



Tesis doctoral

**Cuantificación de deformaciones
nanoscópicas en la membrana del nanotubo
mediante medidas de conductancia eléctrica**

Pedro Arrasate Bermeosolo

Leioa 2022

Director

Vadim Frolov

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	V
GLOSARÍO DE SÍMBOLOS.....	VII
1.INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. DESAJUSTE EN LA GEOMETRÍA Y SU PAPEL EN PROCESOS CELULARES.....	7
1.1.1.A nivel de moléculas individuales	8
1.1.2. A nivel colectivo	15
1.2. Mecanismos de generación de curvatura local por proteínas.....	15
1.2.1. Andamiaje (“scaffolding”) mediado por la curvatura	16
1.2.2. Presión entrópica	20
1.2.3. Inserción hidrofóbica y desajuste hidrofóbico.....	21
1.2.4. Efecto de los lípidos.....	24
1.3. DETECCION EXPERIMENTAL DE LAS DEFORMACIONES LOCALES	27
1.3.1. Vesículas.....	27
1.3.2. NTs.....	31
1.3.2.1. Monitorización de NTs largos por microscopía de fluorescencia	32
1.3.2.3. Uso de la microscopía de fuerza atómica de alta velocidad (HS AFM) para la caracterización de NTs largos.....	36
1.3.2.4. Monitorización de la remodelación del NT mediante registros electrofisiológicos	38
1.3.2.5. Nts ultracortos.....	40
2.OBJETIVOS.....	45
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
3.1. Cuantificación de los parámetros elásticos y geométricos del NT ultracorto	49

2.2. Incorporación de proteínas y lípidos a la membrana del usNT debido al gradiente de curvatura de membrana	58
3.3. Incorporación de moléculas individuales y colectivas en la membrana de usNT mediada por moléculas bolaanfílicas sintéticas.....	71
3.3.1 Detección aleatoria de moléculas individuales.....	71
3.3.2. Detección asistida por foldámeros.....	73
3.3.2.1 Caracterización de los foldámeros.....	75
3.3.2.2 Interacción foldámero-proteína.....	88
4.CONCLUSIONES GENERALES	98
5.MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
5.1. MATERIALES	103
5.1.1. Material y equipo general	103
5.1.2. Microscopía.....	107
5.1.3. Fluorimetría.....	108
5.1.4. Software de adquisición y análisis de datos.....	109
5.1.5. Purificación de proteínas.....	109
5.1.6. Modelos de membrana	110
5.1.7. Electrofisiología	112
5.2. MÉTODOS.....	112
5.2.1. Preparación de stocks de foldámeros.....	112
5.2.2. Preparación de MLVs de lípido y lípido-foldámero.....	113
5.2.3. Preparación de Vesículas unilamelares, LUVs.....	114
5.2.4. Formación de Bicapas soportadas Gigantes GSBs sobre microesferas de sílice.....	115
5.2.5 Formación de NTs lipídicos.....	116
5.2.6 Cálculo del radio de NTs lipídicos por fluorescencia	119
5.2.7 Incorporación de foldámeros a la membrana de GSBs, GUVs y NTs lipídicos	120
5.2.8. Cálculo de la distribución de los foldámeros y proteínas entre membranas planas y curvas (coeficiente de distribución según curvatura).....	121

5.2.9. Expresión y purificación de proteínas	122
5.2.10. Ensayo de unión proteína-foldámero	123
5.2.11 Preparación de muestras para AFM.....	124
5.2.12. Toma de imágenes en AFM.....	125
5.2.13 Formación de NTs lipídicos ultra-cortos (usNT)	126
5.2.14. Medidas de conductancia a través del lumen del usNT.....	130
6.BIBLIOGRAFÍA.....	137

ABREVIATURAS

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
An-V	Anexina V
BAR	Bin-Anfifisin-Rvs
BSA	Albúmina de suero bovino
CaCl ₂	Cloruro cálcico
CCC	Acoplamiento entre curvatura y composición
Chol	Colesterol
CL	Cardiolipina
CrioEM	Crio-Microscopía electrónica
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocolina
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamina
DOPS	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfo-L-serina
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimetilamonio-propano
EDTA	Ácido etilendiaminitetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
ENTH	dominio de homología del extremo N-terminal de la epsina
ER	Retículo endoplasmático
GFP	Proteína verde fluorescente
GSB	Bicapa soportada gigante
GST	Glutathion s transferasa
GTPasa	Guanosin Trifosfatasa
GUV	Vesicula Gigante Unilamelar

Hepes	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico
HS AFM	Microscopía de Fuerza Atómica de alta velocidad
KCl	Cloruro potásico
LUV	Vesícula grande unilamelare
MLV	Vesícula multilamelare
meGFP	Proteína verde fluorescente monomérica aumentada
NT	Nanotubo
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI(4,5)P ₂	L- α -fosfatidylinositol-4,5-bisfosfato
PolyPC 20:4	1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-fosfocolina
PolyPE 18:0 20:4	1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
PolyPE 18:0 22:6	1-estearoil-2-docosahexaenoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
PolyPE 20:4	1,2-diarachidonoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
PS	Fosfatidilserina
RhPE	1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(sulfonil lisamina rodamina B),
ROI	Región de interés
SM	Esfingomielina
SUV	Vesícula pequeña unilamelar
usNT	Nanotubo ultracorto
V	Voltaje
U	Voltaje

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

A	Área
I	Intensidad de fluorescencia
L_0	Longitud inicial
L_{NT}	Longitud del nanotubo
r_{NT}	Radio del nanotubo
$r_{NT,eff}$	Radio efectivo del nanotubo
k	Módulo de la rigidez a la flexión
c_1, c_2	Curvaturas principales
J	Curvatura media
J_s	Curvatura media intrínseca
C_{SP}	Capacitancia específica de la bicapa plana
G	Conductancia eléctrica
G_{NT}	Conductancia eléctrica del nanotubo
G_{SELLO}	Conductancia eléctrica asociada al sello
T	Tiempo
σ	Tensión lateral
ρ_0	Constante de calibración de fluorescencia
ρ	Resistencia específica del electrolito
ϕ	Gradiente de potencial eléctrico

1.INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

La membrana es una fina lámina molecular, compuesta por lípidos y proteínas, que rodea a la célula y a los orgánulos subcelulares permitiendo la compartimentalización. Tiene un importante rol morfológico, manteniendo la forma de la célula, y además está implicada en multitud de procesos como el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior celular, la recepción de señales, la transmisión del impulso nervioso, procesos inmunes como la fagocitosis en los macrófagos o procesos de endo y exocitosis, entre otros (Yeagle, P, 2016).

La membrana, tanto plasmática como las del sistema endomembranoso, es una estructura dinámica y de composición heterogénea (Kinnun et al., 2020). Los componentes que la integran pueden desplazarse lateralmente en el plano de la membrana (Jacobson et al., 2019) pero también translocarse de una capa de la membrana a la otra (Sharom, 2011). Esta aparente fluidez resulta en que las interacciones entre componentes y la dinámica de la membrana sean diferentes dependiendo de la localización concreta en cada instante (Jacobson et al., 2019); además, hace que el sistema no esté en equilibrio (Kalappurakkal et al., 2020). Además de la aparente dinámica en el plano transversal de la membrana, existe otra dinámica relacionada con la interacción de los compartimentos. Así, los compartimentos celulares que están separados pueden unirse, mediante un proceso de fusión (Chernomordik & Kozlov, 2003; Martens & McMahon, 2008) o, por el contrario, pueden generarse nuevos a través de procesos de fisión. Por ejemplo, durante los procesos de macroautofagia, se forma un autofagosoma que contiene el material a reciclar. Este autofagosoma se fusiona con lisosomas, con los que comparte el material que transportan para que comience su degradación (Yu & Melia, 2017).

