

Rebut: 25 de setembre de 2014
Acceptat: 20 d'octubre de 2014

LIPOSOMES GEGANTS UNILAMEL·LARS: OBTENCIÓ, CARACTERITZACIÓ I APLICACIONS

Salvador Castell, Marta;¹ Pujol Cubells, Montserrat
Departament de Fisicoquímica, Facultat de Farmàcia UB
Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona

Abstract

For a few years, the study of the internal behaviour of the human body has led to investigate in depth the cell and all parts that form it. Many of these studies about cells have focused on a fundamental part: the cell membrane and the lipid bilayer which forms it. For this reason it is necessary to develop tools for the study of lipids that form the cell membrane. The liposomes are membrane models widely used for this purpose. Because of their size, the giant unilamellar vesicles (GUVs) are the most similar to cells.

GUVs, with their cellular mimetism, allow the study of the cell at different levels and in this case we will focus on the distribution of lipids in the bilayer membrane of the cell. Though the cell membrane is a fluid membrane and dynamic as a whole, in recent years, some specific areas called lipid rafts have been studied. Lipid rafts are membrane microdomains formed by cholesterol, sphingomyelin and saturated phospholipids, those domains have a lower fluidity than the other portions of membrane. This fact, allow to differ between different domains in the membrane cells, on one side a fluid phase called liquid disordered phase (Ld) and another phase, much more rigid, called liquid ordered phase (Lo).

This work shows the framework of the uses of GUVs and different fluorescent probes, with preference towards a phase or another, to study lipids as well as is proposed a method for obtaining GUVs and the observation of lipid rafts.

Keywords: liposomes, giant unilamellar vesicles, lipid rafts, fluorescent probes.

Resumen

Desde hace años, el estudio del funcionamiento interno del cuerpo humano ha llevado a la investigación en profundidad de la célula y de todas las partes que la conforman. Muchos de estos estudios sobre la célula se han centrado en una parte fundamental: la membrana celular y la bicapa lipídica que la forma. Por esta razón, es necesario desarrollar herramientas que permitan el estudio de los lípidos que conforman la membrana celular. Los liposomas son modelos de membrana ampliamente utilizados con este fin. Debido a su tamaño, los liposomas gigantes unilamelares (GUV) son los más parecidos a las células.

Los GUV, con su mimetismo celular, han permitido estudiar el comportamiento celular en distintos niveles, centrándonos en este caso en la distribución de los lípidos dentro de la bicapa celular. Aunque la membrana celular es fluida y dinámica en su conjunto, en los últimos años se han estudiado unas zonas particulares llamadas *lipid rafts*. Los *lipid rafts* son microdominios de membrana formados por la presencia de colesterol, esfingomielina y fosfolípidos saturados; estos dominios tienen una fluidez menor que el resto de membrana. Este hecho permite diferenciar una parte de la membrana más fluida, llamada fase líquida desordenada (L_d), y otra parte de la membrana, más ordenada y que se encuentra en forma de fase líquida ordenada (L_o).

En este trabajo se presenta el marco de referencia sobre el uso de GUV y distintas sondas fluorescentes, con preferencia por una fase u otra, para estudiar los lípidos, y asimismo se propone un método de obtención de GUV y la observación de los *lipid rafts* formados.

Palabras clave: liposomas, GUV, *lipid rafts*, sondas fluorescentes.

¹ Graduada en Farmàcia (martasalvador@outlook.com)

Resum

Des de fa anys, l'estudi del funcionament intern del cos humà ha portat a la investigació en profunditat de la cèl·lula i de totes les parts que la conformen. Molts d'aquests estudis sobre la cèl·lula s'han centrat en una part fonamental: la membrana cel·lular i la bicapa lipídica que la forma. Per això, cal desenvolupar eines que permetin l'estudi dels lípids que conformen la membrana cel·lular. Els liposomes són models de membrana àmpliament utilitzats amb aquesta finalitat. A causa de la seva grandària, els liposomes gegants unilamel·lars (GUV) són els més semblants a les cèl·lules.

Els GUV, amb el seu mimetisme cel·lular, han permès estudiar el comportament cel·lular en diferents nivells, centrant-nos en aquest cas en la distribució dels lípids dins de la bicapa cel·lular. Tot i que la membrana cel·lular és fluida i dinàmica en el seu conjunt, en els últims anys s'han estudiat unes zones particulars anomenades *lipid rafts*. Aquests són microdominis de membrana formats per la presència de colesterol, esfingomielina i fosfolípids saturats; aquests dominis tenen una fluïdesa menor que la resta de membrana. Aquest fet permet diferenciar una part de la membrana més fluïda, anomenada fase líquida desordenada (L_d), i una altra part de la membrana, més ordenada i que es troba en forma de fase líquida ordenada (L_o).

En aquest treball es presenta el marc de referència sobre l'ús de GUV i diferents sondes fluorescentes, amb preferència per una fase o una altra, per estudiar els lípids, i es proposa un mètode d'obtenció de GUV i l'observació dels *lipid rafts* formats.

Paraules clau: liposomes, GUV, *lipid rafts*, sondes fluorescentes.

1. Introducció

1. 1. Membranes biològiques

Les membranes biològiques tenen un paper bàsic en l'estructura i la funció de les cèl·lules. Les envolten i delimiten, creant així una barrera de permeabilitat selectiva. La seva estructura bàsica consta d'una bicapa lipídica, formada per fosfolípids, que actua com a suport, i en la qual s'insereixen nombroses molècules com a canals iònics, receptors químics, transportadors, bombes iòniques, enzims que generen segons missatgers, proteïnes de reconeixement i de connexió amb altres cèl·lules o proteïnes que serveixen de suport a elements del citoesquelet.

L'últim model acceptat va ser descrit el 1972 per Jonathan Singer i Garth Nicolson, i defineix l'organització de la membrana plasmàtica com un mosaic fluid que conté diverses proteïnes introduïdes en una matriu de fosfolípids, tal com mostra la Figura 1 (Singer i Nicolson, 1972).

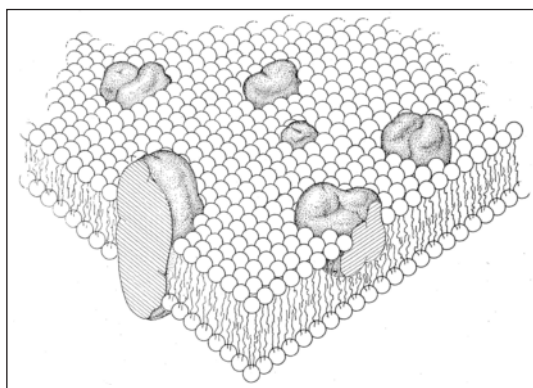


Figura 1. Model de mosaic fluid de la membrana plasmàtica, vista esquemàtica en tres dimensions. Els cossos sòlids amb superfícies puntejades representen les proteïnes integrals globulars (Singer i Nicolson, 1972).

