

TRABAJO DE FIN DE GRADO
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

**Interacción de la diacilglicerol aciltransferasa-3 del
cloroplasto de algas con membranas biológicas**

Autora: Lucía García López

Tutora: Ana Marcela Giudici Besseghini

Co-tutora: María Verónica Beligni

Co-tutor: José Antonio Poveda Larrosa

Área de conocimiento: Química Física

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Curso académico 2024/2025

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. TAG.....	4
1.2. DGAT	5
1.3. DGAT3	5
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivos	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Biología molecular	9
3.2. Expresión de las proteínas.....	9
3.2.1. Transformación	9
3.2.2. Prueba de inducción	10
3.2.3. Preinóculo.....	11
3.2.4. Inóculo-inducción.....	11
3.3. Purificación de las proteínas	12
3.3.1. Resuspensión.....	12
3.3.2. Cromatografía de afinidad.....	13
3.3.3. Electroforesis SDS-PAGE.....	15
3.3.4. <i>Western Blot</i>	16
3.3.5. Cuantificación de la proteína.....	16
3.4. Preparación de muestras para estudios en presencia de lípidos	17
3.5. Anisotropía de fluorescencia.....	19
3.6. <i>Quenching</i> de fluorescencia	19
3.7. <i>Leakage</i>	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Análisis de la expresión y purificación de DGAT3.....	21
4.2. Resultados de GenScript	22
4.3. Interacción de DGAT3 con modelos de membrana	23
4.3.1. Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario.....	24
4.3.2. <i>Quenching</i> o desactivación de la fluorescencia.....	26
4.3.3. Efecto de DGAT3 en la permeabilidad de los liposomas (<i>leakage</i>).....	27
5. DISCUSIÓN.....	29
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

PALABRAS CLAVE: DGAT3, metabolismo lipídico, expresión de proteínas, interacción proteína-membrana, fluorescencia.

RESUMEN:

El triacilglicerol (TAG) es la forma predominante de almacenamiento de energía en la mayoría de los organismos eucariotas y constituye el principal componente de los aceites vegetales. Su biosíntesis puede ocurrir por varias vías, una de las cuales está catalizada por la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). En plantas se han identificado diferentes isoformas, entre ellas DGAT1, DGAT2 y DGAT3. A diferencia de DGAT1 y DGAT2, que son proteínas integrales de membrana, DGAT3 es una proteína soluble y poco estudiada, de la que se espera su interacción con lípidos para ejercer su función. En este trabajo se llevó a cabo la expresión heteróloga y purificación de DGAT3. Se compararon dos muestras de la proteína: una purificada en el laboratorio y otra proporcionada por la empresa GenScript. Además, se estudió su interacción con lípidos mediante ensayos de fluorescencia (anisotropía, *quenching* y *leakage*). Los resultados indican que DGAT3 puede interactuar con bicapas lipídicas, especialmente aquellas compuestas por lípidos aniónicos como POPG o presentes en la membrana de los tilacoides. Este tipo de investigación permite identificar posibles factores que podrían favorecer la acumulación de lípidos en microalgas.

ABSTRACT:

Triacylglycerol (TAG) is the predominant form of energy storage in most eukaryotic organisms and is the main component of vegetable oils. Its biosynthesis can occur through several pathways, one of which is catalysed by diacylglycerol acyltransferase (DGAT). Different isoforms have been identified in plants, including DGAT1, DGAT2 and DGAT3. Unlike DGAT1 and DGAT2, which are integral membrane proteins, DGAT3 is a soluble and poorly studied protein, which is expected to interact with lipids to exert its function. In this work, heterologous expression and purification of DGAT3 was carried out. Two samples of the protein were compared: one purified in the laboratory and the other provided by the company GenScript. In addition, its interaction with lipids was studied by fluorescence assays (anisotropy, quenching and leakage). The results indicate that DGAT3 can interact with lipid bilayers, especially those composed of anionic lipids such as POPG or present in the membrane of the thylakoids. This type of research makes it possible to identify possible factors that could favour lipid accumulation in microalgae.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TAG

El triacilglicerol (TAG) es el principal componente de los aceites vegetales y representa la forma predominante de almacenamiento de energía en la mayoría de los organismos eucariotas. Está compuesto por tres ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol (Fig. 1A), ocupando las posiciones sn-1, sn-2 y sn-3 del mismo (Fig. 1B) [1]. En las plantas, el TAG se acumula principalmente en las semillas, donde actúa como una reserva energética esencial para la germinación y el desarrollo inicial de las plántulas. Además, sirve como fuente de precursores para la biosíntesis de membranas y la señalización lipídica, que son procesos fundamentales para el crecimiento y el desarrollo vegetal [2].

La biosíntesis de TAG puede ocurrir por varias vías [3]. La más estudiada es la vía de Kennedy (Fig. 1C), una ruta dependiente de acil-CoA que implica una serie de reacciones de acilación secuencial sobre la molécula de glicerol-3-fosfato [4]. El paso final y limitante de la vía es catalizado por la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), que transfiere un grupo acilo desde el acil-CoA a la posición sn-3 del diacilglicerol (DAG) para formar el TAG [1]. Esta reacción es clave en la acumulación de lípidos de almacenamiento y está catalizada por diferentes isoformas de DGAT en plantas: DGAT1, DGAT2 y DGAT3, entre las más conocidas [5].

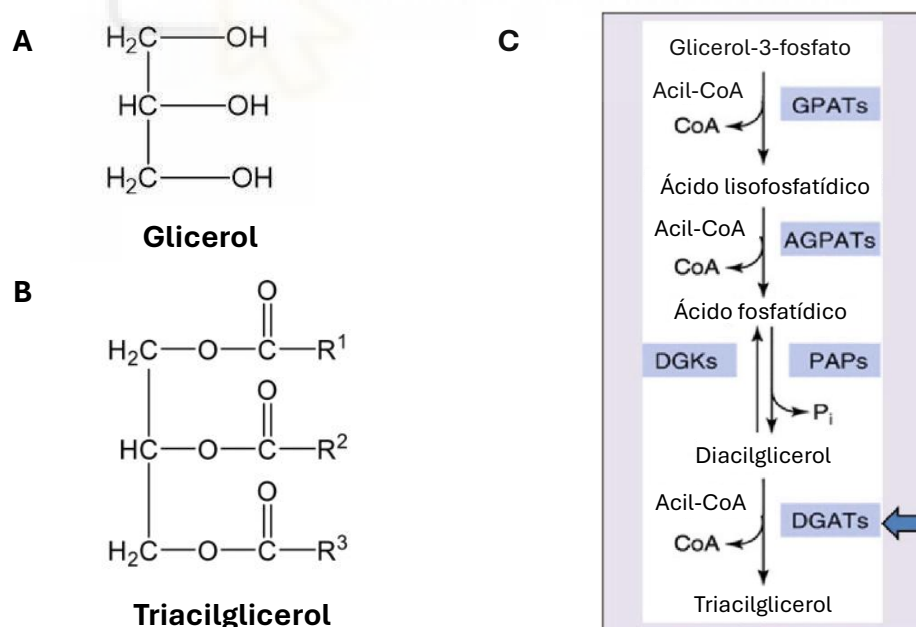


Figura 1. A: estructura molecular del glicerol. B: estructura molecular del triacilglicerol. C: esquema explicativo de la vía de Kennedy para la biosíntesis y acumulación de TAG; GPAT (glicerol-3-fosfato aciltransferasa), AGPAT (1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa), PAP (ácido fosfatídico fosfatasas), DGK (diacilglicerol quinasa), DGAT (diacilglicerol aciltransferasa).

1.2. DGAT

En eucariotas se han identificado al menos cuatro tipos de DGAT: DGAT1, DGAT2, DGAT3 y una forma adicional conocida como Wax Ester Synthase/DGAT (WS/DGAT). A pesar de tener escasa similitud de secuencia entre sí, estos tipos presentan actividades catalíticas convergentes, transfiriendo un grupo acilo al DAG para formar TAG [6]. Los análisis filogenéticos sugieren que provienen de linajes evolutivos distintos, agrupándose en clados separados, lo cual indica una evolución convergente de la función en distintas familias de proteínas [7].

DGAT1 y DGAT2 son proteínas integrales de membrana localizadas en el retículo endoplasmático (RE) [8], mientras que DGAT3, a diferencia de los anteriores, es una proteína soluble que ha sido localizada en el citoplasma [9] y cuya presencia se ha sugerido en el cloroplasto de *Arabidopsis* [10]. Esta diversidad en localización subcelular y estructura sugiere funciones especializadas o complementarias en distintos contextos celulares y fisiológicos [11].

Desde un punto de vista funcional, DGAT no solo influye directamente en el contenido total de TAG en los tejidos vegetales, sino también en la composición de los ácidos grasos, el contenido de aceite en semillas y su peso durante el desarrollo [12]. Por tanto, la caracterización y manipulación de los genes que codifican las diferentes isoformas de DGAT constituye una estrategia prometedora para mejorar el rendimiento y la calidad del aceite en cultivos oleaginosos, como lo han evidenciado distintos estudios [13], [14].

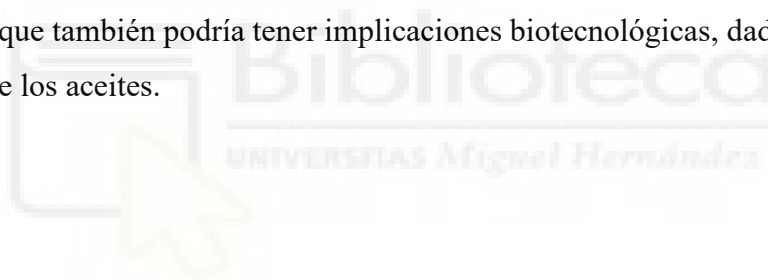
1.3. DGAT3

Recientes análisis filogenéticos identificaron una DGAT soluble, exclusiva de las algas verdes y relacionada con un homólogo de la planta, la llamada DGAT3 [15], [16]. Este clado tiene un ancestro común más reciente con un grupo de polipéptidos no caracterizados de cianobacterias, lo que sugiere un posible origen procariota, a diferencia de DGAT1 y DGAT2, que están exclusivamente relacionadas con proteínas eucariotas. Aunque DGAT3 ha sido estudiada en pocas especies vegetales, se ha propuesto su participación en rutas metabólicas específicas [17]. Además, se ha predicho que DGAT3 de algas verdes se localizan en el cloroplasto, lo cual fue confirmado experimentalmente en el caso de *Chlamydomonas reinhardtii* [18]. La expresión heteróloga de DGAT3 en *Escherichia coli* incrementa la acumulación de TAG en presencia de oleato, que es un ácido graso monoinsaturado de 18 carbonos. El análisis de la secuencia de aminoácidos de DGAT3 en *C. reinhardtii* revela la ausencia de segmentos transmembrana y un bajo contenido de residuos hidrofóbicos en comparación con los miembros canónicos de la familia, características compartidas con las isoformas de plantas. Estos datos sugieren que

DGAT3 podría participar en una vía de síntesis de TAG soluble localizada en el cloroplasto [17], [18].