Este dinamismo de la membrana queda reflejado en los múltiples cambios de forma que experimenta la membrana en el desarrollo de sus funciones (Shnyrova et al., 2009). Importantes procesos intracelulares van acompañados de una reorganización de la membrana y una deformación de la misma (Kozlov et al., 2014). Procesos como la

endo y exocitosis, la fagocitosis en macrófagos, la formación de filopodios, o la citocinesis, tienen en común la necesidad de remodelar la membrana (Mattila & Lappalainen, 2008; Mukherjee & Maxfield, 2000); una remodelación que puede afectar a su forma, topología e incluso composición (Lipowsky & Dimova, 2021). Estas deformaciones de la membrana pueden ser temporales y rápidas, o de larga duración y mantenidas en el tiempo. Un ejemplo de estas últimas lo tenemos en las vesículas de transporte, esferas de tamaño submicrométrico que son constantemente producidas y recicladas, mediante procesos de fisión y fusión, y que participan en el intercambio de materiales entre orgánulos (Yeagle, 2016). Del mismo modo, la formación de estructuras y deformaciones temporales puede verse en la dinámica red de tubos del retículo endoplasmático (Hu et al., 2011).

Resumiendo, vemos que la bicapa lipídica que forma la base de la membrana celular es flexible y puede ser deformada adoptando diferentes formas. Para mantener y estabilizar todas estas formas se hacen necesarios unos andamios proteicos, el citoesqueleto o redes internas filamentosas (Kalappurakkal et al., 2020; Kessels & Qualmann, 2021; Kozlov et al., 2014). Las últimas son estructuras que no solo estabilizan la forma de la membrana, sino que además aplican fuerzas o regulan una serie de fuerzas que deforman la membrana plasmática o el sistema endomembranoso (Gov, 2018; Schweitzer et al., 2015). Un ejemplo de esto lo vemos en los cambios de forma en la estructura del retículo endoplasmático, que se deben a la acción conjunta de proteínas motoras que transforman la membrana a lo largo de los filamentos del citoesqueleto (Bozelli & Epan, 2020; Shibata et al., 2009).

Sin embargo, es sabido que una membrana lipídica puede deformarse sin necesidad de ninguna fuerza externa; es decir, puede tener una curvatura intrínseca (Deuling, n.d.; Kozlov, 2018). La curvatura intrínseca puede definirse como la forma que adopta de manera natural una membrana cuando no actúan sobre ella fuerzas que puedan deformarla, y que minimiza el estrés elástico que sufre la membrana (Epan et al., 2015). La curvatura intrínseca se origina por asimetrías en la membrana, interacciones químicas entre moléculas y por procesos activos (Bashkirov et al., 2022; Bassereau et

al., 2018; Kozlov, 2018; Marsh, 1996). La forma de medir esta curvatura intrínseca de la membrana es usando el concepto matemático de la curvatura media.

Una superficie cualquiera tiene dos curvaturas principales, que llamaremos c_1 y c_2 , medidas de manera ortogonal, es decir, formando un ángulo de 90 grados entre ambas direcciones (Bassereau et al., 2018) (Fig. 1.1.). La curvatura media del plano de la superficie es la suma de ambas curvaturas principales de la superficie o, en nuestro caso, membrana, y se identifica como $J = \frac{c_1+c_2}{2}$, siendo el principal parámetro para describir la geometría de la membrana a nivel local. La forma de la superficie o membrana influye en el valor de la curvatura media. Así, para una esfera el valor de ambas curvaturas principales es mayor que cero, mientras que, para un tubo o cilindro hueco, el valor de una de las curvaturas principales es cero (Fig. 1.1).

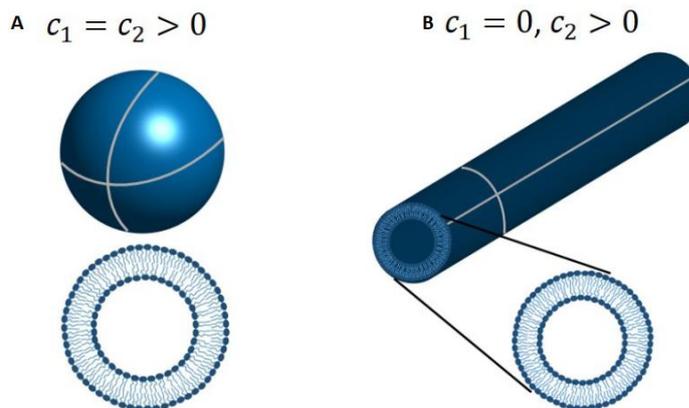


Fig. 1.1. Curvatura media de una membrana. A. Para una esfera, como puede ser una vesícula, ambas curvaturas principales tienen un valor mayor que cero. B. Para un tubo lipídico, aunque el valor de J sea mayor que cero, una de las curvaturas principales es cero. Reproducido de Bassereau et al , 2018.con permiso de IOP publishing. Artículo bajo licencia internacional Creative Commons 4.0

De este modo, podemos introducir la curvatura intrínseca de manera más específica: en esta tesis, solo consideraremos la curvatura intrínseca media, J_s . Importante para esta tesis, este parámetro puede relacionarse con la estructura de los constituyentes moleculares de la membrana, en concreto la forma molecular (Frolov et al., 2011). La

curvatura media viene definida por la curvatura molecular de los lípidos y proteínas que componen cada una de las monocapas de la membrana celular.

En el caso de los lípidos, los principales constituyentes de la membrana, su curvatura intrínseca viene dada por su geometría, es decir, por su forma molecular (Cullis et al., 1986; Frolov et al., 2011). Por tanto, la curvatura intrínseca de una membrana lipídica viene dada por la suma de las curvaturas intrínsecas de sus monocapas, que a la vez vienen dadas por la suma de las curvaturas intrínsecas de las diferentes especies lipídicas que las componen (Fig. 1.2). Diferentes formas, geometrías, darán lugar a diferentes monocapas lipídicas de diferente curvatura (M. F. Brown, 2012).

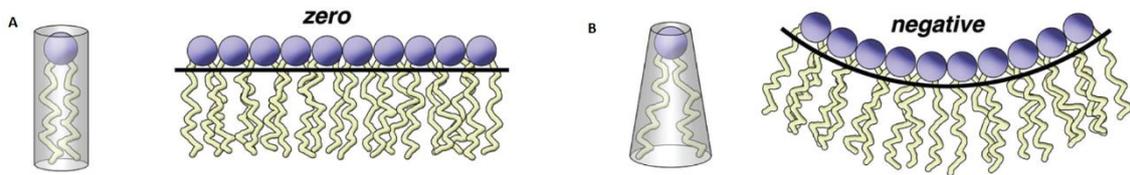


Fig. 1.2. Curvatura intrínseca de membranas lipídicas. A. monocapa lipídica formada por lípidos de geometría cilíndrica, de curvatura, J , igual a cero. B. monocapa compuesta por lípidos de geometría cónica. Reproducido de Brown, 2012. Copyright (2012), con permiso de ACS

El caso de las proteínas es más complejo, ya que su contribución a la curvatura intrínseca de la membrana viene definida por su interacción con los lípidos (McMahon & Gallop, 2005). La principal dificultad para definir la curvatura intrínseca de las proteínas es que éstas, a diferencia de los lípidos, no forman monocapas fluidas, por lo que su curvatura intrínseca solo puede determinarse para proteínas que ya se han incorporado a una monocapa lipídica; es decir, para un sistema de, al menos, dos componentes. Así, para definir la contribución proteica a la curvatura intrínseca de una monocapa, podemos considerar el estrés que se produce en la membrana como producto de la interacción de la proteína con una monocapa lipídica. Es decir, cuando la proteína interacciona o se inserta en la monocapa, se genera un estrés a nivel local, que a su vez depende de la curvatura inicial de la monocapa; así, debe existir una curvatura media, J , para la que este estrés generado por la interacción proteína-

membrana sea mínimo (Fig. 1.3). Esta J de la monocapa puede usarse para definir la J_s de la proteína.

