransferasa intramolecular para formar 1,2-inositolfosfato cíclico seguido por la actividad de la

fosfodiesterasa cíclica para formar inositol-1-fosfato, tal como se describe para la PLC bacteriana PI-específica [204].

Períodos de latencia en la actividad de PLC. Una característica interesante de la acción de muchas fosfolipasas es que, a diferencia de la mayoría de las enzimas con sustratos solubles, las velocidades iniciales no son las velocidades máximas de la actividad de la enzima. En lugar de eso, la mezcla de enzima y sustrato a menudo es seguida por un período de actividad apenas detectable, el llamado periodo de latencia ("lag times"), y sólo después de tal período se produce un "estallido" de actividad y la enzima trabaja en su máxima velocidad hasta que se consume una fracción significativa del sustrato. Tal patrón de comportamiento ha sido reconocido desde los primeros días de investigación en fosfolipasas [205]. Dawson et al. [206], Kimura [116], y Nieva et al. [170], [173] también observaron más tarde periodos de latencia en la cinética de la PLC.

Tal vez el primer estudio diseñado para abordar el origen de los tiempos de latencia en PLC fue realizado por Basañez *et al.* [207], con PC-PLC de *B. cereus* actuando sobre PC de huevo. Estos autores observaron que el período de latencia no podía ser detectado cuando el sustrato estaba en forma de pequeñas vesículas sonicadas o de monómeros de PC de cadena corta, mientras que fue claramente observado (del

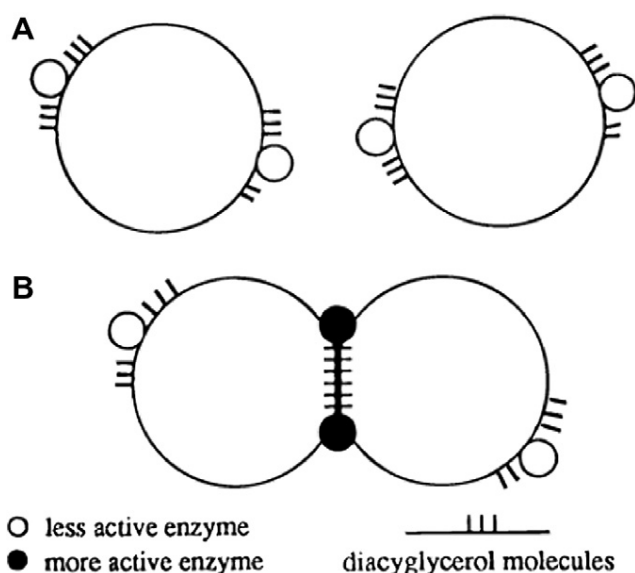


Fig. 11. Esquema simplificado de una hipótesis para la activación de fosfolipasa C a través de la agregación vesicular. (A) La enzima hidroliza el sustrato a bajas velocidades (período de latencia) hasta que una cierta cantidad de diacilglicerol es acumulado en la membrana. (B) La formación de dominios enriquecidos en diacilglicerol conduce a la agregación vesicular y esto a su vez crea o estabiliza los defectos de membrana que permiten la actividad enzimática completa [207].

orden de minutos) para grandes vesículas unilamelares. Para una concentración dada de vesículas se observó disminuir el tiempo de latencia con el aumento de la concentración de Ca^{2+} o de PLC, con el incremento de temperatura o con el aumento de la curvatura de la vesícula (diámetro decreciente). Tal vez la observación más importante en este estudio fue que, para una concentración de vesículas dada, la proporción de PC escindido a DAG generado al final del período de latencia era constante, por ejemplo de ≈ 10 mol% para 0.3 mM de vesículas de PC, independientemente de la temperatura, o de la concentración de Ca^{2+} o PLC. Además Basañez *et al.* [207] observaron que el período de latencia podía ser reducido e incluso anulado mediante la incorporación de algo de DAG junto con PC durante la preparación de la vesícula. Llegaron a la

conclusión de que durante el período de latencia la enzima trabajó a una velocidad baja, generando productos que fueron, al menos de forma transitoria, acumulados en la región cerca o alrededor de la enzima. Cuando se alcanzó una cierta fracción molar de los productos se produjo el "estallido" de la actividad, presumiblemente relacionada con la formación de defectos estructurales. Los mismos autores registraron en paralelo actividad enzimática a lo largo del tiempo y cambios en la turbidez en la suspensión de vesículas, descubriendo que en todos los casos el período de latencia terminaba de forma concomitante con el inicio de un proceso de agregación de vesículas (véase agregación de vesículas más adelante) (Fig. 11). Basañez *et al.* [207] propusieron una hipótesis para el período de latencia de PLC según el cual: (a) la actividad plena del enzima requiere la presencia de irregularidades de la superficie de membrana, (b) el DAG generado en la fase de latencia produce algún tipo de separación de fases, con la formación de "parches" o dominios ricos en DAG, (c) las vesículas se agregan a través de contactos entre parches, y (d) la agregación causa (y/o aumenta, y/o estabiliza) las inhomogeneidades superficiales que permiten la actividad enzimática plena.

Varias observaciones interesantes se hicieron a la luz de los resultados anteriores. Ruiz-Arguello *et al.* [150] describieron que la ceramida de huevo en la composición de la vesícula también contribuía a disminuir los tiempos de latencia, aunque con menor eficiencia que DAG. La capacidad de la ceramida para segregarse lateralmente en dominios rígidos [208], [209] probablemente ayude en la generación de defectos estructurales que tal vez facilitan la inserción de la enzima. Tanto los estudios realizados por Basañez *et al.* [180] como por Ruiz-Arguello *et al.* [183] ofrecen múltiples ejemplos de composiciones de bicapa que modifican los tiempos de retardo. Invariablemente, los períodos de latencia más cortos son el prólogo de las actividades enzimáticas más rápidas. La variación de las composiciones de lípidos manteniendo constantes todos los demás parámetros conduce a un rango de tiempos de latencia que se extiende más de dos órdenes de magnitud (de 0.1 a 38 min), mientras las velocidades máximas enzimáticas correspondientes disminuyen de 56 a 0,4 min⁻¹. Con PI-PLC de *B. cereus* actuando en bicapas de PI:PC:PE:Chol, los tiempos de retardo eran mucho más cortos que con PC-PLC, del orden de segundos [192], [193]. Esto fue acompañado por velocidades máximas mucho más altas. La adición de DAG durante la preparación de vesículas redujo notablemente los tiempos de latencia, que se redujeron a menos de 1 s con DAG 10% molar. Además, los estudios cinéticos revelaron que la agregación de vesículas estaba limitada por la frecuencia de los contactos que involucran dos dominios ricos en DAG sólo cuando la agregación era seguida por la fusión vesícula-vesícula [193], lo que confirma algunas de las predicciones de Basañez *et al.* [207]. Ibarguren *et al.* [210] han proporcionado un nuevo punto de vista sobre el período de latencia de una fosfolipasa mediante el examen por microscopía fluorescencia confocal de vesículas unilamelares gigantes tratadas con enzimas. Según estos autores la unión de enzimas a las vesículas es un proceso cooperativo, que conduce a la formación de cúmulos de enzima. Después de la detección del cúmulo inicial de enzima ligada, siguen rápidamente uniones posteriores y actividad catalítica.

Esfingomielinasas

Clasificación. Una amplia variedad de SMasas (EC 3.1.4.12 en la clasificación IUBMB) ha sido descrita en organismos eucariotas y procariotas. Las SMasas fueron descritas al inicio de los años setenta del siglo pasado [211]. Samet y Barenholz [164] propusieron una clasificación útil de (en su mayoría) SMasas de mamíferos, que continuamos en Goñi y Alonso [167] y Montes *et al.* [212], y que se puede encontrar, con algunas modificaciones, en la Tabla 2. Las SMasas bacterianas pueden ser clasificadas con las SMasas neutras en la Tabla 2 a excepción de las PLCs/SMasas bacterianas, las cuales pueden diferir significativamente en estructura y función y se abordarán en una sección más adelante.

La familia de SMasas neutras, dependientes de Mg^{2+} (Mn^{2+}), merece una reflexión debido a la relevancia

metabólica y

al gran

número de

estudios

dedicados a

este grupo

de enzimas.

Una

excelente

revisión

breve para

esta familia

de enzimas

se puede

encontrar en

[166]. Como

resumieron

sus autores,

nSMasa fue

por primera

vez

caracterizada

en 1967

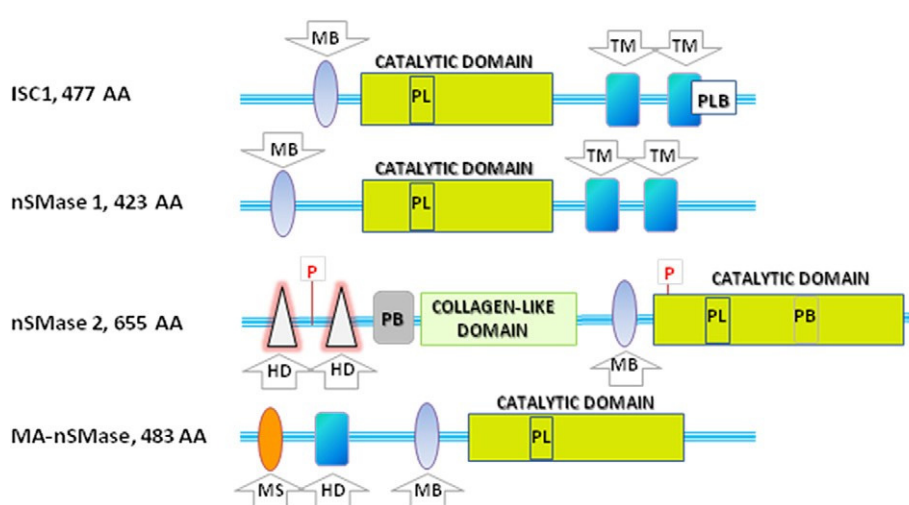


Fig. 12. Dominio estructural de los miembros de la familia de nSMasa eucariota. Lo que se muestra es una ilustración esquemática de los dominios funcionales conocidos de ISC1 de *S. Cerevisiae* (Genbank P40015), nSMasa1 humana (O60906), nSMasa2 humana (Q9NY59) y MA-nSMasa murina (NP_001182466) (de [166]). HD: dominio hidrofóbico; MB: dominio de unión a Mg^{2+} ; TM: dominio transmembrana; PR: dominio rico en prolina; P: sitio de palmitilación; PL: dominio tipo bucle-P; MS: péptido señal de potencial mitocondrial; PLB: sitio de unión a fosfolípido; PB: dominio de interacción de potencial de proteína.

[213]; las primeras nSMasas bacterianas fueron clonadas dos décadas más tarde [214], [215] y se necesitó una década más antes de que fuera clonada la primer nSMasa de mamífero [216]. A continuación, se identificaron los homólogos de la levadura (que hidrolizan ceramida fosforilinositol, lípido de levadura que juega el papel de la SM en los mamíferos), ISC1 de *Saccharomyces cerevisiae* y CSS1 de *Schizosaccharomyces pombe* (para esfingomielinasas de levadura véase la revisión [217]; para la reciente caracterización de ISC1 del hongo patógeno *Cryptococcus neoformans* véase [218]). La nSMasa2 de mamífero fue identificada y clonada en el año 2000 [219] y, más recientemente, la nSMasa mitocondrial se ha aislado de pez cebra [220] y mamíferos [221], [222]. Nuestro laboratorio ha informado de actividad nSMasa en glóbulos rojos

de células humanas provocada como resultado de la flexión de la membrana [223]. Todas estas enzimas pertenecen a la superfamilia de DNasaI [224]. La primera estructura determinada para un miembro de la familia DNasa I/nSMasa fue smCI, en el patógeno bacteriano intracelular *Listeria ivanovi* [225]. Además, una nSMasa3 de mamífero que ha sido clonada parece pertenecer a una familia diferente [226]. El dominio estructural de las nSMasas relacionadas con la superfamilia de DNasaI, adaptado de Clarke *et al.* [166], se muestra en la Fig.12. Véase también el resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de esfingomielinasas [164, 166, 167, 212]

Tipo de Esfingomielinasa	Propiedades importantes
1. SMasa ácida	- pH óptimo 5. Localizada en lisosomas - Ausente en síndrome de Niemann - Pick - Clonado de DNA humano [301,302] - Inhibido por ceramida-1-P y por fosfoinosítidos [303] - Puede ser translocada a la hemicapa externa de la membrana plasmática y posterior de activación de Fas (CD95). La SMasa induciría secuestro de CD95 en dominios ricos en ceramida, y la subsecuente apoptosis [304,305,306]
1 bis. SMasa secretoria	- Se origina del gen de SMasa ácida vía tráfico diferencial de proteína de un precursor proteico común [307] - Localizada en la vía secretoria del Golgi - Involucrada quizás en aterogenesis [308]
2. SMasa neutra, Mg^{2+} dependiente	- pH óptimo 7 - activada por varios eventos de estrés [309] - nSMasa 1 clonada de mamífero [310], localizada en el retículo endoplasmático y Golgi, exhibe además una actividad PLC liso-PAF [311], quizás no involucrada en apoptosis [312] - nSMasa 2 [219, 313], también mamífera, se localiza en Golgi, involucrada en crecimiento y señalización celular - nSMasa 3 [314], encontrada en mamíferos superiores e inferiores, puede constituir una familia separada de nSMasa. - nSMasa mitocondrial de pez cebra [315] y mamíferos [316] - Un grupo de SMasa bacteriana está relacionado estructuralmente a nSMasa 1 [310,317,318] - Fosfolipasa C inositol fosfolípido (ISC1), tiene homología con SMasa bacteriana, encontrada en levaduras y Tripanosomatidos que contienen ceramida fosforilinositol en lugar de SM [319,320, 321]
3. SMasa alcalina	- pH óptimo 8.5. Aislada de intestino de mamíferos [322, 323]

Interacción SMasa-membrana. Tomados en conjunto, los estudios sobre el efecto de la composición de la bicapa sobre SMasas eucariotas (con la posible excepción de nSMasa1) sugieren un efecto de activación generalizado por fosfolípidos aniónicos. Los datos correspondientes a la actividad para SMasa bacteriana, sin embargo remarcan la importancia del estado físico de los lípidos en lugar de su concentración o la presencia de otros lípidos. SM tiende a estar en o cerca de la fase de gel a las temperaturas fisiológicas de mamíferos y aves, mientras la ceramida tiene una transición gel-fluido a temperaturas mucho más altas. Lo mismo es cierto en mezclas de SM: Cer. Por lo tanto hay una tendencia, inherente a este sistema, del sustrato a

segregarse en dominios de fase gel que son prácticamente inaccesibles para la enzima. Las concentraciones altas de colesterol ayudan a "disolver" SM en fases líquido-ordenadas, donde pueden ser hidrolizadas por la enzima. La interacción entre SM, ceramida, colesterol, y lípidos insaturados puede ser muy relevante en la formación y propiedades de las "plataformas" enriquecidas en Cer en la membrana plasmática, las cuales pueden ser esenciales en la señalización del estrés [96].

Efecto de la actividad SMasa en la organización lateral de la membrana. Un efecto importante de la acción de la SMasa en las membranas es la generación de dominios ricos en ceramida debido a la segregación lateral de los productos finales lipídicos debidos a su actividad. Este fenómeno es interesante en términos de la biofísica de lípidos y puede tener importantes implicaciones fisiológicas. La separación de los dominios ricos en ceramida se observó por primera vez por Huang *et al.* [139], que examinaron la estructura de bicapas compuestas por dipalmitilfosfatidilcolina totalmente deuterada y ceramida de cerebro bovino utilizando espectroscopia de $^2\text{HRMN}$. Estos autores observaron que la adición de ceramida induce la separación lateral de fases de bicapas fluidas de fosfolípidos en regiones gel y líquido-cristalino (fluido) – la ceramida se particiona en gran medida en la fase gel de d_{62} -DPPC. Estos estudios se extendieron posteriormente a ceramidas con diferentes longitudes de cadena [227], con el resultado de que C16-ceramida, pero no C2, C6 ni C8-ceramida, dio lugar a separaciones de fases en el plano. Un comportamiento similar de ceramidas de cadena larga ha sido detectado en mezclas de fosfatidilcolina:fosfatidilserina [228]. El uso de fosfolípidos marcados con pireno, una sonda fluorescente que es sensible a la movilidad lateral y a la concentración local de fluoróforo en la membrana, permitieron a Holopainen *et al.* [137], [229] detectar microdominios enriquecidos en ceramida en membranas fluidas de fosfatidilcolina. Un estudio cinético paralelo de dominios ricos en ceramida [229] reveló que, en condiciones que permitían la síntesis rápida de ceramida, los cambios en la organización lateral de la membrana requirieron tiempos significativamente más largos (un orden de magnitud en las condiciones experimentales). El mismo grupo encontró que al poner en contacto una pequeña área de la membrana de los liposomas gigantes que contenían esfingomielina con SMasa inmovilizada [230], se producía la aparición de dominios ricos en ceramida en la zona de interacción.

La capacidad de la ceramida para segregarse lateralmente en dominios ordenados puede ser crucial en ciertos eventos fisiológicos. Kolesnick *et al.* [133], [231] han sugerido que esta es la base de "capping", un proceso por el cual la estimulación celular da lugar a la agrupación de ciertas proteínas de membrana, a menudo, pero no necesariamente, receptores moleculares, en los dominios de membrana. Según estos autores, cuando una señal extracelular, por ejemplo la unión de Fas por el ligando o un anticuerpo agonista, provoca la actividad SMasa ácida a nivel de la membrana plasmática, la ceramida liberada como un producto final enzimático conduce a la reorganización de las "balsas" en plataformas más grandes, o macrodominios, dentro de las cuales Fas se aglutina. La agrupación de receptores se supone que activa efectores corriente abajo dentro de la célula. Hay sugerencias de que la vía SMasa ácido a ceramida actúa en respuesta a una variedad de las formas de estrés celular incluyendo ligandos de muerte ($\text{TNF}\alpha$, TRAIL, o los ligandos Fas mencionados anteriormente), citoquinas (interleuquina 1, interferón γ), radiación, infecciones o agentes citotóxicos [96], [165].

Efectos de la actividad esfingomielinasa sobre el movimiento transbicapa de los lípidos. Un efecto novedoso de la ceramida es la inducción del movimiento transbicapa de lípidos. Este efecto fue demostrado por Contreras *et al.* [104] tanto en membranas modelo (liposomas) como celulares (fantasmas de eritrocitos) en las cuales la generación de ceramida tuvo lugar *in situ* a través de la acción de esfingomielinasa añadida externamente. La adición directa de la ceramida a liposomas preformados tiene esencialmente los mismos efectos [155]. El movimiento transbicapa de lípidos inducido por la ceramida está probablemente relacionado con otra propiedad suya bien conocida, como es la facilitación de la transición de fase lipídica lamelar a no lamelar [143]. Por lo tanto SMasa genera ceramida en un lado de la membrana; posteriormente la ceramida induce la formación transitoria de intermediarios estructurales no lamelares que causan la pérdida transitoria de la asimetría de los lípidos en la bicapa, es decir, el movimiento de la ceramida transbicapa junto con otros lípidos. Como los objetivos directos para ceramida tienden a ser intracelulares, mientras SM se encuentra principalmente en la hemicapa externa de la membrana plasmática, estas observaciones pueden ser relevantes para el mecanismo de señalización transmembrana por medio de la vía de esfingomielina.

Efectos de la actividad de la esfingomielinasa sobre la permeabilidad de la membrana. Ruiz-Arguello *et al.* [150] fueron los primeros en señalar que la generación de ceramidas en bicapa induce un flujo de salida de contenidos celulares. Trataron tanto vesículas unilaminares grandes constituidas por esfingomielina, fosfatidiletanolamina y colesterol (2:1:1 relación molar), como fantasmas de eritrocitos resellados, ambos cargados con colorantes fluorescentes de bajo peso molecular y con SMasa bacteriana. En ambos casos se produjo un rápido flujo de salida en paralelo con la actividad enzimática. Esto es opuesto a lo que sucede con vesículas de fosfatidilcolina:fosfatidiletanolamina: colesterol (2:1:1) tratadas con fosfolipasa C, en cuyo caso los contenidos acuosos no fueron liberados.