Els lípids són un conjunt de molècules orgàniques compostes principalment de carboni i hidrogen i en menor proporció d'oxigen, encara que també poden tenir fòsfor, sofre i nitrogen. Tenen com a característica principal ser insolubles a l'aigua i solubles en dissolvents orgànics; cal tenir en compte que els lípids són biomolècules molt diverses.

Els principals lípids que formen part de les membranes biològiques són fosfolípids, glicoglicerolípids, esfingolípids i esterols. Els fosfolípids estan formats per una molècula de glicerol-3-fosfat amb dos àcids grassos esterificats al carboni C_1 i C_2 .

Els fosfolípids a la membrana formen una bicapa lipídica amb els caps polars dirigits cap a l'exterior i les cues hidrofòbiques a l'interior de la bicapa. La Figura 2 és una representació de l'estructura dels fosfolípids i la seva formació en la bicapa lipídica.

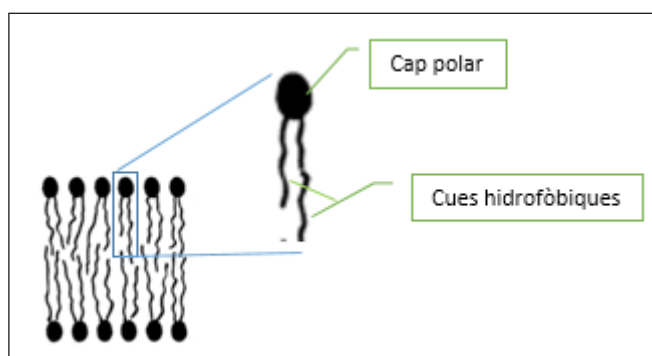


Figura 2. Estructura dels fosfolípids.

Els fosfolípids, com totes les molècules de caràcter amfifílic, poden classificar-se, segons la càrrega del seu cap polar, com a aniònics (cap polar carregat negativament), catiònics (cap polar carregat positivament), zwitteriònics (el cap polar pot tenir la càrrega negativa i la positiva depenent del medi) i no iònics (el cap polar no té càrrega).

A la membrana cel·lular trobem la presència de colesterol, que és un lípid però té una estructura molt diferent de la dels fosfolípids. És un esteroide format per la unió de quatre anells hidrocarbonats; a un extrem se li uneix una cua hidrocarbonada i a l'altre un grup hidroxil, com mostra la Figura 3.

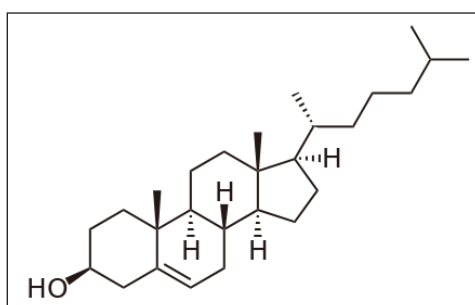


Figura 3. Fórmula estructural del colesterol.

El descobriment en els darrers anys de zones més ordenades en la bicapa lipídica anomenats *lipid rafts* (Rietveld *et al.*, 1998), o bases lipídiques en català, ha convertit la membrana cel·lular en quelcom més complicat que allò descrit per Singer i Nicolson (1972).

1.2. Liposomes

Els liposomes són vesícules submicroscòpiques amb una cavitat central aquosa envoltada per una o més capes lipídiques que es troben separades per espais aquosos. Tenen una estructura de membrana similar a les biològiques, i per això s'utilitzen àmpliament com a models de membrana. No obstant això, també tenen aplicació, entre d'altres, com a sistemes de transport per a l'alliberació controlada de medicaments, en l'administració d'agents terapèutics i en teràpies contra el càncer (Rietveld *et al.*, 1998).

Es pot dir que tenen grans perspectives de futur, perquè a la seva funcionalitat i versatilitat d'utilització se li ha d'afegir el fet que els seus components tenen una baixa toxicitat, no són irritants, són biodegradables i poden incorporar una gran varietat de fàrmacs, tant de naturalesa hidròfila (dins del seu interior aquós) com de naturalesa hidròfoba (al mig de la membrana).

En el comportament dels liposomes hi influeixen diversos factors, com ara la composició química, el nombre de làmines, la mida i el volum intern. És per això que cal utilitzar mètodes de preparació que produeixin liposomes ben definits.

Les propietats dels liposomes són la permeabilitat, la càrrega superficial, l'empaquetament i les transicions de la bicapa lipídica. Aquesta última intervé en la fluïdesa o mobilitat de la bicapa lipídica, i depèn de la temperatura.

La mobilitat de la bicapa lipídica es basa en les transicions de fase dels caps i de les cues dels fosfolípids, que són especialment útils per a la caracterització dels liposomes. Així, a baixes temperatures, els fosfolípids es troben en un estat gel cristal·lí, estructura gairebé rígida, en què la seva mobilitat és restringida. En augmentar la temperatura es produeix una pretransició de fase relacionada amb l'augment de la mobilitat rotacional dels caps lipídics i l'aparició d'ondulacions a la superfície dels liposomes. A una determinada temperatura es produeix una transició en la mobilitat de les cues dels fosfolípids; el procés es mostra esquematitzat en la Figura 4. És una transició termotròpica en l'estructura laminar de la bicapa cap a un estat líquid cristal·lí, en el qual la fluïdesa és major; es produeix un increment en la llibertat rotacional i en l'àrea per lípid de les cadenes d'àcids grassos de la bicapa. La temperatura de la transició de fase en la qual les cadenes d'àcids grassos es fonen es coneix com T_m .

La formació de liposomes es produeix a una temperatura superior a la T_m dels lípids que en formen part, és per això que la temperatura és un punt crític i molt important. Aquesta temperatura depèn de les propietats fisicoquímiques de la bicapa i de la naturalesa del medi.

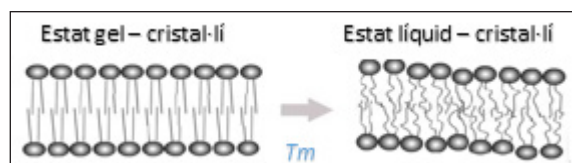


Figura 4. Representació de la transició de la fase gel-cristal·lina a la fase líquid-cristal·lina.

1.2.1. Classificació dels sistemes liposòmics

Els liposomes poden ser classificats per la seva forma i mida. Poden estar constituïts per una simple bicapa o per múltiples bicapes concèntriques. Es poden definir:

- *Liposomes multilamel·lars grans (MLV)*. La seva mida sol ser major d'algunes micres. Cada liposoma està format per diverses làmines concèntriques de fosfolípids en les quals el compartiment aquós està molt reduït. Es formen simplement per la dispersió dels fosfolípids en un medi aquós.
- *Liposomes unilamel·lars petits (SUV)*. Tenen un diàmetre comprès entre 25 i 50 nm, segons la força iònica del medi i la composició de lípids de la membrana. Contenen una única bicapa, i normalment s'obtenen per sonicació dels MLV.
- *Liposomes unilamel·lars grans (LUV)*. Són vesícules amb una única bicapa i presenten un diàmetre d'entre 50 i 1000 nm. Un mètode d'obtenir-ne és per extrusió dels MLV.
- *Liposomes unilamel·lars gegants (GUV)*. Són els liposomes descrits més recentment (Hotani *et al.*, 1999). Estan constituïts per una sola bicapa per vesícula i presenten un diàmetre major d'una micra; sol estar comprès entre 25 i 100 micres. Poden ser visualitzats per un microscopi òptic, la qual cosa els fa molt útils per a l'estudi de la membrana cel·lular.