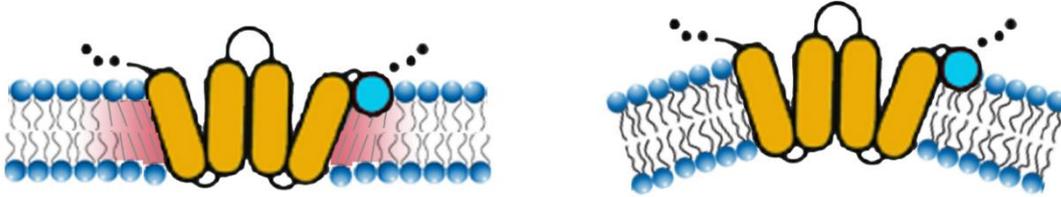


Fig. 1.3. Curvatura intrínseca de proteínas. Cuando la proteína se encuentra unida o integrada en una membrana cuya curvatura intrínseca no coincide con la de la proteína, se origina un estrés local, que puede aliviarse doblando la membrana. En este ejemplo, se muestra la inserción en forma de V de dominios de reticulón que crea un estrés local en la membrana (rojo). El estrés disminuye en una membrana curva (Hu et al., 2008a)

Si la proteína se une o inserta en una membrana que no tiene curvatura espontánea, o que no coincide con la de la proteína, puede darse un desajuste en la geometría, que depende tanto de la estructura de los lípidos y proteínas implicados, como de su interacción con otros constituyentes de la membrana. Este desajuste crea un estrés a nivel local que tiene importantes consecuencias fisiológicas, como veremos a continuación.

1.1. DESAJUSTE EN LA GEOMETRÍA Y SU PAPEL EN PROCESOS CELULARES

El estrés local, asociado a una molécula individual de proteína, tiene importantes consecuencias fisiológicas, que revisaremos a continuación.

1.1.1.A nivel de moléculas individuales

Efectos del estrés local sobre la actividad de canales en la membrana

Uno de los efectos más estudiados del estrés local es la alteración de la conformación de las proteínas. Aunque por lo general las proteínas son más rígidas que los lípidos, el estrés producido por la curvatura a nivel local puede tener efecto sobre la conformación y el funcionamiento de ciertas proteínas (Cox et al., 2017). Este es el caso, por ejemplo, de los canales mecanotransductores, cuya función fisiológica se basa precisamente en poder sentir el efecto del estrés a nivel local, ya que pueden sentir estímulos mecánicos que perturban la membrana y convertir este estímulo en señales biológicas (Fang et al., 2021; Jiang et al., 2021; Sukharev & Corey, 2004).

Las hemolisinas son un tipo de proteínas transmembrana, muy estudiadas y bien caracterizadas, presentes en la membrana externa de bacterias gram negativas y en los cloroplastos y mitocondrias de células eucariotas, y que forman poros en la membrana. Estas proteínas transmembrana se han empleado para estudiar el efecto regulatorio de la curvatura de membrana sobre la actividad de estos canales (Fig.1.4) (Tonnesen et al., 2014).

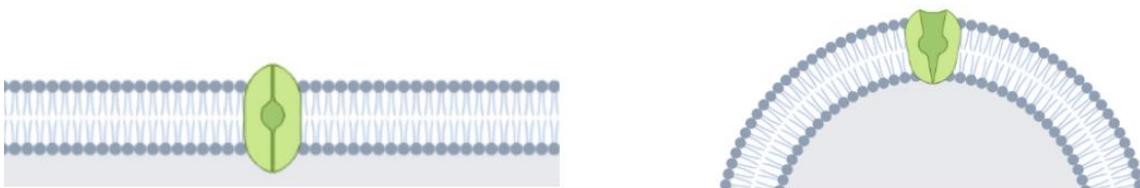


Fig. 1.4. Efecto del estrés local sobre la actividad de canales de membrana. La aparición de un estímulo mecánico provoca un estrés local sobre la membrana, que afecta a la actividad y funcionamiento del canal de membrana.

Créditos: Biorender.com

.Este mismo efecto ha sido visto en los canales PIEZO(Jiang et al., 2021). Los llamados canales PIEZO son mecanotransductores, canales iónicos sensibles al estrés mecánico, que provocan un flujo de iones de un lado a otro de la membrana en la que están

insertados, y que convierten el estrés mecánico en señales biológicas (Fang et al, 2021). Son básicamente sensores de curvatura, que pueden detectar los cambios en tensión y curvatura producidos por estrés mecánico, y responder en consecuencia. Su descubrimiento es relativamente reciente y son claves en mamíferos en procesos como la propiocepción, el equilibrio, el sentido del tacto o la recepción del dolor (B. M. Brown et al., 2019; Wu et al., 2017). Las mutaciones o defectos en estos canales iónicos están asociados a varias enfermedades (Saotome et al, 2018). Existen dos tipos de estos canales, llamados PIEZO1 y PIEZO2. Este último es muy abundante en ciertas neuronas directamente implicadas en el sentido del tacto, la propiocepción o la percepción del dolor (Fang et al., 2021). Estos canales iónicos están formados por tres dominios transmembrana, una serie de hélices flexibles extracelulares y el poro iónico, y su apertura y regulación está ligada a cambios en la tensión de la membrana producidos por un estrés mecánico. Es decir, perturbaciones en la membrana producidas por estrés mecánico se convierten en deformaciones de la membrana que provocan la apertura de estos canales, y la transducción de las señales (Saotome et al., 2018).

Efectos del estrés local sobre proteínas transmembrana y citosólicas

Mientras que los canales necesitan del estrés para llevar a cabo su función, otras moléculas pueden evitar este estrés local desplazándose a otra parte de la membrana con una geometría diferente (Markin, 1981). Así, una de las principales consecuencias a nivel de moléculas individuales es la reorganización de las mismas en zonas de la membrana con distintas curvaturas. Aunque este desajuste anteriormente citado afecta a las proteínas a nivel individual, sus efectos se hacen visibles a nivel colectivo, cuando afectan a la concentración y distribución de las proteínas a nivel local. Este desajuste provoca el llamado efecto de acoplamiento curvatura-composición (CCC por sus siglas en inglés Curvature-composition coupling) (Bashkirov et al., 2022)

Así, la curvatura espontánea define un estado espontáneo de referencia, de estrés mínimo, que viene determinado por los componentes de la membrana. De este modo,

una forma de reducir el estrés de la membrana es modificar su composición de forma local, a nivel nanoscópico (Canham, 1970; Markin, 1981)

Ya hemos visto que los componentes de la membrana son capaces de desplazarse lateralmente en la misma, reorganizarse en otros puntos de la membrana y modificar la composición a nivel local (Bashkirov et al., 2022). La curvatura de la membrana puede ser uno de los mediadores de este proceso, propiciando un cambio en la composición en zonas concretas de la membrana dictada por la preferencia de curvatura de sus componentes. De este modo, el cambio en la composición de una zona determinada de la membrana puede llevar a un nuevo estado de referencia, un nuevo estado espontáneo, minimizando el estrés acumulado.

El fenómeno de CCC afecta tanto a proteínas transmembrana, integradas en la membrana y presentes en ella de manera constante, como a proteínas citosólicas.

Proteínas transmembrana

En sistemas celulares, la deformación de la membrana provoca la acumulación de ciertos componentes de la membrana en esa zona (Fig. 1.4). Es el caso de las proteínas como el reticulón (Sackmann, 2014). Las proteínas de la familia del reticulón se expresan de manera ubicua en las células eucariotas, y entre sus funciones se encuentran formar y mantener las estructuras tubulares que forman parte de la red del retículo endoplasmático (RE). El RE está compuesto por una red de tubos y estructuras más planas. El reticulón se encuentran siempre en las zonas de mayor curvatura de este orgánulo; es decir, en los tubos y en los límites de las estructuras planas, donde se alcanzan curvaturas similares a las de los túbulos (Schwarz & Blower, 2016; Shibata et al., 2010) (Fig. 1.5).