Dado que tanto DGAT1 como DGAT2, enzimas integrales de membrana, interactúan directamente con lípidos como parte de su función en el metabolismo lipídico [19], [20], se podría esperar que DGAT3, a pesar de ser una proteína soluble, interaccione con lípidos, considerando su implicación en este mismo proceso metabólico. Estudiar la posible interacción con lípidos, así como el tipo de lípido con el que interacciona DGAT3 en *C. reinhardtii*, puede aportar información importante sobre su función dentro del metabolismo lipídico de esta microalga. Este tipo de investigación permite identificar posibles factores que podrían favorecer la acumulación de lípidos en microalgas.

La proteína DGAT3 presenta fluoróforos intrínsecos en su estructura, concretamente dos residuos de triptófano (Trp216 y Trp218), lo que posibilita realizar estudios de interacción con membranas mediante técnicas de fluorescencia. Además, el estudio detallado de estas interacciones no solo ampliará nuestro conocimiento sobre el metabolismo de lípidos en microalgas, sino que también podría tener implicaciones biotecnológicas, dado el amplio uso a nivel industrial de los aceites.



2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La búsqueda de fuentes de energía vegetal sostenibles ha impulsado la investigación sobre las rutas metabólicas que conducen a la generación de lípidos neutros, como los triacilglicéridos (TAGs), debido al creciente reconocimiento del potencial de las microalgas para la producción de biodiésel [18].

En los últimos años, DGAT3 ha sido objeto de estudio dentro del metabolismo lipídico de microalgas, particularmente en *Chlamydomonas reinhardtii*. Como se ha dicho anteriormente, DGAT3 presenta diferencias con respecto a otras isoformas de DGAT, tanto en su localización subcelular como en sus propiedades bioquímicas, lo que sugiere la existencia de rutas alternativas de formación de triacilglicéridos dentro del cloroplasto.

En estudios anteriores, DGAT3 fue expresada y purificada mediante el plásmido pET19b y su expresión se caracterizó en *Escherichia coli* BL21. Estas aproximaciones experimentales permitieron confirmar su capacidad para catalizar la formación de TAGs en ausencia de estructuras membranosas [17].

Además, se ha demostrado que la expresión génica de DGAT3 se induce en respuesta a la luz y muestra una correlación con el aumento de los niveles de TAGs. Por lo tanto, se sugirió que DGAT3 cumple un papel funcional en el acoplamiento entre la fotosíntesis y el almacenamiento de lípidos [18].

Sin embargo, a pesar de estos avances, todavía no se han caracterizado en profundidad las propiedades estructurales de DGAT3 ni su capacidad de unión a lípidos en condiciones *in vitro*. En este trabajo se tratará de abordar esta cuestión.

Por otro lado, se solicitó a una empresa (GenScript) la síntesis del plásmido pET30a (+) y la purificación heteróloga de la proteína, con el objetivo de comparar sus resultados con los obtenidos en el laboratorio. Además, se discutirán ambos procedimientos de purificación.

2.1. Objetivos

Se expone el objetivo general que expresa el propósito que se quiere alcanzar con el presente trabajo:

- Estudiar la interacción de DGAT3 con lípidos en modelos de membrana.

A continuación, se enumeran los objetivos específicos que concretan el objetivo general mencionado:

- Expresar y purificar la proteína DGAT3.
- Comparar los resultados obtenidos con los de la proteína obtenida por la empresa GenScript.
- Análisis de anisotropía, *quenching* de fluorescencia y *leakage* de la proteína con lípidos en membranas modelo.
- Discutir la relevancia de estos resultados con respecto a la función de DGAT3.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Biología molecular

El gen *dgat3* fue sintetizado con optimización de codones de *E. coli* y se le agregaron 6 histidinas (His) en el extremo N-terminal. Posteriormente, el fragmento génico fue insertado en el vector pET30a (+), el cual presenta resistencia a kanamicina. La síntesis, producción y purificación de esta construcción genética la llevó a cabo la empresa GenScript.

Utilizando la base de datos www.expasy.org y su herramienta *ProtParam*, se analizaron distintos parámetros de la proteína DGAT3 a partir de su secuencia de aminoácidos. Entre los valores obtenidos se encuentran el peso molecular, el número de aminoácidos, el coeficiente de extinción molar (ϵ), el punto isoelectrico (pI) y la carga neta, que resulta ser positiva a un pH de 7.

- Secuencia de aminoácidos:

MHHHHHHDDDDKASFGLLGRVPTCGELPKCSARSPESLARSGRARAMVPSGF
PSVARASHMPHALVDASRPVAVSPVLCSSLRKERRKLSKVLKSHRKVLERR
LSALTSSVDVDSPLLTELLSELKTLRTSLEGQRSAALLCAADDSSDSDSDDDG
CDTRSAAALAAQRRRAATSALTAASTSQAMTSPARMVVSGLGGMELTVPE
LEEGWEWSEADFRAARFEGAPGRVMVCTGSKCQRKGAQQVLEAVSALADG
NTNIEVVPCKCVGKCSAGAALRVRPQGQACATYTQVRPAQLRDMFEEHFGAV
AAAAGAPSAACCVECKSPGSESQPHLHSHAEGAAVEQHVLVA

Se resaltan en rojo los residuos de triptófano (W216 y W218).

- Peso molecular: 37,5 kDa; número de aminoácidos: 357; coeficiente de extinción molar (ϵ): $12.490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; pI: 7,22.

3.2. Expresión de las proteínas

3.2.1. Transformación

La expresión de DGAT3 se llevó a cabo en la cepa *E. coli* BL21 después de una previa transformación realizada con el vector pET30a (+).

Las bacterias *E. coli* BL21 fueron transformadas mediante shock térmico. Para ello, se mezclaron con 100 ng del plásmido pET30a (+), 1,7 μL de β -mercaptoetanol 12,8 M y 1 mL de medio de cultivo LB estéril. Después, se incubó en un agitador durante 1 hora a 37°C y 225 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se sembraron 30 μL de la reacción en una placa LB agar previamente suplementada con 50 μL de kanamicina (stock de 25 mg/mL) (Fig. 2B). Con el fin

de obtener un control negativo, simultáneamente, se realizó el mismo procedimiento de transformación de las bacterias *E. coli* BL21 con la diferencia de que el plásmido no fue añadido. Estas bacterias fueron plaqueadas en una placa LB agar con kanamicina (Fig. 2A).

Finalmente, se dejaron crecer ambas placas durante toda la noche a 37°C en una estufa.

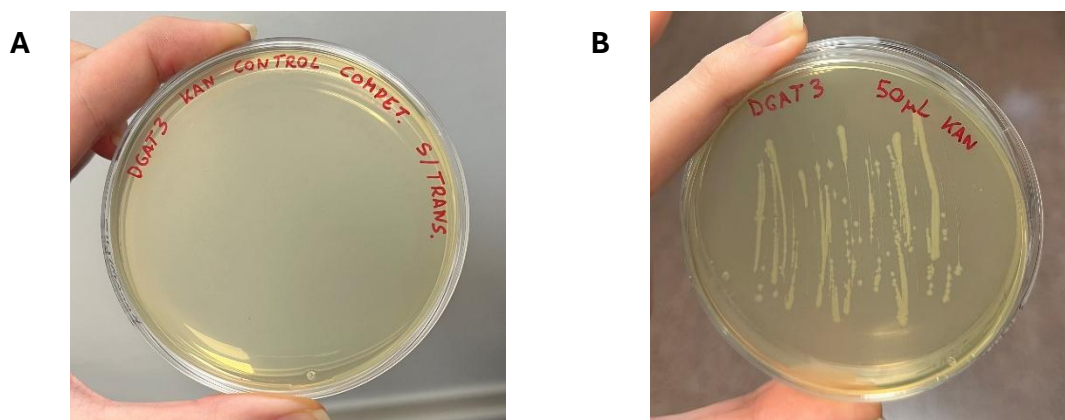


Figura 2. Placas LB Agar suplementadas con Kanamicina. A: placa control, células competentes sin transformar. B: placa con células transformadas.

3.2.2. Prueba de inducción

Se llevó a cabo la transformación de las bacterias *E. coli* BL21 de la misma manera que se describe en el punto 3.2.1. Se seleccionó una colonia de la placa de cultivo y se inoculó en 30 mL de medio líquido LB. El cultivo se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de $\sim 0,7$ a 600 nm. Después, se tomaron 10 mL del cultivo y se transfirieron a un tubo estéril. Se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0,5 mM y, posteriormente, el cultivo se incubó a tres temperaturas distintas (20°C, 30°C y 37°C), dos tiempos de inducción diferentes (3 h y 24 h) y con agitación a 200 rpm. Se comprobó que se obtenía una mayor cantidad de proteínas cuando la inducción se realizaba durante toda la noche a 20°C (resultados no mostrados). Una vez pasado el tiempo de incubación, se tomó un volumen de 1 mL del cultivo inducido y se transfirió a un tubo Eppendorf. La muestra se sometió a centrifugación a 15.000 rpm durante 10 minutos en la microcentrífuga refrigerada Hermle Z 216 MK. Se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 150 μ L de tampón 1X de electroforesis (25 mM Tris-Base, 200 mM Glicina y 3,5 mM SDS a pH 8,3). La muestra se sometió a tres ciclos consecutivos de congelación y descongelación para facilitar la lisis celular y, finalmente, se calentó a 100°C durante 5 minutos antes de realizar la electroforesis (punto 3.3.3.) con el objetivo de evaluar la inducción.

3.2.3. Preinóculo

Se utilizó una sola colonia de células transformadas para la inoculación del cultivo, el cual contenía 100 mL de medio LB estéril líquido. Este cultivo fue suplementado por kanamicina (25 $\mu\text{g/mL}$) y glucosa (0,4 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 3) y, posteriormente, se dejó a 30°C durante toda la noche con agitación de 200 rpm.



Figura 3. Matraz donde se introdujo la colonia seleccionada con 100 mL de LB estéril líquido suplementado con kanamicina (25 $\mu\text{g/mL}$) y glucosa (0,4 $\mu\text{g/mL}$).

3.2.4. Inóculo-inducción

Se prepararon dos matraces de 2 L de medio líquido 2xYT. Cada uno de ellos contenía un litro de agua y 36 g de medio (16 g de Triptona, 10 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl). Posteriormente, se llevaron a autoclavar. Una vez autoclavados, a cada matraz se le añadió, en condiciones estériles, 1 mL de kanamicina (stock de 25 mg/L) y 1 mL de glucosa (stock de 0,4 g/L). Después, se añadió 50 mL de preinóculo (Fig. 4) y se dejó crecer en el agitador a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar un valor de $\sim 0,7$ de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.



Figura 4. Matraces utilizados en la preparación del inóculo.

Tras alcanzar la densidad óptica adecuada, se realizó la inducción añadiendo 500 μL de IPTG 1 M y se dejó incubar en agitación durante toda la noche a 20°C y 200 rpm. Pasado este tiempo, los cultivos se sometieron a un proceso de centrifugación en una centrífuga refrigerada

Beckman Coulter Avanti J26-XP con un rotor JA-10 durante 15 minutos, a 6.000 rpm y a una temperatura de 4°C. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se congelaron los pellets.

Antes del proceso de inducción, se preparó un tubo de glicerol-stock mezclando 800 µL de células con 200 µL de glicerol estéril (80%), con la finalidad de almacenar células ya transformadas en nitrógeno líquido.