La Figura 5 és una representació dels diferents tipus de liposomes segons el diàmetre.

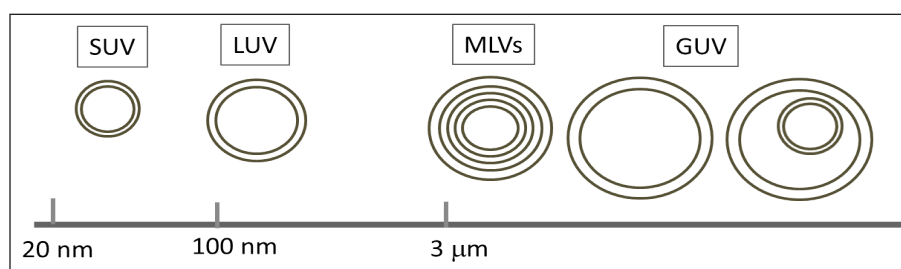


Figura 5. Representació esquemàtica de la classificació dels liposomes segons el seu diàmetre.

En un esforç d'entendre i expandir els coneixements dels processos biològics i bioquímics que porta a terme el cos humà, des de fa uns anys fins a l'actualitat ha crescut l'interès i l'esforç en la creació i manipulació de cèl·lules artificials, i és en aquest punt on intervenen els GUV, per la seva gran similitud amb les membranes cel·lulars (Evans *et al.*, 1990) i la possibilitat d'estudiar els dominis cel·lulars (Wesolowska *et al.*, 2009)

2. Objectiu

El treball que es presenta té dos objectius principals: la revisió bibliogràfica dels *lipid rafts* i dels GUV per tal de definir el marc de referència, per un costat, i l'obtenció experimental de GUV per a la visualització de microdominis ordenats mitjançant la microscòpia confocal, per l'altre.

3. Marc teòric

3.1. Aplicacions dels GUV

La principal característica dels GUV, que els han convertit en tema d'estudi, és la seva similitud a la cèl·lula; s'hi assemblen tant per la membrana, que és una bicapa lipídica, com per la seva mida i el seu interior aquós (Sandre *et al.*, 1999; Holopainen *et al.*, 2000). Aquesta similitud permet estudiar les propietats i l'estructura de la membrana, com per exemple la seva curvatura (Baumgart *et al.*, 2003; Staneva *et al.*, 2005).

Poder veure els liposomes al microscopi i amb altres tècniques ha permès l'estudi dels mecanismes de formació cel·lular (Angelova *et al.*, 1986; Inaoka *et al.*, 2007); també és un model acceptat per a l'observació directa al microscopi d'interaccions de l'ADN amb membranes lipídiques (Angelova *et al.*, 1999) i de les interaccions de proteïnes que no són de membrana, com la DNasa i RNasa, amb la membrana lipídica (Fischer *et al.*, 2000).

El model cel·lular que ens aporten els GUV també permet observar les interaccions del citoesquelet amb la membrana cel·lular (Saitoh *et al.*, 1988; Honda *et al.*, 1999), la reconstitució de danys a la membrana cel·lular (Gözen *et al.*, 2003), la incorporació de proteïnes de membrana (Kahya *et al.*, 2001) i investigar diferents reaccions enzimàtiques (Jesorka *et al.*, 2005).

Les seves aplicacions continuen creixent any rere any. Per exemple, els GUV també s'emprenen per investigar el mecanisme d'electroporació (Riske *et al.*, 2005), la polimerització del DNA (Shonda *et al.*, 2006), la síntesi de RNA (Fischer *et al.*, 2002) i fins i tot fer estudis sobre la microcompartimentació (Long *et al.*, 2005; Markstrom *et al.*, 2007).

A part de tots aquests usos, és important la utilització d'aquests liposomes en reaccions en cadena de la polimerasa (Oberholzer *et al.*, 1995) i com a sistema d'alliberació de fàrmacs (Kono *et al.*, 2001).

Finalment, cal destacar que els GUV, per la seva similitud amb la membrana cel·lular, són els sistemes d'elecció en l'observació dels diferents dominis de membrana marcats amb sondes fluorescents (Zhao *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2010; Betaneli *et al.*, 2012).

3.2. Mètodes d'obtenció de GUV

Actualment, es poden diferenciar dos mètodes principals per a l'obtenció de GUV: un mètode basat en la rehidratació i l'altre en l'electroformació.

El primer mètode per a l'obtenció dels liposomes gegants va ser el descrit per Reeves i Dowben l'any 1969 (Reeves *et al.*, 1969). Aquesta metodologia està basada en la rehidratació, amb aigua destil·lada, d'una fina capa de fosfolípids. En la publicació, la metodologia està molt ben detallada, fet que permet una bona reproductibilitat. Com a punt crític del mètode es troba l'agitació de la solució; tal com els autors descriuen, «s'ha de vigilar de no distorsionar o agitar la solució» (Reeves *et al.*, 1969), perquè si s'agita es formen liposomes multilaminars, i llavors ja no hi pot haver conversió cap als GUV, atès que no és favorable energèticament (Gruner *et al.*, 1985).

Com en la gran majoria de mètodes, i aquest no és una excepció, s'han publicat estudis posteriors afegint-hi característiques necessàries, tal com la necessitat que hi hagi un 10% de lípids carregats (Akashi *et al.*, 1996) o si no, que hi hagi la presència de cations alcalins divalents al medi (Akashi *et al.*, 1998) per a la correcta formació dels GUV. Aquest mètode també es pot utilitzar amb fosfatidilcolines zwitteriòniques (com el

DOPC) sempre que el film lipídic es formi juntament amb monosacàrids com la glucosa, la manosa o la fructosa (Akashi *et al.*, 1996).

Bàsicament, el mètode de rehidratació per a la formació de GUV es basa en passos senzills però que tenen punts crítics, com per exemple la temperatura (Morales *et al.*, 2010; Betaneli *et al.*, 2012). El primer pas d'aquest mètode és formar un film de lípids amb el rotavapor (Sánchez-Martín *et al.*, 2011) o mitjançant nitrogen (Reeves *et al.*, 1969). Un cop tots els dissolvents orgànics estan correctament evaporats i ja no hi queden traces de dissolvents orgànics, s'ha de rehidratar amb el tampó o bé amb aigua destil·lada, i es deixa durant un cert temps, un mínim de 24 hores, per sobre de la *T_m*.