En un estudio más detallado Montes *et al.* [152], encapsularon en liposomas solutos fluorescentes de diferentes tamaños, de hasta 20 kDa, y complementaron los experimentos en los que la ceramida fue generada por SMasa, con otros en las que se añadió la ceramida en disolvente orgánico a la suspensión de liposomas preformados. Se utilizaron pequeñas proporciones de ceramida (10 mol% del lípido total) que pueden existir bajo condiciones fisiológicas de señalización ceramida-dependiente. Las ceramidas de cadena larga (derivadas de huevo), añadidas tanto externamente como producidas enzimáticamente, indujeron la liberación del contenido de la vesícula; sin embargo, la misma proporción de ceramidas generadas por SMasa indujo un flujo de salida más rápido y más grande que cuando se adicionó en solución orgánica a las vesículas. Sorprendentemente, el tratamiento SMasa en bicapas que contienen 50% molar de esfingomielina dio lugar a la liberación de dextranos derivatizados con fluoresceína de masa molecular ≈ 20 kDa, es decir, más grande que el citocromo c. Además, algunos experimentos en el mismo trabajo fueron diseñados para explorar el mecanismo de flujo de salida inducido por ceramida. Dos propiedades de ceramida parecen ser importantes en el proceso de reestructuración de la membrana que conduce al eflujo de soluto. Una de ellas es la capacidad de ceramida para inducir una curvatura "negativa" de la monocapa, es decir, una curvatura de signo opuesto al que se encuentra en las membranas celulares [132]. La otra es su tendencia a segregarse en dominios ricos en ceramida. La interfaz entre dominios deficientes y ricos en ceramida es probablemente una región de alto flujo de salida. Siskind *et al.* [232] han

demostrado que la ceramida aumenta la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial a las proteínas de masa molecular de hasta 60 kDa. Cabe señalar en este contexto que la permeabilización de la membrana mitocondrial por ceramida puede ser un paso esencial en la liberación del citocromo c de mitocondrias y la posterior muerte celular [233], [234].

Efectos de la actividad de la esfingomielinasa en la estructura de los agregados lipídicos, la agregación y la fusión de membrana. La actividad de la esfingomielinasa en bicapas de lípidos puede dar lugar a profundos cambios en la organización tridimensional de los lípidos, incluyendo la formación de estructuras no lamelares y la fusión entre vesículas. Estos efectos de la SMasa se discuten en la siguiente sección.

Fosfolipasas C/esfingomielinasas bacterianas

En esta sección nos ocuparemos de tres enzimas bacterianas que pueden degradar tanto glicerofosfolípidos como esfingomielina, produciendo, respectivamente, DAG y ceramida, además de productos solubles en agua. Las tres enzimas son una α -toxina de *C. perfringens*, LmPLC de *L. monocytogenes*, y PlcHR₂ de *P. aeruginosa*. Se describen aquí juntos debido a su doble capacidad hidrolítica, incluso si no forman un grupo homogéneo desde el punto de vista estructural, evolutivo o mecanístico.

α -toxina de Clostridium perfringens. *Clostridium perfringens* es una bacteria anaeróbica Gram-positiva que es capaz de formar esporas. Está muy extendida en el medio ambiente (por ejemplo, en el suelo y las aguas residuales) y se encuentra comúnmente en los intestinos de los animales, incluyendo seres humanos, donde puede actuar como patógeno en ciertas circunstancias. *C. perfringens* de tipo A es el agente más importante causante de la gangrena gaseosa en los seres humanos. El organismo produce una multiplicidad de toxinas de las cuales la α -toxina (370 residuos) ha sido la más ampliamente estudiada [235]. Fue la primera toxina bacteriana en ser identificada como una enzima, concretamente, como una PLC. Más tarde también se encontró actividad SMasa en α -toxina [236]. Los primeros estudios sobre esta toxina fueron brevemente resumidos por Titball [159].

A pesar de los estudios anteriores no estaba disponible una descripción para las medidas de actividad de PLC y SMasa usando un método directo sobre una bicapa sustrato en ausencia de detergentes. Urbina *et al.* [237] caracterizaron ambas actividades de la α -toxina midiendo la hidrólisis de fosfolípido como la generación de fósforo soluble en agua. El sustrato estaba en la forma de vesículas unilamelares obtenidas por extrusión. Las composiciones de bicapa más simples que permitieron medir actividades utilizando esta metodología fueron DOPC:Chol (2:1 relación molar) y SM:PE:Chol (2:1:1 relación molar) para las actividades de PLC y SMasa respectivamente. Para ambas se observó una fase de latencia durante la cual $\approx 10\%$ del sustrato fue hidrolizado (véase el caso paralelo de *B. cereus* PC-PLC en [178], [207], [238]); a continuación, se produjo un estallido de actividad. Las máximas velocidades hidrolíticas registradas, por tanto post-lag, fueron 1.9×10^{-2} mol de fosfolípido/g de proteína $\times$ s (PLC) y 3.8×10^{-3} moles de fosfolípido/g proteína $\times$ s (SMasa) [234]. La dilución de α -toxina más allá de cierto punto tuvo el efecto de la inactivación de la enzima. Takahashi *et al.* [224] habían encontrado que 0.1% (w/v) de albúmina de suero bovino en el buffer ejercía un efecto protector. Urbina *et al.* [237]

obtuvieron el mejor resultado cuando la enzima diluida en presencia de albúmina fue añadida a suspensiones de liposomas preparados sin albúmina. También se encontró que Tris 10 mM permite actividades más altas que Bis-Tris o HEPES utilizados en las mismas concentraciones.

Según se observó con otras PLCs y SMasas bacterianas, las actividades hidrolíticas de α -toxina dieron lugar a una amplia agregación de vesículas después el período de latencia. La agregación de vesículas se puede monitorizar convenientemente a través de cambios en la turbidez de suspensión con un espectrofotómetro simple [239]. Urbina *et al.* [237] fueron capaces de establecer una buena correlación entre las velocidades máximas de reacción medidas por el ensayo de fósforo y por el ensayo turbidimétrico, de modo que este último se puede utilizar como un método semi-cuantitativo para la estimación de la actividades enzimáticas. Usando el ensayo turbidimétrico, una interesante observación indicó que, aunque ambas actividades PLC y SMasa de α -toxina estuvieran presumiblemente ubicadas en el mismo sitio catalítico, PLC mostró un pH óptimo a 5-6, mientras que SMasa tuvo su pH óptimo en ≈ 7 [237]. Así, las actividades hidrolíticas combinadas de α -toxina podrían operar de manera óptima en el rango de pH 5-7. Esto puede estar relacionado con el papel esencial observado de α -toxina de *C. perfringens* para sobrevivir intracelularmente cuando la bacteria es fagocitada por los macrófagos [240]. Un pH óptimo ácido (alrededor de pH 5, el pH lisosomal) podría explicar el papel de la toxina para ayudar a la bacteria a escapar del fagosoma. La capacidad de la toxina para hidrolizar también lípidos a pH 7 podría ser utilizada extracelularmente, o en el citoplasma, donde la bacteria puede permanecer durante periodos prolongados hasta que aparezcan las condiciones adecuadas para la infección.

Un problema interesante que no había recibido suficiente atención anteriormente era cómo la presencia de lípidos que no fueran PC o SM, es decir, lípidos no-sustrato, influiría en las actividades de la α -toxina, y si las actividades de PLC y SMasa se modificarían (o no) en paralelo. Nagahama *et al.* [241] habían observado que el colesterol incrementaba la unión de la α -toxina a liposomas compuestos de PC. En estudios posteriores [242] esos autores describieron la exigencia de cadenas de ácidos grasos insaturados para que el dominio C se inserte en la bicapa. Urbina *et al.* [243] analizaron los efectos de una variedad de lípidos, distintos de PC o SM, para las actividades hidrolíticas PLC y SMasa de α -toxina. Fueron capaces de detectar una correlación entre la curvatura intrínseca de las actividades de lípidos no sustrato y la actividad lipasa de la toxina: los lípidos con curvatura intrínseca negativa, por ejemplo PE, mejoran ambas actividades. A la inversa, los lisofosfolípidos, que presentan una curvatura intrínseca positiva, inhibieron las actividades lipasa de la toxina. Los fosfolípidos con una carga negativa no ejercieron ningún efecto importante sobre la actividad de la lipasa, y la misma falta de efecto se observó cuando el lípido lisosomal bis(monoacylglycero)fosfato fue incorporado a las bicapas [243]. Nótese, sin embargo, que en un estudio más reciente [244] se comprobó que, en contra de la opinión predominante, la α -toxina de *C. perfringens* fue capaz de escindir fosfolípidos distintos de PC o SM, por ejemplo PE, PG o PI, por lo que algunos resultados de Urbina *et al.* [243] tendrán que ser, por lo menos, cuantitativamente reinterpretados (véase más adelante).

Flores-Díaz *et al.* [245] habían demostrado que los gangliósidos, en particular aquellos que son ricos en ácido siálico, ejercen un efecto protector en cultivos celulares contra el ataque de α -toxina. Esto está de acuerdo con los estudios anteriores sobre monocapas de lípidos realizados

por Bianco *et al.* [246]. Urbina *et al.* [243] encontraron que el gangliósido trisiálico GT1b tenía un claro efecto inhibitor inclusive a concentraciones de 1 mol %, mientras que el monosialico GM3 fue prácticamente ineficaz incluso cuando fue incorporado a 6 mol % en vesículas.

Urbina *et al.* [243], además, hicieron la observación de que el cambio de tamaño de la vesícula, es decir, la curvatura, tuvo un efecto diferente en las actividades PLC y SMasa de α -toxina. PLC aumentó con vesículas más grandes (curvatura más pequeña) mientras SMasa disminuyó en las mismas condiciones. Esto, junto con la observación anterior de diferentes pH óptimos [237] llevó a estos autores a proponer que la actividad lipasa de α -toxina tiene distintos sitios activos, pero parcialmente superpuestos y con interacciones entre sí [243].

En su más reciente contribución Urbina *et al.* [244] habían desafiado la opinión predominante de que la α -toxina de *C. perfringens* podría hidrolizar sólo PC y SM. Se realizaron estudios de acoplamiento (“docking”) molecular sobre la base de la presunta semejanza estructural de la α -toxina y los sitios activos de PC-PLC en *B. cereus*, siendo la estructura de esta último conocida [247], [248]. Los residuos implicados en el sitio activo, aparte de un cambio de Glu a Asp parecen estar conservados de PLC de *Bacillus* a α -toxina [249]. Además, ambas proteínas presentan una similitud en el plegamiento global, y comparten un 29% de identidad en secuencia (Fig. 6). Así, la estructura cristalina publicada del sitio activo de PC-PLC de *B. cereus* fue utilizada como modelo para los experimentos de “docking” en α -toxina. Urbina *et al.* [244] encontraron que, además de PC y SM, otros fosfolípidos por ejemplo, PE, PI, y, en menor medida, PG, eran también ligandos de la α -toxina. Sobre la base de estas predicciones, se realizaron estudios experimentales en los que se demostró que la α -toxina degrada todos los fosfolípidos mencionados anteriormente [244]. Esto hará necesaria una reevaluación de las actividades enzimáticas reportadas en [243], medidas en presencia de fosfolípidos que se creía anteriormente no ser sustratos. A pesar de ello, aparte de los aspectos cuantitativos las principales conclusiones sobre ciertos lípidos que activan la actividad de la lipasa mientras otros inhiben, o se comportan simplemente neutrales, siguen siendo plenamente válidas.

En sus trabajos anteriores [237], [243] estos autores habían encontrado que las actividades PLC y SMasa de α -toxina, si bien se encuentran obviamente localizadas en la misma proteína, eran lo suficientemente diferentes (velocidades máximas, pH óptimo, efectos de los inhibidores/activadores) para sugerir que α -toxina contendría dos sitios activos, uno para PLC y uno para SMasa, que se encontrarían parcialmente superpuestos en la misma región de la proteína. De hecho, los experimentos de “docking” [244] predicen un patrón diferente de unión para moléculas que contienen ceramida, por ejemplo SM, que para glicerofosfátidos, por ejemplo PC, lo que implica en el primer caso la ausencia de la participación de residuo Y57 para la interacción con la cabeza de grupo polar. La Y57 de α -toxina (correspondiente a PC-PLC Y56 de *B. cereus*) es un residuo importante en el sitio activo que interactúa con el resto de colina del sustrato. La falta de predicción de la participación de Y57 en la interacción con SM podría proporcionar una explicación simple y comprobable para los resultados observados, es decir, un solo sitio activo al que SM y PC se unen de una manera ligeramente diferente; PC se uniría de manera más eficiente siendo hidrolizada así a velocidades mayores.

Otra posible explicación para una clara preferencia por PC (la razón de k_{cat} con respecto a SM es 5 veces mayor, Urbina *et al.* [237]), podría surgir de la mayor propensión de SM, en comparación con PC, para establecer uniones hidrógeno con otros componentes de la membrana [250], que pueden impedir la extracción fácil de sustrato de la membrana por α -toxina. Sin embargo, otro factor que debe ser considerado al respecto es el dominio C-terminal de α -toxina, que está ausente en PC-PLC de *B. cereus*. La eliminación de este dominio reduce, pero no elimina, la actividad SMasa [159], [251]. Este dominio adicional similar a los dominios de unión de fosfolípidos C2 en eucariotas, podría permitir que la proteína permanezca en la membrana durante más largo tiempo, lo que favorecería la extracción de SM de la bicapa.

Fosfolipasa de Listeria monocytogenes. *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo de seres humanos y animales. La bacteria es internalizada por los macrófagos pero en una proporción significativa de los casos se escapa de la vacuola primaria para crecer y propagarse de célula a célula. La transmisión entre células se produce a través de estructuras de tipo pseudópodos, que contienen una bacteria en su punta y que son internalizadas por células huésped vecinas. En esta etapa, las bacterias se encuentran en las vacuolas de doble membrana, a partir de las cuales se escapan de nuevo para continuar la propagación. Smith *et al.* [252] mostraron que "una PLC de amplio espectro" producida por la bacteria era un agente importante en el proceso de escape.

Esta última enzima es el producto del gen *plcB* de *L. monocytogenes*, una proteína de 29 kDa con actividades PLC y SMasa [253], [254]. El producto del gen *plcB*, LmPLC, se secreta como una proenzima inactiva y es activada por proteólisis [255]. Cuando se ensayó en micelas mixtas de detergentes-fosfolípidos, LmPLC era activa en una variedad de glicerofosfolípidos y, en menor medida, en SM en micelas mixtas con detergente [256].

Montes *et al.* [257] caracterizaron la actividad catalítica de LmPLC en bicapas lipídicas libres de detergentes en la forma de vesículas extruidas unilamelares. Para ello desarrollaron un procedimiento de purificación mejorado que dio una LmPLC libre de su contaminante frecuente, listeriolisina, el cual se inserta en las membranas y forma poros y podría afectar la actividad LmPLC. La enzima fue más activa en un medio rico en K^+ que en uno rico en Na^+ , de acuerdo con su sitio de acción intracelular. Se observó un pequeño efecto activador de 1-2 mM Mg^{2+} . La influencia de la composición de bicapa lipídica sobre la actividad de la hidrolasa LmPLC fue probada con una variedad de mezclas compuestas de PC, PE, PS, SM y colesterol en diferentes proporciones [257]. Las actividades más elevadas se encontraron con mezclas enriquecidas en PE y PS. Esto es interesante porque, cuando la bacteria está contenida dentro de la vacuola de doble membrana en la situación *in vivo*, la monocapa más cercana a la bacteria es la monocapa citoplasmática de la membrana plasmática de la célula, que se espera que esté enriquecida en PS y PE.

Además de las mezclas que contienen PS, la comparación de las actividades de hidrólisis en bicapas de PC:Chol (2:1 relación molar) y SM:Chol (2:1 relación molar) indicaron que la enzima fue aproximadamente dos veces más activa en PC que en SM, aunque ambos lípidos eran sustratos [257]. Esto confirmó las observaciones previas realizadas en presencia de detergentes [256]. Se observaron actividades hidrolíticas más altas en mezclas PC:PE:Chol (2:1:1 relación molar), tal

como se encontró para la PLC de *B. cereus* [170]. Sin embargo, en oposición con la enzima de *Bacillus*, que tiene una actividad muy baja en la mezcla equimolar de PC:SM:PE:Chol [183], [258], PLC fue altamente activa en esa composición cuaternaria. Nótese que la última mezcla contenía los cuatro lípidos más abundantes en las membranas celulares de mamíferos. Además, Montes *et al.* [257], midieron por separado la hidrólisis a lo largo del tiempo de los tres fosfolípidos en la mezcla cuaternaria, y encontraron que las velocidades de hidrólisis son muy similares para los tres. Esto es interesante porque, como se mencionó anteriormente, PC fue mejor sustrato que SM cuando estos fosfolípidos se ensayaron individualmente.

Se había encontrado que LmPLC requiere Zn^{2+} para su actividad catalítica al igual que otras enzimas relacionadas, por ejemplo PLC de *B. cereus* [259]. LmPLC fue activada por Zn^{2+} 0.1 mM cuando se probó en micelas mixtas de fosfolípidos y detergente [256], sin embargo cuando el sustrato estaba en la forma de bicapas Zn^{2+} 0.1 mM no condujo a la activación de la enzima [257]. A diferencia de PLC de *B. cereus*, que está completamente inhibida por el quelante de Zn^{2+} *o*-fenantrolina, LmPLC mantuvo una fracción importante de su actividad incluso después de una preincubación de 10 min con *o*-fenantrolina 2 mM. Esto sería consistente ya sea con una unión muy firme del ion Zn^{2+} en la estructura de la enzima o con unión de Zn^{2+} a una región aislada del medio acuoso. Curiosamente *o*-fenantrolina fue mucho más activa cuando se añadió un par de minutos después del inicio de la actividad enzimática [257], lo que sugiere que la unión al sustrato cambia la conformación de la enzima de tal manera que Zn^{2+} luego se hace más accesible para el inhibidor soluble en agua.

Toxina PlcHR₂ de Pseudomonas aeruginosa. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista Gram negativo que es responsable de complicaciones de enfermedades y muerte en pacientes inmunodeprimidos (por ejemplo, en quimioterapia) y en fibrosis quística [260]. *P. aeruginosa* secreta una variedad de toxinas durante la infección, entre las cuales al menos cuatro son PLCs [261]. De éstas, PlcA y PlcB pertenecen a la misma familia que PC-PLC de *B. cereus*. Las otras dos, PlcH y PlcN (hemolítica y no hemolítica respectivamente) pertenecen a una nueva familia de PLCs [262]. Se ha demostrado que PlcH es un factor de virulencia en una amplia variedad de organismos, mamíferos, insectos, levaduras y plantas [263], [264].

Vasil *et al.* [265] han caracterizado en detalle PlcHR₂ de *P. aeruginosa* como un complejo heterodimérico, formado por PlcH, la subunidad que contiene el centro activo, y PlcR₂, una chaperona que modula la actividad de la enzima que se requiere para la secreción de PlcH. PlcHR₂ (95.5 kDa) es el miembro paradigmático de una nueva superfamilia de PLC/fosfatasa, con miembros en varios procariotas (*Mycobacterium*, *Bordetella*), hongos (*Aspergillus*) y plantas (*Arabidopsis*). PlcH exhibe similitudes estructurales y funcionales con fosfatasa ácida, por lo tanto esta superfamilia hidroliza tanto enlaces fosfomonoéster como fosfodiéster. PlcHR₂ es igualmente activa en PC y en SM cuando estos lípidos se encuentran en forma monomérica, o en micelas mixtas con detergentes [265]. Se ha descubierto además que PlcH tiene una actividad SM-sintasa (transferasa) [266], que hace por tanto a PlcH una enzima multifuncional. El gen PlcH sería el primer gen estructural descrito para una SM-sintasa.

Montes *et al.* [267] describieron la actividad hidrolítica de PlcHR₂ en vesículas de composición lipídica definida. Se determinó fosfato soluble en agua, proveniente de fosforilcolina libre, a

diferentes tiempos después de la adición de la enzima. Para bicapas compuestas de SM:PC:PE:Chol (1:1:1:1 relación molar) la adición de la enzima condujo a un período de latencia de 0.5-0.8 min, luego la hidrólisis procedió linealmente durante al menos 5 min, durante la cual se escindió el 30-40% del sustrato (PC+SM). La actividad de la enzima en condiciones basales (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.2) fue de $\approx 12 \mu\text{mol}/\text{min} \times \mu\text{g}$ de proteína. La adición de Ca^{2+} o EGTA no modificó significativamente este valor, pero 1 mM Ni^{2+} causó una inhibición significativa, de acuerdo con observaciones anteriores en sustratos monoméricos [265].