3.3. Purificación de las proteínas

3.3.1. Resuspensión

El siguiente paso fue la descongelación de los pellets y eliminación de cualquier resto de medio que pudiera quedar en los tubos de centrifuga. Se prepararon 25 mL de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl, 0,1% Tritón, 500 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol y 5 mM imidazol a pH 8,0) por cada litro de cultivo, al que se le añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free ROCHE, 1 pastilla/200 mL). Una vez preparado el tampón, se resuspendieron todos los pellets para, después, sonicar en hielo. En el sonicador Hielscher UP400St (Fig. 5) se realizaron 6 ciclos de 45 segundos a una potencia del 40%. Entre un ciclo y otro se dejó reposar en hielo durante un minuto para evitar que la muestra se calentara.

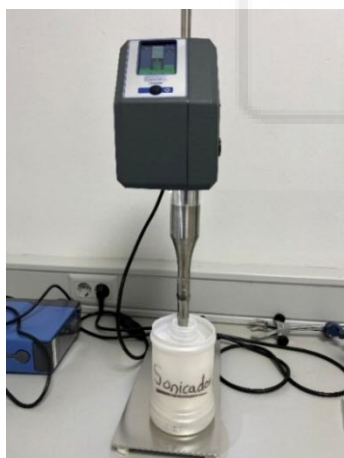


Figura 5. Sonicador Hielscher UP400St, utilizado para romper las células en el proceso de purificación de la proteína.

Posteriormente, se realizó un proceso de centrifugación en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K con el rotor TFT-70 durante 30 minutos a 17.000 rpm y una temperatura de 4°C (Fig. 6).

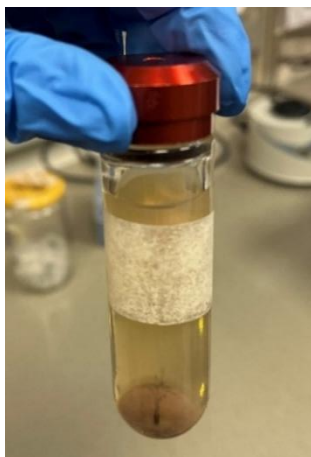


Figura 6. Pellet obtenido tras la centrifugación en la Beckman Coulter Optima L-90K (rotor TFT-70, 30 min, 17.000 rpm, 4°C).

Tras la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido se resuspendió en tampón de cuerpos de inclusión (20 mL por litro de cultivo), el cual contiene 20 mM Tris-HCl, 0,1% Tritón, 500 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, 5 mM imidazol y 7 M urea a pH 8,0.

En el momento en el que el pellet ya había sido resuspendido, fue traspasado a tubos Falcon estériles y se terminó la resuspensión mediante una nueva sonicación. Se realizaron 6 ciclos de 45 segundos cada uno y un minuto de reposo en hielo entre ellos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 17.000 rpm durante 30 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K con rotor TFT-70 para eliminar residuos insolubles (Fig. 7).

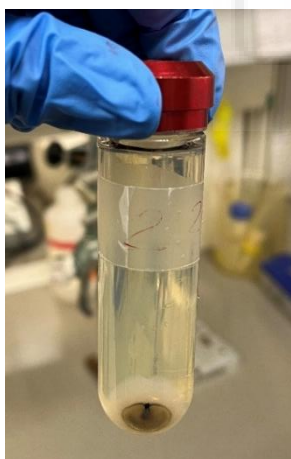


Figura 7. Pellet obtenido tras la centrifugación en la Beckman Coulter Optima L-90K (rotor TFT-70, 30 min, 17.000 rpm, 4°C).

3.3.2. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad se utilizó para separar las proteínas del resto de componentes de la mezcla. El mecanismo se basa en el uso de una “cola” de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína durante la construcción del plásmido. Esta secuencia de histidinas permite la unión específica a una matriz que contiene grupos quelantes de iones Ni^{2+} , el cual forma un complejo de coordinación entre los componentes de la fase estacionaria y el grupo imidazol presente en los residuos de histidina de dicha cola (Fig. 8).

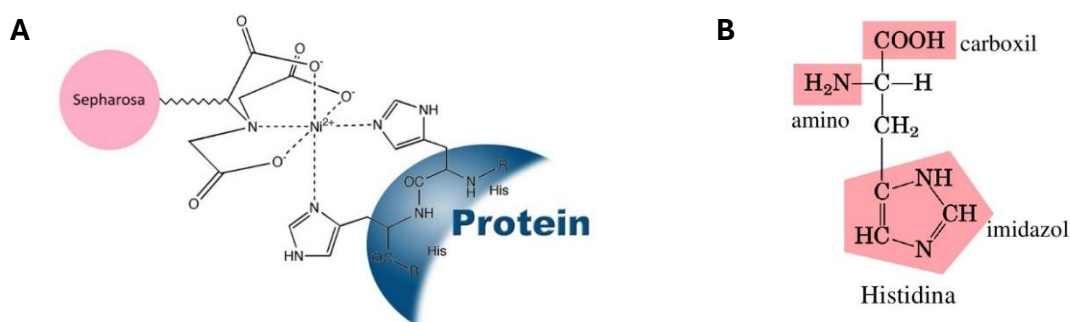


Figura 8. A: esquema explicativo de la interacción de los grupos imidazol de los residuos de la cola de histidinas de la proteína a los grupos quelantes de Ni²⁺ de la resina durante la cromatografía de afinidad. B: estructura del aminoácido histidina, formada por un grupo amino (-NH₂), un grupo carboxilo (-COOH) y un anillo imidazol.

La resina de Ni²⁺-Sepharosa fue mezclada con el sobrenadante de la centrifugación del punto 3.3.1. e incubada en noria durante 30 minutos a 4°C.

Una vez pasado el tiempo de incubación, la mezcla fue traspasada a la columna cromatográfica (columna de vidrio de Bio-Rad) y se dejó decantar por gravedad sin que la resina llegue a secarse. La resina se lavó con tampón de lavado, el cual contiene 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol y 30 mM imidazol a pH 8,0 (Fig. 9).

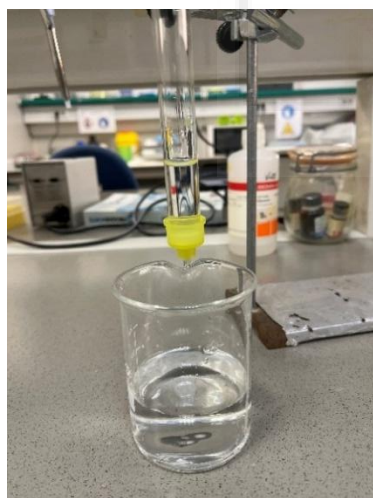


Figura 9. Columna de cromatografía de afinidad durante el proceso de lavado. Las proteínas con alta afinidad al ligando inmovilizado en la columna (Ni²⁺) quedarán retenidas, mientras que las demás quedarán en la fase móvil y se eliminarán en el lavado.

En el momento en el que el tampón de lavado pasado por la columna tuvo una absorbancia menor a 0,001, indicativo de que en la columna no han quedado restos de proteína no unida específicamente, se procedió a eluir la proteína de interés mediante la adición de ~20 mL de tampón de elución, compuesto por 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol y 500 mM imidazol a pH 8,0.

Para separar el imidazol de nuestra proteína, se utilizó un tubo Amicon Ultra-15 de 15 mL, con un tamaño de poro de 10 kDa (Fig. 10). La separación se realizó por centrifugación del mismo

en una centrífuga refrigerada Allegra X-15R, con el rotor SX-4750 a 3.500 rpm durante 40 minutos a 4°C.



Figura 10. A: tubo Amicon Ultra-15 con un volumen de 15 mL. B: esquema explicativo de las partes que componen el tubo Amicon Ultra-15, que son el tapón, el dispositivo filtrante que contiene la membrana y el tubo de centrifuga.

3.3.3. Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). El gel se llevó a cabo para confirmar la presencia de la proteína y determinar su estado. Para una mejor visualización de las bandas de proteína, el gel fue posteriormente teñido con la solución de tinción, la cual contiene metanol, ácido acético y agua en proporciones 5:1:5 y Azul de Coomassie 0,05%. Finalmente, el gel fue desteñido con solución de destinción, que contiene metanol, ácido acético y agua en proporciones 5:1:5.

Las muestras que se cargaron en el gel se prepararon añadiendo la cantidad adecuada de Sample Buffer (SB) 4x con β -mercaptoetanol. A continuación, se incubaron durante 5 minutos a 100°C y, antes de la carga en el gel, se sometieron a centrifugación durante 1 minuto a máxima velocidad.

En este ensayo, las muestras utilizadas fueron las siguientes: marcador de peso molecular (MW, 8 μ L), células BL21 sin inducir (7 μ L + 2,35 μ L SB 4x), BL21 inducidas con IPTG (5 μ L + 1,7 μ L SB 4x), primer sonificado (1/10, 4 μ L + 1,35 μ L SB 4x), sobrenadante (1/10, 7 μ L + 2,35 μ L SB 4x), fracción precipitada (1/10, 5 μ L + 1,7 μ L SB 4x), fracción no retenida en resina (1/10, 5 μ L + 1,7 μ L SB 4x), fracción retenida en resina (1/5, 5 μ L + 1,7 μ L SB 4x), proteína GenScript (10 μ L + 3,35 μ L SB 4x) y proteína GenScript con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) (10 μ L + 3,35 μ L SB 4x).

Las muestras de células BL21 sin inducir y con inducción se obtuvieron según lo descrito en el punto 3.2.2. El resto de las muestras corresponde a distintas diluciones de las fracciones obtenidas durante los diferentes pasos del proceso de purificación.

3.3.4. Western Blot

El *Western Blot* se llevó a cabo para la detección de la proteína DGAT3. Para ello se utilizó el equipo de Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System. El gel, resultado de la electroforesis SDS-PAGE anterior, fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y esta fue bloqueada utilizando una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 3% durante toda la noche en nevera y en agitación orbital. A continuación, se hizo un lavado con 10 mL de TBST (50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl y 0,05% Tween 20 a pH 7,5) durante 15 minutos para eliminar el exceso de bloqueador. Se incubó la membrana con 5 mL del anticuerpo primario Anti-His (Penta-His monoclonal, Qiagen) realizado en ratón, previamente diluido 1:2.000, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Se realizaron dos lavados consecutivos con 10 mL de TBST durante 10 minutos cada uno. Posteriormente, se incubó la membrana con 5 mL del anticuerpo secundario Anti-Mouse, previamente diluido 1:10.000, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Se volvieron a realizar dos lavados consecutivos con 10 mL de TBST durante 10 minutos cada uno. Después, la membrana se incubó durante 15 minutos con buffer AP (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl y 5 mM MgCl₂ a pH 9,5) para activar la reacción de detección. Se añadieron 5 mL de buffer AP con 165 µL de NBT (nitroazul de tetrazolio) y 17 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) para permitir el revelado de la proteína. Se dejó incubar la membrana en oscuridad hasta que la señal se hizo visible y, finalmente, se lavó con agua destilada para detener la reacción enzimática.

3.3.5. Cuantificación de la proteína

Se utilizó la espectroscopía UV-Vis, donde se hizo un barrido desde una longitud de 230 nm hasta 340 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 50 BIO.