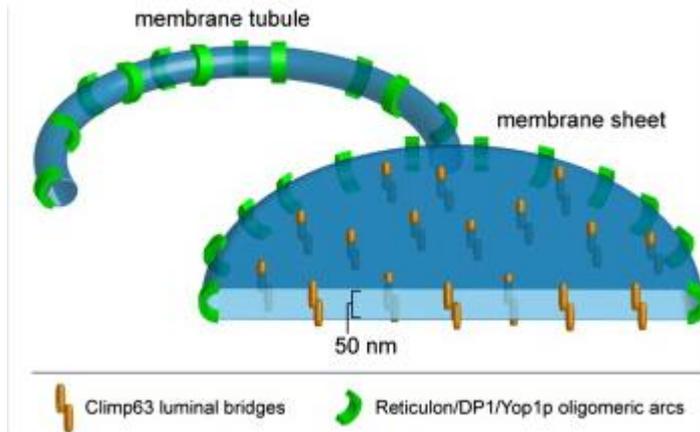


Fig. 1.5. Distribución de la proteína reticulón en las zonas de elevada curvatura del RE, como las estructuras tubulares y los límites de las estructuras en forma de saco. Reproducido de Shibata et al, 2010. Copyright (2010) con permiso de Elsevier

Del mismo modo, existen otras evidencias sobre el efecto de la curvatura en la distribución de proteínas transmembrana, más allá de la familia del reticulón.

Aunque es difícil estudiar el efecto de la curvatura sobre las proteínas transmembrana *in vivo*, es posible hacerlo empleando modelos *in vitro*. En este sentido, el sistema de nanotubos lipídicos (NTs), cilindros huecos formados al tirar de una bicapa lipídica madre y cuyo diámetro está en el rango nanométrico, han sido un modelo de membrana muy útil para el estudio de CCC. Por ejemplo, en NTs formados a partir de la membrana de vesículas gigantes unilamelares, GUVs, se ha establecido la preferencia por la curvatura de KvAP. Esta proteína tetramérica constituye canales iónicos dependientes de voltaje, y se localiza en zonas de elevada curvatura en la membrana de las neuronas; en concreto, en axones y dendritas (Aimon et al., 2014). Empleando proteína marcada químicamente con Alexa 488, se pudo observar que la proteína era capaz de discriminar la curvatura, prefiriendo las zonas de elevada curvatura y acumulándose en la membrana del NT (Fig. 1.6).

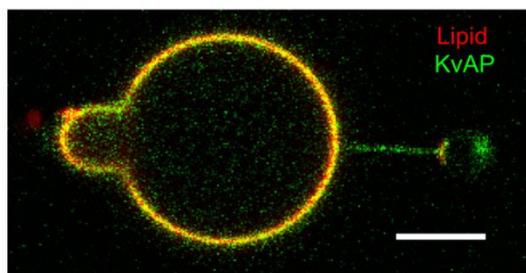


Fig. 1.6. Distribución de la proteína transmembrana KvaP en zonas de elevada curvatura. El canal iónico dependiente de voltaje se ve afectado por el fenómeno de CCC, reorganizándose en zonas de elevada curvatura como la membrana del NT. Reproducido de Aimon et al, 2014. Copyright (2014), con permiso de Elsevier.

Proteínas citosólicas

En el caso de proteínas citosólicas, la forma y curvatura de la membrana afecta a la unión e interacción de las mismas con la membrana. Por ejemplo, los llamados dominios BAR (Bin/Anfifisina/Rvs), que reciben este nombre por ser regiones conservadas en proteínas presentes en animales, como la anfifisina o Bin, y proteínas presentes en levaduras, como Rvs161 y Rvs167 (Simunovic et al., 2019). Las proteínas que contienen estos dominios juegan un papel importante en la formación de protrusiones y deformaciones de la membrana, como los filopodios, y son conectores entre la actina y el citoesqueleto y la membrana, colaborando en las deformaciones de la membrana producidas por el citoesqueleto (Stanishneva-Konovalova et al., 2016). Al avanzar en nuestro conocimiento sobre estos dominios BAR, se ha descubierto que están implicados en procesos como la endocitosis mediada por clatrina, donde juegan un rol fundamental ya que presentan sitios de unión a la dinamina, actuando así como reclutadores de otras proteínas (Fig. 1.7)(Chen & Schmid, 2020).

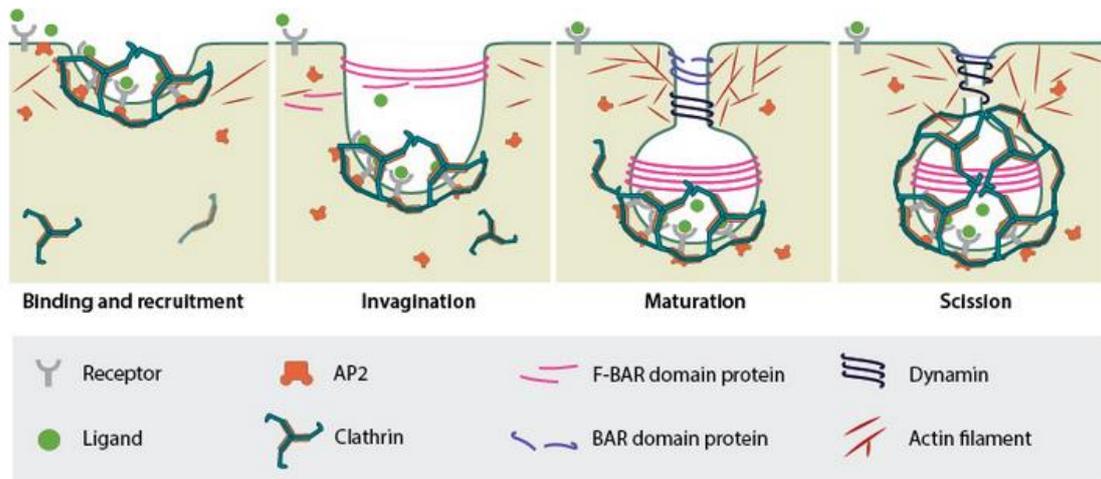


Fig. 1.7. Representación del proceso de endocitosis mediada por clatrina. Como puede verse, proteínas que contienen dominios BAR son reclutadas hacia la zona de elevada curvatura del cuello que une la vesícula con la membrana plana. Reproducido de <https://www.mechanobio.info/what-is-the-plasma-membrane/what-is-membrane-trafficking/what-is-clathrin-mediated-endocytosis/invagination-and-maturation-of-the-clathrin-coated-vesicle>, con permiso. Trabajo bajo licencia Creative Commons CC-BY-NC 4.0

Además, a medida que se ha ido resolviendo la estructura de estos dominios, se observó que su papel no se limita a actuar como reclutadores de otras proteínas, sino que las proteínas que contienen estos dominios pueden detectar y generar curvatura tanto a nivel local como a nivel colectivo (Simunovic et al., 2016). Dos de los miembros más destacados de esta familia de proteínas, como son la amfifisina y la endofilina, son muy abundantes en el cerebro, y juegan un papel crucial durante la formación y liberación de vesículas sinápticas (Higgins & McMahon, 2005; Wigge & McMahon, 1998).