Cuando el sustrato estuvo constituido por LUVs compuestos de PC:PE:Chol (2:1:1 relación molar), o de PC:PE:Chol:SM:gangliósido (12:3:17:10:1 relación molar), este último para representar la hemicapa externa de la membrana de glóbulos rojos, la actividad hidrolítica fue similar en ambos casos. Vesículas de SM:PC:PE:Chol (1:1:1:1 relación molar) fueron tratadas con la enzima en ausencia o presencia de 5 mM de Ca^{2+} ; se retiraron alícuotas de la mezcla de reacción a intervalos regulares de 10 min y los componentes lipídicos individuales fueron cuantificados por cromatografía de capa delgada. Se encontró que (i) PC y SM fueron degradadas a velocidades similares, (ii) PE no fue hidrolizada y (iii) Ca^{2+} no influyó en las velocidades de degradación de fosfolípidos individuales [267]. Se verá más adelante que la segunda de estas conclusiones no fue completamente correcta.

PlcHR₂ de *P. aeruginosa* es un claro ejemplo de una lipasa cuyos productos finales lipídicos, DAG y ceramida, modifican a su vez la actividad de la enzima. Este estudio fue abordado por Ibarguren *et al.* [268], quienes ensayaron PlcHR₂ en bicapas compuestas de PC:SM:PE:Chol en proporciones equimolares, como habían hecho Montes *et al.* [267], pero que contenían además DAG y/o ceramida en su composición inicial. Ibarguren *et al.* [268] midieron la unión de PlcHR₂ a bicapas con las composiciones que acabamos de mencionar en estado estacionario y a lo largo del tiempo. Encontraron que la enzima se une al lípido mucho más rápido y con una afinidad mayor cuando 5-10 mol% de DAG y/o Cer estaban presentes en la bicapa. Al mismo tiempo la presencia de los productos finales lipídicos en la bicapa disminuyó el período de latencia de la enzima en un orden de magnitud. Estas observaciones están de acuerdo con estudios previos sobre los períodos de latencia de otras PLCs bacterianas (véase Sección *Períodos de latencia en la actividad de PLC*) [172], [207].

En el estudio de Ibarguren *et al.* [268] los ensayos cuantitativos de PlcHR₂ revelaron que la ceramida, pero no DAG, inhibía la actividad enzimática. La interpretación de los autores fue que, más allá de su papel como inhibidores por producto final, ceramida y DAG tenían propiedades físicas opuestas que influyeron en la actividad enzimática. En presencia de SM, la ceramida se separa en los dominios rígidos de SM-ceramida [90], [146], por lo tanto, presumiblemente, una fracción del sustrato SM no está disponible para la enzima en presencia de ceramida desde el principio del ensayo, y esa fracción aumenta a medida que progresa la actividad SMasa. Por el contrario DAG se mezcla bien con los otros lípidos, incrementa la fluidez de membrana, y esto facilita la actividad enzimática y compensa la inhibición por producto final.

El mismo sistema fue puesto en una nueva perspectiva por Ibarguren *et al.* [210] cuando estos autores prepararon vesículas unilamelares gigantes (GUVs) con las composiciones usadas en su trabajo anterior, y las examinaron por microscopía de fluorescencia confocal. Los lípidos y la

enzima fueron marcados por separado con marcadores fluorescentes específicos (Fig. 13). Se hicieron algunas observaciones sorprendentes, que difícilmente podrían haber sido adivinadas por los ensayos espectrofotométricos convencionales en cubeta. Se encontró que, aunque la enzima difundía rápidamente en la cámara de observación, la unión (detectable) de la enzima parecía ser un proceso azaroso y lento, de manera que nuevas vesículas unidas a la enzima continuaban apareciendo durante varios minutos. La unión de enzimas a las vesículas parecía ser un proceso cooperativo. Después de que se detectase el grupo inicial de moléculas de enzima unida, la unión adicional y la actividad catalítica seguían rápidamente. Una vez que su actividad había comenzado la enzima no era liberada por lavados repetitivos, de acuerdo con un mecanismo de "scooting" para la actividad hidrolítica.

Mientras tanto Sot *et al.* [90], examinando el mismo sistema por microscopía confocal en ausencia de enzima, habían detectado en bicapas de PC: SM: PE: Chol la coexistencia de dominios líquido-ordenados y líquido-desordenados. En presencia de ceramida, dominios de tipo gel aparecían dentro de las regiones de líquido desordenado. DAG tenía el opuesto efecto, dando

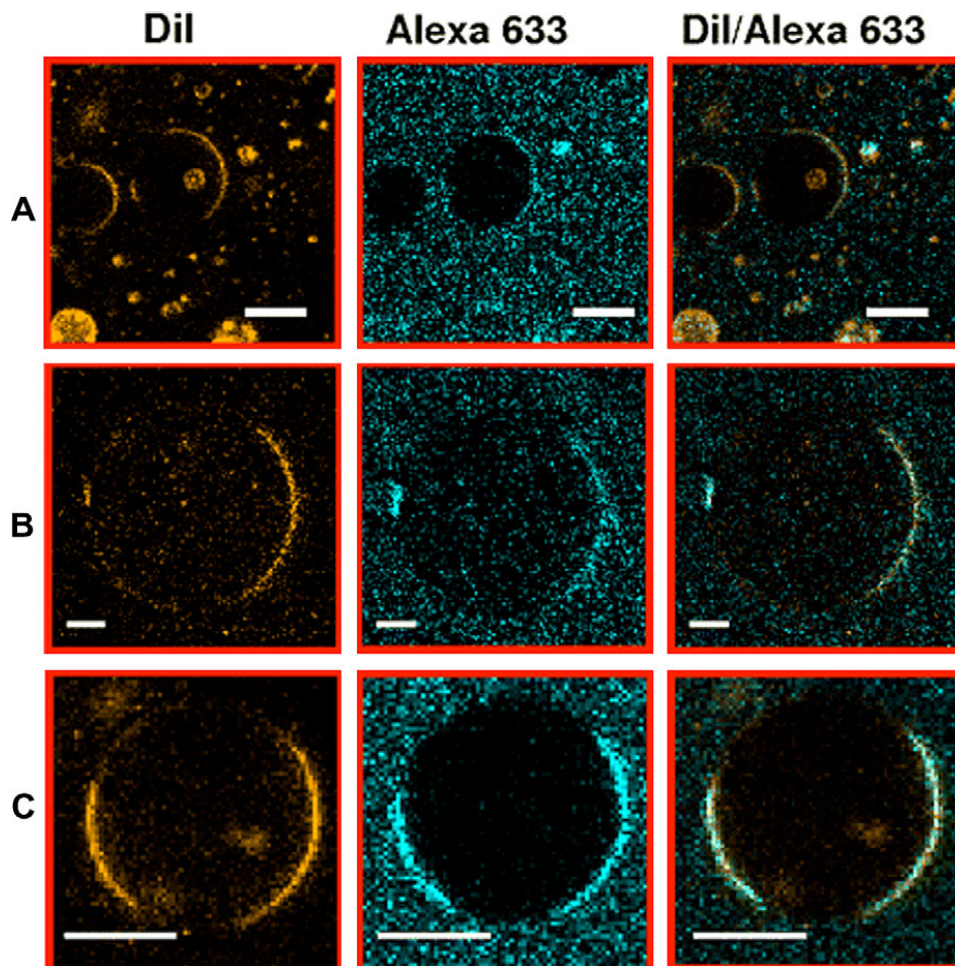


Fig. 13. Microscopia confocal de fluorescencia de GUV que muestra que PlcHR₂ se une preferentemente a dominios más desordenados. Composición lipídica: (A) control; (B) con 10% Cer; (C) con 5 mol% Cer más 5 mol% DAG. Los lípidos fueron teñidos con Dil (amarillo). La enzima fue derivatizada con Alexa 633 (pseudocolor azul). La columna a la derecha muestra las imágenes superpuestas de Dil y Alexa 633. Barra = 10 μ m [210].

lugar a bicapas líquidas homogéneas desordenadas. Cuando se añadió PlcHR₂ a estos sistemas se encontró que la enzima se unía preferentemente a los dominios más desordenados, y en la mayoría de los casos, causaba el desorden en los otros dominios [210].

López *et al.* [269] estudiaron PlcHR₂ desde un punto de vista diferente, a saber, su especificidad hacia sustratos. Observaciones previas habían demostrado que, al menos en las primeras etapas de hidrólisis de mezclas complejas, sólo PC y SM eran hidrolizados [265], [267]. Sin embargo, cuando la hidrólisis de los lípidos individuales se monitorizó en función del tiempo, se encontró que otros fosfolípidos también se degradaban, con un orden de preferencia PC>SM>CL>PE>PG. En estas mismas condiciones PS no era un sustrato. Particularmente útil en este contexto fue la aplicación de ³¹P NMR para estudiar la progresiva hidrólisis de cada clases de fosfolípidos [269]. Urbina *et al.* [244] habían hecho un descubrimiento similar de una especificidad de sustrato más amplia de lo esperada para α -toxina de *C. perfringens*.

Como se mencionó al principio de esta sección, PlcHR₂ de *P. aeruginosa* es un agente hemolítico importante. Este fenómeno puede ser analizado a la luz de los conocimientos actuales del comportamiento de fase de los lípidos, principalmente ceramida. Montes *et al.* [270] señalaron que la hemólisis de PlcHR₂ puede ocurrir de dos maneras y que cada una sigue un mecanismo diferente. Es decir, la hemólisis a temperatura constante (normalmente 37 °C), que consiste en la liberación gradual de la hemoglobina, o hemólisis en caliente-frío (preincubación a 37 °C, a continuación hemólisis cuando las células se transfieren a 4 °C), para la cual se proponen eventos de lisis de todo o nada.

La hemólisis de PlcH a temperatura constante fue estudiada por Okino e Ito [271], quienes también observaron que el fenómeno fue marcadamente aumentado por ceramidasa de *P. aeruginosa*. La ceramida, producida a partir de SM por la actividad SMasa de PlcH, fue parcialmente degradada a esfingosina por ceramidasa. La hemólisis gradual observada bajo esas condiciones está quizás relacionada con el fenómeno de liberación, inducida por la ceramida, de los contenidos celulares y vesiculares descritos anteriormente [150], [152]. La esfingosina, un producto final de la ceramidasa, es incluso más activa que la ceramida en el aumento de la permeabilidad de la bicapa [272] y esto probablemente explica la hemólisis aumentada causada por la ceramidasa.

Con respecto a la hemólisis caliente-fría inducida por PlcHR₂ [270] los autores observaron que lo que se requería para la hemólisis era la actividad SMasa de PlcHR₂ y no la de la PLC. Observaciones por microscopía de fluorescencia y calorimétricas indicaron la formación de dominios enriquecidos en ceramida a 37°C como resultado de la actividad PlcHR₂. Después de enfriar a 4°C, estos dominios se fusionaron en áreas rígidas mayores en la membrana. Montes *et al.* sugieren que la formación de tales dominios rígidos en la membrana celular originalmente flexibles convierten la membrana en frágil, por lo tanto muy susceptible a la hemólisis provocada por, por ejemplo, la simple tensión de cizallamiento de las células que difunden en el líquido.

Agregación de vesículas y fusión de membranas inducida por fosfolipasas C y esfingomielinasas

Esta sección está dedicada a un fenómeno específico causado, en ciertas condiciones, por PLC y esfingomielinasas, a saber, la agregación vesícula-vesícula y la fusión de membranas. La razón para hablar de esto por separado es que es un efecto muy inusual e interesante de las actividades enzimáticas, altamente influenciadas por lípidos no-sustrato, y que no se limita a un tipo específico de enzima. Para no desviarnos del marco de esta revisión limitamos nuestra discusión sobre la fusión para el papel que los lípidos, ya sea sustratos, no sustratos o productos finales, ejercen en la actividad enzimática y en los subsiguientes cambios en la arquitectura de la membrana. Otros aspectos, tales como los estudios ultraestructurales y morfológicos de fusión de vesículas, o las implicaciones fisiológicas, pueden verse en [273]. Para una opinión autorizada sobre los aspectos biofísicos de la fusión y el papel de los lípidos, véase Siegel [274].

Fusión Inducida por PC-PLC. Nieva *et al.* [170] encontraron que las vesículas unilamelares grandes (LUV) (100 nm de diámetro, obtenidas por extrusión, fosfatidilcolina (PC):fosfatidiletanolamina (PE):colesterol (Chol) 2:1:1 razón molar) tratadas con PLC, se fusionaban con la concomitante hidrólisis de muy pequeñas cantidades de fosfolípidos y sin liberación significativa del contenido de la vesícula. La fusión fue detectada como la mezcla de los contenidos de vesículas y de los lípidos de la bicapa. La señal de fusión (mezcla de contenidos vesiculares) no fue corregida para las fugas, ya que éstas fueron indetectables en la escala de tiempo de las observaciones. La fusión de las vesículas fue acompañada por un aumento concomitante de luz dispersada [170].

La influencia de la composición de la bicapa sobre los efectos fusogénicos de PLC fue examinada mediante la repetición de los experimentos anteriores utilizando liposomas que contenían proporciones variables de PC, PE y Chol. La concentración óptima de la enzima se determinó por separado en cada uno de los casos; experimentos preliminares mostraron que en nuestras condiciones, PC y PE fueron hidrolizados por PLC a velocidades similares. Se encontró que la composición de la bicapa era bastante crítica, y que, además de PC, tanto PE como Chol eran esenciales para que se produjese una fusión significativa con bajos niveles de hidrólisis de fosfolípidos [170].

También se estudió la fusión de vesículas unilaminares (SUV) sonicadas en presencia de PLC. Como era de esperar, estas vesículas fueron mejores sustratos que los LUV para la enzima; es decir, las velocidades iniciales de hidrólisis de lípidos fueron mucho mayores. En consecuencia, la fusión también se produjo en una etapa temprana, principalmente debido a un período de latencia más corto; sin embargo, la medida y las velocidades máximas de fusión fueron similares a las registradas con LUV [170]. Luk *et al.* [275] publicaron más tarde observaciones de la agregación inducida por PLC y la fusión de SUV de lecitina-colesterol que confirmaron nuestros resultados previos.

Así, PLC podría inducir la mezcla de lípidos de la bicapa cuando se añade a una suspensión de liposomas y, simultánea o inmediatamente después, la mezcla libre de fugas de los contenidos vesiculares. Se considera que estas dos observaciones conjuntas son un indicador de fusión liposoma-liposoma [276]. La medida de la fusión (> 50%) indicó que cada producto final de fusión se componía de más de dos de los liposomas originales [277]. No se observó ninguno de los fenómenos anteriores cuando la actividad de la enzima fue inhibida por *o*-fenantrolina; por lo tanto la fusión de vesículas se promovía específicamente por la actividad catalítica del PLC. Como

esta enzima escinde fosfolípidos liberando diacilglicerol, se podría suponer razonablemente que estos últimos fueron los responsables de los fenómenos observados. Este sistema de fusión fue reconocido [278] como el primer sistema modelo en el que la fusión fue inducida por un agente catalítico.

Modulación de la fusión por DAG y otros lípidos. Se obtuvo más información sobre los mecanismos moleculares implicados en la fusión de membrana promovida por fosfolipasa C mediante la preparación de liposomas que contienen, además de fosfolípidos y colesterol, pequeñas cantidades de DAG u otros lípidos tales como lisofosfatidilcolina (liso-PC) [173]. El proceso de fusión podría ser modificado mediante la sustitución de DAG por algunos de los fosfolípidos en la formulación inicial de liposomas. A 37°C, cuando DAG no estaba presente en el sustrato, la fusión comenzó ≈ 10 s después de la adición de la enzima, cuando la cantidad de DAG generada era ≈ 4 mol % del total de lípidos. La reacción procedió durante otros 20 s (hasta ≈ 15 mol % DAG), antes de que la inhibición por producto final se volviese evidente; el proceso continuó hasta que prácticamente el 100% de vesículas se mezclaron sin liberación de contenidos significativa, aunque a velocidades progresivamente decrecientes [173]. Cuando la composición inicial de liposomas fue modificada, de modo que 5 mol % del fosfolípido fue sustituido por DAG, el proceso de fusión se hizo más rápido y el tiempo de latencia después de la adición de la enzima se hizo más corto: 10 s después de la adición de la enzima el contenido de DAG total fue de 12 mol % y la velocidad de reacción ya era máxima. La saturación tuvo lugar ≈ 20 s después de la adición de la enzima, cuando DAG llegó hasta 20 mol % de los lípidos totales. Cuando en los liposomas sustrato se había sustituido 10 mol% del fosfolípido por DAG, la fusión comenzaba tan pronto como se añadía PLC, y el proceso alcanzaba la saturación después de 10 s, una vez que la cantidad total de DAG generado enzimáticamente fue de nuevo ≈ 10 mol %. Estos resultados parecen indicar que, a 37°C, la enzima cataliza la fusión eficiente de los liposomas que contienen PC:PE:Ch (2:1:1 relación molar) más DAG, cuando la proporción de este último está en el rango de 5-20 mol % de lípido total. A proporciones más altas de DAG, la fusión resulta inhibida por este producto final.

El proceso de fusión fue igualmente anulado cuando liso-PC fue incorporado en los liposomas a 10 mol % [173] o cuando la concentración Ca^{2+} fue reducida de 10 a 2 mM, mientras que la actividad hidrolítica de la enzima se mantuvo sin cambios. En estas muestras, la mezcla de contenido acuoso se produjo sólo a concentraciones DAG mayores que 30 mol %. Los lisofosfolípidos se han descrito como inhibidores de procesos de fusión viral muy diferentes de los descritos aquí [279].

Un análisis detallado de las velocidades de fusión que tenía en cuenta las diferentes preparaciones de liposomas en función de la temperatura demostró que la fusión variaba con la temperatura de una manera diferente de la actividad de la enzima o la agregación de vesículas (Fig. 14) [173]. Se observó una buena correlación, para todas las temperaturas, entre la agregación y la actividad enzimática para los liposomas que no contenían originalmente DAG; ambos fenómenos parecieron ser activados a ≈ 45 °C. Para liposomas que contienen DAG, la actividad de la enzima pareció ser mayor para todas las temperaturas, pero la dependencia de la temperatura fue, por otra parte, similar a los otros sustratos. Sin embargo, la agregación fue

mucho más eficiente en presencia de DAG que en su ausencia, especialmente a bajas temperaturas, lo que sugiere que DAG confirió algún grado de adherencia a las vesículas. La dependencia de la temperatura de la fusión de vesículas (medida como mezcla de sus contenidos) exhibe máximos cuyos valores absolutos fueron más altos, y se produjeron a temperaturas más bajas, cuanto mayor fue el contenido inicial del DAG. La presencia de liso-PC o bajas concentraciones de Ca^{2+} , inhibieron específicamente este proceso.

Además, en contraste con la agregación, la fusión no aumentó monótonamente con la temperatura, y cada composición de liposomas exhibió un patrón peculiar en función de la temperatura (Fig. 14). A bajas temperaturas, la fusión procedió a una velocidad baja, pero fue muy eficiente (valores de saturación cercanos al 100%); cuando la temperatura aumentó, la velocidad aumentó, pero el punto de saturación disminuyó. Finalmente, a las temperaturas mayores, ambos valores disminuyeron. Este efecto inhibitorio, a las temperaturas a las cuales tanto la actividad enzimática como la agregación de vesículas aumentaron, proporcionó el primer indicio de la existencia de un intermediario estructural cuya formación estaría influenciada tanto por la temperatura como por la concentración de DAG. El hecho de que la liso-PC también inhibiese el proceso de fusión rápida sugiere que el intermediario de fusión podría tener una estructura no lamelar [181].