En espectroscopía UV-Vis, la luz atraviesa una muestra a una longitud de onda específica dentro del rango ultravioleta o visible del espectro. Si la muestra absorbe parte de esa luz, no toda la luz será capaz de pasar o transmitirse. La transmisión se define como la relación entre la intensidad de la luz que pasa a través de la muestra y la luz incidente, y está vinculada a la absorbancia [21], [22].

La absorbancia puede utilizarse de manera cualitativa para identificar un compuesto, teniendo en cuenta que, por ejemplo, las proteínas absorben a una longitud de onda de 280 nm debido a

la presencia de triptófanos en su estructura. También se puede emplear de forma cuantitativa para determinar la concentración de una muestra, aplicando la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde A es la absorbancia medida a 280 nm, ε es el coeficiente de extinción molar de la proteína ($12.490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l es la medida del paso óptico de la cubeta (1 cm en este caso) y C es la concentración molar de la proteína.

Resulta fundamental realizar el barrido y medir la absorbancia hasta 340 nm, ya que, en principio, las proteínas no absorben a esta longitud de onda, por lo que se espera un valor de absorbancia de 0. Si se detecta absorción en esta región, podría indicar la presencia de turbidez en la muestra, incluso después de haber sido centrifugada. Para corregir este problema, se podría realizar una nueva centrifugación o bien, se podría restar ese valor a la medida de absorbancia de 280 nm.

A partir de este tipo de medidas se determinó que el rendimiento de la purificación de DGAT3 fue de 0,33 mg por cada litro de cultivo.

3.4. Preparación de muestras para estudios en presencia de lípidos

Se colocaron alícuotas con la cantidad correspondiente de lípido en $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) en un tubo de ensayo. Ambos disolventes se eliminaron por evaporación bajo una corriente de nitrógeno libre de O_2 y los posibles residuos se eliminaron posteriormente por vacío en oscuridad durante más de tres horas. A continuación, se añadió la solución que contenía la proteína al lípido seco para obtener la relación molar específica entre lípido y proteína.

La suspensión resultante se agitó en un vórtex para formar vesículas multilamelares grandes (MLVs). Después, la mezcla se sometió a dos ciclos de congelación y descongelación para una completa homogeneización y maximizar la interacción entre la proteína y el fosfolípido. Finalmente, la muestra obtenida se incubó durante diez minutos a una temperatura $\sim 5^\circ\text{C}$ por encima de la temperatura de transición del fosfolípido, con agitación ocasional en vórtex. Los fosfolípidos que se utilizaron fueron DMPC (1,2-dimiristoilfosfatidilcolina) y POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), que son zwitteriónicos y, por tanto, tienen carga neutra al tener grupos con cargas tanto positivas como negativas; y DMPG (1,2-dimiristoilfosfatidilglicerol) y POPG (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol), que son aniónicos, por lo que presentan carga neta negativa.

Para los experimentos de anisotropía de fluorescencia utilizando las sondas 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) o 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH), se emplearon MLVs que contenían DGAT3 y controles sin proteína. El tampón utilizado contenía 50 mM de Tris, 100 mM de NaCl y 5 mM de TCEP a pH 8,0. Se añadió a la suspensión de MLVs la cantidad adecuada de una solución stock de DPH a una concentración de 1,28 mM en dimetilformamida o, en el caso de TMA-DPH, a una concentración de 0,6 mM en dimetilformamida. Después, la solución resultante se incubó a 55°C durante 60 minutos en el caso del DPH y durante 20 minutos para TMA-DPH. La relación molar entre lípido y proteína fue de 100:1, mientras que la relación molar entre el lípido y la sonda fluorescente fue de 500:1.

Para los ensayos de *quenching* en presencia de un modelo de membrana o para los experimentos de *leakage* de vesículas, se prepararon vesículas unilamelares grandes (LUVs) mediante el método de extrusión, utilizando una membrana con un tamaño de poro de 100 nm. Se mezclaron las cantidades necesarias de lípidos disueltos en CHCl₃ y se secaron con N₂. Después, se eliminó el resto de CHCl₃ colocando la muestra en un desecador al vacío durante más de 3 horas. A continuación, en los experimentos de *quenching*, se añadió 1 mL de tampón (50 mM Tris y 100 mM NaCl a pH 8) a la mezcla seca de fosfolípidos y se obtuvieron las MLVs mediante vortex a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron cinco ciclos de congelación/descongelación. La solución resultante se pasó a través de una membrana con poros de 100 nm utilizando el sistema LiposoFast, repitiendo el proceso hasta que la suspensión se volvió transparente, obteniendo así LUVs. Para los experimentos de *leakage*, las MLVs se obtuvieron con el mismo procedimiento, pero utilizando un tampón de 10 mM Tris, 20 mM NaCl, 40 mM carboxifluoresceína (CF) y 0,1 mM EDTA a pH 7,4 para resuspender la mezcla seca de fosfolípidos. Posteriormente, para eliminar la CF no encapsulada, se utilizó una columna de filtración Sephadex G-75, que se lavó y eluyó con un tampón que contenía 10 mM Tris, 100 mM NaCl y 0,1 mM EDTA a pH 7,4. Las membranas con el fluoróforo encapsulado salen primero, y más tarde saldría el fluoróforo libre.

Las composiciones lipídicas de los modelos de membrana utilizados en los experimentos de *quenching*, anisotropía de fluorescencia y *leakage* son las siguientes: la membrana de *Staphylococcus aureus* está compuesta por un 42% de 1',3'-bis[1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo]-glicerol (CL) y un 58% de L- α -fosfatidilglicerol (PG) [23]; la membrana plasmática eucariota está compuesta por un 25% de L- α -fosfatidilcolina (PC), 18% de esfingomielina (SM), 13% de fosfatidiletanolamina (PE), 8% de L- α -fosfatidilserina (PS) y 36% de colesterol (CHO) [24]; la membrana de *Escherichia coli* está compuesta por un 80% de PE, 15% de PG y 5% de CL [25];

la membrana tilacoide, que es la membrana que está dentro del cloroplasto donde se lleva a cabo la absorción de fotones y la transferencia de electrones hasta el receptor final (NADP^+), está compuesta por un 40% de monogalactosildiacilglicerol (MGDG), 30% de digalactosildiacilglicerol (DGDG), 16% de sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) y 14 % de POPG [26].

3.5. Anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia es una técnica utilizada para caracterizar la movilidad rotacional de moléculas en entornos moleculares complejos [27]. Al estar relacionada con la dinámica de rotación de un fluoróforo, ya sea intrínseco o unido a una biomolécula, este ensayo permite detectar cambios en la conformación, orientación, fluidez del entorno y tamaño de las moléculas [28].

La anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de DGAT3, $\langle r \rangle$, se midió utilizando un espectrofluorímetro PicoQuant F300 y se calculó según la siguiente ecuación [29]:

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde I_{VV} e I_{VH} representan las intensidades de fluorescencia (con el blanco sustraído) de la emisión polarizada vertical y horizontal, respectivamente, cuando la muestra es excitada con luz polarizada verticalmente. El valor G corresponde al factor de corrección del instrumento, definido como $G = I_{VH}/I_{HH}$.

Las mediciones se realizaron a 340 nm tras la excitación a 295 nm. Para los experimentos, se empleó una concentración final de 5 μM de proteína en un tampón compuesto por 50 mM Tris, 100 mM NaCl y 5 mM TCEP a pH 8,0.

3.6. Quenching de fluorescencia

En las medidas de fluorescencia de muestras biológicas, el fluoróforo suele encontrarse en disolución. Esto implica la presencia de muchas otras moléculas que pueden interactuar con el fluoróforo. En muchos casos, dichas interacciones provocan una disminución de la emisión de fluorescencia. Este efecto se conoce con el nombre de *quenching* o desactivación de fluorescencia. Lo que sucede es un proceso de desexcitación no radiativa, provocado por una molécula ajena al fluoróforo, que recibe el nombre de desactivador o *quencher* [30].

En este caso, el *quencher* utilizado fue el yoduro (I^-), soluble en medio acuoso. El *quenching* de fluorescencia por yoduro fue examinado en presencia de modelos de membrana. La

concentración de proteína utilizada fue de 5 μ M, mientras que la concentración de LUVs fue de 0,1 mM. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 280 y 320 nm, respectivamente.

Los datos fueron ajustados a la siguiente ecuación [29]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [X] \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde K_{sv} es la constante de Stern-Volmer para el *quenching* colisional, F_0 es la fluorescencia en ausencia de KI (*quencher*) y F es la fluorescencia a cualquier concentración de KI (entre 0 y 0,6 M).

3.7. Leakage

La ruptura de la membrana (*leakage*) y la consecuente liberación de carboxifluoresceína (CF) encapsulada en liposomas se evaluó exponiendo los liposomas cargados con la sonda (con una concentración final de lípido de 0,125 mM) a cantidades específicas de DGAT3 en placas de microtitulación estabilizadas a 25°C. Las mediciones se realizaron utilizando un lector de microplacas, donde cada pocillo contenía un volumen final de 170 μ L.

El medio en las placas de microtitulación se agitó de manera continua para garantizar una mezcla homogénea entre DGAT3 y las vesículas. La liberación de CF se midió a una razón molar aproximada de DGAT3 a lípido de 1:100 y 1:50. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se registraron con longitudes de onda de excitación y emisión de 492 nm y 517 nm, respectivamente.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en tres etapas: primero con los liposomas cargados con la sonda, luego tras la adición de la solución de DGAT3 y, finalmente, después de agregar Tritón X-100 para obtener la liberación total de la sonda (100% de liberación). La liberación de CF se cuantificó en términos de porcentaje (% de liberación) utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ liberación} = \left(\frac{F_t - F_0}{F_{100} - F_0} \right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde F_t es el valor de fluorescencia en equilibrio 15 minutos después de la adición de DGAT3, F_0 es la fluorescencia inicial de la suspensión de vesículas y F_{100} es el valor de fluorescencia tras la adición de Tritón X-100 a una concentración final del 1% [31].

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de la expresión y purificación de DGAT3

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE y un posterior *Western Blot* con el fin de evaluar la expresión y purificación de la proteína DGAT3. Para ello, se fueron obteniendo alícuotas de 1 mL de cada uno de los pasos de los procesos de purificación (Fig. 11A).