Así, los dominios BAR pueden dividirse en dominios BAR clásicos y dominios N-BAR; dominios F-BAR, y dominios I-BAR (Simunovic et al., 2015, 2019). Todos tienen en mayor o menor medida forma de luna creciente, cóncava o convexa. Los dominios N-BAR y F-Bar, se unen a la membrana a través de una zona cóncava cargada de residuos positivos, que se unen por interacción electrostática con fosfolípidos cargados negativamente, inducen curvatura positiva, y pueden tubular vesículas a altas concentraciones (Cui et al., 2009). Por su lado, los dominios I-BAR, también tienen forma de luna creciente, pero se unen a la membrana por su cara convexa, donde presentan los residuos positivos, también a través de interacción electrostática,

generan curvatura negativa y están implicados en la formación de protrusiones como los filopodios en las células (Simunovic et al., 2019).

Efectos del estrés local sobre lípidos

El efecto del CCC también afecta a los lípidos. Las mitocondrias presentan zonas con una alta curvatura, las llamadas crestas mitocondriales, que son protrusiones de la membrana interna de la mitocondria hacia el interior del orgánulo. El extremo de estas estructuras presenta una elevada curvatura, y en ellas, en la capa interna de la bicapa, de elevada curvatura negativa, se acumulan lípidos de geometría cónica, como la cardiolipina (CL) o la fosfatidiletanolamina (PE) (Frolov et al., 2011). Dada la curvatura de estos lípidos, tienen preferencia por la capa interna de la membrana, que presenta una curvatura negativa coincidente con la suya (Fig. 1.8) (Ikon & Ryan, 2017).

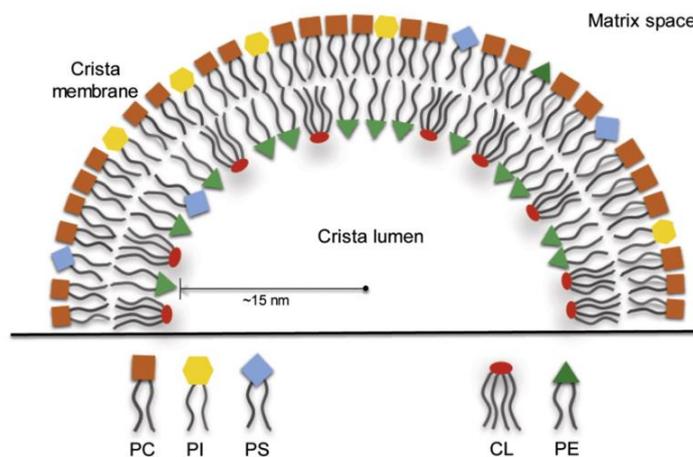


Fig. 1.8. Reorganización de lípidos en las crestas mitocondriales en función de su curvatura intrínseca.

Lípidos como la CL o el PE, se acumulan en la cara interna de la cara mitocondrial, cuya curvatura coincide con la intrínseca de esos lípidos. Reproducido de Ikon y Ryan, 2017. Copyright 2017, con permiso de Elsevier B.V.

Esta reorganización de lípidos por efecto del CCC puede ocurrir mediante una difusión lateral de los lípidos, de un punto a otro de la membrana, o bien traslocándose de una

capa a la otra de la membrana plasmática, por acción de proteínas especializadas como las flipasas (Pomorski & Menon, 2006)

1.1.2. A nivel colectivo

El acoplamiento entre curvatura y composición juega un rol importante en la formación de dominios (Cornet et al., 2020), en el movimiento celular (como por ejemplo la formación de filopodios y la vesiculación asociada los mismos (Nishimura et al., 2021)) y en la remodelación de la membrana que tiene lugar en procesos como la vesiculación (Kumar et al., 2015; Makowski et al., 2020).

Aunque el fenómeno del CCC depende de un complejo conjunto de factores, la generación de curvatura a nivel local es uno de los parámetros fundamentales, para el cual han sido descritos muchos mecanismos relacionados con la estructura de las proteínas implicadas en el proceso.

1.2. Mecanismos de generación de curvatura local por proteínas

El desarrollo en el conocimiento de la estructura de las proteínas implicadas en la remodelación de la membrana ha permitido descubrir secuencias y dominios estructurados y conservados que participan activamente en la unión de la proteína a la membrana y en la deformación a nivel local de la misma (McMahon & Gallop, 2005). Entre estos dominios se pueden destacar las hélices anfipáticas, presentes por ejemplo en el dominio ENTH, o los dominios BAR de los que hemos hablado con anterioridad, todos ellos capaces de reconocer la curvatura en la membrana, unirse a ella y promover cierto grado de curvatura de manera individual (Simunovic et al., 2015; Zeno et al., 2018). Estos dominios se encuentran en diferentes proteínas que están implicadas en la deformación y remodelación de la membrana, se unen a la misma a

través de la interacción con lípidos, y son capaces de generar curvatura mediante mecanismos muy diferentes, entre los que se pueden citar los siguientes:

1.2.1. Andamiaje (“scaffolding”) mediado por la curvatura

El andamiaje proteico es una estructura formada por proteínas individuales o sus oligómeros, que genera y estabiliza la curvatura de membrana, pudiendo así tubular la membrana, modificar la forma de la misma, y alterar las propiedades mecánicas de la membrana a la que rodea (Simunovic et al., 2016)

En el caso más simple, el andamio es mucho más rígido que la membrana, de tal manera que, tras la unión y formación de la estructura, obliga a la membrana a adoptar su forma. La unión del andamio de proteínas a la membrana ocurre normalmente por interacciones electrostáticas. El andamio proteico y la membrana lipídica pueden considerarse como dos capas, láminas elásticas que están en contacto. La curvatura de esta estructura conjunta que forman el andamio y la membrana vendrá determinada por la lámina más rígida, normalmente la del andamio, que impone así su geometría a la membrana (Hu et al., 2008b)

El mecanismo de andamiaje o “scaffolding” para la generación de curvatura local por proteínas individuales fue descrito por primera vez para las proteínas que contienen dominios BAR (Fig. 1.9) (Campelo et al., 2010)

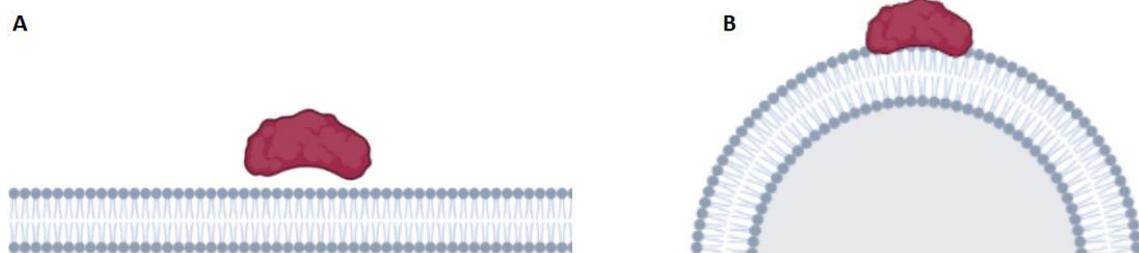


Fig. 1.9. Reconocimiento de la curvatura por parte de los dominios BAR. La unión a la membrana mediada por estos dominios se lleva a cabo por uniones electrostáticas, gracias a los residuos cargados positivamente presentes

en la cara citosólica de la membrana. La unión es más fuerte si hay más residuos implicados, es decir, cuando la curvatura de la membrana coincide con la de la proteína. A, Representación esquemática de un dominio N-BAR sobre una membrana plana cuya curvatura intrínseca no coincide con la de la proteína. B, dominio N-BAR unido a una membrana cuya curvatura coincide con la de la proteína, siendo la unión electrostática más fuerte. Créditos: Biorender.com

Los dominios BAR son capaces de generar curvatura a nivel local, en primer lugar, imponiendo su geometría intrínseca a la de la membrana. Entre los dominios BAR, destacan los llamados clásicos, los F-BAR, los N-BAR y los I-BAR. Todos ellos imponen su geometría y generan mayor o menor curvatura en la membrana, mediante la formación de andamios. Mientras que los dominios N-BAR y F-BAR generan curvatura positiva, los dominios I-BAR generan curvatura negativa (Fig. 1.10) (Simunovic et al., 2019).