Esta última idea ha recibido un considerable apoyo experimental de nuestros estudios espectroscópicos y de difracción de rayos X [238], [280] y ha sido reforzada aún más por su ajuste dentro de la llamada "hipótesis del tallo" ("stalk") de fusión de membranas [180], [274], [281]. Se propone que el tallo es una estructura lipídica semitoroidal con curvatura negativa (la convención seguida es que la curvatura de una monocapa en la fase hexagonal HII invertida es negativa) que permitiría

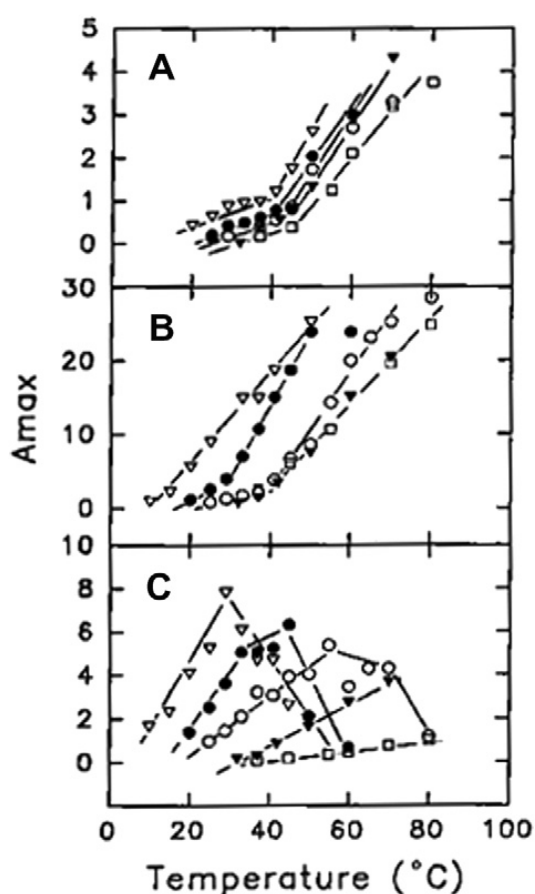


Fig 14. Actividades máximas (velocidad) en función de la temperatura de agregación de vesículas y fusión medidas tras la adición de PC-PLC. (A) velocidades máximas de actividad de fosfolipasa C, como porcentaje total de hidrólisis de lípido por segundo. (B) velocidades máximas de agregación de vesículas, como porcentaje total de cambio en dispersión de luz por segundo. (C) velocidades máximas de fusión de vesículas (mezcla de contenidos acuosos), como porcentaje total de cambio en intensidad de fluorescencia por segundo. Formulación de liposomas (relaciones molares) : (O) PC:PE:Chol (2:1:1); (●) PC:PE:Chol:DAG (17:23:25:5); (▽) PC:PE:Chol:DAG (43:22:25:10); (▼) PC:PE:Chol:liso-PC (43:22:25:10); (■) PC:PE:Chol (2:1:1) pero 2 mM Ca^{2+} [173].

la fusión de las hemicapas más cercanas (*cis*) de membranas yuxtapuestas [282]. Siegel y Epan [283] sugirieron que intermediarios TMC (contactos trans-monocapa) jugaban un papel en transiciones de fase lamelares a no lamelares y que podrían tanto romperse para formar poros de fusión que modulan las transiciones a fases cúbicas invertidas Q_{II} o bien ensamblarse en haces tubulares de fase hexagonal H_{II} invertida.

Los efectos de varios lípidos de cadena simple a bajas concentraciones fueron estudiados en la transición de fase lamelar a no lamelar de la mezcla PC:PE:Ch:DAG (50:25:25:5, relación molar) por polarización de fluorescencia y ^{31}P NMR [180]. Se observó una muy buena correlación entre la modificación de la temperatura de transición de fase y la actividad fusogénica. El escualeno y el ácido araquidónico, que se encontró que mejoran la mezcla de lípidos y contenidos, facilitaron la transición lamelar-isotrópica, y ocurrió lo contrario con el lípido con curvatura positiva liso-PC. El ácido araquídico fue prácticamente neutral, tanto con respecto a la fusión como a la transición de fase. Estos resultados están claramente de acuerdo con la hipótesis del tallo.

Combinando nuestros datos sobre la fusión inducida por fosfolipasa en función de la temperatura [173] con aquellos sobre el comportamiento de fase de nuestra mezclas lipídicas [280], hemos podido demostrar [180] que la agregación de vesículas y la mezcla de lípidos aumentó monótonamente con la temperatura, mientras que la mezcla de contenidos tuvo un máximo en la región de temperaturas correspondientes a la transición lamelar a no-lamelar (en nuestro caso cúbica), de acuerdo con las predicciones y observaciones mencionadas. Así, el "intermediario de fusión" estructural cuya existencia fue predicha a partir de nuestros estudios cinéticos [173] correspondió probablemente al tallo-TMC-poro.

Fusión inducida por SMasa y por mezclas de SMasa + PLC. Los estudios sobre los efectos estructurales de la esfingomielinasa en membranas lipídicas fueron probablemente iniciados por Ruiz-Arguello *et al.* [150], quienes compararon los efectos de DAG y ceramida, producidas por PLC y SMasa, respectivamente. Para ello, el sistema que originalmente consistía en PC:PE:Ch fue reemplazado por SM:PE:Ch, y se utilizó esfingomielinasa en lugar de la fosfolipasa C. El comportamiento de fase de mezclas de lípidos que contenían ceramidas o diacilglicerol fue también examinado comparativamente por ^{31}P NMR. Las vesículas que contenían SM:PE:Ch (2:1:1) cuando fueron tratadas con esfingomielinasa sufrieron una agregación rápida y fugas, pero sin mezcla de contenido o de lípidos [150]. Los resultados de ^{31}P NMR de Ruiz-Arguello *et al.* [150] mostraron que las bicapas de SM:PE:Ch eran perfectamente estables a 37 °C, incluso en presencia de la ceramida. La ausencia de fusión en esas condiciones apoyó el requisito de una cierta plasticidad en la mezcla de lípidos para que se produzca la fusión. Curiosamente, cuando las vesículas compuestas por SM:PE:Ch (2:1:1) fueron tratados con cantidades bajas de esfingomielinasa, de modo que la velocidad de hidrólisis de la esfingomielina se reducía considerablemente [284], en comparación con experimentos analizados anteriormente se encontró una situación en la que cerca de un tercio de las vesículas eran claramente más grandes en tamaño que las originales (cerca de 6 veces). Estas observaciones fueron confirmadas por Holopainen *et al.* [229], quienes también determinaron que, en contraste, LUVs que contenían ceramida (en los cuales la ceramida y los fosfolípidos habían sido mezclados en disolvente orgánico antes de la hidratación y extrusión) no mostraban ningún signo de agregación con un máximo de 24 h de incubación. Además, Holopainen *et al.* [285] mostraron imágenes

microscópicas de segregación "endocítica" en vesículas compuestas de fosfatidilcolina y esfingomielina tras la adición de la esfingomielinasa. Segregación y fusión son probablemente imágenes reflejo de procesos de fusión y pueden compartir el mismo tipo de intermediarios no lamelares. Holopainen *et al.* [285] atribuyeron la segregación observada a la tendencia de la ceramida a separarse en dominios, y a su curvatura espontánea negativa, la cual conduciría a la invaginación de la membrana.

También relevante es la observación hecha por Zha *et al.* [286] de que las vesículas endocíticas son formadas en ausencia de ATP cuando fibroblastos y macrófagos son tratados con SMasa exógena (o ceramidas). De acuerdo con estos autores, la adición de SMasa de *B. cereus* a células vaciadas de ATP induce la formación rápida de vesículas, cercanas a 400 nm de diámetro, no enriquecidas ni en clatrina ni en caveolinas, que se liberan desde la membrana plasmática y van al citosol. Especulan que la hidrólisis de esfingomielinas en la membrana plasmática causa una curvatura hacia el interior y una formación posterior de vesículas selladas, de acuerdo con los datos biofísicos [239], [273]. Además la entrada de *Neisseria gonorrhoeae* en células no fagocíticas es mediada por la activación de una esfingomielinasa ácida [287].

Se obtuvieron ideas adicionales sobre los respectivos efectos de la fosfolipasa C y esfingomielinasa en vesículas lipídicas puras de los estudios de [258] en los que se ensayaron ambas enzimas, ya por separado o en conjunto, en bicapas lipídicas que contenían PC y SM. Era sabido que la adición de la fosfolipasa C a una suspensión de vesículas LUV de PC:PE:Ch (2:1:1, relación molar) llevaba a una agregación liposomal rápida y fusión [170]. Sin embargo, cuando PC se sustituyó por una mezcla equimolar de PC y SM, de manera que la nueva composición liposomal era PC:SM:PE:Ch (1:1:1:1), la adición de la fosfolipasa C, en condiciones por lo demás similares, no produjo ni la fusión (mezcla de contenido) ni la mezcla de lípidos (Fig. 15A, B), incluso en una escala de tiempo que era un orden de magnitud mayor que la utilizada para PC-PLC [170]. La luz dispersada tampoco cambió en el experimento

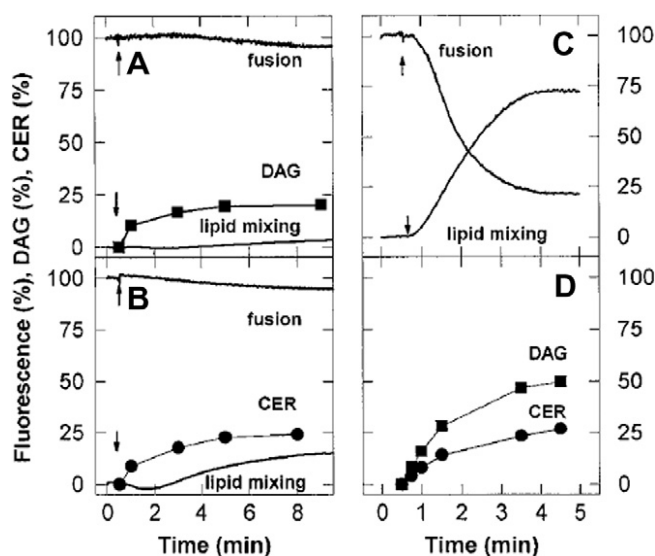


Fig. 15. Efectos de la fosfolipasa C y/o esfingomielinasa sobre vesículas unilamelares grandes. La composición de la bicapa fue 1:1:1:1, relación molar. La concentración total de lípidos fue 0.3 mM. (A) Fosfolipasa C, 1.6 unidades/ml; (B) esfingomielinasa, 1.6 unidades/ml; (C) y (D) Fosfolipasa C + esfingomielinasa, 0.4 unidades/ml de cada una; (■) diacilglicerol producido enzimáticamente, expresado como porcentaje molar del total de lípidos en la mezcla; (●) (B) y (D), ceramida. La línea continua marcada "fusión" corresponde a fluorescencia de ANTS y representa la mezcla de contenidos acuosos vesiculares. La línea continua marcada "mezcla lipídica" corresponde a la fluorescencia de octadecilrodamina e indica la mezcla de bicapas lipídicas vesiculares [170].

mostrado en la fig. 15A, que excluyó la agregación de vesículas bajo esas condiciones (no mostrado). Sin embargo, la hidrólisis de los lípidos había tenido lugar, y la cantidad de DAG producida en el experimento mostrado en la fig. 15A debería haber sido suficiente para producir la fusión de vesículas, al menos desde los datos obtenidos con la mezcla PC:PE:Ch [173].

Sorprendentemente, sin embargo, la adición conjunta de fosfolipasa y esfingomielinasa a vesículas de PC:SM:PE:Ch (1:1:1:1) produjo una agregación rápida de vesículas (mezcla de lípidos y contenidos, Fig. 15C). Cuando se añadieron las dos enzimas juntas sus actividades parecieron ser potenciadas mutuamente y la fosfolipasa C se volvió especialmente activa (Fig. 15D). Ninguno de los efectos mostrados en la Fig. 15C y D fueron vistos cuando las enzimas habían sido inactivadas previamente por calor o cuando la fosfolipasa C había sido preincubada con su inhibidor específico, *o*-fenantrolina. El comportamiento conjunto de la fosfolipasa C y la esfingomielinasa en los experimentos en Fig. 15 puede explicarse por el supuesto de que: (a) la velocidad de hidrólisis de glicerofosfolípido por fosfolipasa C que actúa sobre vesículas de PC:SM:PE:Ch (1:1:1:1) (Fig. 15A) es demasiado lenta para permitir una creación asimétrica y localizada de un conjunto de diacilglicerol que pueda actuar como iniciador de la fusión. Una alta concentración local de diacilglicerol en una de las monocapas sólo se puede crear en competencia con fenómenos de difusión lateral y transbicapa (flip-flop) [103]. (b) La esfingomielinasa actúa de la misma manera que en la mezcla ternaria SM:PE:Ch (1:1:1) [150] y, en consecuencia, no ocurre fusión. Sin embargo, se genera una proporción significativa de ceramida en las bicapas, facilitando así una eventual transición lamelar-no lamelar. (c) Cuando ambas enzimas están actuando en conjunto, la velocidad de generación de ceramida y particularmente de diacilglicerol es lo suficientemente alta para superar la difusión, y se produce la fusión de vesículas (Fig. 15C y D). Estos puntos fueron confirmados experimentalmente por Ruiz-Arguello *et al.* [258].

Los estudios a nivel celular realizados por Utermohlen *et al.* [288] apoyan la importancia biológica de los datos anteriores obtenidos en membranas liposomales. Estos autores encontraron que la SMasa ácida (Tabla 2), una enzima que expresada en casi todos los tipos de células de mamíferos y situada en la monocapa interna de endo-, fago-, y lisosomas y en la monocapa externa de la membrana plasmática, aumenta la fusogenicidad de las membranas celulares a nivel inter- e intracelular, a través de la generación de ceramida. Estudios de tres sistemas de infección independientes mostraron que la SMasa ácida es necesaria para la fusión fago-lisosomal en macrófagos infectados con *L. monocytogenes*; para la exocitosis de lisosomas secretores por células T, citotóxicos específicos del virus de coriomeningitis linfocítica, y para la generación de células gigantes multinucleadas en granuloma de los ratones infectados con *Mycobacterium arium*. La SMasa ácida no era, en opinión de Utermohlen *et al.*, fundamental para la generación del poro de fusión de por sí, pero en cambio, contribuiría a la ampliación del poro inicial. Esto podría estar de acuerdo con las capacidades apenas fusogénicas de la SMasa de *B. cereus* en vesículas lipídicas (véanse los párrafos anteriores). La SMasa ácida regularía ciertos procesos de fusión a través de los cambios inducidos por la ceramida en la estructura de la membrana. Además Utermohlen *et al.* [288] sugieren que la SMasa ácida podría ser una de las enzimas que ayudan en los procesos de fusión dependientes de SNARE.

Fusión inducida por PLC/SMasas. La observación de que una mezcla de PC-PLC de *B. cereus* + esfingomielinasa indujo fusión de vesículas que no habían experimentado fusión después del

tratamiento con cualquiera de las dos enzimas por separado, sugirió la comprobación de algunas de las toxinas bacterianas que se conocía que poseen ambas actividades enzimáticas en mezclas de, por ejemplo, PC:PE:SM:Chol. Montes *et al.* [257] estudiaron los efectos de fosfolipasa C/esfingomielinasa (LmPLC) de *Listeria monocytogenes* en vesículas grandes unilamelares con la composición lipídica antes mencionada. Ellos observaron que la hidrólisis de lípidos fue acompañada por importantes cambios en la estructura de las vesículas de fosfolípidos, a saber, agregación vesicular, mezcla de lípidos intervesicular, y la mezcla de contenido acuoso con una escasa fuga de los contenidos vesiculares. Además, Montes *et al.* [257] desarrollaron un procedimiento novedoso para ensayar la mezcla de lípidos intervesicular de la monocapa lipídica interna y demostraron que este fenómeno también fue inducido por LmPLC. Los datos en general fueron interpretados como indicativos de que LmPLC era capaz de inducir la fusión de vesículas. Estos resultados pueden ser entendidos a la luz de los estudios previos de Ruiz-Arguello *et al.* [258]. Según lo sugerido por Zuckert *et al.* [289], LmPLC tiene propiedades intermedias entre las de PC-PLC y las de SMasa de *B. cereus*. El comportamiento de LmPLC se asemeja más al de la mezcla PC-PLC + SMasa de *B. cereus* que al de cualquiera de los componentes.

La observación de la fusión de membranas inducida por LmPLC hecha por Montes *et al.* [257] sugiere un mecanismo para la propagación de la bacteria célula a célula, lo que requiere la ruptura de una vacuola de doble membrana. Los mismos autores observaron que, cuando la bacteria está contenida dentro de la vacuola de doble membrana en la situación *in vivo*, la monocapa más cercana a la bacteria es la monocapa interna citoplasmática de la membrana plasmática de la célula, que se espera que sea rica en PE y PS. Por consiguiente, se realizaron experimentos en LUVs compuestos de PC:PE:PS (2:5:3 relación molar) o PC:PE:PS:Chol (2: 5:3:2.5 relación molar). La principal diferencia entre estas vesículas enriquecidas en PS, PE y aquellas enriquecidas en PC, SM descritas antes fue que las velocidades enzimáticas fueron mucho mayores, alrededor de un orden de magnitud, en las LUV que representan la monocapa citoplasmática. También se produjo agregación de vesículas y la mezcla de lípidos intervesicular a una velocidad mayor que con las vesículas que contienen SM, y el conjunto de eventos de fusión se produjo sin fugas [257]. Así LmPLC parece haber evolucionado para funcionar en las membranas principalmente desde el interior de la célula.

PlcHR₂ de *P. aeruginosa* es otra importante PLC/SMasa que se ha utilizado en ensayos de fusión de membrana. La actividad catalítica de la enzima fue capaz de inducir la fusión de vesículas, demostrada por la observación concomitante de la mezcla total de lípidos intervesicular, la mezcla de monocapa lipídica interna y la mezcla de contenido acuoso. No se detectaron fugas del contenido vesicular en estas condiciones. La presencia de PS en la composición de la vesícula no modificó significativamente la agregación de vesículas inducida por PlcHR₂, siempre y cuando Ca²⁺ estuviera presente, pero anuló completamente la fusión, incluso en presencia del catión. La fusión parece ocurrir a través de la formación de un intermediario transitorio no lamelar, el "tallo", cuya estructura se asemeja al de las fases cúbicas invertidas. Debido a su carga negativa y moléculas de agua circundantes, PS es poco probable que permita la formación de fases invertidas, por lo tanto la falta de fusión en presencia de este fosfolípido cargado [267] no es un resultado sorprendente, sino que hace hincapié en la excepcionalidad de la alta actividad de fusión de LmPLC en presencia de PS [257].

En otra serie de estudios, Ibarguren *et al.* [268] examinaron los efectos de dos productos lipídicos

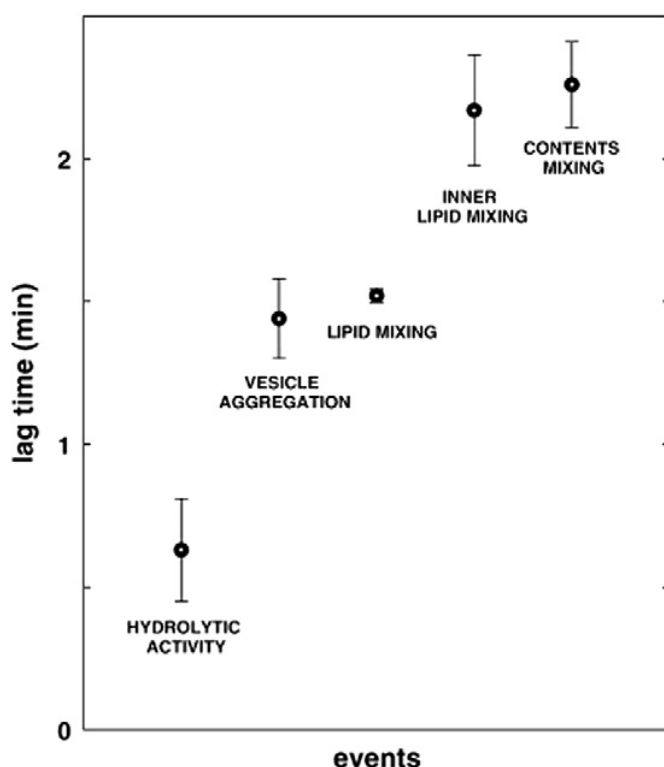


Fig. 16. Períodos de latencia de varios eventos causados por PlcHR2 sobre LUV compuestos por PC:SM:PE:Chol (1:1:1:1 relación molar). Tiempos de latencia medidos desde la adición de la enzima. Valores promedios $\pm$ S.D. (n=3) [267].

finales de PLC/SMasa de *P. aeruginosa*, a saber, DAG y ceramida, sobre la fusión de membrana vesicular promovida por la enzima. Se encontró que DAG incrementa la agregación y fusión de vesículas inducida por PLC/SMasa, mientras que la ceramida tuvo un efecto inhibidor neutral. Los autores explicaron sus resultados en términos de las diferentes propiedades físicas de los dos lípidos. DAG aumenta la fluidez de la bicapa y disminuye la separación lateral de los lípidos, aumentando así la actividad hidrolítica de la enzima y la accesibilidad de sustrato a la enzima. Ceramida tiene el efecto opuesto sobre todo debido a su tendencia a secuestrar SM, un sustrato de la enzima, en dominios rígidos presumiblemente menos accesibles a la enzima. Por otra

parte, la activación de la fusión por DAG está probablemente relacionada con la capacidad de DAG para inducir fases no lamelares cuya estructura invertida es reproducida en el intermediario de fusión, "tallo" [268].