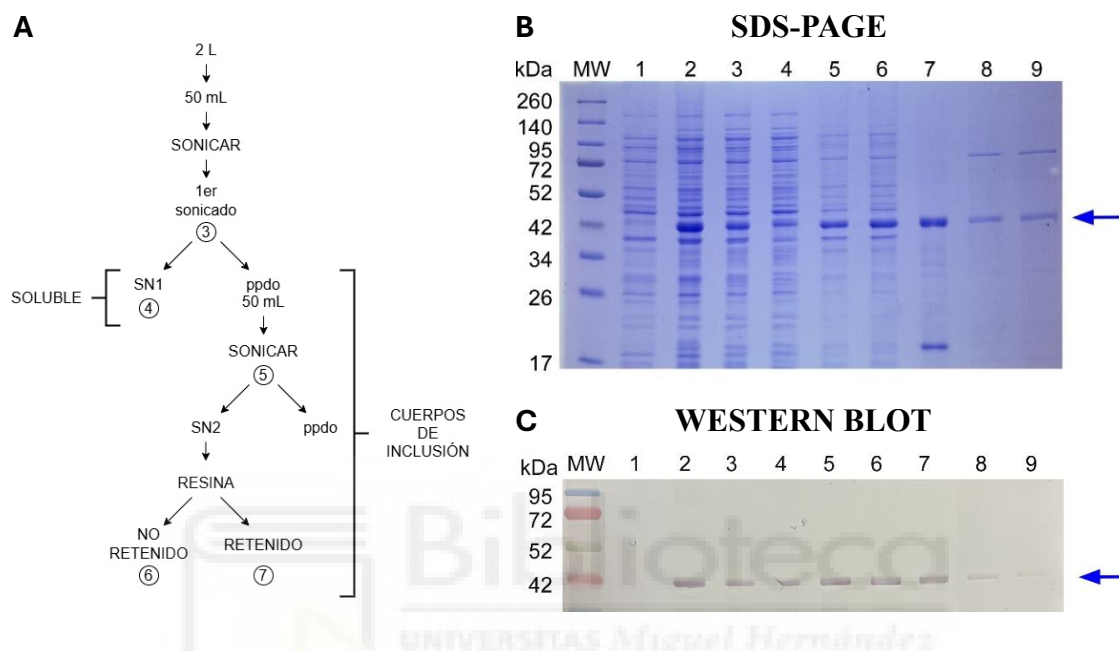


Figura 11. A: Esquema explicativo de la obtención de las muestras utilizadas en la electroforesis SDS-PAGE con cada uno de los pasos de purificación explicados en materiales y métodos. B: gel de electroforesis SDS-PAGE. C: *Western Blot*. Las muestras corresponden a: calle MW: marcador de peso molecular; calle 1: células BL21 sin inducir; calle 2: BL21 inducido con IPTG; calle 3: primer sonificado; calle 4: sobrenadante; calle 5: fracción precipitada; calle 6: fracción no retenida en la resina; calle 7: fracción retenida en la resina; calle 8: proteína GenScript; calle 9: proteína GenScript con TCEP.

En primer lugar, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE, en cuyo gel se observa una banda proteica intensa alrededor de los 42 kDa en las calles de la 2 a la 9 (Fig. 11B). Se sugiere que dicha banda se trata de la proteína DGAT3, cuya masa molecular teórica es de aproximadamente 37,5 kDa. Para confirmar su identidad, se realizó un *Western Blot* utilizando un anticuerpo Anti-His. Se observa la presencia de señal específica correspondiente a DGAT3 en todas las fracciones analizadas, a excepción de la calle 1 (Fig. 11C).

En la calle 2 (BL21 inducido) se observa una clara señal, lo que confirma la expresión de DGAT3 tras la inducción. La presencia de señal en la calle 3 (primer sonificado) indica que la proteína se encuentra en la fracción celular después de la lisis. En la calle 4 (sobrenadante) se detectó una señal ligeramente más débil, lo que sugiere que una fracción menor de la proteína se mantiene en el sobrenadante soluble, mientras que en la calle 5 (precipitado) se observa una

señal un poco más intensa. Esto podría deberse a la formación de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados densos e insolubles de proteínas que se forman dentro de las células. Se forman frecuentemente en bacterias como *E. coli* cuando se sobreexpresan proteínas recombinantes. Para recuperar la proteína es necesaria la utilización de agentes desnaturizantes como la urea [32], [33].

La detección de señal en la calle 6 (fracción no retenida) indica que una proporción de la proteína expresada no se unió de forma eficiente a la resina de afinidad durante la cromatografía. En cambio, en la calle 7 (fracción retenida), la presencia de una señal intensa sugiere que parte de la proteína sí se unió correctamente a la resina de afinidad.

Finalmente, las calles 8 y 9 (proteína de GenScript, sin y con tratamiento con TCEP, respectivamente) también muestran señal, permitiendo comparar y confirmar la presencia de DGAT3 en el resto de las calles.

Estos resultados confirman que la proteína DGAT3 se expresa eficientemente tras la inducción, y que se encuentra tanto en la fracción soluble como en los cuerpos de inclusión. Si bien en la fracción soluble se obtiene proteína, esta no presentaba estabilidad y precipitaba con el tiempo. Por ese motivo, se continuó trabajando con la fracción de cuerpos de inclusión.

4.2. Resultados de GenScript

Además de la purificación de DGAT3 realizada en el laboratorio mediante expresión en *Escherichia coli* BL21, se solicitó a la empresa GenScript la purificación de la misma proteína. A continuación, se presentan los resultados correspondientes a esta última.

Se observa un gel SDS-PAGE y un *Western Blot*. La construcción utilizada fue pET30a, y las condiciones de inducción fueron dos: 16 horas a 15°C y 4 horas a 37°C.

En el gel SDS-PAGE (Fig. 12A) se analizaron distintas fracciones del cultivo: lisado celular total (calles 1 y 2), sobrenadante del lisado celular (calles 3 y 4) y precipitado del lisado celular (calles 5 y 6), en comparación con los controles negativos sin inducción (calles NC, NC₁ y NC₂). Las calles PC₁ y PC₂ corresponden a BSA, utilizada como referencia de concentración proteica y la calle M₁, al marcador de peso molecular.

En el *Western Blot* (Fig. 12B), se detectó la proteína DGAT3 utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His (Mouse-anti-His, GenScript, Cat.No. A00186). Se observaron bandas definidas en las calles 3 y 4, correspondientes al sobrenadante tras inducción durante 16 horas

a 15°C y 4 horas a 37°C, respectivamente, lo que indica que DGAT3 se expresa en su forma soluble.

Por otro lado, las fracciones del precipitado del lisado celular (calles 5 y 6) también muestran presencia de DGAT3 en el SDS-PAGE, aunque con una menor intensidad, lo que indica que una parte de la proteína se podría encontrar en cuerpos de inclusión.

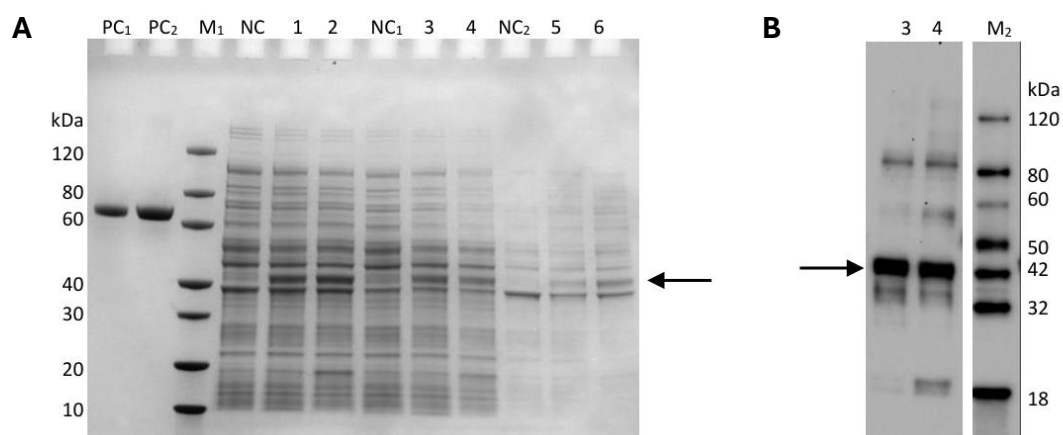


Figura 12. Análisis de la expresión de DGAT3 en *E. coli* BL21 utilizando el vector pET30a. A: gel de electroforesis SDS-PAGE con muestras de cultivo en diferentes condiciones de inducción: PC₁ y PC₂, BSA (1 µg y 2 µg, respectivamente); M₁, marcador de peso molecular; NC, lisado celular sin inducción; calles 1 y 2, lisado celular tras inducción durante 16 h a 15 °C y 4 h a 37 °C, respectivamente; NC₁, sobrenadante del lisado celular sin inducción; calles 3 y 4, sobrenadante del lisado celular con inducción; NC₂, precipitado del lisado celular sin inducción; calles 5 y 6, precipitado del lisado celular tras inducción. B: *Western Blot* de DGAT3 detectada mediante anticuerpo monoclonal anti-His. Se muestran los sobrenadantes del lisado celular correspondientes a las condiciones de inducción 16 horas a 15 °C (calle 3) y 4 horas a 37 °C (calle 4); M₂, marcador de peso molecular para *Western Blot*.

Además de los ensayos realizados experimentalmente, se recibieron datos de la evaluación de la expresión de DGAT3 en *E. coli* por parte de la empresa GenScript. Según este informe, la condición óptima de expresión fue una inducción durante 16 horas a 15°C, alcanzándose una producción de 10 mg por litro de cultivo y una solubilidad del 50%.

4.3. Interacción de DGAT3 con modelos de membrana

Uno de los objetivos del presente trabajo es evaluar si DGAT3 es capaz de interactuar con lípidos, considerando que sus homólogos, DGAT1 y DGAT2 (ambas enzimas integrales de membrana), participan directamente en el metabolismo lipídico a través de este tipo de interacciones. A pesar de que DGAT3 es una proteína soluble, su implicación funcional en el mismo proceso sugiere que también podría presentar alguna forma de interacción con lípidos. Para ello, se utilizan varios métodos: la anisotropía en estado estacionario, el *quenching* o la desactivación de la fluorescencia y la permeabilidad de los liposomas a DGAT3 (*leakage*).

Por otro lado, se pretende analizar si DGAT3 adquiere una conformación “nativa” tras el proceso de renaturalización, ya que en este trabajo la proteína se ha expresado mayoritariamente en forma de cuerpos de inclusión, lo que ha requerido su desnaturalización mediante urea y posterior renaturalización en una columna de afinidad. Para comprobar si el replegamiento ha sido exitoso, se ha comparado la proteína obtenida en el laboratorio con una muestra purificada por la empresa GenScript, la cual fue producida a partir de la fracción soluble del lisado celular, lo que implica que no necesitó ser renaturalizada. En este sentido, un primer indicio es que tanto la proteína soluble purificada por GenScript como nuestra proteína purificada a partir de cuerpos de inclusión presentan el mismo espectro de dicroísmo circular (CD) (resultado no mostrado) [34].

4.3.1. Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario

Para estudiar el efecto de DGAT3 sobre las propiedades estructurales y termotrópicas de las membranas modelo, se llevaron a cabo mediciones de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario utilizando las sondas DPH y TMA-DPH. Estas sondas fueron incorporadas en modelos de membranas zwitteriónicas de DMPC y aniónicas de DMPG, y los análisis se realizaron a lo largo de un rango de temperaturas (Fig. 13).

En cuanto a la localización de las sondas, DPH se sitúa en el centro de la bicapa actuando como sonda interna, mientras que TMA-DPH se expande hacia el exterior de la bicapa lipídica, concretamente entre las posiciones C-5/C-11 de las cadenas acilfosfolipídicas. De esta manera, se obtiene información estructural sobre estas regiones y, por tanto, se precisa el uso de ambas sondas para abordar el orden estructural en bicapas lipídicas [35], [36].