L'altre mètode àmpliament reproduït és l'electroformació, descrit per primer cop per Angelova i Dimitrov l'any 1986 (Angelova *et al.*, 1986). En aquest mètode s'utilitza un corrent elèctric estàtic (DC) i es fa passar per un vidre recobert d'òxid d'estany i indi (ITO, per les seves sigles en anglès). Posteriorment, l'any 1992, el mateix grup investigador va aplicar un canvi al mètode, i en lloc d'utilitzar corrent estàtic van emprar un corrent elèctric alternat (AC) (Angelova *et al.*, 1992); així es força les molècules a moure's, i aquest fet ajuda que es formi la bicapa lipídica (Politano *et al.*, 2010).

El mètode d'electroformació (Angelova *et al.*, 1986) també té limitacions, ja que els GUV no es formen si la mescla lipídica té una alta concentració de lípids carregats. Tampoc permeten l'encapsulació de molècules grans solubles en aigua, com els enzims (Okumura *et al.*, 2007), i a més formen llargues i fines connexions amb els elèctrodes.

Tant la rehidratació com l'electroformació són mètodes acceptats per a la formació de GUV; són mètodes que es complementen l'un amb l'altre, i per això són molt comparats entre ells. La Taula 1 mostra de forma esquematitzada la comparativa duta a terme per Rodríguez N (Rodríguez *et al.*, 2005).

Tant el mètode de l'electroformació com el de la rehidratació han tingut diverses modificacions per tal de millorar-los o adaptar-los a les necessitats de la recerca plantejada. Un exemple és el mètode descrit per Moscho i el seu equip l'any 1996 (Moscho *et al.*, 1996), en què modifiquen el mètode de rehidratació per disminuir el temps del procés. Així i tot, l'electroformació ha estat el mètode més escollit en els diferents estudis al llarg dels anys, però també ha patit diverses variacions (Kuribayashi *et al.*, 2006; Okumura *et al.*, 2011; Estes *et al.*, 2005) i millores específiques, com exemple poder formar els GUV amb altes concentracions de sals (Yamashita *et al.*, 2002).

Taula 1. Comparació entre els dos mètodes principals per obtenir GUV

Mètode de Reeves i Dowben³³	Mètode d'Angelova <i>et al.</i>¹⁴
60% de vesícules defectuoses.	80% de vesícules sense defectes.
Menor control sobre els liposomes formats.	Mida de les vesícules més controlades.
Mètode senzill i ús de material habitual en un laboratori.	Mètode més complex amb necessitat de material específic.
Material fàcil de netejar.	Dificultat per netejar correctament la cambra on es formen els liposomes.

Cal esmentar que, complementant els dos mètodes principals per a la formació de GUV, existeixen altres mètodes, com per exemple fer sèries de congelació i escalfament (Oku *et al.*, 1983), utilitzar films d'agarosa (Horger *et al.*, 2009) o altres gels (Weinberger *et al.*, 2013), i fins i tot emprar fonts de calor (Billerit *et al.*, 2011), com ara la infraroja, per a la seva formació (Billerit *et al.*, 2012).

3.3. Lipid rafts

En estudis sobre l'extracció de lípids a partir de detergents no iònics es va observar que hi havia unes fraccions específiques de lípids que tenien resistència a aquests detergents (Brown *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1997). Aquest fet va portar a la hipòtesi de l'existència de microdominis d'esfingolípid (Rietveld *et al.*, 1998; Simons *et al.*, 1997) que es coneixen amb el nom de *lipid rafts*.

Els *lipid rafts* s'han definit com microdominis de la membrana plasmàtica formats per fosfolípids, esfingomielina i colesterol que es troben situats a la part exterior de la membrana i connectats als fosfolípids i al colesterol per la part interna de la bicapa lipídica que forma la membrana cel·lular (Simons *et al.*, 2002). En aquests dominis es donen interaccions intermoleculars entre els diferents components, incloent-hi forces de Van der Waals, entre les cadenes llargues i saturades de l'esfingomielina i els esfingolípid i també ponts d'hidrogen (Simons *et al.*, 1997), que juntament amb les interaccions amb el colesterol porten a pensar que totes aquestes interaccions són la raó de la seva resistència als detergents.

Tant el colesterol com la ceramida, que és la base de l'esfingomielina, se sintetitzen al reticle endoplasmàtic; seguidament els esfingolípid es formen a l'aparell de Golgi (Van Meer *et al.*, 1989), que és on se sintetitzen els *raft* (Brown *et al.*, 1998). Tot seguit, els *lipid rafts* es mouen de l'aparell de Golgi cap a la membrana plasmàtica (Mukherjee *et al.*, 2000).

Aquestes associacions que formen els *lipid rafts* a la membrana plasmàtica no eliminen per complet la seva fluïdesa, però són formacions més ordenades que es troben embolcallades dins de la membrana cel·lular. La disminució de fluïdesa que s'observa es deu a la cadena hidrocarbonada d'esfingosina que forma l'esfingomielina i a l'alta rigidesa del colesterol, que estan en contraposició amb la flexibilitat aportada per les insaturacions dels fosfolípids (Brown *et al.*, 1998).

Així, a les membranes biològiques podem trobar dos tipus diferents de fases lipídiques. Una fase, denominada fase líquida desordenada (L_d), on les cadenes dels lípids estaran molt desordenades i per tant hi haurà un moviment de major fluïdesa. L'altra fase és la fase de líquid ordenat (L_o), on les cadenes lipídiques, per l'acció de l'esfingomielina i el colesterol, estaran molt empaquetades i per tant la difusió de les molècules serà menor. La Figura 6 mostra aquest concepte de forma més visual.

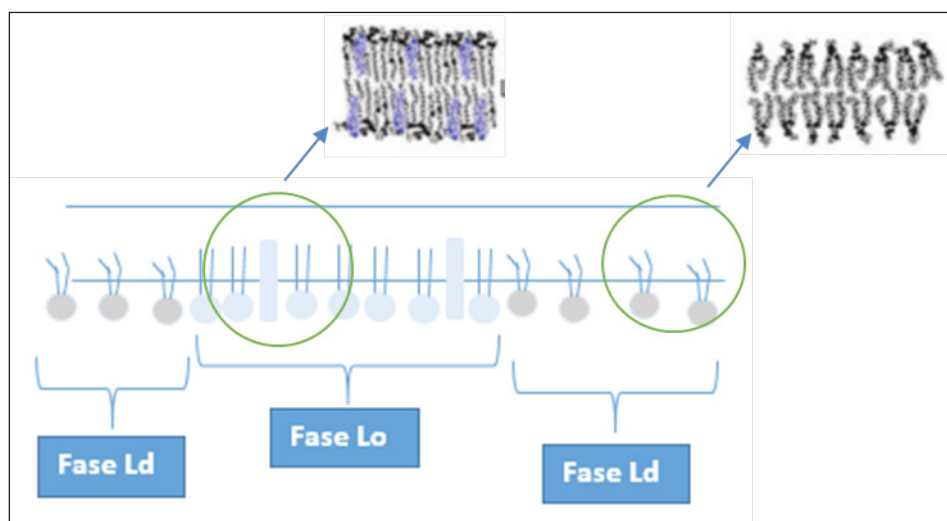


Figura 6. Esquema d'un domini *raft* i la seva organització.