Montes *et al.* [267] prestaron atención a los tiempos de latencia de los distintos acontecimientos desencadenados por la enzima: la hidrólisis de lípidos, la agregación de vesículas, la mezcla de lípidos, la mezcla de lípidos de monocapa interna, y la mezcla de contenidos. Observaron que los tiempos de latencia correspondientes aumentan progresivamente, dando lugar a una aparente secuencia de eventos que a su vez puede ser informativa del proceso general de los cambios estructurales causados por PlcHR₂. Estos tiempos de latencia son representados en la Fig. 16. Los tiempos aumentan en el orden: hidrólisis de PC < agregación de vesículas < mezcla de lípidos < mezcla interna de lípido < mezcla de contenidos. Esta es exactamente la secuencia de eventos que conducen a la fusión celular o vesicular, según lo propuesto por una variedad de autores [290]–[292].

Por lo tanto parece como si, una vez que completada una fase determinada, el sistema quedara preparado para el siguiente paso. Todo el proceso es impulsado por la actividad hidrolítica de la enzima y DAG, o ceramida, o ambos, han sido considerados responsables de las diversas etapas

[173], [239], [273], [280]. En general, los tiempos de latencia más largos significan concentraciones más altas de DAG/ceramida en las bicapas. Es ilustrativo a este respecto observar los datos recogidos en la Tabla 3 para una variedad de fosfolipasas C o esfingomielinasas fusogénicas. Las concentraciones de DAG/ceramida requeridas para la fusión (mezcla de lípidos) son invariablemente superiores a las encontradas en el inicio de la agregación. Por lo tanto la progresión de los tiempos de latencia y las mediciones de lípidos fusogénicos (DAG y/o ceramida) en el inicio de las distintas etapas, coinciden en subrayar el papel de DAG y/o ceramida como los agentes responsables de los cambios estructurales observados en membranas en el que estos lípidos se están generando.

Tabla 3. Comparación de varias fosfohidrolasas fosfolipídicas y sus efectos sobre bicapas de lípidos [267]

Enzima	Composición de la bicapa (relación molar)	^a DAG/Cer (mol%) al inicio de		Referencias
		Agregación	Fusión	
PC-PLC <i>B. cereus</i>	PC:PE:Ch (2:1:1)	1.8	4.0	[170]
SMasa <i>B. cereus</i>	SM:PE:Ch (2:1:1)	2.8	n.o. ^b	[150]
PI-PLC <i>B. cereus</i>	PI:PE:Ch (1:2:1)	3.3	4.4	[192]
PLC/SMasa <i>L. monocytogenes</i>	PC:SM:PE:Ch (1:1:1:1)	3.3	16.3	[257]
PlcHR ₂ <i>P. aeruginosa</i>	PC:SM:PE:Ch (1:1:1:1)	4.7	7.0	[267]

^a El porcentaje de DAG (o ceramida, o DAG + ceramida, requerido por cada enzima) en las vesículas al comienzo de los eventos indicados fue medido experimentalmente para PlcHR₂, y calculado de datos publicados en los otros casos. En este contexto, la fusión fue ensayada como mezcla de lípidos intervesiculares.

^b n.o. = no observado

Fusión inducida por PI-PLC. Un sistema modelo adicional para la fusión de la membrana fue desarrollado por Villar [192], en el que las vesículas que contienen PI, PC, PE y colesterol experimentaron agregación y fusión como resultado de la actividad catalítica de PI-PLC bacteriana. A diferencia del caso de liposomas zwitteriónicos fusionados por PC-PLC, las vesículas que contienen PI cargadas negativamente se agregaron y fusionaron en grupos de sólo 2-3 vesículas, y la fusión fue acompañada por fuga de los contenidos acuosos vesiculares. En experimentos en los que el PC:PE: Chol fue mantenido en una relación molar constante de 2:1:1, pero PI varió entre 5 y 40 mol % en la composición del liposoma, la diferencia en la concentración de PI dio lugar a diferentes efectos físicos de la PI-PLC. Curiosamente, 30-40 mol % PI llevó a la fusión vesicular, mientras que con 5-10 mol % PI sólo se detectó hemifusión, es decir, la mezcla de lípidos de la monocapa externa sin mezcla del contenido acuoso. La obtención de estos intermediarios estables de hemifusión sería sin lugar a duda útil en los estudios experimentales sobre el mecanismo de fusión de las bicapas. Se observó, además, que, cuando se incluyó 10 mol % DAG en las formulaciones de bicapa, la actividad PI-PLC llevó a producir fusión incluso con concentraciones tan bajas de PI como 5 mol %.

Por otra parte, Larijani *et al.* han demostrado el papel de PI-PLC eucariota en la fusión de la membrana nuclear [293]. Estos autores aislaron una fracción de vesículas de membrana citoplasmática de ovocitos fertilizados de erizo de mar que era esencial para la fusión de membrana que conduce a la formación de la envoltura nuclear. Esta población de vesículas era inusual en su composición (> 50% fosfoinosítidos), y en que estaban enriquecidas > 100 veces en PLC γ [294], [295]. Los polifosfoinosítidos parecen actuar como "fluidificantes" de membrana [296]. Mediante el uso de extractos de células libres de ovocitos para ensamblar envolturas nucleares a través de la fusión de pequeñas poblaciones de vesículas, Byrne *et al.* [297] mostraron que los eventos tempranos de la señalización involucraron la activación de una tirosina quinasa, la cual, a su vez activó PLC γ en fracciones de vesícula enriquecidas en PLC γ y PI [294]. La generación de DAG que da lugar a esas vesículas facilitó la fusión con las membranas del retículo endoplasmático que contribuyen en la mayor parte a la envoltura nuclear [298], [299]. Los mismos autores, utilizando una combinación de técnicas espectroscópicas, de imagen y bioquímicas, han demostrado, además, que el montaje de la envoltura nuclear surge de dos sitios únicos donde estas vesículas enriquecidas en PI se unen a la cromatina. Desde ellos se propagan bidireccionalmente eventos de fusión múltiple hasta que la cromatina está rodeada por la recientemente formada envoltura nuclear [293]. Estos estudios de Larijani *et al.* son interesantes porque, por un lado, proporcionan una correlación entre los mundos de señalización de membrana y la fusión de la misma [53]. Por otro lado, constituyen una elegante demostración del papel *in vivo* de PLC y DAG en la fusión, el cual había sido propuesto por experimentos *in vitro* [239], [273].

4. CONCLUSIÓN

Hasta aquí un resumen, obligadamente denso a fuer de sucinto, de mis principales líneas de investigación en las dos últimas décadas. Para terminar, una breve reflexión sobre el papel de la bioquímica y la biología molecular en la medicina. Todos estamos de acuerdo, probablemente, en que la medicina actual no sería lo que es si no se hubieran producido los descubrimientos de la estructura del DNA, de los antibióticos, o de la resonancia magnética nuclear. Ahora bien, ni Watson y Crick podían soñar con las aplicaciones médicas y médico-legales de su modelo, ni Fleming estaba buscando nuevas herramientas terapéuticas, ni se pasó por la cabeza de Bloch y Purcell que la resonancia magnética fuera algo más que un fenómeno físico de interés. No podemos dejar de insistir en esto: no hay ciencia básica y ciencia aplicada, sino buena ciencia y mala ciencia, o, como alguien ha dicho, hay ciencia aplicada y ciencia que aún espera a ser aplicada. Muestran una total ceguera y una ignorancia crasa quienes deciden financiar ciencia aplicada, a la medicina o a lo que sea. Como indican los ejemplos anteriores, y decenas más que están en la mente de todos, debemos hacer la mejor ciencia posible, y luego vendrán las aplicaciones.

En 1761 Giambattista Morgagni publicaba su "*De sedibus et causis morborum, per anatomen indagatis*", inaugurando así la anatomía patológica, que ha dado tantos frutos a la medicina. Dos siglos y medio más tarde estamos viendo ya los albores de una nueva época en la que las enfermedades serán diagnosticadas y tratadas no ya *per anatomen*, sino con las herramientas maravillosas que nos proporciona la biología molecular.

He dicho.

5. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. J. Singer and G. L. Nicolson, "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes," *Science*, vol. 175. pp. 720–731, 1972.
- [2] J. F. Danielli and H. Davson, "A contribution to the theory of permeability of thin films," *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 5, pp. 495–508, 1935.
- [3] J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle, "Structure of lipid bilayers," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, vol. 1469. pp. 159–195, 2000.
- [4] D. Chapman, J. C. Gómez-Fernandez, and F. M. Goñi, "Intrinsic protein-lipid interactions. Physical and biochemical evidence" vol. 98, no. 2, pp. 211–223, 1979.
- [5] K. Razi Naqvi, J. González-Rodríguez, R. J. Cherry, and D. Chapman, "Spectroscopic Technique for Studying Protein Rotation in Membranes," *Nat. New Biol.*, vol. 245, no. 147, pp. 249–251, 1973.
- [6] M. Edidin, "Rotational and translational diffusion in membranes.," *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 3, pp. 179–201, 1974.
- [7] R. F. A. Zwaal, P. Comfurius, and L. L. M. Van Deenen, "Membrane asymmetry and blood coagulation," *Nature*, vol. 268, pp. 358 – 360, 1977.
- [8] G. L. Nicolson, "Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.*, vol. 457, no. 1, pp. 57–108, Apr. 1976.
- [9] D. M. Engelman, "Membranes are more mosaic than fluid.," *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 578–80, Dec. 2005.
- [10] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, and A. Kusumi, "Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane.," *J. Cell Biol.*, vol. 157, no. 6, pp. 1071–81, Jun. 2002.
- [11] D. Branton, "Freeze-Etching Studies of Membrane Structure," *Philos. Trans. R. Soc. London. B, Biol. Sci.*, vol. 261, no. 837, pp. 133–138, May 1971.
- [12] S. H. White, "Membrane proteins of known 3D structure." [Online]. Available: <http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>.
- [13] J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker, "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria," *Nature*, vol. 370, no. 6491, pp. 621–628, Aug. 1994.
- [14] U. Golebiewska and S. Scarlata, "The effect of membrane domains on the G protein–phospholipase C β signaling pathway," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 45, no. 2, pp. 97–105, Feb. 2010.
- [15] R. Baradaran, J. M. Berrisford, G. S. Minhas, and L. A. Sazanov, "Crystal structure of the entire respiratory complex I," *Nature*, vol. 494, no. 7438, pp. 443–448, Feb. 2013.

- [16] M. Cortijo, A. Alonso, J. C. Gomez-Fernandez, and D. Chapman, "Intrinsic protein-lipid interactions," *J. Mol. Biol.*, vol. 157, no. 4, pp. 597–618, Jun. 1982.
- [17] J. L. R. Arrondo and F. M. Goñi, "Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 96, no. 1–2, pp. 53–68, Nov. 1998.
- [18] P. L. Yeagle, M. Bennett, V. Lemaître, and A. Watts, "Transmembrane helices of membrane proteins may flex to satisfy hydrophobic mismatch.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1768, no. 3, pp. 530–7, Mar. 2007.
- [19] A. Holt and J. A. Killian, "Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models," *Eur. Biophys. J.*, vol. 39, no. 4, pp. 609–621, 2010.
- [20] H. Heerklotz, "Membrane stress and permeabilization induced by asymmetric incorporation of compounds.," *Biophys. J.*, vol. 81, no. 1, pp. 184–95, Jul. 2001.
- [21] J. Derganc, B. Antonny, and A. Copič, "Membrane bending: the power of protein imbalance.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 38, no. 11, pp. 576–84, Nov. 2013.
- [22] R. Latorre and J. E. Hall, "Dipole potential measurements in asymmetric membranes," *Nature*, vol. 264, no. 5584, pp. 361–363, Nov. 1976.
- [23] D. M. Rice, M. D. Meadows, A. O. Scheinman, F. M. Gõni, J. C. Gómez-Fernández, M. A. Moscarello, D. Chapman, and E. Oldfield, "Protein-lipid interactions. A nuclear magnetic resonance study of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase, lipophilin, and proteolipid apoprotein-lecithin systems and a comparison with the effects of cholesterol," *Biochemistry*, vol. 18, no. 26, pp. 5893–5903, 1979.
- [24] P. L. Yeagle, "Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1838, no. 6, pp. 1548–59, Jun. 2014.
- [25] J. E. Wilson, "Brain hexokinase, the prototype ambiquitous enzyme.," *Current topics in cellular regulation*, vol. 16, pp. 1–54, 1980.
- [26] P. Burn, "Talking point Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 79–83, Mar. 1988.
- [27] M. D. Bazzi and G. L. Nelsestuen, "Protein kinase C and annexins: Unusual calcium response elements in the cell," *Cell. Signal.*, vol. 5, no. 4, pp. 357–365, Jul. 1993.
- [28] W. C. Wimley and S. H. White, "Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 3, no. 10, pp. 842–848, Oct. 1996.
- [29] F. M. Goñi, "Non-permanent proteins in membranes: when proteins come as visitors (Review)," *Mol. Membr. Biol.*, vol. 19, no. 4, pp. 237–245, Jan. 2002.

- [30] K. W. A. Wirtz, A. Schouten, and P. Gros, "Phosphatidylinositol transfer proteins: from closed for transport to open for exchange.," *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 46, no. 1, pp. 301–11, Jan. 2006.
- [31] M. C. Peitsch and J. Tschopp, "Assembly of macromolecular pores by immune defense systems.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 3, pp. 710–716, 1991.
- [32] M. Guerrero-Valero, C. Ferrer-Orta, J. Querol-Audí, C. Marin-Vicente, I. Fita, J. C. Gómez-Fernández, N. Verdaguer, and S. Corbalán-García, "Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P₂.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, pp. 6603–6607, 2009.
- [33] L. Sánchez-Magraner, A. L. Cortajarena, F. M. Goñi, and H. Ostolaza, "Membrane insertion of Escherichia coli α -hemolysin is independent from membrane lysis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 9, pp. 5461–7, Mar. 2006.
- [34] A. Barlic, I. Gutiérrez-Aguirre, J. M. M. Caaveiro, A. Cruz, M.-B. Ruiz-Argüello, J. Pérez-Gil, and J. M. González-Mañas, "Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from Actinia equina.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 33, pp. 34209–16, Aug. 2004.
- [35] L. De Tullio, M. L. Fanani, and B. Maggio, "Surface mixing of products and substrate of PLA₂ in enzyme-free mixed monolayers reproduces enzyme-driven structural topography.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1828, no. 9, pp. 2056–63, Sep. 2013.
- [36] J. Cheng, R. Goldstein, A. Gershenson, B. Stec, and M. F. Roberts, "The Cation- π Box Is a Specific Phosphatidylcholine Membrane Targeting Motif," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 21, pp. 14863–14873, May 2013.
- [37] F. M. Goñi, L.-R. Montes, and A. Alonso, "Phospholipases C and sphingomyelinases: Lipids as substrates and modulators of enzyme activity.," *Prog. Lipid Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 238–66, Jul. 2012.
- [38] D. M. Small, *The physical Chemistry of Lipids. From Alkanes to Phospholipids*, Plenum Pre. New York, 1986, pp. 43–87.
- [39] V. Luzzati, A. Tardieu, and D. Taupin, "A pattern-recognition approach to the phase problem: Application to the X-ray diffraction study of biological membranes and model systems," *J. Mol. Biol.*, vol. 64, no. 1, pp. 269–286, Feb. 1972.
- [40] P. J. Quinn and C. Wolf, "An X-ray diffraction study of model membrane raft structures," *FEBS J.*, vol. 277, no. 22, pp. 4685–4698, Nov. 2010.
- [41] M. Caffrey, "The Study of Lipid Phase Transition Kinetics by Time-Resolved X-Ray Diffraction," *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, vol. 18, no. 1, pp. 159–186, Jun. 1989.
- [42] P. R. Cullis and B. de Kruijff, "Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 559, pp. 399–420, 1979.

- [43] B. D. Ladbroke, R. M. Williams, and D. Chapman, "Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 150, no. 3, pp. 333–340, Apr. 1968.
- [44] T. P. W. McMullen, B. C. M. Wong, E. L. Tham, R. N. A. H. Lewis, and R. N. McElhaney, "Differential scanning calorimetric study of the interaction of cholesterol with the major lipids of the *Acholeplasma laidlawii* B membrane," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 16789–16798, 1996.
- [45] M. Caffrey, "Kinetics and mechanism of transitions involving the lamellar, cubic, inverted hexagonal and fluid isotropic phases of hydrated monoacylglycerides monitored by time-resolved x-ray diffraction," *Biochemistry*, vol. 26, no. 20, pp. 6349–6363, Oct. 1987.
- [46] V. Luzzati, R. Vargas, P. Mariani, A. Gulik, and H. Delacroix, "Cubic phases of lipid-containing systems. Elements of a theory and biological connotations," *J. Mol. Biol.*, vol. 229, no. 2, pp. 540–551, Jan. 1993.
- [47] J. L. Nieva, A. Alonso, G. Basáñez, F. M. Goñi, A. Gulik, R. Vargas, and V. Luzzati, "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.*, vol. 368, no. 1, pp. 143–147, Sep. 2014.
- [48] B. Tenchov and R. Koynova, "Cubic phases in membrane lipids," *Eur. Biophys. J.*, vol. 41, no. 10, pp. 841–850, 2012.
- [49] J. H. Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, and M. J. Zuckermann, "Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 905, pp. 162–172, 1987.
- [50] P. K. Tarafdar, H. Chakraborty, S. M. Dennison, and B. R. Lentz, "Phosphatidylserine inhibits and calcium promotes model membrane fusion," *Biophys. J.*, vol. 103, pp. 1880–1889, 2012.
- [51] L. V. Chernomordik and J. Zimmerberg, "Bending membranes to the task: Structural intermediates in bilayer fusion," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 5, pp. 541–547, 1995.
- [52] B. G. Tenchov, R. C. MacDonald, and D. P. Siegel, "Cubic phases in phosphatidylcholine-cholesterol mixtures: cholesterol as membrane 'fusogen'," *Biophys. J.*, vol. 91, pp. 2508–2516, 2006.
- [53] D. Poccia and B. Larijani, "Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion," *Biochem. J.*, vol. 418, pp. 233–246, 2009.
- [54] N. Huarte, M. Lorizate, E. Perez-Paya, and J. L. Nieva, "Membrane-Transferring Regions of gp41 as Targets for HIV-1 Fusion Inhibition and Viral Neutralization," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 11, pp. 2985–2996, 2011.
- [55] V. S. Markin, M. M. Kozlov, and V. L. Borovjagin, "On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism," *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 3, pp. 361–377, 1984.