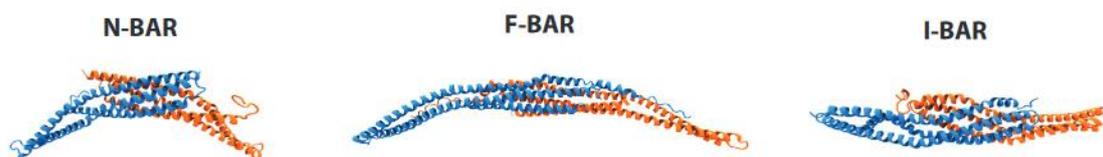


Fig. 1.10. Dominios BAR. La figura muestra los diferentes dominios BAR. Los N-BAR y los F-BAR generan curvatura positiva, mientras que los I-BAR generan curvatura negativa. Los F-BAR a su vez, generan una curvatura más suave, dada su forma. Reproducido de Simunovic et al, 2019. Con permiso de Annual Reviews, Inc

En lo que respecta a los dominios N-BAR y F-BAR, aunque ambos generan curvatura positiva, la que generan los F-BAR es más suave (Simunovic et al., 2019). Tienen una curvatura intrínseca menos pronunciada, y pueden unirse a membranas más planas. Esta diferencia en la curvatura intrínseca entre los dominios N-BAR y los F-BAR se ve en el diámetro de los tubos que generan a partir de la membrana de los GUVs; los tubos formados por acción de los dominios F-BAR son hasta 3 veces superiores en diámetro a los formados por los N-BAR. Esta diferencia se correlaciona con la diferencia en la curvatura intrínseca de los respectivos dominios (Frost et al., 2008). Ambos dominios participan en procesos como la endocitosis mediada por clatrina, pero en momentos diferentes, siendo los dominios N-BAR los que se distribuyen en el cuello que conecta la vesícula con la membrana plasmática, donde la curvatura es mayor (Dawson et al.,

2006). En el caso de los dominios N-BAR modelos y simulaciones muestran que la interacción entre moléculas individuales mediada por las deformaciones de la membrana acaba propiciando y favoreciendo la formación del andamio proteico y la remodelación profunda de la membrana (Simunovic et al., 2019). Durante este proceso, que comienza con la interacción entre moléculas individuales, las proteínas que contienen dominios BAR forman filamentos sobre la membrana, que continúan con la formación de la estructura en espiral típica del scaffold y finaliza la deformación de la membrana (Suetsugu, 2016).

En el caso particular de los dominios I-BAR, resultan interesantes ya que generan curvatura negativa, opuesta a la de otros miembros de la familia de los dominios BAR. Experimentos *in vitro*, empleando modelos de membrana como GUVs muestran que la unión de estos dominios a la membrana genera invaginaciones y tubos hacia el interior de los GUVs, y la formación de pequeños clusters, dominios, de $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$, lípido con afinidad por el I-BAR, en la membrana (Jarin et al., 2019). La formación de estos clusters, puede generar asimetrías y favorecer la formación de las deformaciones por acción de los dominios I-BAR (Saarikangas et al., 2009) Las imágenes de criomicroscopía electrónica (crioEM) muestran que estos dominios I-BAR se unen a través de su superficie convexa y por interacción con lípidos con carga negativa a la capa interna de la membrana de los túbulos, propiciando la formación de filopodios (Saarikangas et al., 2009).

Otra familia de proteínas que generan curvatura mediante la formación de andamios son las dinaminas, miembros de una familia de proteínas GTPasas, involucradas en procesos de remodelación de la membrana como la endocitosis mediada por clatrina (Schmid & Frolov, 2011). El proceso de formación del andamio se ve favorecido por la acción de proteínas individuales, ya que la deformación producida por una proteína puede ser sentida por proteínas vecinas, y generar fuerzas de atracción entre moléculas individuales (Fig. 1.11).

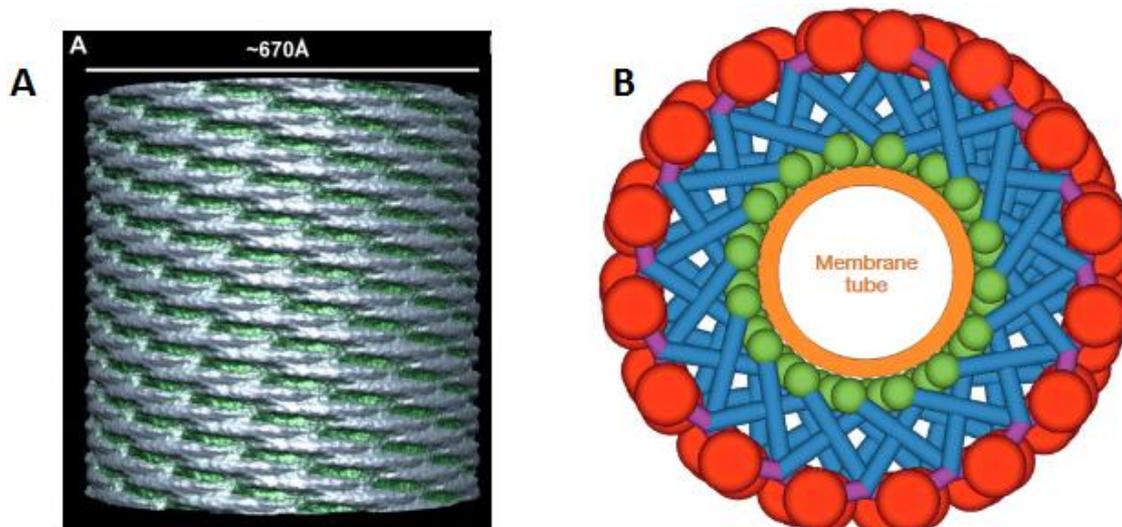


Fig. 1.11. Andamio de proteína alrededor de tubos lipídicos. **A.** Hélice de proteínas que contienen dominios F-BAR, adaptado de Frost et al, 2007, con permiso. **B.** Representación gráfica de la hélice de dinamina alrededor de un NT. A, reproducido de Frost et al, 2008. Copyright 2008, con permiso de Elsevier. B, reproducido de Colom et al, 2017. Con permiso de National Academy of Sciences of the United States of America

El proceso de andamiaje también puede ser llevado a cabo por proteínas consideradas planas, es decir, que no tienen una marcada curvatura intrínseca. Es el caso de la Anexina V (An-V), que ha sido empleada durante el desarrollo de esta tesis. Esta proteína está implicada en la reparación de lesiones, como poros, en la membrana; es capaz de formar estructuras, un entramado que puede estabilizar estas lesiones, los poros, y forzar su cierre (Fig.1.12) (Lin et al., 2020).

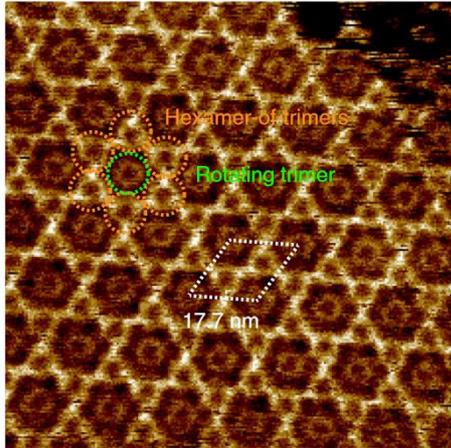


Fig.1.12. Entramado que forma la anexina tras unirse a la membrana. Detalle del entramado que forma la anexina sobre la membrana, compuesto por hexámeros de trimeros. Reproducido de Lin et al, 2020. Artículo bajo licencia internacional creative commons attribution 4.0. Copyright 2020, con permiso de los autores. .