En aquests dominis ordenats hi ha associacions estables entre esfingolípid i colesterol que intervenen en un elevat nombre de funcions (Mukherjee *et al.*, 2000):

- Centres d'organització per a l'assemblatge de molècules de senyalització (Cinek *et al.*, 1992).
- Influeixen sobre la fluïdesa de la membrana (Mukherjee *et al.*, 2000).
- Proteïnes de membrana (Mukherjee *et al.*, 2000).
- Regulació de la neurotransmissió (Mukherjee *et al.*, 2000).
- Tràfic de membrana (Simons *et al.*, 1988).

El principal problema d'aquests dominis cel·lulars és que el colesterol és tòxic però a la vegada és necessari per mantenir els dominis *raft* junts. Si els nivells de colesterol a la cèl·lula no estan correctament controlats (Simons *et al.*, 2000), això porta a un desequilibri en la concentració de colesterol cel·lular que pot desencadenar una sèrie de malalties com l'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, la hipertensió, l'aterosclerosi o l'asma (Simons *et al.*, 2002). A més, s'ha vist que aquests microdominis permeten les infeccions d'alguns virus, com per exemple del virus de la influència (Scheiffele *et al.*, 1999).

Tots aquests estudis i el descobriment dels *lipid rafts* han fet pensar que la membrana plasmàtica no és tan fluida i dinàmica com en un primer terme es pensava (Singer i Nicolson, 1972), sinó que existeixen dominis de membrana (Mukherjee *et al.*, 2004) que porten a una estructura de la membrana cel·lular més complexa. Tot i això, aquesta no pot ser una afirmació feta en ferm, ja que l'evidència de la presència dels *lipid rafts* en cèl·lules de membrana intactes és inconclusiva.

3.4. Observació dels lipid rafts

Actualment, els *lipid rafts* s'observen a través de mètodes microscòpics, però anteriorment, abans d'aquesta tècnica, s'utilitzaven mètodes indirectes, com per exemple la resistència als detergents (Brown *et al.*, 1992) o colocalització (Thomas *et al.*, 1994).

Recentment s'utilitza microscòpia de fluorescència per a l'observació directa de la coexistència de diferents fases en les membranes dels GUV que contenen mesclades de lípids saturats, lípids insaturats i colesterol (Dietrich *et al.*, 2001; Samsonov *et al.*, 2001; Veatch *et al.*, 2005). Aquest mètode té com a principal avantatge que es poden observar directament les membranes i que les diferents fases es poden estudiar amb un major control (Veatch *et al.*, 2003).

Les tècniques per a l'observació dels *lipid rafts* han evolucionat de manera ràpida; actualment es poden utilitzar diferents tècniques per a l'observació de microdominis de lípids (Lagerholm *et al.*, 2005), com per exemple imatges de microscòpia d'intensitat de fluorescència (Malinska *et al.*, 2003) o a partir d'imatges de microscòpia de vida de fluorescència (Becker *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).

3.5. Sondes fluorescentes

La identificació de diferents dominis en la membrana lipídica és possible gràcies a la preferència de fases (líquid ordenada o líquid desordenada) de determinades sondes fluorescentes (Klausnert *et al.*, 1980; Loura *et al.*, 2000).

La majoria d'anàlegs fluorescents de lípids tenen una forta preferència cap a la fase líquida desordenada (L_d). Per contra, alguns hidrocarburs policíclics aromàtics fluorescents amb un anell pla en la seva estructura tenen preferència cap a la fase de líquid ordenat (L_o) (Baumgart *et al.*, 2007), que és la fase rica en colesterol i esfingomielina. Combinar aquests marcadors fluorescents permet l'estudi dels *lipid rafts*.

Taula 2. Preferència de fase de diferents sondes per a una barreja lipídica de SM/DOPC/Chol

Sonda fluorescent	Preferència de fase
Dil Cm:0	L_d
Dil C18:1	L_d
Fast DiO	L_d
Bodipy PC	L_d
DPPE	L_d
NBD-Chol	L_d
Naftopirè	L_o
Terrilè	L_o
Colestatrienol	L_o
Perilè	=
Rubicè	=
DPH	=

Tot i això, s'ha de vigilar, ja que un parell de sondes complementàries en una mescla lipídica pot ser totalment diferent en una altra mescla lipídica; per exemple, les sondes de cadenes saturades de dialquilindocarbocianines di-*alquil*-carbocianines (conegudes com a Dil Cm:0, on *m* és el nombre de carbonis), canvien el seu domini preferencial segons si al sistema hi ha esfingomielina o no (Baumgart *et al.*, 2007). La Taula 2 exposa diferents sondes i la seva preferència de fase segons els estudis duts a terme per Baumgart T.

4. Part experimental

4.1. Materials

4.1.1. Instrumentació

- Balança Sartorius Analytic B-310S de precisió de 10^{-4} o 10^{-5} grams.
- Balança electrònica de precisió Precisa 40 SM-200A.
- Agitador mecànic model AT-1 (de SBS Instruments, SA).
- Bany d'ultrasons model TRANSSONIC DIGITALS (Laboratori Elma).
- Sistema Mili-Q plus de Millipore (resistivitat de 18 M Ω -9).
- Micropipetes Gilson de 20, 200 i 1000 μ l.
- Nevera Liebherr model tròpic a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$.
- Congelador Liebherr Premium a $-28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$.
- Rotavapor R-210 (Buchi Laboratory Equipment).
- Bany Maria Univeba.
- Portaobjectes de microscopi ($\pm 26 \times 76$ mm) d'O. Kindler GmbH.

- Cobreobjectes de vidre (20 x 20 mm) Deltalab.
- Microscopi confocal espectral Leica TCS-SPE.

S'ha utilitzat Agarosa del tipus IX-A de punt de fusió ultrabaix de Sigma-Aldrich i greix de segellat Apiezon del tipus N.

4.1.2. Dissolvents i reactius

Els dissolvents i reactius utilitzats han estat: cloroform (Cl_3CH) i metanol (MeOH), ambdós de la marca Merck. Altres dissolvents que s'han utilitzat han estat etanol (Alcohols Montplet, SL) i aigua bidestil·lada.

4.1.3. Lípids

Els lípids d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al.USA) utilitzats han estat:

- 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) PM= 677,95 g/mol.
- 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DMPG) PM= 689,01 g/mol.
- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) PM = 786,20 g/mol.
- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS) PM = 810,03 g/mol.

Els que s'han obtingut de Sigma-Aldrich han estat:

- **N-acil-4-esfingenil-1-O-fosforilcolina** (esfingomielina del rovell d'ou de gallina [eSM]) PM= 731,08 g/mol.
- **3 β -hidroxi-5-coleste** (colesterol) PM = 386,65 g/mol.

4.1.4. Barreges lipídiques

- DMPC/DMPG (9:1)
- DOPC/DOPS /SM /Chol (3:2:2,5:2,5)

4.1.5. Sondes fluorescentes

- Rodamina (Rho) de Sigma-Aldrich.
- 1,1'-Didodecyl-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorat (Dil C12 [3]) de Life Technologies.