- [56] G. Basáñez, G. D. Fidelio, F. M. Goñi, B. Maggio, and A. Alonso, "Dual inhibitory effect of gangliosides on phospholipase C-promoted fusion of lipidic vesicles," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 7506–7513, 1996.
- [57] L. Yang and H. W. Huang, "A rhombohedral phase of lipid containing a membrane fusion intermediate structure.," *Biophys. J.*, vol. 84, pp. 1808–1817, 2003.
- [58] S. Aefferer, T. Reusch, B. Weinhausen, and T. Salditt, "PNAS Plus: Energetics of stalk intermediates in membrane fusion are controlled by lipid composition," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, pp. E1609–E1618, 2012.
- [59] S. Qian and H. W. Huang, "A novel phase of compressed bilayers that models the prestalk transition state of membrane fusion," *Biophys. J.*, vol. 102, pp. 48–55, 2012.
- [60] P. V. Bashkurov, S. A. Akimov, A. I. Evseev, S. L. Schmid, J. Zimmerberg, and V. A. Frolov, "GTPase Cycle of Dynamin Is Coupled to Membrane Squeeze and Release, Leading to Spontaneous Fission," *Cell*, vol. 135, pp. 1276–1286, 2008.
- [61] F. M. Goni and A. Alonso, "Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes," *Prog. Lipid Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–48, 1999.
- [62] C. Martín, M.-A. Requero, J. Masin, I. Konopasek, F. M. Goñi, P. Sebo, and H. Ostolaza, "Membrane restructuring by Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family.," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 12, pp. 3760–5, Jun. 2004.
- [63] M. Faini, R. Beck, F. T. Wieland, and J. A. G. Briggs, "Vesicle coats: Structure, function, and general principles of assembly," *Trends in Cell Biology*, vol. 23, pp. 279–288, 2013.
- [64] A. V Shnyrova, P. V Bashkurov, S. a Akimov, T. J. Pucadyil, J. Zimmerberg, S. L. Schmid, and V. a Frolov, "Geometric catalysis of membrane fission driven by flexible dynamin rings.," *Science*, vol. 339, pp. 1433–6, 2013.
- [65] J. Zimmerberg and S. McLaughlin, "Membrane curvature: How BAR domains bend bilayers," *Current Biology*, vol. 14, 2004.
- [66] B. J. Peter, H. M. Kent, I. G. Mills, Y. Vallis, P. J. G. Butler, P. R. Evans, and H. T. McMahon, "BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure.," *Science*, vol. 303, pp. 495–499, 2004.
- [67] M. Simunovic, A. Srivastava, and G. A. Voth, "Linear aggregation of proteins on the membrane as a prelude to membrane remodeling," *Proc. ...*, vol. 110, pp. 20396–20401, 2013.
- [68] R. Rodríguez-García, L. R. Arriaga, M. Mell, L. H. Moleiro, I. López-Montero, and F. Monroy, "Bimodal spectrum for the curvature fluctuations of bilayer vesicles: Pure bending plus hybrid curvature-dilation modes," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 102, 2009.
- [69] S. Vikström, L. Li, and Å. Wieslander, "The nonbilayer/bilayer lipid balance in membranes: regulatory enzyme in *Acholeplasma laidlawii* is stimulated by metabolic phosphates,

- activator phospholipids, and double-stranded DNA" *J. Biol. Chem.* , vol. 275 , no. 13 , pp. 9296–9302, Mar. 2000.
- [70] D. J. López, M. Egido-Gabas, I. López-Montero, J. V. Busto, J. Casas, M. Garnier, F. Monroy, B. Larijani, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Accumulated bending energy elicits neutral sphingomyelinase activity in human red blood cells," *Biophys. J.*, vol. 102, pp. 2077–2085, 2012.
 - [71] H. T. McMahon and J. L. Gallop, "Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling.," *Nature*, vol. 438, pp. 590–596, 2005.
 - [72] W. Helfrich, "Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments," *Z. Naturforsch. C.*, vol. 28, no. 11, pp. 693–703, 1973.
 - [73] E. A. Evans and V. A. Parsegian, "ENERGETICS OF MEMBRANE DEFORMATION AND ADHESION IN CELL AND VESICLE AGGREGATIONa," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 416, no. 1, pp. 13–33, Dec. 1983.
 - [74] S. M. Gruner, "Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, pp. 3665–3669, 1985.
 - [75] R. M. Epand, N. Fuller, and R. P. Rand, "Role of the position of unsaturation on the phase behavior and intrinsic curvature of phosphatidylethanolamines.," *Biophys. J.*, vol. 71, pp. 1806–1810, 1996.
 - [76] J. N. Israelachvili, S. Marcelja, and R. G. Horn, "Physical principles of membrane organization.," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 13, pp. 121–200, 1980.
 - [77] D. Marsh, "Intrinsic curvature in normal and inverted lipid structures and in membranes.," *Biophys. J.*, vol. 70, pp. 2248–2255, 1996.
 - [78] D. Marsh, *Handbook of Lipid Bilayers*, 2nd ed. Boca Raton, 2013.
 - [79] D. Marsh, "Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 144, pp. 146–159, 2006.
 - [80] A. Diz-Muñoz, D. A. Fletcher, and O. D. Weiner, "Use the force: Membrane tension as an organizer of cell shape and motility," *Trends in Cell Biology*, vol. 23, pp. 47–53, 2013.
 - [81] E. EVANS, "New Membrane Concept Applied to the Analysis of Fluid Shear- and Micropipette-Deformed Red Blood Cells," *Biophys. J.*, vol. 13, pp. 941–954, 1973.
 - [82] E. Leikina, K. Melikov, S. Sanyal, S. K. Verma, B. Eun, C. Gebert, K. Pfeifer, V. A. Lizunov, M. M. Kozlov, and L. V. Chernomordik, "Extracellular annexins and dynamin are important for sequential steps in myoblast fusion," *J. Cell Biol.*, vol. 200, pp. 109–123, 2013.
 - [83] M. Phillips, B. Ladbroke, and D. Chapman, "Molecular interactions in mixed lecithin systems," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 196, no. 1, pp. 35–44, Jan. 1970.

- [84] R. F. M. de Almeida, A. Fedorov, and M. Prieto, "Sphingomyelin/ phosphatidylcholine/ cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts.," *Biophys. J.*, vol. 85, pp. 2406–16, 2003.
- [85] S. L. Veatch and S. L. Keller, "Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 94, 2005.
- [86] F. M. Goñi, A. Alonso, L. A. Bagatolli, R. E. Brown, D. Marsh, M. Prieto, and J. L. Thewalt, "Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1781. pp. 665–684, 2008.
- [87] F. A. Heberle and G. W. Feigenson, "Phase separation in lipid membranes," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, pp. 1–13, 2011.
- [88] F. A. Heberle, R. S. Petruzielo, J. Pan, P. Drazba, N. Kučerka, R. F. Standaert, G. W. Feigenson, and J. Katsaras, "Bilayer thickness mismatch controls domain size in model membranes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, pp. 6853–6859, 2013.
- [89] P. Husen, L. R. Arriaga, F. Monroy, J. H. Ipsen, and L. A. Bagatolli, "Morphometric image analysis of giant vesicles: A new tool for quantitative thermodynamics studies of phase separation in lipid membranes," *Biophys. J.*, vol. 103, pp. 2304–2310, 2012.
- [90] J. Sot, M. Ibarguren, J. V. Busto, L. R. Montes, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Cholesterol displacement by ceramide in sphingomyelin-containing liquid-ordered domains, and generation of gel regions in giant lipidic vesicles," *FEBS Lett.*, vol. 582, pp. 3230–3236, 2008.
- [91] J. B. De La Serna, J. Perez-Gil, A. C. Simonsen, and L. A. Bagatolli, "Cholesterol rules: Direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 40715–40722, 2004.
- [92] P. A. Rice and H. M. McConnell, "Critical shape transitions of monolayer lipid domains.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, pp. 6445–6448, 1989.
- [93] A. R. Honerkamp-Smith, P. Cicuta, M. D. Collins, S. L. Veatch, M. den Nijs, M. Schick, and S. L. Keller, "Line tensions, correlation lengths, and critical exponents in lipid membranes near critical points.," *Biophys. J.*, vol. 95, pp. 236–246, 2008.
- [94] A. J. García-Sáez, S. Chiantia, and P. Schwille, "Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, pp. 33537–33544, 2007.
- [95] M. Tomishige, Y. Sako, and A. Kusumi, *Regulation Mechanism of the Lateral Diffusion of Band 3 in Erythrocyte Membranes by the Membrane* 1998.
- [96] B. Stancevic and R. Kolesnick, "Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling," *FEBS Letters*, vol. 584. pp. 1728–1740, 2010.

- [97] Y. Zhang, X. Li, K. A. Becker, and E. Gulbins, "Ceramide-enriched membrane domains-Structure and function," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1788. pp. 178–183, 2009.
- [98] K. Simons and E. Ikonen, "Functional rafts in cell membranes.," *Nature*, vol. 387, pp. 569–572, 1997.
- [99] L. J. Pike, "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function.," *Journal of lipid research*, vol. 47. pp. 1597–1598, 2006.
- [100] D. Lichtenberg, F. M. Goñi, and H. Heerklotz, "Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 30. pp. 430–436, 2005.
- [101] S. R. Shaikh and M. A. Edidin, "Membranes are not just rafts," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 144. pp. 1–3, 2006.
- [102] G. van Meer, "Dynamic transbilayer lipid asymmetry," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, pp. 1–11, 2011.
- [103] F. X. Contreras, L. Sánchez-Magraner, A. Alonso, and F. M. Goñi, "Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes," *FEBS Letters*, vol. 584. pp. 1779–1786, 2010.
- [104] F. X. Contreras, A. V. Villar, A. Alonso, R. N. Kolesnick, and F. M. Goñi, "Sphingomyelinase activity causes transbilayer lipid translocation in model and cell membranes," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, pp. 37169–37174, 2003.
- [105] J. L. W. Thudichum, *A treatise on the chemical constitution of the brain*. Archon Books, Hamden, Conn., USA, 1962, pp. 340.
- [106] B. Dahlén and I. Pascher, "Molecular arrangements in sphingolipids: crystal structure of N-tetracosanoylphytosphingosine," *Acta Crystallogr. B*, vol. 28, pp. 2396–2404, 1972.
- [107] I. Pascher and S. Sundell, "Molecular arrangements in sphingolipids: Crystal structure of the ceramide N-(2D,3D-dihydroxyoctadecanoyl)-phytosphingosine," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 62, pp. 79–86, 1992.
- [108] S. Hakomori, "Chemistry of Glycosphingolipids," in *Sphingolipid Biochemistry SE - 1*, vol. 3, Springer US, 1983, pp. 1–165.
- [109] H. Wiegandt, *Glycolipids*. Amsterdam: Elsevier, 1985, p. 314.
- [110] Y. A. Hannun, C. R. Loomis, A. H. Merrill Jr., and R. M. Bell, "Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets," *J Biol Chem*, vol. 261, pp. 12604–12609, 1986.
- [111] A. H. Merrill, A. M. Sereni, V. L. Stevens, Y. A. Hannun, R. M. Bell, and J. M. Kinkade, "Inhibition of phorbol ester-dependent differentiation of human promyelocytic leukemic

- (HL-60) cells by sphinganine and other long-chain bases," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, pp. 12610–12615, 1986.
- [112] R. N. Kolesnick, "1,2-Diacylglycerols but not phorbol esters stimulate sphingomyelin hydrolysis in GH3 pituitary cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, pp. 16759–16762, 1987.
- [113] B. Maggio, M. L. Fanani, C. M. Rosetti, and N. Wilke, "Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: An assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1758, pp. 1922–1944, 2006.
- [114] F. M. Goñi and A. Alonso, "Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1758, pp. 1902–1921, 2006.
- [115] M. A. Perillo, A. Polo, A. Guidotti, E. Costa, and B. Maggio, "Molecular parameters of semisynthetic derivatives of gangliosides and sphingosine in monolayers at the air-water interface.," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 65, pp. 225–238, 1993.
- [116] F.-X. Contreras, J. Sot, A. Alonso, and F. M. Goñi, "Sphingosine increases the permeability of model and cell membranes.," *Biophys. J.*, vol. 90, pp. 4085–4092, 2006.
- [117] F. López-García, V. Micol, J. Villalain, and J. C. Gómez-Fernández, "Interaction of sphingosine and stearylamine with phosphatidylserine as studied by DSC and NMR," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1153, no. 1, pp. 1–8, Nov. 1993.
- [118] H. Sasaki, H. Arai, M. J. Cocco, and S. H. White, "pH dependence of sphingosine aggregation," *Biophys. J.*, vol. 96, pp. 2727–2733, 2009.
- [119] P. K. J. Kinnunen, M. Rytomaa, A. Koiv, J. Lehtonen, P. Mustonen, and A. Aro, "Sphingosine-mediated membrane association of DNA and its reversal by phosphatidic acid," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 66, pp. 75–85, 1993.
- [120] S. C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Y. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougères, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden, and M. J. Hope, "Rational design of cationic lipids for siRNA delivery.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, pp. 172–176, 2010.
- [121] F. Lopez-Garcia, J. Villalain, and C. Gomez-Fernandez, "A phase behavior study of mixtures of sphingosine with zwitterionic phospholipids," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1194, pp. 281–288, 1994.
- [122] L. J. Siskind, S. Fluss, M. Bui, and M. Colombini, "Sphingosine forms channels in membranes that differ greatly from those formed by ceramide," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 37, pp. 227–236, 2005.

- [123] R. Georgieva, K. Koumanov, A. Momchilova, C. Tessier, and G. Staneva, "Effect of sphingosine on domain morphology in giant vesicles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 350, pp. 502–510, 2010.
- [124] E. Zupancic, A. C. Carreira, R. F. M. De Almeida, and L. C. Silva, "Biophysical implications of sphingosine accumulation in membrane properties at neutral and acidic pH," *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, pp. 4858–4866, 2014.
- [125] N. Jiménez-Rojo, A. R. Viguera, M. I. Collado, K. H. Sims, C. Constance, K. Hill, W. A. Shaw, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Sphingosine induces the aggregation of imine-containing peroxidized vesicles," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1838, no. 8, pp. 2071–7, Aug. 2014.
- [126] E. Lloyd-Evans, A. J. Morgan, X. He, D. A. Smith, E. Elliot-Smith, D. J. Sillence, G. C. Churchill, E. H. Schuchman, A. Galione, and F. M. Platt, "Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium.," *Nat. Med.*, vol. 14, pp. 1247–1255, 2008.
- [127] J. Gruenberg, "Lipids in endocytic membrane transport and sorting," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 15, pp. 382–388, 2003.
- [128] A. Olivera and S. Spiegel, "Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens," *Nature*, vol. 365, no. 6446, pp. 557–560, Oct. 1993.
- [129] G. T. Kunkel, M. Maceyka, S. Milstien, and S. Spiegel, "Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, pp. 688–702, 2013.
- [130] M. García-Pacios, M. I. Collado, J. V. Busto, J. Sot, A. Alonso, J. L. R. Arrondo, and F. M. Goñi, "Sphingosine-1-phosphate as an amphipathic metabolite: Its properties in aqueous and membrane environments," *Biophys. J.*, vol. 97, pp. 1398–1407, 2009.
- [131] E. ten Grotenhuis, R. A. Demel, M. Ponec, D. R. Boer, J. C. van Miltenburg, and J. A. Bouwstra, "Phase behavior of stratum corneum lipids in mixed Langmuir-Blodgett monolayers.," *Biophys. J.*, vol. 71, pp. 1389–1399, 1996.
- [132] R. N. Kolesnick, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects," *J. Cell. Physiol.*, vol. 184, no. 3, pp. 285–300, Sep. 2000.
- [133] A. E. Cremesti, F. M. Goni, and R. Kolesnick, "Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: Do biophysical properties determine biologic outcome?," *FEBS Letters*, vol. 531, pp. 47–53, 2002.
- [134] F. M. Goñi, F.-X. Contreras, L.-R. Montes, J. Sot, and A. Alonso, "Biophysics (and sociology) of ceramides.," *Biochem. Soc. Symp.*, pp. 177–188, 2005.
- [135] N. Jiménez-Rojo, A. B. García-Arribas, J. Sot, A. Alonso, and F. M. Goñi, "Lipid bilayers containing sphingomyelins and ceramides of varying N-acyl lengths: A glimpse into

- sphingolipid complexity," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1838, pp. 456–464, 2014.
- [136] Y. A. Hannun and L. M. Obeid, "Many ceramides.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, pp. 27855–27862, 2011.
 - [137] J. M. Holopainen, J. Y. Lehtonen, and P. K. Kinnunen, "Lipid microdomains in dimyristoylphosphatidylcholine-ceramide liposomes.," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 88, pp. 1–13, 1997.
 - [138] L. Silva, R. F. M. De Almeida, A. Fedorov, A. P. A. Matos, and M. Prieto, "Ceramide-platform formation and -induced biophysical changes in a fluid phospholipid membrane," *Mol. Membr. Biol.*, vol. 23, no. 2, pp. 137–148, Jan. 2006.
 - [139] H. W. Huang, E. M. Goldberg, and R. Zidovetzki, "Ceramide induces structural defects into phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A2.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 220, pp. 834–838, 1996.
 - [140] Y.-W. Hsueh, R. Giles, N. Kitson, and J. Thewalt, "The effect of ceramide on phosphatidylcholine membranes: a deuterium NMR study.," *Biophys. J.*, vol. 82, pp. 3089–3095, 2002.
 - [141] D. C. Carrer and B. Maggio, "Phase behavior and molecular interactions in mixtures of ceramide with dipalmitoylphosphatidylcholine," *J. Lipid Res.*, vol. 40, no. 11, pp. 1978–1989, Nov. 1999.
 - [142] S. S. W. Leung, J. V. Busto, A. Keyvanloo, F. M. Goñi, and J. Thewalt, "Insights into sphingolipid miscibility: Separate observation of sphingomyelin and ceramide N-acyl chain melting," *Biophys. J.*, vol. 103, pp. 2465–2474, 2012.
 - [143] M. P. Veiga, J. L. Arrondo, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases.," *Biophys. J.*, vol. 76, pp. 342–350, 1999.
 - [144] S. Chiantia, N. Kahya, J. Ries, and P. Schwille, "Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS.," *Biophys. J.*, vol. 90, pp. 4500–4508, 2006.
 - [145] M. L. Fanani, S. Härtel, R. G. Oliveira, and B. Maggio, "Bidirectional control of sphingomyelinase activity and surface topography in lipid monolayers.," *Biophys. J.*, vol. 83, pp. 3416–3424, 2002.
 - [146] J. Sot, L. A. Bagatolli, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers.," *Biophys. J.*, vol. 90, pp. 903–914, 2006.
 - [147] F. M. Goni and A. Alonso, "Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1788, no. 1, pp. 169–177, 2009.

- [148] J. M. Holopainen, J. Lemmich, F. Richter, O. G. Mouritsen, G. Rapp, and P. K. Kinnunen, "Dimyristoylphosphatidylcholine/C16:0-ceramide binary liposomes studied by differential scanning calorimetry and wide- and small-angle x-ray scattering.," *Biophys. J.*, vol. 78, pp. 2459–2469, 2000.
- [149] J. Sot, F. J. Aranda, M.-I. Collado, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Different effects of long- and short-chain ceramides on the gel-fluid and lamellar-hexagonal transitions of phospholipids: a calorimetric, NMR, and x-ray diffraction study.," *Biophys. J.*, vol. 88, pp. 3368–3380, 2005.
- [150] M. B. Ruiz-Argüello, G. Basáñez, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in phospholipid membrane fusion and leakage," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 26616–26621, 1996.
- [151] L. R. Montes, M. Ibarguren, F. M. Goñi, M. Stonehouse, M. L. Vasil, and A. Alonso, "Leakage-free membrane fusion induced by the hydrolytic activity of PlcHR2, a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1768, pp. 2365–2372, 2007.
- [152] L. R. Montes, M. B. Ruiz-Argüello, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Membrane restructuring via ceramide results in enhanced solute efflux," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, pp. 11788–11794, 2002.
- [153] J. Bai and R. E. Pagano, "Measurement of Spontaneous Transfer and Transbilayer Movement of BODIPY-Labeled Lipids in Lipid Vesicles[†]," *Biochemistry*, vol. 36, no. 29, pp. 8840–8848, Jul. 1997.
- [154] I. López-Montero, N. Rodriguez, S. Cribier, A. Pohl, M. Vélez, and P. F. Devaux, "Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 25811–25819, 2005.
- [155] F.-X. Contreras, G. Basáñez, A. Alonso, A. Herrmann, and F. M. Goñi, "Asymmetric addition of ceramides but not dihydroceramides promotes transbilayer (flip-flop) lipid motion in membranes.," *Biophys. J.*, vol. 88, pp. 348–359, 2005.
- [156] L. A. Hoeflerlin, D. S. Wijesinghe, and C. E. Chalfant, "The role of ceramide-1-Phosphate in biological functions," *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 215, pp. 153–166, 2013.
- [157] E. E. Kooijman, J. Sot, L.-R. Montes, A. Alonso, A. Gericke, B. de Kruijff, S. Kumar, and F. M. Goñi, "Membrane organization and ionization behavior of the minor but crucial lipid ceramide-1-phosphate.," *Biophys. J.*, vol. 94, pp. 4320–4330, 2008.
- [158] F. M. Goñi, "The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1838, no. 6, pp. 1467–76, Jun. 2014.
- [159] R. W. Titball, "Bacterial Phospholipase C," *Microbiol. Mol. Biol. R.*, vol. 57, pp. 347–366, 1993.
- [160] M. R. Popoff and P. Bouvet, "Clostridial toxins.," *Future Microbiol.*, vol. 4, pp. 1021–1064, 2009.