1.2.2. Presión entrópica

Las proteínas con dominios estructurados son, por lo general, mucho más rígidas que las membranas a las que se unen; de este modo, imponen su geometría a la membrana, deformándola (Day & Stachowiak, 2020). Sin embargo, proteínas con dominios no estructurados, desordenados, también son capaces de deformar la membrana (Fig. 1.13)

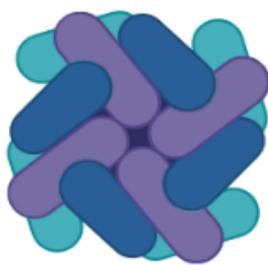


Fig. 1.13. Representación esquemática de una proteína globular. A diferencia de otras proteínas, carecen de dominios estructurados, ordenados, y su aspecto es el de un polímero filamentososo. Créditos: Biorender.com

El efecto sobre la membrana es mucho más débil que el de proteínas con dominios estructurados, y no se debe tanto a la geometría rígida como a la presión entrópica (Lipowsky, 1995)

Los dominios desordenados, no estructurados, pueden describirse como cadenas de polímeros unidas entre sí, formando una estructura globular, enmarañada, carente de estructura, que tiende a ocupar un espacio determinado. El hecho de ocupar todo este espacio provoca que la membrana se deforme, se constriña, alrededor de la proteína, generando así curvatura positiva (Fig. 1.14).



Fig. 1.14. Efecto de proteínas globulares sobre la membrana. La proteína globular, carente de dominios estructurados, tiende a doblar el espacio a su alrededor, generando así curvatura positiva. Este efecto es más intenso en tubos menos curvos, de mayor radio, donde hay más superficie que ocupar.

Cuando muchas de estas proteínas se acumulan en la membrana pueden inducir deformaciones profundas de la membrana, como resultado de la acumulación, o el efecto “crowding” de estas proteínas, y la presión entrópica que generan sobre la membrana (J. Stachowiak, 2022; J. C. Stachowiak et al., 2013). Este proceso de crowding puede no solo deformar la membrana, sino provocar remodelaciones profundas de la misma, tales como procesos de fisión (Snead et al., 2017).

1.2.3. Inserción hidrofóbica y desajuste hidrofóbico

Otro mecanismo para deformar la membrana implica alterar la estructura de la bicapa lipídica. Para ello, es necesario introducir parte de la proteína entre las cadenas hidrofóbicas de los lípidos que constituyen la membrana. La forma más característica de hacer esto es mediante la inserción de hélices anfipáticas (AH, por sus siglas en inglés) (Drin & Antony, 2010). Las proteínas citosólicas que emplean este mecanismo no se insertan de manera profunda en la bicapa; una inserción superficial de estas

hélices anfipáticas es suficiente para generar elevadas curvaturas (Kozlov et al., 2014). Por eso las hélices anfipáticas son muy frecuentes en proteínas implicadas en procesos de remodelación de la membrana (Drin & Antonny, 2010). Normalmente las proteínas que presentan estas AH también presentan otros mecanismos de generación de curvatura, como se ha visto en el caso de las proteínas que contienen dominios N-BAR e I-BAR, donde aparecen ambos mecanismos (curvatura intrínseca y AH); por eso en ocasiones no está claro si el efecto sobre la membrana se debe más bien a las hélices que se insertan o si se trata de un compromiso entre ambos mecanismos (Campelo et al., 2010). Algunas simulaciones muestran que el efecto sobre la curvatura local se debe sobre todo a la unión a través del dominio cóncavo, donde abundan los residuos con carga positiva, siendo éste mecanismo suficiente para unirse a la membrana y promover curvatura a nivel local (Campelo et al., 2010); no obstante, la presencia de las hélices anfipáticas y su inserción estabiliza la unión a la membrana del dominio N-BAR, comparado con mutantes que carecen de las hélices anfipáticas, y, aunque estas hélices por si solas no parecen generar curvatura, su contribución debe tenerse en cuenta cuando están presentes a altas concentraciones (Arkhipov et al., 2009; Blood et al., 2008).

Además de en los dominios ya citados, estas hélices anfipáticas han sido identificadas en proteínas como la α -sinucleína o en el dominio ENTH de las epsinas, implicadas también en procesos de remodelación de la membrana (Zhukovsky et al., 2019). La epsina es una proteína que tiene un papel destacado durante la endocitosis mediada por clatrina (Horvath et al., 2007; Steinem & Meinecke, 2021), donde ayuda a atraer la maquinaria protéica a la membrana (Fig. 1.15). En lo que respecta a su dominio ENTH (Epsin NH2-Terminal Homology, por sus siglas en inglés), que ocupará un papel destacado en el presente trabajo de tesis, se sitúa en el extremo N-terminal de la epsina. Es un dominio muy bien conservado, y que aparece en otras proteínas de función similar a la epsina. Es sabido que el dominio ENTH presenta afinidad por fosfoinosítidos como el $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$, a través de los cuales interacciona con la membrana (de Camilli et al., 2002).

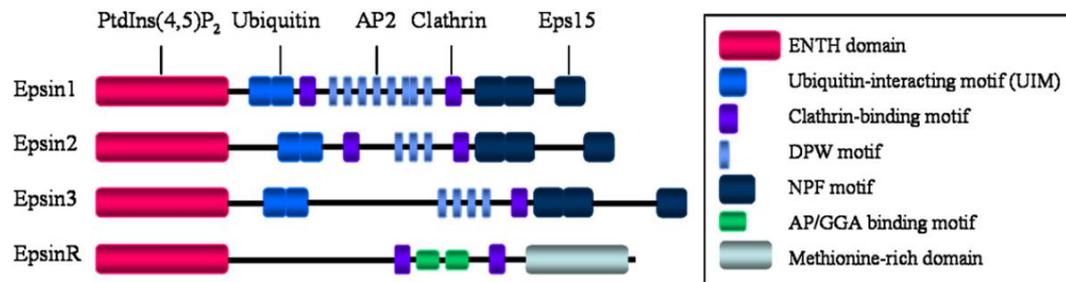


Fig. 1.15. Estructura de diferentes isoformas de la superfamilia de las epsinas. La figura muestra los diferentes dominios que componen las isoformas de la superfamilia de las epsinas, y la afinidad de cada uno de ellos. Reproducido de Horvath et al, 2007. Copyright 2007, con permiso de Elsevier

En las células, el dominio ENTH es capaz de generar curvatura gracias a la existencia de una AH, que, tras la unión a la membrana en zonas ricas en Pi(4,5)P₂, se inserta en la cara interna de la membrana, generando su asimetría y curvándola. El ENTH se estructura y dobla de manera adecuada en contacto con el fosfoinosítido PI(4,5)P₂, y exhibe una pequeña superficie hidrofóbica que se inserta entre los lípidos de la membrana y los empuja (Drin & Antony, 2010) (Fig. 1.16). No obstante, aunque tiene una gran afinidad por los fosfoinosítidos, el dominio ENTH también es capaz de unirse a lípidos cargados negativamente como la fosfatidilserina (PS) (Rozovsky et al., 2012a; Steinem & Meinecke, 2021). De hecho, parece que la presencia de PS induce la oligomerización del dominio ENTH en la membrana y como consecuencia una acumulación de este dominio sobre la membrana, lo que lleva a pensar que, además de la inserción del ENTH, los procesos de remodelación de la membrana producidos por este dominio, que incluyen la tubulación y la vesiculación, se dan también por otros mecanismos, como el crowding proteico. De hecho, probablemente estos mecanismos se den de manera simultánea (Steinem & Meinecke, 2021).

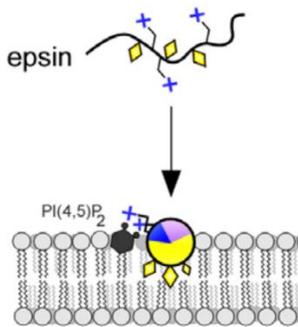


Fig. 1.16. Inserción de la hélice anfipática presente en el dominio ENTH de la epsina. Esta hélice se estructura y dobla en contacto con el fosfoinosítido $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, y se inserta entre las cadenas hidrofóbicas de los lípidos. Reproducido de Drin y Antpny, 2009. Con permiso de John Wiley and sons.