4.2. Obtenció de GUV

El mètode principal que es va seguir va ser el descrit per Sánchez-Martín (Sánchez-Martín *et al.*, 2011) que principalment és una modificació del mètode de la rehidratació (Reeves *et al.*, 1969) per a l'obtenció de GUV.

En primer lloc, es van preparar dues dissolucions, lípid 10 mM en cloroform i glucosa 20mM en metanol. Es van introduir 50 µl de lípid, 250 µl de glucosa i 0,6% molar de rodamina-PE en un flascó, i la mescla es va evaporar al rotavapor per formar un film homogeni. Seguidament, es va assecar sota vapor de nitrogen durant una hora. Un cop la pel·lícula lipídica va estar completament seca, es va rehidratar amb 2 ml d'aigua destil·lada i es va deixar a 40 °C durant 24 h per a la formació de GUV.

Per a l'observació de *lipid rafts* es va seguir el mateix procediment, però amb unes petites modificacions. Per una banda, es van utilitzar els lípids en una concentració inferior (5 mM), es va utilitzar DilC12 (3) per a la seva observació (atracció per les zones de L_d) (Baumgart *et al.*, 2007), i finalment el medi líquid es va fixar al portaobjectes fent la gelidificació d'una solució d'agarosa (2%) en aigua. La barreja utilitzada va ser la següent:

- 50% d'una barreja 3:2 de DOPC/DOPS.
- 0,25% d'esfingomielina.
- 0,25% de colesterol.

5. Resultats

Seguint la metodologia descrita, es van obtenir liposomes de DMPC i DMPC:DMPG d'una mida considerablement gran (Figura 7 A i 7 B), la majoria d'aproximadament 10 µm de diàmetre, encara que també se'n van formar alguns de més grans (Figura 8).

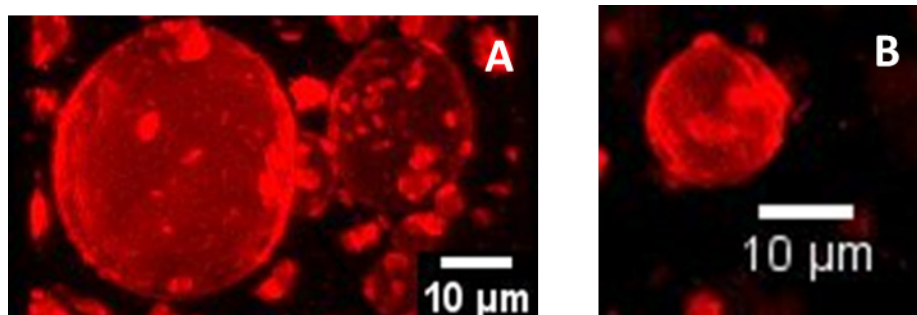


Figura 7. Imatge en 3D d'un grup de GUV de DMPC: A i d'un GUV aïllat.

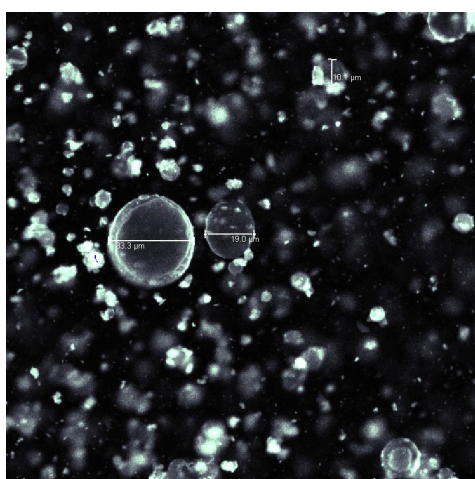


Figura 8. Visió general de l'observació de GUV de DMPC al microscopi confocal.

La presència de *lipid rafts* es pot apercebre en la Figura 9. On es presenten imatges de GUV formades per DOPC/DOPS/SM/Chol (30/20/25/25) es poden advertir zones fosques, on la sonda DilC12 (3) no dona senyal de fluorescència. Són zones que corresponen a líquid ordenat; estan senyalades amb una fletxa sobre la Figura 9.

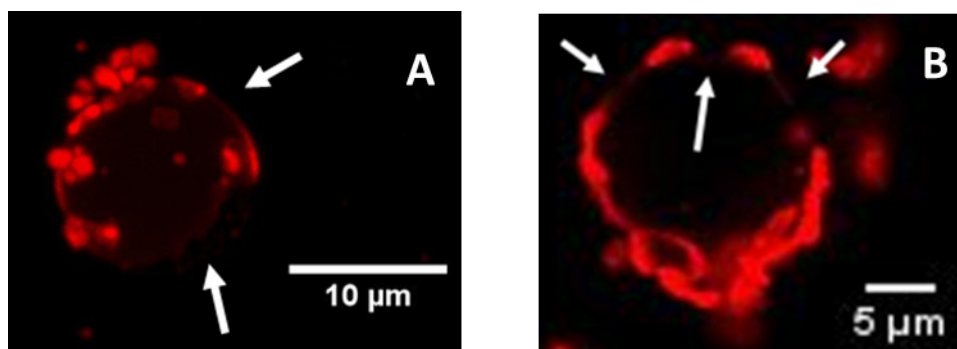


Figura 9. Imatges d'un pla de diferents liposomes de DOPC/DOPS/SM/Chol (30, 20, 25, 25). Les zones sense marcar estan assenyalades, són les zones L_o . a) La barra d'escala és de 10 μm . b) La barra d'escala és de 5 μm .

Nota: Totes les imatges mostrades en aquest apartat han estat obtingudes pel microscopi confocal Leica TCS-SPe situat a la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. Un cop obtingudes, les imatges han estat visualitzades amb el programa de processament d'imatges digital de domini públic anomenat Fiji.

6. Conclusions

L'establiment del marc de referència ha permès constatar la utilitat dels GUV com a models de membrana per estudiar l'organització de la membrana cel·lular, ja que permeten visualitzar el comportament dels lípids que la conformen. S'ha constatat l'existència de diferents dominis en la membrana cel·lular, anomenats *lipid rafts*. Mitjançant la microscòpia de fluorescència s'ha evidenciat la seva forma i mida, així com la complexitat de l'emplaçament dels lípids que els conformen a la bicapa lipídica.

El mètode de rehidratació suau per obtenir GUV és un mètode eficaç i senzill, però cal el control precís de diferents factors, com la temperatura i el temps de rehidratació.

Experimentalment, s'ha proposat un mètode de rehidratació per a l'obtenció de GUV i la seva posterior observació al microscopi de fluorescència. Ha resultat òptim per a composicions de la membrana amb fosfolípids saturats a més del colesterol i l'esfingomielina, mentre que cal seguir optimitzant el procediment, en el cas que els fosfolípids siguin insaturats, ja que s'ha observat que les vesícules més grans n'encapsulen d'altres de més petites.

7. Bibliografia

AKASHI, K., MIYATA, H., ITOH, H. *et al.* (1996) «Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope». *Biophysical journal*, 71, 6, pp. 3242-3250.