- [161] P.-G. Suh, J.-I. Park, L. Manzoli, L. Cocco, J. C. Peak, M. Katan, K. Fukami, T. Kataoka, S. Yun, and S. H. Ryu, "Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes.," *BMB Rep.*, vol. 41, pp. 415–434, 2008.
- [162] K. Fukami, S. Inanobe, K. Kanemaru, and Y. Nakamura, "Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance," *Progress in Lipid Research*, vol. 49, pp. 429–437, 2010.
- [163] T. D. Bunney and M. Katan, "PLC regulation: Emerging pictures for molecular mechanisms," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 36, pp. 88–96, 2011.
- [164] D. Samet and Y. Barenholz, "Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 102, pp. 65–77, 1999.
- [165] Y. H. Zeidan and Y. A. Hannun, "The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation.," *Curr. Mol. Med.*, vol. 10, pp. 454–466, 2010.
- [166] C. J. Clarke, B. X. Wu, and Y. A. Hannun, "The neutral sphingomyelinase family: Identifying biochemical connections," *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 51, pp. 51–58, 2011.
- [167] F. M. Goni and A. Alonso, "Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity," *Febs Lett.*, vol. 531, no. 1, pp. 38–46, 2002.
- [168] A.B. Otnaess, C. Little, K. Sletten, R. Wallin, S. Johnsen, R. Flengsrud, and H. Prydz, "Some Characteristics of Phospholipase C from *Bacillus cereus*," *Eur. J. Biochem.*, vol. 79, no. 2, pp. 459–468, Oct. 1977.
- [169] C. Little, B. Aurebekk, and A.-B. Otnaess, "Purification by affinity chromatography of phospholipase C from *Bacillus cereus*," *FEBS Lett.*, vol. 52, no. 2, pp. 175–179, Apr. 1975.
- [170] J. L. Nieva, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Liposome fusion catalytically induced by phospholipase C.," *Biochemistry*, vol. 28, pp. 7364–7367, 1989.
- [171] A. Alonso, F. M. Goni, and J. T. Buckley, "Lipids favoring inverted phase enhance the ability of aerolysin to permeabilize liposome bilayers," *Biochemistry*, vol. 39, pp. 14019–14024, 2000.
- [172] H. Ahyayauch, A. V. Villar, A. Alonso, and F. M. Goñi, "Modulation of PI-specific phospholipase C by membrane curvature and molecular order," *Biochemistry*, vol. 44, pp. 11592–11600, 2005.
- [173] J. L. Nieva, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Phospholipase C-promoted membrane fusion. Retroinhibition by the end-product diacylglycerol.," *Biochemistry*, vol. 32, pp. 1054–1058, 1993.
- [174] J. Singh, R. Ranganathan, and J. Hajdu, "Kinetics of bacterial phospholipase c activity at micellar interfaces: Effect of substrate aggregate microstructure and a model for the kinetic parameters," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, pp. 16741–16751, 2008.

- [175] M. B. Ruiz-Arguello, M. P. Veiga, A. Alonso, and F. M. Goni, "Effect of sublytic concentrations of sodium cholate on phospholipase C hydrolysis of phospholipid bilayers," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 219, no. 1, pp. 163–167, 1999.
- [176] R. Ranganathan, C. M. Tcacenco, R. Rosseto, and J. Hajdu, "Characterization of the kinetics of phospholipase C activity toward mixed micelles of sodium deoxycholate and dimyristoylphosphatidylcholine," *Biophys. Chem.*, vol. 122, pp. 79–89, 2006.
- [177] J. J. Daniele, B. Maggio, I. D. Bianco, F. M. Goñi, A. Alonso, and G. D. Fidelio, "Inhibition by gangliosides of *Bacillus cereus* phospholipase C activity against monolayers, micelles and bilayer vesicles," *Eur. J. Biochem.*, vol. 239, pp. 105–110, 1996.
- [178] G. Basanez, G. D. Fidelio, F. M. Goni, B. Maggio, and A. Alonso, "Dual inhibitory effect of gangliosides on phospholipase C-promoted fusion of lipidic vesicles," *Biochemistry*, vol. 35, no. 23, pp. 7506–7513, 1996.
- [179] G. Basanez, F. M. Goni, and A. Alonso, "Poly(ethylene glycol)-lipid conjugates inhibit phospholipase C-induced lipid hydrolysis, liposome aggregation and fusion through independent mechanisms," *Febs Lett.*, vol. 411, no. 2–3, pp. 281–286, 1997.
- [180] G. Basáñez, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Effect of single chain lipids on phospholipase C-promoted vesicle fusion. A test for the stalk hypothesis of membrane fusion," *Biochemistry*, vol. 37, pp. 3901–3908, 1998.
- [181] R. M. Epand, "Diacylglycerols, lysolecithin, or hydrocarbons markedly alter the bilayer to hexagonal phase transition temperature of phosphatidylethanolamines," *Biochemistry*, vol. 24, pp. 7092–7095, 1985.
- [182] A. Walter, P. L. Yeagle, and D. P. Siegel, "Diacylglycerol and hexadecane increase divalent cation-induced lipid mixing rates between phosphatidylserine large unilamellar vesicles," *Biophys. J.*, vol. 66, pp. 366–376, 1994.
- [183] M. B. Ruiz-Argüello, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Phospholipase C Hydrolysis of Phospholipids in Bilayers of Mixed Lipid Compositions[†]," *Biochemistry*, vol. 37, no. 33, pp. 11621–11628, Jul. 1998.
- [184] O. H. Griffith and M. Ryan, "Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: Structure, function, and interaction with lipids," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1441, pp. 237–254, 1999.
- [185] D. W. Heinz, M. Ryan, T. L. Bullock, and O. H. Griffith, "Crystal-structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase-C from *Bacillus-cereus* in complex with myo-inositol," *Embo J.*, vol. 14, no. 16, pp. 3855–3863, 1995.
- [186] D. W. Heinz, M. Ryan, M. P. Smith, L. H. Weaver, J. F. W. Keana, and O. Hayes Griffith, "Crystal structure of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* in complex with glucosaminyl(1,2,3,4,6)-D-myo-inositol, an essential fragment of GPI anchors," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 9496–9504, 1996.

- [187] C. Shao, X. Shi, H. Wehbi, C. Zambonelli, J. F. Head, B. A. Seaton, and M. F. Roberts, "Dimer structure of an interfacially impaired phosphatidylinositol-specific phospholipase C," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, pp. 9228–9235, 2007.
- [188] J. Moser, B. Gerstel, J. E. Meyer, T. Chakraborty, J. Wehland, and D. W. Heinz, "Crystal structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C from the human pathogen *Listeria monocytogenes*," *J. Mol. Biol.*, vol. 273, pp. 269–282, 1997.
- [189] D. W. Heinz, L. O. Essen, and R. L. Williams, "Structural and mechanistic comparison of prokaryotic and eukaryotic phosphoinositide-specific phospholipases C," *J. Mol. Biol.*, vol. 275, pp. 635–650, 1998.
- [190] R. L. Williams, "Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1441, pp. 255–267, 1999.
- [191] X. Qian, C. Zhou, and M. F. Roberts, "Phosphatidylcholine activation of bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C toward PI vesicles," *Biochemistry*, vol. 37, pp. 6513–6522, 1998.
- [192] A. V. Villar, A. Alonso, and F. M. Goni, "Leaky vesicle fusion induced by phosphatidylinositol-specific phospholipase C: Observation of mixing of vesicular inner monolayers," *Biochemistry*, vol. 39, pp. 14012–14018, 2000.
- [193] A. V. Villar, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Diacylglycerol effects on phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and vesicle fusion," *FEBS Lett.*, vol. 494, pp. 117–120, 2001.
- [194] H. Ikezawa, M. Yamanegi, R. Taguchi, T. Miyashita, and T. Ohyabu, "Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. purification, properties and phosphatase-releasing activity," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 450, pp. 154–164, 1976.
- [195] A. D. Stuart, H. E. Eustace, T. A. McKee, and T. D. K. Brown, "A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts," *J. Virol.*, vol. 76, pp. 9307–9322, 2002.
- [196] A. V. Villar, F. M. Goñi, A. Alonso, D. R. Jones, Y. León, and I. Varela-Nieto, "Phospholipase cleavage of glycosylphosphatidylinositol reconstituted in liposomal membranes," *FEBS Lett.*, vol. 432, pp. 150–154, 1998.
- [197] J. B. Bonilla, M. Belén Cid, F. X. Contreras, F. M. Goñi, and M. Martín-Lomas, "Phospholipase cleavage of D- and L-chiro-glycosylphosphoinositides asymmetrically incorporated into liposomal membranes," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 12, pp. 1513–1528, 2006.
- [198] D. R. Jones, C. Pañeda, A. V. Villar, A. Alonso, F. M. Goñi, P. Bütikofer, U. Brodbeck, P. R. Shepherd, and I. Varela-Nieto, "Phosphorylation of glycosyl-phosphatidylinositol by phosphatidylinositol 3-kinase changes its properties as a substrate for phospholipases," *FEBS Lett.*, vol. 579, pp. 59–65, 2005.

- [199] E. R. S. Roldan and Q. X. Shi, "Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis," *Front. Biosci.*, vol. 12, pp. 89–104, 2007.
- [200] R. G. Sheikhnejad and P. N. Srivastava, "Isolation and properties of a Phosphatidylcholine-specific phospholipase-C from bull seminal plasma," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 16, pp. 7544–7549, 1986.
- [201] J. M. Vazquez and E. R. S. Roldan, "Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the de novo formation of phosphatidylcholine," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 47, no. 1, pp. 105–112, 1997.
- [202] F. Sekiya, B. Poulin, Y. J. Kim, and S. G. Rhee, "Mechanism of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 - Tyrosine 783 phosphorylation is not sufficient for lipase activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 31, pp. 32181–32190, 2004.
- [203] J. I. Hwang, Y. S. Oh, K. J. Shin, H. Kim, S. H. Ryu, and P. G. Suh, "Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta," *Biochem. J.*, vol. 389, pp. 181–186, 2005.
- [204] Y. Q. Wu, O. Perisic, R. L. Williams, M. Katan, and M. F. Roberts, "Phosphoinositide-specific phospholipase C delta 1 activity toward micellar substrates, inositol 1,2-cyclic phosphate, and other water-soluble substrates: A sequential mechanism and allosteric activation," *Biochemistry*, vol. 36, no. 37, pp. 11223–11233, 1997.
- [205] R. M. C. Dawson and A. D. Bangham, "Activation of surface films of lecithin by amphipathic molecules," *Biochem. J.*, vol. 72, pp. 493–496, 1959.
- [206] R. M. C. Dawson, R. F. Irvine, J. Bray, and P. J. Quinn, "Long-chain unsaturated diacylglycerols cause a perturbation in the structure of phospholipid-bilayers rendering them susceptible to phospholipase attack," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 125, no. 2, pp. 836–842, 1984.
- [207] G. Basanez, J. L. Nieva, F. M. Goni, and A. Alonso, "Origin of the lag period in the phospholipase C cleavage of phospholipids in membranes. Concomitant vesicle aggregation and enzyme activation," *Biochemistry*, vol. 35, no. 48, pp. 15183–15187, 1996.
- [208] F. M. Goni and A. Alonso, "Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1758, no. 12, pp. 1902–1921, 2006.
- [209] F. M. Goñi and A. Alonso, "Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1788, pp. 169–177, 2009.
- [210] M. Ibarguren, D. J. Lopez, L. R. Montes, J. Sot, A. I. Vasil, M. L. Vasil, F. M. Goni, and A. Alonso, "Imaging the early stages of phospholipase C/sphingomyelinase activity on vesicles containing coexisting ordered-disordered and gel-fluid domains," *J. Lipid Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 635–645, 2011.

- [211] S. Gatt, A. Herzl, and Y. Barenholz, "Hydrolysis of sphingomyelin liposomes by sphingomyelinase," *Febs Lett.*, vol. 30, no. 3, pp. 281–285, 1973.
- [212] L.R. Montes, F.M. Goñi and A. Alonso, "Sphingomyelinases: Distribution in nature, structure and function". In "Sphingolipids and cell function" (E. Albi, ed.). Research Signpost, Kerala, India, pp. 53-82, 2006.
- [213] P. Schneider and E. P. Kennedy, "Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with niemann-pick disease," *J. Lipid Res.*, vol. 8, no. 3, p. 202–&, 1967.
- [214] D. C. Coleman, J. P. Arbuthnott, H. M. Pomeroy, and T. H. Birkbeck, "Cloning and expression in *Escherichia-coli* and *Staphylococcus-aureus* of the beta-lysin determinant from *Staphylococcus-aureus* - evidence that bacteriophage conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determina," *Microb. Pathog.*, vol. 1, no. 6, pp. 549–564, 1986.
- [215] A. Yamada, N. Tsukagoshi, S. Uda, T. Sasaki, S. Makino, S. Nakamura, C. Little, M. Tomita, and H. Ikezawa, "Nucleotide-sequence and expression in *Escherichia-coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus-cereus*," *Eur. J. Biochem.*, vol. 175, no. 2, pp. 213–220, 1988.
- [216] S. Tomiuk, K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, and W. Stoffel, "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling?," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 7, pp. 3638–3643, 1998.
- [217] N. Matmati and Y. A. Hannun, "ISC1 (inositol phosphosphingolipid-phospholipase C), the yeast homologue of neutral sphingomyelinases," *J. Lipid Res.*, vol. 49, no. 5, pp. 922–928, 2008.
- [218] J. Henry, A. Guillotte, C. Luberto, and M. Del Poeta, "Characterization of inositol phosphosphingolipid-phospholipase C 1 (Isc1) in *Cryptococcus neoformans* reveals unique biochemical features," *Febs Lett.*, vol. 585, no. 4, pp. 635–640, 2011.
- [219] K. Hofmann, S. Tomiuk, G. Wolff, and W. Stoffel, "Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 11, pp. 5895–5900, 2000.
- [220] T. Yabu, A. Shimizu, and M. Yamashita, "A Novel Mitochondrial Sphingomyelinase in Zebrafish Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 30, pp. 20349–20363, 2009.
- [221] J. Wu, A. Nilsson, B. A. G. Jonsson, H. Stenstad, W. Agace, Y. J. Cheng, and R. D. Duan, "Intestinal alkaline sphingomyelinase hydrolyses and inactivates platelet-activating factor by a phospholipase C activity," *Biochem. J.*, vol. 394, pp. 299–308, 2006.
- [222] B. X. Wu, C. J. Clarke, N. Matmati, D. Montefusco, N. Bartke, and Y. A. Hannun, "Identification of Novel Anionic Phospholipid Binding Domains in Neutral Sphingomyelinase 2 with Selective Binding Preference," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 25, pp. 22362–22371, 2011.

- [223] D. J. Lopez, M. Egido-Gabas, I. Lopez-Montero, J. V Busto, J. Casas, M. Garnier, F. Monroy, B. Larijani, F. M. Goni, and A. Alonso, "Accumulated Bending Energy Elicits Neutral Sphingomyelinase Activity in Human Red Blood Cells," *Biophys. J.*, vol. 102, no. 9, pp. 2077–2085, 2012.
- [224] C. J. Clarke, C. F. Snook, M. Tani, N. Matmati, N. Marchesini, and Y. A. Hannun, "The extended family of neutral sphingomyelinases," *Biochemistry*, vol. 45, no. 38, pp. 11247–11256, 2006.
- [225] A. E. A. Openshaw, P. R. Race, H. J. Monzo, J. A. Vazquez-Boland, and M. J. Banfield, "Crystal structure of SmcL, a bacterial neutral sphingomyelinase C from *Listeria*," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 41, pp. 35011–35017, 2005.
- [226] O. Krut, K. Wiegmann, H. Kashkar, B. Yazdanpanah, and M. Kronke, "Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 19, pp. 13784–13793, 2006.
- [227] H. W. Huang, E. M. Goldberg, and R. Zidovetzki, "Ceramide perturb the structure of phosphatidylcholine bilayers and modulate the activity of phospholipase A(2)," *Eur. Biophys. J. with Biophys. Lett.*, vol. 27, no. 4, pp. 361–366, 1998.
- [228] H. W. Huang, E. M. Goldberg, and R. Zidovetzki, "Ceramide modulate protein kinase C activity and perturb the structure of phosphatidylcholine/phosphatidylserine bilayers," *Biophys. J.*, vol. 77, no. 3, pp. 1489–1497, 1999.
- [229] J. M. Holopainen, M. Subramanian, and P. K. J. Kinnunen, "Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane," *Biochemistry*, vol. 37, no. 50, pp. 17562–17570, 1998.
- [230] T. A. Nurminen, J. M. Holopainen, H. X. Zhao, and P. K. J. Kinnunen, "Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 41, pp. 12129–12134, 2002.
- [231] H. Grassme, A. Cremesti, R. Kolesnick, and E. Gulbins, "Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation," *Oncogene*, vol. 22, no. 35, pp. 5457–5470, 2003.
- [232] L. J. Siskind, R. N. Kolesnick, and M. Colombini, "Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 30, pp. 26796–26803, 2002.
- [233] H. Birbes, C. Luberto, Y. T. Hsu, S. E. L. Bawab, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid, "A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNF alpha-induced Bax translocation to mitochondria," *Biochem. J.*, vol. 386, pp. 445–451, 2005.
- [234] O. Terrones, B. Antonsson, H. Yamaguchi, H. G. Wang, J. H. Liu, R. M. Lee, A. Herrmann, and G. Basanez, "Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 29, pp. 30081–30091, 2004.

- [235] L. K. Duffy, J. L. McDonel, B. A. McClane, and A. Kurosky, "Clostridium-perfringens type-a entero-toxin - characterization of the amino-terminal region," *Infect. Immun.*, vol. 38, no. 1, pp. 386–388, 1982.
- [236] E. L. Krug and C. Kent, "Phospholipase-C from *Clostridium-perfringens* - preparation and characterization of homogeneous enzyme," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 231, no. 2, pp. 400–410, 1984.
- [237] P. Urbina, M. Flores-Díaz, A. Alape-Girón, A. Alonso, and F. M. Goni, "Phospholipase C and sphingomyelinase activities of the *Clostridium perfringens* alpha-toxin," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 159, no. 1, pp. 51–57, 2009.
- [238] G. Basanez, J. L. Nieva, E. Rivas, A. Alonso, and F. M. Goni, "Diacylglycerol and the promotion of lamellar-hexagonal and lamellar-isotropic phase transitions in lipids: Implications for membrane fusion," *Biophys. J.*, vol. 70, no. 5, pp. 2299–2306, 1996.
- [239] F. M. Goni and A. Alonso, "Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1508, no. 1–2, pp. 51–68, 2000.
- [240] D. K. O'Brien and S. B. Melville, "Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C-perfringens* in host tissues," *Infect. Immun.*, vol. 72, no. 9, pp. 5204–5215, 2004.
- [241] M. Nagahama, K. Michiue, and J. Sakurai, "Membrane-damaging action of Clostridium perfringens alpha-toxin on phospholipid liposomes," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1280, no. 1, pp. 120–126, 1996.
- [242] M. Nagahama, A. Otsuka, M. Oda, R. K. Singh, Z. M. Ziora, H. Imagawa, M. Nishizawa, and J. Sakurai, "Effect of unsaturated bonds in the sn-2 acyl chain of phosphatidylcholine on the membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin toward liposomes," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1768, no. 11, pp. 2940–2945, 2007.
- [243] P. Urbina, M. Flores-Díaz, A. Alape-Girón, A. Alonso, and F. M. Goñi, "Effects of bilayer composition and physical properties on the phospholipase C and sphingomyelinase activities of *Clostridium perfringens* α -toxin," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, pp. 279–286, 2011.
- [244] P. Urbina, M. I. Collado, A. Alonso, F. M. Goñi, M. Flores-Díaz, A. Alape-Girón, J. M. Ruysschaert, and M. F. Lensink, "Unexpected wide substrate specificity of *C. perfringens* α -toxin phospholipase C," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, pp. 2618–2627, 2011.
- [245] M. Flores-Díaz, A. Alape-Girón, G. Clark, B. Catimel, Y. Hirabayashi, E. Nice, J. M. Gutierrez, and R. Titball, "A cellular deficiency of gangliosides causes hypersensitivity to *Clostridium perfringens* phospholipase C," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 29, pp. 26680–26689, 2005.