La anisotropía de fluorescencia de las sondas fluorescentes (DPH y TMA-DPH) permite evaluar la fluidez de la membrana. Cuando la membrana presenta una mayor fluidez, la sonda puede rotar más fácilmente. Esta mayor rotación provoca una despolarización de la fluorescencia emitida, lo que da lugar a una disminución en el valor de anisotropía de ambas sondas [37].

Los resultados obtenidos con las membranas zwitteriónicas de DMPC mostraron que la presencia de DGAT3 no tuvo ningún efecto sobre la anisotropía tanto de DPH como de TMA-DPH a temperaturas inferiores y superiores a la temperatura de transición de la fase fosfolipídica. Además, tampoco se observó una influencia de DGAT3 sobre la cooperatividad de la transición de fase gel a líquido cristalino del lípido (Fig. 13A y 13B). Por otro lado, para las membranas aniónicas formadas por DMPG, DGAT3 sí provocó una disminución en la cooperatividad de la transición de fase gel a líquido cristalino del lípido, además de un

desplazamiento de la t_m (Fig. 13C y 13D). La curva de desnaturalización térmica sigue una función sigmoidea, a cuyo punto de inflexión se le conoce como temperatura media de desnaturalización, t_m , que representa la transición entre los dos estados [38], [39].

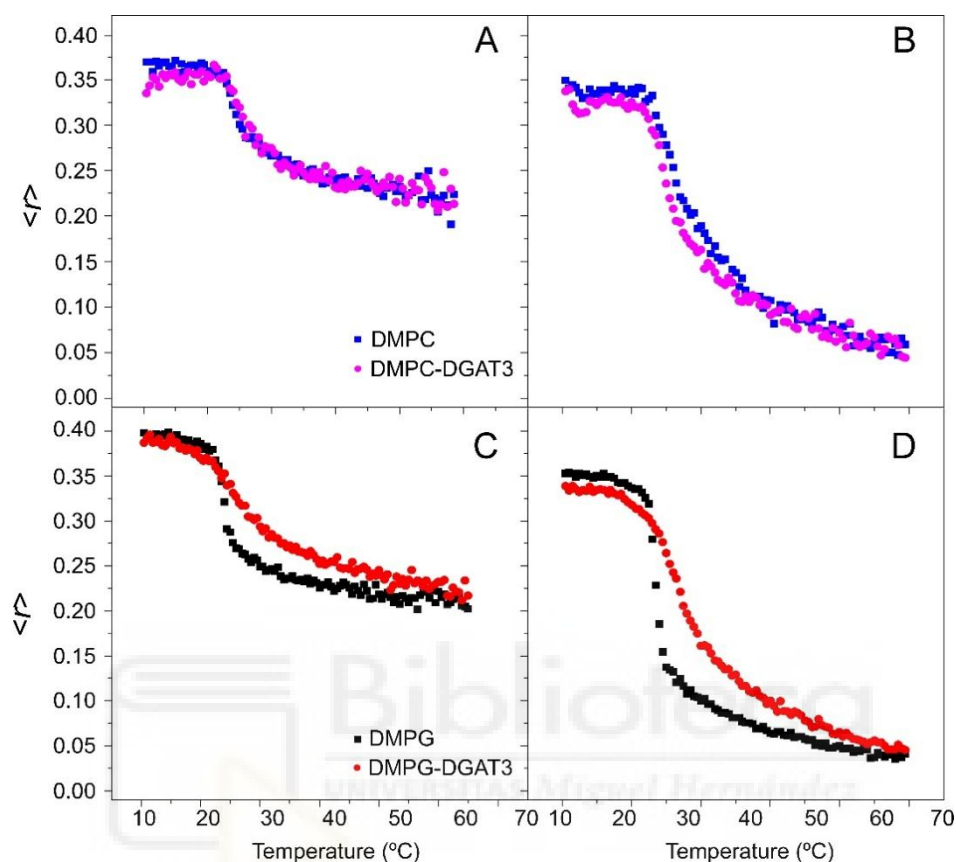


Figura 13. Mediciones de la anisotropía de DGAT3: la anisotropía en estado estacionario $\langle r \rangle$, de TMA-DPH (A y C) y DPH (B y D) incorporada en membranas modelo de DMPC (A y B) y DMPG (C y D) en función de la temperatura. Los datos corresponden a vesículas que contienen fosfolípido puro y fosfolípido con DGAT3 [34].

Otra manera de evaluar la interacción de DGAT3 con lípidos es mediante la medición de la anisotropía de fluorescencia, en este caso a partir de la fluorescencia intrínseca de la proteína, atribuida a los residuos de triptófano presentes en su estructura. Dado que esta señal depende del entorno local y de la movilidad rotacional de la proteína, los cambios observados en la anisotropía pueden reflejar su interacción con lípidos.

En solución acuosa (tampón), el valor de anisotropía de DGAT3 se situaba entre 0,075 y 0,08. Sin embargo, cuando se añadieron vesículas POPG aniónicas, este valor $\langle r \rangle$ aumentó a medida que se incrementaba la concentración lipídica, indicando la interacción de la proteína con la membrana. Así, a altas relaciones [lípidos]/[proteína], la $\langle r \rangle$ se aproximó a un valor límite de 0,095 (Fig. 14). Este valor más alto indicaba una reducción de la movilidad de los triptófanos en presencia de membranas POPG y, por tanto, interacción con este lípido [29].

Aunque la variación de la anisotropía del triptófano fue relativamente discreta en presencia de POPG, no se observó ningún cambio significativo en la anisotropía del triptófano en presencia de membranas modelo zwitteriónicas de POPC (Fig. 14). Este resultado muestra que no hubo interacción DGAT3/lípido cuando se utilizó POPC.

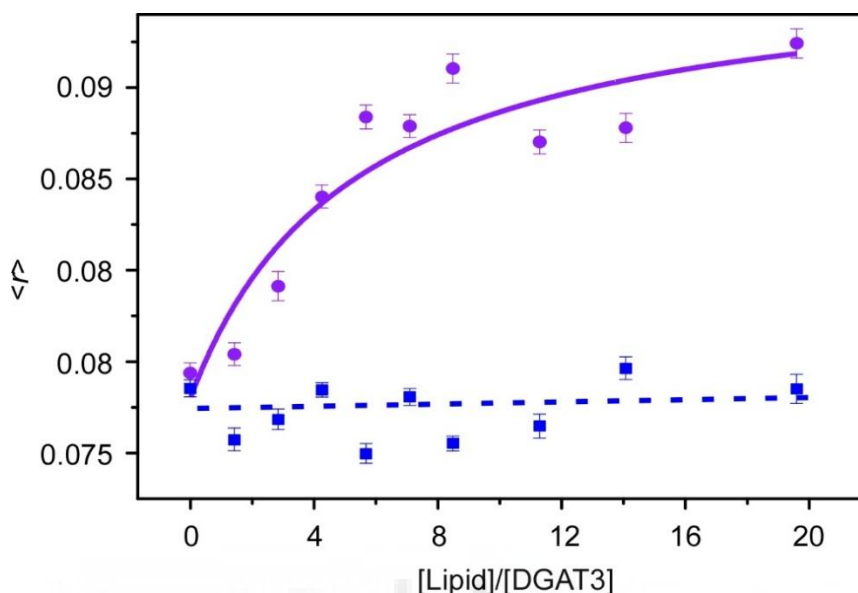


Figura 14. Medidas de anisotropía dependientes de POPC y POPG: anisotropía en estado estacionario de DGAT3 en función de la relación [lípido]/[proteína] cuando el lípido es POPC (azul) y POPG (púrpura). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 290 y 340 nm, respectivamente. La línea continua para POPG es el ajuste de los datos. La línea de puntos se ha trazado como guía para el ojo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres mediciones independientes [34].

4.3.2. *Quenching* o desactivación de la fluorescencia

La capacidad de los residuos de triptófano de DGAT3 para acceder a la bicapa lipídica se evaluó midiendo el *quenching* de fluorescencia mediante yoduro de potasio (KI). Si los triptófanos se insertan en el núcleo hidrofóbico de la bicapa, deberían ser menos susceptibles a los efectos de un *quencher* soluble, como es el KI. Por lo tanto, una menor desactivación de la fluorescencia indicaría que el fluoróforo se encuentra enterrado en el núcleo hidrofóbico de la bicapa [29].

Para este análisis, se utilizaron dos lípidos sintéticos, incluyendo zwitteriónicos (POPC) y aniónicos (POPG), así como membranas modelo con diversas composiciones lipídicas. Estas incluían membranas plasmáticas de *E. coli* y células eucariotas, las cuales presentan un alto contenido en lípidos zwitteriónicos, y membranas de *S. aureus* y tilacoides de cloroplasto, que tienen un alto contenido en lípidos aniónicos.

Comparando con el control (DGAT3 aislada en tampón), se observó una disminución de la relación I_0/I_q al mezclar la proteína con liposomas, lo que indica que los triptófanos están menos

expuestos al *quencher* (KI) y que, por tanto, la intensidad de fluorescencia I_q es mayor en presencia de lípido que en tampón. Este efecto fue evidente cuando DGAT3 estaba tanto con liposomas de POPC como de POPG, aunque fue más notable para POPG (Fig. 15A).

Cuando la DGAT3 se incubó con membranas modelo, se produjo una reducción significativa del *quenching* en presencia de liposomas que imitaban las membranas de los tilacoides (donde se producen las reacciones de la fotosíntesis dependientes de luz), y de membranas de *S. aureus* (Fig. 15B). Por otro lado, no hubo ningún efecto sobre el *quenching* cuando la proteína estaba en presencia de liposomas que imitaban las membranas plasmáticas de *E. coli* o de eucariotas (Fig. 15B).

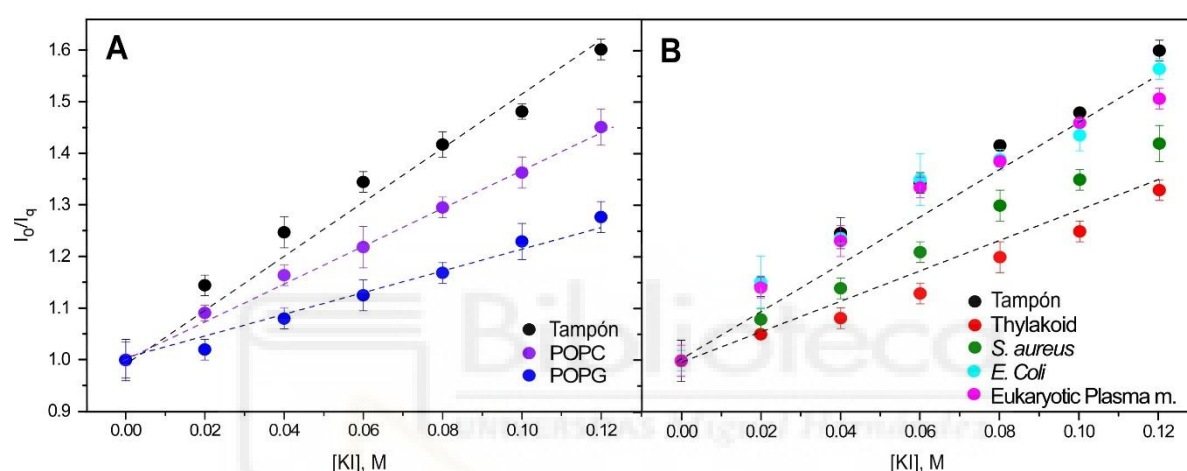


Figura 15. Gráficos de Stern-Volmer: *quenching* de triptófanos de DGAT3 por KI en tampón o incorporado en LUVs de POPC o POPG (A) o diferentes modelos de membrana (B). Las líneas de puntos se han trazado para guiar la vista. Las barras de error indican la desviación estándar de tres mediciones independientes [34].