- (1998) «Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion». *Biophysical journal*, 74, 6, pp. 2973-2982.
- ANGELOVA, M. I., DIMITROV, D. (1986) «Liposome electroformation». *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81, pp. 303-311.
- ANGELOVA, M. I., HRISTOVA, N., TSONEVA, I. (1999) «DNA-induced endocytosis upon local microinjection to giant unilamellar cationic vesicles». *European Biophysical journal*, 28 (2), pp. 142-150.
- ANGELOVA, M., SOLEAU, S., MELEARD, P. *et al.* (1992) «Preparation of giant vesicles by external a.c. electric fields. Kinetics and applications». *Progress in Colloid and Polymer Science*, 89, pp. 127-131.
- BAUMGART, T., HESS, S. T., WEBB, W. W. (2003) «Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension». *Nature*, 425, 6960, pp. 821-824.
- BAUMGART, T., HUNT, G., FARKAS, E. *et al.* (2007) «Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes». *Biochimica et biophysica acta*, 1768, 9, pp. 2182-2194.
- BECKER, W., BERGMANN, A., HINK, M. A. *et al.* (2004) «Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single photon counting». *Microscopy Research and Technique*, 63, 1, pp. 58-66.
- BETANELI, V., WORCH, R., SCHWILLE, P. (2012) «Effect of temperature on the formation of liquid phase-separating giant unilamellar vesicles (GUV)». *Chemistry and Physics of Lipids*, 165, 6, pp. 630-637.
- BILLERIT, C., WEGRZYN, I., JEFFRIES, G. *et al.* (2011) «Heat-induced formation of single giant unilamellar vesicles». *Soft Matter*, 7, 20, pp. 9751-9757.
- BILLERIT, C., JEFFRIES, G., ORWAR, O. *et al.* (2012) «Formation of giant unilamellar vesicles from spin-coated lipid films by localized IR heating». *Soft Matter*, 8, 42, pp. 10823- 10826.
- BROWN, D. A., LONDON, E. (1997) «Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes?». *Biochemical and biophysical research communications*, 240, 1, pp. 1-7.
- (1998) «Functions of lipid rafts in biological membranes». *Annual review of cell and developmental biology*, 14, pp. 111-136.
- BROWN, D. A., ROSE, J. K. (1992) «Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface». *Cell*, 68, 3, 533-544.
- CHEN, Y. E., PERIASAMY, A. (2004) «Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization». *Microscopy Research and Technique*, 63, pp. 72-807.
- CINEK, T., HOREJSI, V. (1992) «The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases». *Journal of immunology*, 149, 7, pp. 2262-2270.
- DIETRICH, C., BAGATOLLI, L., VOLOVYK, Z. *et al.* (2001) «Lipid rafts reconstituted in model membranes». *Biophysical journal*, 80, 3, pp. 1417-1428.
- ESTES, D., MAYER, M. (2005) «Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber». *Biochimica et biophysica acta*, 1712, 2, pp. 152-160.
- EVANS, E., RAWICZ, W. (1990) «Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes». *Phys. Rev. Lett.*, 64, pp. 2094-2097.
- FUJI (ImageJ) [Versió per a escriptori]. Disponible a: <fiji.sc>.
- FISCHER, A., FRANCO, A., OBERHOLZER, T. (2002) «Giant vesicles as microreactors for enzymatic mRNA synthesis», *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 3, 5, pp. 409-417.
- FISCHER, A., OBERHOLZER, T., LUISI, P. L. (2000) «Giant vesicles as models to study the interactions between membranes and proteins». *Biochim Biophys Acta*, 1467, pp. 177-188.
- GÖZEN, I., ORTMEN, B., POLDSALU, I. (2013) «Repair of large area pores in supported double bilayers». *Soft Matter*, 9, 10, pp. 2787-2792.
- GRUNER, S. M., LENK, R. P., JANOFF, A. S. *et al.* (1985) «Novel multilayered lipid vesicles: comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles». *Biochemistry*, 24, 12, pp. 2833- 2842.

- GUISÁN, J. (2006) *Immobilization of Enzymes and Cells*. New Jersey, Humana Press, vol. 22, 2a ed.
- HAMADA, T., MIURA, Y., ISHII, K. *et al.* (2007) «Dynamic Processes in Endocytic Transformation of a Raft-Exhibiting Giant Liposome». *The journal of physical chemistry*, 111, 37, pp. 10853-10857.
- HOLOPAINEN, J. M., ANGELOVA, M. I., KINNUNEN, P. K. (2000) «Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes». *Bio- phys. J.*, 78, pp. 830-838.
- HONDA, M., TAKIGUCHI, K., ISHIKAWA, S. (1999) «Morphogenesis of liposomes encapsulating actin depends on the type of actin-crosslinking». *Journal of molecular biology*, 287, 2, pp. 293-300.
- HORGER, K., ESTES, D., CAPONE, R. *et al.* (2009) «Films of Agarose Enable Rapid Formation of Giant Liposomes in Solutions of Physiologic Ionic Strength». *Journal of the American Chemical Society*, 131, 5, pp. 1810-1819.
- HOTANI, H., NOMURA, F., SUZUKI, Y. (1999) «Giant liposomes: from membrane dynamics to cell morphogenesis». *Colloid and Interface Science*, 4 (5), pp. 358-368.
- INAOKA, Y., YAMAZAKI, M. (2007) «Vesicle Fission of Giant Unilamellar Vesicles of Liquid-Ordered-Phase Membranes Induced by Amphiphiles with a Single Long Hydrocarbon Chain». *Langmuir*, 23, pp. 720-728.
- JESORKA, A., MARKSTRÖM, M., KÄRLSON, M. (2005) «Controlled hydrogel formation in the internal compartment of giant unilamellar vesicles». *The journal of physical chemistry*, 109, 31, pp. 14759-14763.
- KAHYA, N., PÉCHEUR, E., BOEIJ, W. (2001) «Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion». *Biophysical journal*, 81, 3, pp. 1464-1474.
- KHATTAR, J. I. S., SARMA, T., SINGH, D. (1999) «Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in a continuous flow bioreactor». *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 7, pp. 564-568.
- KLAUSNER, R. D., WOLF, D. E. (1980) «Selectivity of fluorescent lipid analogs for lipid domains». *Biochemistry*, 19, pp. 6199-61203.
- KONO, K. (2001) «Thermosensitive polymer-modified liposomes». *Drug Delivery*, 53, 3, pp. 307-319.
- KURIBAYASHI, K., TRESSET, G., COQUET, Ph. *et al.* (2006) «Electroformation of giant liposomes in microfluidic channels». *Measurement Science and Technology*, 17, 12, pp. 3121-3126.
- LAGERHOLM, B., WEINREB, G., JACOBSON, K. *et al.* (2005) «Detecting microdomains in intact cell membranes». *Annual review of physical chemistry*, 56, pp. 309-336.
- LEICA MICROSYSTEMS [en línia]. Regne Unit. Disponible a:
www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SPE/Brochures/Leica%20TCS%20SPE-Brochure_EN.pdf [accés: 25.1.2014].
- LONG, M., JONES, C., HELFRICH, M. (2005) «Dynamic microcompartmentation in synthetic cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 17, pp. 5920-5925.
- LOURA, L. M., FEDOROV, A., PRIETO, M. (2000) «Partition of membrane probes in a gel/fluid two-component lipid system: a fluorescence resonance energy transfer study». *Biochimica et biophysica acta*, 1467, 1, pp. 101-112.
- MALINSKA, K., MALINSKY, J., OPEKAROVA, M. *et al.* (2003) «Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells». *Molecular Biology of the Cell*, 14, 11, pp. 4427-4436.
- MARKSTROM, M., GUNNARSON, A., ORWAR, O. (2007) «Dynamic microcompartmentalization of giant unilamellar vesicles by sol-gel transition and temperature induced shrinking/swelling of poly (N-isopropyl acrylamide)». *Soft Matter*, 3, 5, pp. 587-595.
- MORALES-PENNINGSTON, N., WU, J., FARKAS, E. (2010) «GUV preparation and imaging: Minimizing artifacts». *Biochimica et biophysica acta*, 1789, 7, pp. 1324-1332.
- MOSCHO, A., ORWAR, O., CHIU, D. T. *et al.* (1996) «Rapid preparation of giant unilamellar vesicles». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, octubre, pp. 11443-11447.