- [246] I. D. Bianco, G. D. Fidelio, and B. Maggio, "Effect of sulfatide and gangliosides on phospholipase-C and phospholipase-A2 activity - a monolayer study," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1026, no. 2, pp. 179–185, 1990.
- [247] S. F. Martin, B. C. Follows, P. J. Hergenrother, and B. K. Trotter, "The choline binding site of phospholipase C (*Bacillus cereus*): Insights into substrate specificity," *Biochemistry*, vol. 39, no. 12, pp. 3410–3415, 2000.
- [248] S. F. Martin and G. E. Pitzer, "Solution conformations of short-chain phosphatidylcholine - Substrates of the phosphatidylcholine-preferring PLC of *Bacillus cereus*," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1464, no. 1, pp. 104–112, 2000.
- [249] C. E. Naylor, J. T. Eaton, A. Howells, N. Justin, D. S. Moss, R. W. Titball, and A. K. Basak, "Structure of the key toxin in gas gangrene," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 738–746, 1998.
- [250] C. M. Talbott, I. Vorobyov, D. Borchman, K. G. Taylor, D. B. DuPre, and M. C. Yappert, "Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1467, no. 2, pp. 326–337, 2000.
- [251] N. M. Antikainen, A. F. Monzingo, C. L. Franklin, J. D. Robertus, and S. F. Martin, "Using X-ray crystallography of the Asp55Asn mutant of the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C from *Bacillus cereus* to support the mechanistic role of Asp55 as the general base," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 417, no. 1, pp. 81–86, 2003.
- [252] G. A. Smith, H. Marquis, S. Jones, N. C. Johnston, D. A. Portnoy, and H. Goldfine, "The 2 distinct phospholipases-C of *Listeria-monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread," *Infect. Immun.*, vol. 63, no. 11, pp. 4231–4237, 1995.
- [253] C. Geoffroy, J. Raveneau, J. L. Beretti, A. Lecroisey, J. A. Vazquezboland, J. E. Alouf, and P. Berche, "Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase-C from *Listeria-monocytogenes*," *Infect. Immun.*, vol. 59, no. 7, pp. 2382–2388, 1991.
- [254] J. A. Vazquezboland, C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud, and P. Cossart, "Nucleotide-sequence of the lecithinase operon of *Listeria-monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread," *Infect. Immun.*, vol. 60, no. 1, pp. 219–230, 1992.
- [255] H. Marquis and E. J. Hager, "pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*," *Mol. Microbiol.*, vol. 35, no. 2, pp. 289–298, 2000.
- [256] H. Goldfine, N. C. Johnston, and C. Knob, "Nonspecific phospholipase-C of *Listeria-monocytogenes* - activity on phospholipids in triton x-100-mixed micelles and in biological-membranes," *J. Bacteriol.*, vol. 175, no. 14, pp. 4298–4306, 1993.
- [257] L. R. Montes, F. M. Goni, N. C. Johnston, H. Goldfine, and A. Alonso, "Membrane fusion induced by the catalytic activity of a phospholipase C/sphingomyelinase from *Listeria monocytogenes*," *Biochemistry*, vol. 43, no. 12, pp. 3688–3695, 2004.

- [258] M. B. Ruiz-Arguello, F. M. Goni, and A. Alonso, "Vesicle membrane fusion induced by the concerted activities of sphingomyelinase and phospholipase C," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 36, pp. 22977–22982, 1998.
- [259] C. Little, B. Aurebekk, and A. B. Otnaess, "Purification by affinity chromatography of phospholipase-C from *Bacillus-cereus*," *Febs Lett.*, vol. 52, no. 2, pp. 175–179, 1975.
- [260] J. A. Driscoll, S. L. Brody, and M. H. Kollef, "The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections," *Drugs*, vol. 67, no. 3, pp. 351–368, 2007.
- [261] M. L. Vasil, L. M. Graham, R. M. Ostroff, V. D. Shortridge, and A. I. Vasil, Phospholipase-C - molecular-biology and contribution to the pathogenesis of *Pseudomonas-aeruginosa*, vol. 44. 1991, pp. 34–47.
- [262] R. M. Ostroff, A. I. Vasil, and M. L. Vasil, "Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase-C from *Pseudomonas-aeruginosa*," *J. Bacteriol.*, vol. 172, no. 10, pp. 5915–5923, 1990.
- [263] D. A. Hogan and R. Kolter, "*Pseudomonas-candida* interactions: An ecological role for virulence factors," *Science (80-.)*, vol. 296, no. 5576, pp. 2229–2232, 2002.
- [264] L. G. Rahme, F. M. Ausubel, H. Cao, E. Drenkard, B. C. Goumnerov, G. W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M. W. Tan, J. Tsongalis, C. L. Walendziewicz, and R. G. Tompkins, "Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 16, pp. 8815–8821, 2000.
- [265] M. J. Stonehouse, A. Cota-Gomez, S. K. Parker, W. E. Martin, J. A. Hankin, R. C. Murphy, W. B. Chen, K. B. Lim, M. Hackett, A. I. Vasil, and M. L. Vasil, "A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C," *Mol. Microbiol.*, vol. 46, no. 3, pp. 661–676, 2002.
- [266] C. Luberto, M. J. Stonehouse, E. A. Collins, N. Marchesini, S. El-Bawab, A. I. Vasil, M. L. Vasil, and Y. A. Hannun, "Purification, characterization, and identification of a sphingomyelin synthase from *Pseudomonas aeruginosa* - PlcH is a multifunctional enzyme," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 35, pp. 32733–32743, 2003.
- [267] L. R. Montes, M. Ibarguren, F. M. Goni, M. Stonehouse, M. L. Vasil, and A. Alonso, "Leakage-free membrane fusion induced by the hydrolytic activity of PlcHR(2), a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1768, no. 10, pp. 2365–2372, 2007.
- [268] M. Ibarguren, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, M. Stonehouse, A. I. Vasil, M. L. Vasil, A. Alonso, and F. M. Goni, "End-products diacylglycerol and ceramide modulate membrane fusion induced by a phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, vol. 1798, no. 1, pp. 59–64, 2010.
- [269] D. J. Lopez, M. Isabel Collado, M. Ibarguren, A. I. Vasil, M. L. Vasil, F. M. Goni, and A. Alonso, "Multiple phospholipid substrates of phospholipase C/sphingomyelinase HR2 from *Pseudomonas aeruginosa*," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 164, no. 1, pp. 78–82, 2011.

- [270] L. R. Montes, D. J. Lopez, J. Sot, L. A. Bagatolli, M. J. Stonehouse, M. L. Vasil, B. X. Wu, Y. A. Hannun, F. M. Goni, and A. Alonso, "Ceramide-enriched membrane domains in red blood cells and the mechanism of sphingomyelinase-Induced hot-cold hemolysis," *Biochemistry*, vol. 47, no. 43, pp. 11222–11230, 2008.
- [271] N. Okino and M. Ito, "Ceramidase enhances phospholipase C-induced hemolysis by *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 9, pp. 6021–6030, 2007.
- [272] F.-X. Contreras, J. Sot, A. Alonso, and F. M. Goñi, "Sphingosine increases the permeability of model and cell membranes," *Biophys. J.*, vol. 90, no. 11, pp. 4085–92, Jun. 2006.
- [273] F. M. Goni and A. Alonso, "Membrane fusion induced by phospholipase C and sphingomyelinases," *Biosci. Rep.*, vol. 20, no. 6, pp. 443–463, 2000.
- [274] D. P. Siegel, "Energetics of intermediates in membrane-fusion - comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms," *Biophys. J.*, vol. 65, no. 5, pp. 2124–2140, 1993.
- [275] A. S. Luk, E. W. Kaler, and S. P. Lee, "Phospholipase-C-induced aggregation and fusion of cholesterol lecithin small unilamellar vesicles," *Biochemistry*, vol. 32, no. 27, pp. 6965–6973, 1993.
- [276] H. Ellens, J. Bentz, and F. C. Szoka, " H^+ -induced and Ca^{2+} -induced fusion and destabilization of liposomes," *Biochemistry*, vol. 24, no. 13, pp. 3099–3106, 1985.
- [277] J. Bentz, S. Nir, and D. G. Covell, "Mass-action kinetics of virus-cell aggregation and fusion," *Biophys. J.*, vol. 54, no. 3, pp. 449–462, 1988.
- [278] T. E. Little, H. Madani, S. P. Lee, and E. W. Kaler, "Lipid vesicle fusion induced by phospholipase-C activity in model bile," *J. Lipid Res.*, vol. 34, no. 2, pp. 211–217, 1993.
- [279] L. V Chernomordik, S. S. Vogel, A. Sokoloff, H. O. Onaran, E. A. Leikina, and J. Zimmerberg, "Lysolipids reversibly inhibit Ca^{2+} -dependent, GTP-dependent and pH-dependent fusion of biological-membranes," *Febs Lett.*, vol. 318, no. 1, pp. 71–76, 1993.
- [280] J. L. Nieva, A. Alonso, G. Basanez, F. M. Goni, A. Gulik, R. Vargas, and V. Luzzati, "Topological properties of 2 cubic phases of a phospholipid-cholesterol-diacylglycerol aqueous system and their possible implications in the phospholipase C-induced liposome fusion," *Febs Lett.*, vol. 368, no. 1, pp. 143–147, 1995.
- [281] M. M. Kozlov and V. S. Markin, "Possible mechanism of membrane-fusion," *Biofizika*, vol. 28, no. 2, pp. 242–247, 1983.
- [282] L. Chernomordik, "Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 81, no. 2, pp. 203–213, Jul. 1996.
- [283] D. P. Siegel and R. M. Epand, "The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine: Implications for membrane fusion mechanisms," *Biophys. J.*, vol. 73, no. 6, pp. 3089–3111, 1997.

- [284] G. Basanez, M. B. RuizArguello, A. Alonso, F. M. Goni, G. Karlsson, and K. Edwards, "Morphological changes induced by phospholipase C and by sphingomyelinase on large unilamellar vesicles: A cryo-transmission electron microscopy study of liposome fusion," *Biophys. J.*, vol. 72, no. 6, pp. 2630–2637, 1997.
- [285] J. M. Holopainen, M. I. Angelova, and P. K. J. Kinnunen, "Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes," *Biophys. J.*, vol. 78, no. 2, pp. 830–838, 2000.
- [286] X. H. Zha, L. M. Pierini, P. L. Leopold, P. J. Skiba, I. Tabas, and F. R. Maxfield, "Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis," *J. Cell Biol.*, vol. 140, no. 1, pp. 39–47, 1998.
- [287] H. Grassme, E. Gulbins, B. Brenner, K. Ferlinz, K. Sandhoff, K. Harzer, F. Lang, and T. F. Meyer, "Acidic sphingomyelinase mediates entry of N-gonorrhoeae into nonphagocytic cells," *Cell*, vol. 91, no. 5, pp. 605–615, 1997.
- [288] O. Utermohlen, J. Herz, M. Schramm, and M. Kroenke, "Fusogenicity of membranes: The impact of acid sphingomyelinase on innate immune responses," *Immunobiology*, vol. 213, no. 3–4, pp. 307–314, 2008.
- [289] W. R. Zuckert, H. Marquis, and H. Goldfine, "Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by amino acid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog," *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 10, pp. 4823–4831, 1998.
- [290] L. V Chernomordik and M. M. Kozlov, "Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 72, no. 1, pp. 175–207, Jun. 2003.
- [291] M. E. Haque and B. R. Lentz, "Roles of curvature and hydrophobic interstice energy in fusion: Studies of lipid perturbant effects," *Biochemistry*, vol. 43, no. 12, pp. 3507–3517, 2004.
- [292] D. P. Siegel and M. M. Kozlov, "The Gaussian curvature elastic modulus of N-monomethylated dioleoylphosphatidylethanolamine: Relevance to membrane fusion and lipid phase behavior," *Biophys. J.*, vol. 87, no. 1, pp. 366–374, 2004.
- [293] F. Dumas, R. D. Byrne, B. Vincent, T. M. C. Hobday, D. L. Poccia, and B. Larijani, "Spatial Regulation of Membrane Fusion Controlled by Modification of Phosphoinositides," *PLoS One*, vol. 5, no. 8, 2010.
- [294] R. D. Byrne, M. Gamier-Lhomme, K. Han, M. Dowicki, N. Michael, N. Totty, V. Zhendre, A. Cho, T. R. Pettitt, M. J. Wakelam, D. L. Poccia, and B. Larijani, "PLC gamma is enriched on poly-phosphoinositide-rich vesicles to control nuclear envelope assembly," *Cell. Signal.*, vol. 19, no. 5, pp. 913–922, 2007.
- [295] R. D. Byrne, B. Larijani, and D. L. Poccia, "Tyrosine kinase regulation of nuclear envelope assembly," in *Advances in Enzyme Regulation, Vol 49*, vol. 49, G. Weber, C. E. Forrest Weber, and L. Cocco, Eds. 2009, pp. 148–156.

- [296] V. Zhendre, A. Grelard, M. Garnier-Lhomme, S. Buchoux, B. Larijani, and E. J. Dufourc, "Key Role of Polyphosphoinositides in Dynamics of Fusogenic Nuclear Membrane Vesicles," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, 2011.
- [297] R. D. Byrne, V. Zhendre, B. Larijani, and D. L. Poccia, "Nuclear envelope formation in vitro: a sea urchin egg cell-free system," *Methods Mol. Biol.*, vol. 464, pp. 207–223, 2009.
- [298] T. Barona, R. D. Byrne, T. R. Pettitt, M. J. O. Wakelam, B. Larijani, and D. L. Poccia, "Diacylglycerol induces fusion of nuclear envelope membrane precursor vesicles," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 50, pp. 41171–41177, 2005.
- [299] B. Larijani and D. L. Poccia, "Nuclear Envelope Formation: Mind the Gaps," in *Annual Review of Biophysics*, vol. 38, 2009, pp. 107–124.
- [300] M. Katan, "New insights into the families of PLC enzymes: looking back and going forward," *Biochem. J.*, vol. 391, no. Pt 3, pp. e7–9, 2005.
- [301] L. E. Quintern, E. H. Schuchman, O. Levran, M. Suchi, K. Ferlinz, H. Reinke, K. Sandhoff, and R. J. Desnick, "Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase - occurrence of alternatively processed transcripts," *Embo J.*, vol. 8, no. 9, pp. 2469–2473, 1989.
- [302] S. Lansmann, O. Bartelsen, and K. Sandhoff, "Purification and characterization of recombinant human acid sphingomyelinase expressed in insect Sf21 cells," *Sphingolipid Metab. Cell Signaling, Pt A*, vol. 311, pp. 149–156, 2000.
- [303] F. D. Testai, M. A. Landek, R. Goswami, M. Ahmed, and G. Dawson, "Acid sphingomyelinase and inhibition by phosphate ion: role of inhibition by phosphatidyl-myoinositol 3,4,5-triphosphate in oligodendrocyte cell signaling," *J. Neurochem.*, vol. 89, no. 3, pp. 636–644, 2004.
- [304] H. Grassme, V. Jendrosseck, and E. Gulbins, "Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis," *Apoptosis*, vol. 6, no. 6, pp. 441–445, 2001.
- [305] O. Utermohlen, U. Karow, J. Lohler, and M. Kronke, "Severe impairment in early host defense against *Listeria monocytogenes* in mice deficient in acid sphingomyelinase," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 5, pp. 2621–2628, 2003.
- [306] J. A. Rotolo, J. J. Zhang, M. Donepudi, H. Lee, Z. Fuks, and R. Kolesnick, "Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 28, pp. 26425–26434, 2005.
- [307] I. Tabas, "Secretory sphingomyelinase," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 102, no. 1–2, pp. 123–130, 1999.
- [308] A. R. Leventhal, W. G. Chen, A. R. Tall, and I. Tabas, "Acid sphingomyelinase-deficient macrophages have defective cholesterol trafficking and efflux," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 48, pp. 44976–44983, 2001.

- [309] N. Marchesini and Y. A. Hannun, "Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation," *Biochem. Cell Biol. Biol. Cell.*, vol. 82, no. 1, pp. 27–44, 2004.
- [310] S. Tomiuk, K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, and W. Stoffel, "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling?," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 7, pp. 3638–3643, 1998.
- [311] H. Sawai, N. Domae, N. Nagan, and Y. A. Hannun, "Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 53, pp. 38131–38139, 1999.
- [312] A. C. Fensome, M. Josephs, M. Katan, and F. Rodrigues-Lima, "Biochemical identification of a neutral sphingomyelinase 1 (NSM1)-like enzyme as the major NSM activity in the DT40 B-cell line: absence of a role in the apoptotic response to endoplasmic reticulum stress," *Biochem. J.*, vol. 365, pp. 69–77, 2002.
- [313] N. Marchesini, C. Luberto, and Y. A. Hannun, "Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase2 and its role in sphingolipid metabolism," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 16, pp. 13775–13783, 2003.
- [314] O. Krut, K. Wiegmann, H. Kashkar, B. Yazdanpanah, and M. Kronke, "Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 19, pp. 13784–13793, 2006.
- [315] T. Yabu, A. Shimuzu, and M. Yamashita, "A novel mitochondrial sphingomyelinase in zebrafish cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 30, pp. 20349–20363, 2009.
- [316] B. X. Wu, V. Rajagopalan, P. L. Roddy, C. J. Clarke, and Y. A. Hannun, "Identification and characterization of murine mitochondria-associated Neutral sphingomyelinase (MANSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 23, pp. 17993–18002, 2010.
- [317] F. Rodrigues-Lima, A. C. Fensomes, M. Josephs, J. Evans, R. J. Veldman, and M. Katan, "Structural requirements for catalysis and membrane targeting of mammalian enzymes with neutral sphingomyelinase and lysophospholipid phospholipase C activities - Analysis by chemical modification and site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 36, p. 28316–+, 2000.
- [318] C. Sergelius, S. Niinivehmas, T. Maula, M. Kurita, S. Yamaguchi, T. Yamamoto, S. Katsumura, O. T. Pentikäinen, and J. P. Slotte, "Structure-activity relationship of sphingomyelin analogs with sphingomyelinase from *Bacillus cereus*," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1818, pp. 474–480, 2012.
- [319] H. Sawai, Y. Okamoto, C. Luberto, C. G. Mao, A. Bielawska, N. Domae, and Y. A. Hannun, "Identification of ISC1 (YER019w) as inositol phosphosphingolipid phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 50, pp. 39793–39798, 2000.
- [320] S. V de Avalos, X. F. Su, M. Zhang, Y. Okamoto, W. Dowhan, and Y. A. Hannun, "The phosphatidylglycerol/cardiolipin biosynthetic pathway is required for the activation of

- inositol phosphosphingolipid phospholipase C, Isc1p, during growth of *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 8, pp. 7170–7177, 2005.
- [321] O. Zhang, M. C. Wilson, W. Xu, F.-F. Hsu, J. Turk, F. M. Kuhlmann, Y. Wang, L. Soong, P. Key, S. M. Beverley, and K. Zhang, "Degradation of host sphingomyelin is essential for leishmania virulence," *Plos Pathog.*, vol. 5, no. 12, 2009.
- [322] A. Nilsson and R. D. Duan, "Alkaline sphingomyelinases and ceramidases of the gastrointestinal tract," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 102, no. 1–2, pp. 97–105, 1999.
- [323] J. Wu, A. Nilsson, B. A. G. Jonsson, H. Stenstad, W. Agace, Y. J. Cheng, and R. D. Duan, "Intestinal alkaline sphingomyelinase hydrolyses and inactivates platelet-activating factor by a phospholipase C activity," *Biochem. J.*, vol. 394, pp. 299–308, 2006.
- [324] F.M. Goñi, J. Sot, and A. Alonso, "Biophysical properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids", *Biochem. Soc. Trans.* Vol. 42, pp. 1401-1408, 2014.

AGRADECIMIENTOS

Agradezcoa la Dra. A. Bouchet su ayuda en la preparación de esta Memoria, y a Dña. M.J. Peña su colaboración editorial en ésta y tantas ocasiones. Las investigaciones reseñadas han recibido el apoyo impagable, durante décadas, de los gobiernos vasco y español, de la Diputación Foral de Bizkaia, de la Universidad del País Vasco y de la Unión Europea.