4.3.3. Efecto de DGAT3 en la permeabilidad de los liposomas (*leakage*)

La capacidad de DGAT3 para alterar la permeabilidad de la membrana se analizó mediante la observación de *leakage* de carboxifluoresceína (CF), un fluoróforo encapsulado en vesículas unilamelares grandes (LUVs).

Los resultados obtenidos revelaron que la liberación de CF de los liposomas dependía de la composición lipídica de las vesículas, y que la DGAT3 inducía la liberación con eficacia variable. La figura 16 muestra los resultados de los experimentos realizados con cuatro liposomas distintos: membrana plasmática de eucariotas, *E. coli*, *S. aureus* y membranas de los tilacoides de cloroplastos.

A una relación $[\text{lípido}]/[\text{DGAT3}]$ de 100, la liberación de carboxifluoresceína fue de aproximadamente un 20% en los liposomas de *S. aureus* y de tilacoides. Sin embargo, en los

liposomas compuestos por lípidos de membrana plasmática eucariota y de *E. coli*, el *leakage* se mantuvo alrededor del 5%.

Cuando se añadió más proteína, alcanzando una relación [lípid]/[DGAT3] de 50, el porcentaje de liberación de carboxifluoresceína (*leakage*) aumentó hasta aproximadamente un 40% en los liposomas compuestos por lípidos de *S. aureus* y un 30% en los de tilacoides. En cambio, para los liposomas formados a partir de lípidos de membranas plasmáticas eucariotas o de *E. coli* se mantuvo una liberación en torno al 5%.

Por lo tanto, se observó que el *leakage* fue mayor en los liposomas formados por *S. aureus* y lípidos de tilacoides, mostrando una relación dosis-respuesta, mientras que en los compuestos por membranas plasmáticas eucariotas y de *E. coli*, el efecto fue mucho más limitado (Fig. 16).

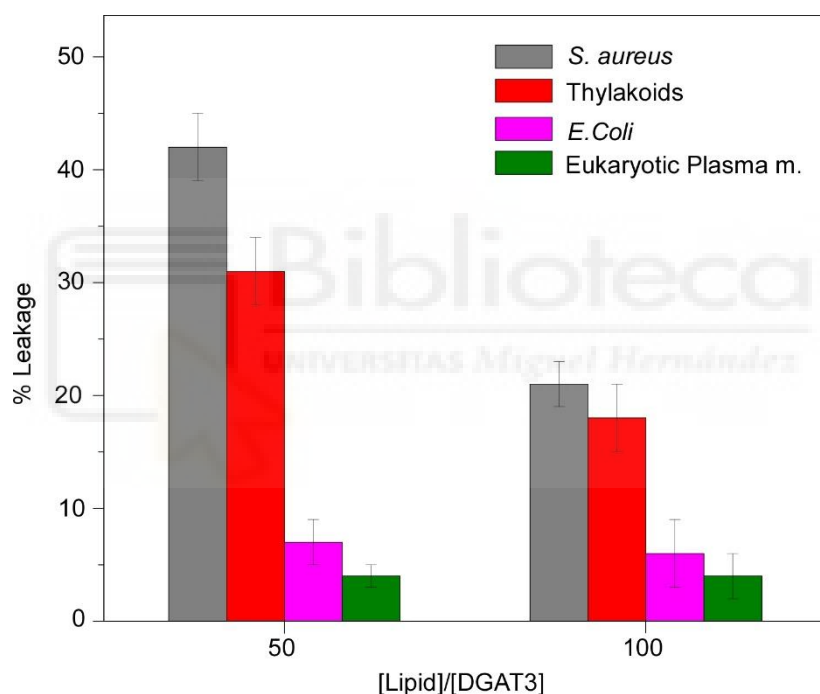


Figura 16. Experimentos de *leakage*: los datos de *leakage* para LUVs compuestas de diferentes modelos de membrana se obtuvieron en presencia de DGAT3. El experimento se realizó a dos relaciones diferentes de [lípid]/[proteína]. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes [34].

5. DISCUSIÓN

El análisis de la expresión y purificación de DGAT3 mostró que esta proteína no se expresa de manera basal en *E. coli* BL21, ya que no se detectó señal en la muestra no inducida (Fig. 11C, calle 1). Esto confirma que su expresión es dependiente de la inducción, en este caso mediante IPTG. Respecto a la presencia de señal en la fracción no retenida (Fig. 11C, calle 6), esta indica que una parte de la DGAT3 expresada no se unió a la resina de la cromatografía de afinidad. Esto podría explicarse por la acumulación de la proteína en cuerpos de inclusión, lo cual puede alterar la exposición de la cola de histidinas, necesaria para la interacción con la resina, de manera que esta esté oculta o mal expuesta, impidiendo su interacción. Por ello, la proteína requiere de un tratamiento con agentes desnaturalizantes, como la urea, para ser solubilizadas adecuadamente. A pesar de esto, la fracción retenida (Fig. 11C, calle 7) mostró una señal intensa, lo que indica que la purificación fue eficaz.

Cabe destacar que, aunque la mayor parte de la DGAT3 se recuperó a partir de los cuerpos de inclusión, también se detectó proteína en la fracción soluble (Fig. 11C, calle 4), sin embargo, esta fracción mostró una menor estabilidad, puesto que precipitaba con el tiempo. Se ha demostrado mediante la técnica de dicroísmo circular que tanto la fracción soluble como la no soluble de DGAT3 presentan la misma estructura secundaria [34].

Al analizar la diferencia entre la cantidad de DGAT3 obtenida por GenScript (~10 mg/L) y la obtenida en este trabajo (0,33 mg/L), se podrían plantear varias explicaciones. En el caso de GenScript, la empresa estimó la cantidad de proteína expresada usando un gel SDS-PAGE y comparando la intensidad de la banda correspondiente a DGAT3 con una cantidad conocida de proteína seroalbúmina bovina (BSA). Este método podría ser útil como referencia, pero puede no ser preciso, ya que la intensidad de la banda puede variar dependiendo del tipo de proteína. En nuestro caso, la cuantificación se realizó mediante espectroscopía UV-Vis, utilizando la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm asociada a los residuos de triptófano presentes en la estructura proteica, y aplicando la ley de Lambert-Beer para calcular la concentración.

Además, en nuestro gel SDS-PAGE se observan dos bandas en las dos muestras correspondientes a la proteína purificada por GenScript (Fig. 11B, calles 8 y 9), lo que podría indicar la presencia de impurezas o fragmentos de la proteína. Sin embargo, en nuestro *Western Blot*, realizado con un anticuerpo Anti-His, solo se detecta una de esas bandas, sugiriendo que únicamente esa banda corresponde a DGAT3. Por otro lado, en el *Western Blot* proporcionado por GenScript se aprecian ambas bandas, lo que podría deberse a diversos factores que aún no han sido determinados, como diferencias en las condiciones experimentales o en la sensibilidad

del anticuerpo utilizado, entre otros. Es importante destacar que, al analizar la proteína purificada por GenScript con nuestro anticuerpo Anti-His, la banda de mayor peso molecular no se detectó, lo que indicaría que esa banda es en realidad una impureza y no parte de la proteína DGAT3.

Una vez obtenida la proteína, se procedió a evaluar su interacción con membranas modelo mediante diferentes técnicas biofísicas.

En primer lugar, los ensayos de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario utilizando las sondas DPH y TMA-DPH permitieron estudiar la organización estructural de las bicapas lipídicas en presencia de DGAT3. Las curvas obtenidas con ambas sondas mostraron alteraciones similares (Fig. 13), lo que indica que la interacción de DGAT3 con los modelos de membrana lipídica no se restringe a una única región de la membrana. Además, mediante la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano de DGAT3, también se evaluó su capacidad de interacción con distintos tipos de lípidos. La gráfica obtenida (Fig. 14) mostró que DGAT3 interactúa preferentemente con vesículas formadas por POPG, un lípido aniónico, mientras que no se detectó interacción con los liposomas compuestos por POPC, de naturaleza zwitteriónica.

Complementariamente, los estudios de *quenching* de fluorescencia con yoduro de potasio (KI) permitieron evaluar el grado de exposición de los residuos de triptófano de DGAT3 al medio acuoso. En presencia de vesículas lipídicas aniónicas, como las formadas por POPG o lípidos derivados de *S. aureus* y tilacoides, los triptófanos de DGAT3 eran menos accesibles a I⁻, lo que sugiere que Trp216 y Trp218 estaban protegidos del *quencher* por la asociación con la membrana (Fig. 15). Esto refuerza la hipótesis de que DGAT3 interacciona con la membrana, poniendo en contacto al menos parte de su estructura con la bicapa.

Por último, se estudió el efecto de DGAT3 en la permeabilidad de los liposomas mediante ensayos de *leakage* de carboxifluoresceína. Se observó una liberación del fluoróforo dependiente de la composición lipídica de las vesículas, siendo mayor en los liposomas compuestos por lípidos aniónicos (Fig. 16). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos mediante mediciones de anisotropía de fluorescencia ($\langle r \rangle$) y ensayos de *quenching* con liposomas, sugiriendo que DGAT3 efectivamente interaccionó con lípidos cargados negativamente y que no interacciona o lo hace en menor medida con los zwitteriónicos. Este comportamiento concuerda con la composición lipídica de los tilacoides, que constituyen el

sistema de membranas internas del cloroplasto y están formado por lípidos aniónicos. Por tanto, estos datos demuestran la posible asociación de DGAT3 con compartimentos cloroplásticos.



6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este trabajo, se logró expresar y purificar la proteína DGAT3 de *Chlamydomonas reinhardtii* en *Escherichia coli*, permitiendo estudiar su interacción con modelos de membrana. La comparación con la muestra purificada por la empresa GenScript reveló una notable discrepancia en el rendimiento proporcionado por dicha empresa. A pesar de que nuestros datos indicaron una cantidad de proteína obtenida menor a la estimada por GenScript, se ha confirmado que la DGAT3 purificada en este estudio presenta una estructura similar a la de la proteína soluble y es adecuada para distintos ensayos.

A diferencia de sus homólogos DGAT1 y DGAT2, que son enzimas integrales de membrana ancladas al retículo endoplasmático, DGAT3 carece de dominios transmembrana y actúa como proteína soluble. Esta diferencia estructural sugeriría un mecanismo de acción distinto, basado en interacciones transitorias con membranas específicas. A través de diferentes técnicas, se demostró que DGAT3 puede asociarse con bicapas lipídicas, en particular con membranas compuestas por lípidos aniónicos, ya que mostraba unión tanto a vesículas cargadas negativamente como a membranas que imitan la composición lipídica de los tilacoides, que contienen un alto porcentaje de lípidos aniónicos. Esto refuerza la hipótesis de que DGAT3 participa en rutas alternativas de síntesis de triacilglicéridos dentro del cloroplasto, posiblemente coordinadas con la actividad fotosintética.