- MUKHERJEE, S., MAXFIELD, F. R. (2000) «Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking». *Traffic*, 1, 3, pp. 203-211.
- (2004) «Membrane domains». *Annual review of cell and developmental biology*, 20, pp. 839-866.
- MULLER, M., BELLINGHAM Michiel (2006) *Introduction to confocal fluorescence microscopy*. Washington, SPIE Press, 2a ed.
- OBERHOLZER, T., ALBRIZIO, M., LUISI, P. L. (1995) «Polymerase chain reaction in liposomes». *Chemistry and biology*, 2, 10, pp. 677-682.
- OKU, N., MACDONALD, R. (1983) «Differential effects of alkali metal chlorides on formation of giant liposomes by freezing and thawing and by dialysis». *Biochemistry*, 22, 4, pp. 855-863.
- OKUMURA, Y., IWATA, Y. (2011) «Effect of counter electrode in electroformation of giant vesicles». *Membranes*, 1, 4, pp. 109-118.
- OKUMURA, Y., ZHANG, H., SUGIYAMA, T. *et al.* (2007) «Electroformation of Giant Vesicles on a Non-Electroconductive Substrate». *Journal of the American Chemical Society*, 129, 6, pp. 1490-1491.
- PATIL, S. G., GATTANI, S. G., GAUD, R. S., SURANA, S. J. *et al.* (2005) «Liposome: A magic bullet concept». *Pharma Review*, 3(16), pp. 53-58.
- POLITANO, T. J., FROUDE, V., JING, B. *et al.* (2010) «AC-electric field dependent electroformation of giant lipid vesicles». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 1, 75-82.
- REEVES, J. P., DOWBEN, R. M. (1969) «Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles». *Cell. Physiol.*, 73, pp. 49-60.
- RIETVELD, A., SIMONS, K. (1998) «The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts». *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Biomembranes*, 1376, pp. 467-479.
- RISKE, K., DIMOVA, R. (2005) «Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution». *Biophysical journal*, 88, 2, pp. 1143-1155.
- RODRIGUEZ, N., PINCET, F., CRIBIER, S. (2005) «Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42, 2, pp. 125-130.
- SAMSONOV, A. M., MIHALYOV, I., COHEN, F. S. (2001) «Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes». *Biophysical journal*, 81, 3, pp. 1486-1500.
- SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J., HRISTOVA, K., PUJOL, M. *et al.* (2011) «Analysis of HIV-1 fusion peptide inhibition by synthetic peptides from E1 protein of GB virus C». *Journal of colloid and interface science*, 360, 1, pp. 124-131.
- SANDRE, O., MOREAUX, L., BROCHARD-WYART, F. (1999) «Dynamics of transient pores in stretched vesicles». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, pp. 10591-10596.
- SAITOH, A., TAKIGUCHI, K., TANAKA, Y. (1998) «Opening-up of liposomal membranes by talin». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 3, pp. 1026-1031.
- SCHEIFFELE, P., RIETVELD, A., WILK, T. *et al.* (1999) «Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane». *The Journal of biological chemistry*, 274, 4, pp. 2038-2044.
- SHOHDA, K., SUGARAWA, T. (2006) «DNA polymerization on the inner surface of a giant liposome for synthesizing an artificial cell model». *Soft Matter*, 2, 5, pp. 402-408.
- SIMONS, K., EHEHALT, R. (2002) «Cholesterol, lipid rafts, and disease». *Journal of Clinical Investigation*, 110, 5, pp. 597-603.
- SIMONS, K., IKONEN, E. (1997) «Functional rafts in cell membranes». *Nature*, 387, 6633, pp. 569-572.
- (2000) «Review: Cell biology: How cells handle cholesterol». *Science*, 290, 5497, pp. 1721-1726.
- SIMONS, K., VAN MEER, G. (1988) «Lipid sorting in epithelial cells». *Biochemistry*, 27, 17, pp. 6197-6202.

- SINGER, S. J., NICOLSON, G. L. (1972) «Fluid mosaic model of the structure of cell membranes». *Science* 175, pp. 720-731.
- STANEVA, G., SEIGNEURET, M., KOUMANOV, K. *et al.* (2005) «Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles». *Chem. Phys. Lipids*, 136, pp. 55-66.
- THOMAS, J. L., HOLOWKA, D., BAIRD, B. *et al.* (1994) «Large-scale co-aggregation of fluorescent lipid probes with cell surface proteins». *Journal of Cell biology*, 125, 4, pp. 795-802.
- VAN MEER, G. (1989) «Lipid traffic in animal cells». *Annual review of cell biology*, 5, pp. 247-275.
- VEATCH, S., KELLER, S. (2003) «Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol». *Biophysical journal*, 85, 5, pp. 3074-3083.
- VEATCH, S., KELLER, S. (2005) «Miscibility Phase Diagrams of Giant Vesicles Containing Sphingomyelin». *Physical Review Letters*, 94, 14, p. 148101.
- WALSTON, T., HARDIN, J. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- WEINBERGER, A., TSAI, F., KOENDERINK, G. *et al.* (2013) «Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles». *Biophysical journal*, 105, 1, pp. 154-164.
- WESOŁOWSKA, O., MICHALAK, K., MANIEWSKA, J. *et al.* (2009) «Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems». *Polonica Acta*, 1(56), pp. 33-39.
- YAMASHITA, Y., OKA, M., TANAKA, T. *et al.* (2002) «A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them». *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes*, 1561, 2, pp. 129-134.
- ZHAO, J., WU, J., SHAO, H. (2007) «Phase studies of model biomembranes: Macroscopic coexistence of $L\alpha + L\beta$, with light-induced coexistence of $L\alpha + L_o$ Phases». *Biochimica et biophysica acta*, 1768, 11, pp. 2777-2786.