Los resultados obtenidos contribuyen a comprender mejor el comportamiento de DGAT3 *in vitro*, y sientan las bases para futuros estudios enfocados en su función en el metabolismo lipídico de organismos fotosintéticos.

Como línea de trabajo futura, sería interesante optimizar el protocolo de expresión y purificación para aumentar el rendimiento de DGAT3, especialmente trabajando con la fracción soluble de la expresión bacteriana. Esto permitiría evitar el uso de agentes desnaturalizantes, favorecer un correcto plegamiento de la proteína y estudiar su actividad.

Además, los resultados obtenidos pueden servir como punto de partida para el desarrollo de estrategias más efectivas orientadas a la producción de TAG en microalgas u otros sistemas fotosintéticos. Esta mejora podría convertirse en una herramienta prometedora para impulsar la sostenibilidad en la producción de biocombustibles.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. dos S. Maraschin *et al.*, “Enzymes of glycerol-3-phosphate pathway in triacylglycerol synthesis in plants: Function, biotechnological application and evolution,” *Prog Lipid Res*, vol. 73, pp. 46–64, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2018.12.001.
- [2] Y. Xu *et al.*, “Properties and Biotechnological Applications of Acyl-CoA:diacylglycerol Acyltransferase and Phospholipid:diacylglycerol Acyltransferase from Terrestrial Plants and Microalgae,” *Lipids*, vol. 53, no. 7, pp. 663–688, Jul. 2018, doi: 10.1002/LIPD.12081.
- [3] J. M. Shockey *et al.*, “Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum,” *Plant Cell*, vol. 18, no. 9, pp. 2294–2313, 2006, doi: 10.1105/TPC.106.043695.
- [4] Z. H. Guo, S. C. Lung, M. F. Hamdan, and M. L. Chye, “Interactions between plant lipid-binding proteins and their ligands,” *Prog Lipid Res*, vol. 86, p. 101156, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2022.101156.
- [5] X. Yin *et al.*, “Genome-Wide Characterization of DGATs and Their Expression Diversity Analysis in Response to Abiotic Stresses in Brassica napus,” *Plants*, vol. 11, no. 9, p. 1156, May 2022, doi: 10.3390/PLANTS11091156/S1.
- [6] A. C. Turchetto-Zolet, A. P. Christoff, F. R. Kulcheski, G. Loss-Morais, R. Margis, and M. Margis-Pinheiro, “Diversity and evolution of plant diacylglycerol acyltransferase (DGATs) unveiled by phylogenetic, gene structure and expression analyses,” *Genet Mol Biol*, vol. 39, no. 4, pp. 524–538, Oct. 2016, doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0024.
- [7] J. Xue *et al.*, “Functional Characterization of Soybean Diacylglycerol Acyltransferase 3 in Yeast and Soybean,” *Front Plant Sci*, vol. 13, p. 854103, May 2022, doi: 10.3389/FPLS.2022.854103/BIBTEX.
- [8] X. R. Zhou, P. Shrestha, F. Yin, J. R. Petrie, and S. P. Singh, “AtDGAT2 is a functional acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase and displays different acyl-CoA substrate preferences than AtDGAT1,” *FEBS Lett*, vol. 587, no. 15, pp. 2371–2376, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2013.06.003.

- [9] X. Chi *et al.*, “Cloning and functional analysis of three diacylglycerol acyltransferase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.),” *PLoS One*, vol. 9, no. 9, 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0105834.
- [10] L. Aymé *et al.*, “*Arabidopsis thaliana* DGAT3 is a [2Fe-2S] protein involved in TAG biosynthesis,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1038/S41598-018-35545-7.
- [11] L. Han *et al.*, “Diacylglycerol Acyltransferase 3(DGAT3) Is Responsible for the Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids in Vegetative Organs of *Paeonia rockii*,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 22, p. 14390, Nov. 2022, doi: 10.3390/IJMS232214390/S1.
- [12] V. Katavic *et al.*, “Alteration of Seed Fatty Acid Composition by an Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutation in *Arabidopsis thaliana* Affecting Diacylglycerol Acyltransferase Activity,” *Plant Physiol*, vol. 108, no. 1, pp. 399–409, May 1995, doi: 10.1104/PP.108.1.399.
- [13] S. B. Settlage, P. Kwanyuen, and R. F. Wilson, “Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 75, no. 7, pp. 775–781, Jul. 1998, doi: 10.1007/S11746-998-0225-2.
- [14] V. Andrianov *et al.*, “Tobacco as a production platform for biofuel: Overexpression of *Arabidopsis* DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass,” *Plant Biotechnol J*, vol. 8, no. 3, pp. 277–287, Apr. 2010, doi: 10.1111/J.1467-7652.2009.00458.X.
- [15] S. Saha, B. Enugutti, S. Rajakumari, and R. Rajasekharan, “Cytosolic Triacylglycerol Biosynthetic Pathway in Oilseeds. Molecular Cloning and Expression of Peanut Cytosolic Diacylglycerol Acyltransferase,” *Plant Physiol*, vol. 141, no. 4, p. 1533, 2006, doi: 10.1104/PP.106.082198.
- [16] H. Cao, J. M. Shockey, K. T. Klasson, D. C. Chapital, C. B. Mason, and B. E. Scheffler, “Developmental regulation of diacylglycerol acyltransferase family gene expression in tung tree tissues,” *PLoS One*, vol. 8, no. 10, Jan. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0076946.
- [17] C. Bagnato, M. B. Prados, G. R. Franchini, N. Scaglia, S. E. Miranda, and M. V. Beligni, “Analysis of triglyceride synthesis unveils a green algal soluble diacylglycerol acyltransferase and provides clues to potential enzymatic components of the chloroplast

- pathway,” *BMC Genomics*, vol. 18, no. 1, pp. 1–23, Mar. 2017, doi: 10.1186/S12864-017-3602-0.
- [18] M. de las Mercedes Carro *et al.*, “Expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast diacylglycerol acyltransferase 3 is induced by light in concert with triacylglycerol accumulation,” *Plant J*, vol. 110, no. 1, pp. 262–276, Jan. 2022, doi: 10.1111/TPJ.15671.
- [19] J. L. S. Lopes, L. M. Beltramini, B. A. Wallace, and A. P. U. Araujo, “Deconstructing the DGAT1 Enzyme: Membrane Interactions at Substrate Binding Sites,” *PLoS One*, vol. 10, no. 2, p. e0118407, Feb. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0118407.
- [20] Y. Jin, P. J. McFie, S. L. Banman, C. Brandt, and S. J. Stone, “Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2) and Monoacylglycerol Acyltransferase-2 (MGAT2) Interact to Promote Triacylglycerol Synthesis,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 41, pp. 28237–28248, Oct. 2014, doi: 10.1074/JBC.M114.571190.
- [21] Mettler Toledo, “Espectroscopia ultravioleta-visible: conceptos básicos.” Accessed: Jun. 15, 2025. [Online]. Available: https://www.mt.com/es/es/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html
- [22] Agilent Technologies, “Fundamentos de la espectrofotometría UV-vis,” 2021.
- [23] Masaaki Hayami, A. Okabe, R. Kariyama, M. Abe, and Y. Kanemasa, “Lipid composition of *Staphylococcus aureus* and its derived L-forms,” *Microbiol Immunol*, vol. 23, no. 6, pp. 435–442, 1979, doi: 10.1111/J.1348-0421.1979.TB00483.X.
- [24] G. Van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, “Membrane lipids: where they are and how they behave,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, no. 2, pp. 112–124, Jan. 2008, doi: 10.1038/NRM2330.
- [25] V. W. Rowlett *et al.*, “Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation,” *J Bacteriol*, vol. 199, no. 13, Jan. 2017, doi: 10.1128/JB.00849-16.
- [26] I. Sakurai, J. R. Shen, J. Leng, S. Ohashi, M. Kobayashi, and H. Wada, “Lipids in Oxygen-Evolving Photosystem II Complexes of Cyanobacteria and Higher Plants,” *The Journal of Biochemistry*, vol. 140, no. 2, pp. 201–209, Jan. 2006, doi: 10.1093/JB/MVJ141.

- [27] A. Volpato *et al.*, “Extending fluorescence anisotropy to large complexes using reversibly switchable proteins,” *Nat Biotechnol*, vol. 41, no. 4, pp. 552–559, Apr. 2023, doi: 10.1038/S41587-022-01489-7.
- [28] N. Jain, S. Mukhopadhyay, N. S. Jain Á Mukhopadhyay, and S. Mukhopadhyay, “Applications of Fluorescence Anisotropy in Understanding Protein Conformational Disorder and Aggregation,” *Progress in Optical Science and Photonics*, vol. 2, pp. 41–57, 2015, doi: 10.1007/978-981-287-242-5_3.
- [29] J. R. Lakowicz, “Principles of fluorescence spectroscopy,” *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp. 1–954, 2006, doi: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- [30] J. M. García-Segura, *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*. Síntesis, 1996.
- [31] M. R. Moreno, M. Giudici, and J. Villalaín, “The membranotropic regions of the endo and ecto domains of HIV gp41 envelope glycoprotein,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1758, no. 1, pp. 111–123, Jan. 2006, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2006.01.007.
- [32] S. M. Singh and A. K. Panda, “Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins,” *J Biosci Bioeng*, vol. 99, no. 4, pp. 303–310, Apr. 2005, doi: 10.1263/JBB.99.303.
- [33] E. Krachmarova, I. Ivanov, and G. Nacheva, “Nucleic acids in inclusion bodies obtained from E. coli cells expressing human interferon-gamma,” *Microb Cell Fact*, vol. 19, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2020, doi: 10.1186/S12934-020-01400-6.
- [34] N. Pavia *et al.*, “The Diacylglycerol Acyltransferase 3 of *Chlamydomonas reinhardtii* Is a Disordered Protein Capable of Binding to Lipids Derived from Chloroplasts,” *Biomolecules*, vol. 15, no. 2, p. 245, Feb. 2025, doi: 10.3390/BIOM15020245/S1.
- [35] P. J. Trotter and J. Storch, “3-[p-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl]phenylpropionic acid (PA-DPH): characterization as a fluorescent membrane probe and binding to fatty acid binding proteins,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 982, no. 1, pp. 131–139, Jan. 1989, doi: 10.1016/0005-2736(89)90183-1.
- [36] C. R. Mateo, M. P. Lillo, J. González-Rodríguez, and A. U. Acuña, “Molecular order and fluidity of the plasma membrane of human platelets from time-resolved fluorescence

- depolarization,” *European Biophysics Journal*, vol. 20, no. 1, pp. 41–52, Jan. 1991, doi: 10.1007/BF00183278.
- [37] G. Seydlova *et al.*, “The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 19, pp. 8048–8058, May 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.781559.
- [38] M. L. Renart *et al.*, “Ion binding to KcsA: Implications in ion selectivity and channel gating,” *Biochemistry*, vol. 49, no. 44, pp. 9480–9487, Nov. 2010, doi: 10.1021/bi101235v.
- [39] E. Montoya *et al.*, “Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering the mechanisms of potassium channel selectivity,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1859, no. 5, pp. 779–788, May 2017, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2017.01.014.