Las AH son frecuentes en proteínas implicadas en procesos de remodelación de la membrana, y actúan como sensores de curvatura (Drin & Antony, 2010). Cuando estos dominios están solos, y se incuban con vesículas de diferente tamaño, y por tanto curvatura, presentan una clara preferencia por aquellas con mayor curvatura. Sin embargo, esta preferencia por la curvatura puede no deberse tanto a la curvatura como tal, sino a la presencia de defectos en la membrana, que surgen cuando una membrana se dobla. A ciertas curvaturas, pueden aparecer problemas de empaquetamiento de lípidos, defectos que dejan expuestas las colas hidrofóbicas de los lípidos. Las AH aprovechan estos defectos para insertarse en la membrana. De este modo, se trata más bien de una detección de residuos hidrofóbicos, aunque sea consecuencia de la curvatura (Hatzakis et al., 2009).

1.2.4. Efecto de los lípidos

Debido a la enorme complejidad que representa el estudio de los diferentes mecanismos de generación de curvatura de membrana *in vivo*, normalmente se opta por su estudio teórico mediante simulaciones y modelos, o mediante la reconstitución de estos procesos de remodelación *in vitro*, usando modelos de membrana adecuados y proteínas purificadas. Estos modelos de membrana se pueden formar a partir de mezclas muy heterogéneas de lípidos; de hecho, a medida que se ha ido resolviendo la estructura de las proteínas, y se ha ido entendiendo su funcionamiento, el papel de los lípidos en la unión de las proteínas a la membrana ha ido cobrando cada vez mayor relevancia. Así, la presencia de ciertos lípidos facilita la unión de las proteínas a la

membrana, o ayuda a disminuir el umbral energético necesario para poder deformar y remodelar la membrana (Chernomordik & Kozlov, 2003; Manni et al., 2018).

El efecto de los lípidos sobre las propiedades de la membrana está relacionado con tres aspectos principales: la composición de sus colas hidrofóbicas, la forma molecular y la carga.

En lo que respecta a la composición de las colas, la presencia de poli-insaturaciones flexibiliza la membrana, haciéndola más fácil de deformar, al reducir el umbral energético necesario para ello (Harayama & Shimizu, 2020; Tiberti et al., 2020). Estos lípidos con poli-insaturaciones suelen estar muy presentes en el cerebro donde hay una constante remodelación de la membrana mediante la exo y endocitosis de vesículas sinápticas (Pinot et al., 2014; Tiberti et al., 2020). Por el contrario, la interacción del colesterol con las colas saturadas tiende a aumentar la rigidez de las membranas (Chakraborty et al., 2020).

En cuanto a la forma y geometría de los lípidos, la presencia de lípidos cónicos como el PE favorece la aparición de defectos en el empaquetamiento de los lípidos en la membrana y la exposición de sus colas hidrofóbicas (Vamparys et al., 2013), lo cual afecta a su vez a la inserción de AH, presentes en muchas proteínas que intervienen en procesos de remodelación de la membrana.

Por último, en lo que respecta a la carga de los lípidos, hay que tener en cuenta que muchas proteínas se unen a la membrana a partir de interacciones electrostáticas entre residuos positivos presentes en dominios específicos de las proteínas, y lípidos cargados negativamente, o presentan una alta afinidad por los fosfolípidos.

Por todo ello, a los mecanismos anteriormente citados que involucran a las proteínas, hay que añadir el efecto que los lípidos tienen sobre la interacción proteína-membrana y sobre las propiedades de la membrana.

A modo de resumen, podemos decir que la interacción de las proteínas citosólicas con la membrana comienza con una molécula individual de proteína que se une a la membrana e interacciona con ella a través de diferentes mecanismos. Esta interacción

resulta en una pequeña deformación a nivel local, nanoscópico, mediante mecanismos bien establecidos y determinados.

Sin embargo, las deformaciones producidas por moléculas individuales no han podido ser debidamente caracterizadas. Por otro lado, aunque el fenómeno de CCC para moléculas individuales ha podido ser establecido (en base a una diferencia en la distribución mediada por la curvatura), las deformaciones de membrana asociadas a este proceso para moléculas individuales no han sido caracterizadas. Sin embargo, establecer correctamente la contribución de las deformaciones producidas por moléculas individuales es importante, porque todo proceso de remodelación de la membrana comienza con moléculas individuales de proteína que luego suman sus efectos, mediante un proceso aditivo, para dar lugar a diferentes topologías (Fig.1.17).

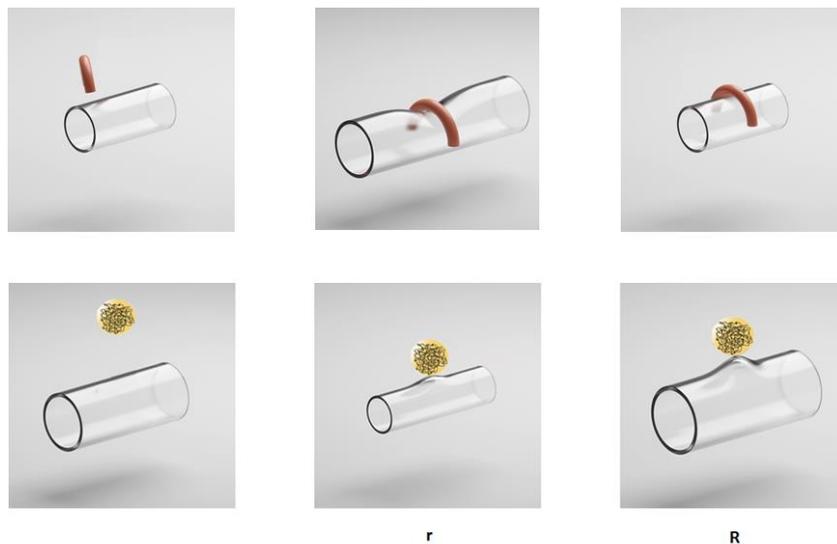


Fig. 1.17. Deformaciones locales de la membrana producidas por moléculas individuales de proteína. Arriba. Efecto de una proteína con curvatura intrínseca sobre la membrana de NTs de diferente radio. **Abajo.** Efecto de una proteína globular sobre la membrana de NTs de diferente radio

Además, hay que tener en cuenta que las deformaciones producidas por una molécula individual de proteína pueden ser muy diferentes a su suma colectiva; por ejemplo, así como una única proteína que contiene dominios BAR, deforma la membrana en una forma característica de silla de montar, el efecto colectivo de estas proteínas tiene como resultado la tubulación de la membrana o formación de cilindros. Esto dificulta aún más el estudio de las deformaciones producidas por moléculas individuales a nivel

local. Por último, cuál es el efecto local que la interacción de la proteína infliere a los lípidos a su alrededor no ha podido ser caracterizado.

Por lo tanto, el **objetivo principal** de esta tesis es *desarrollar una aproximación experimental que permita monitorizar en tiempo real el proceso de reorganización de los componentes de la membrana, las deformaciones locales y las propiedades mecánicas de la membrana y de los lípidos simultáneamente.*

1.3. DETECCION EXPERIMENTAL DE LAS DEFORMACIONES LOCALES

Detectar estas deformaciones locales en la célula es prácticamente imposible debido a la gran cantidad de procesos que ocurren simultáneamente. Por lo general, se han empleado sistemas *in vitro*, para los que se han diseñado diferentes modelos de membrana soportados, por ejemplo, sobre nanoesferas. El principal inconveniente es que estos modelos son rígidos, no deformables, de tal modo que la interacción con estas membranas se ve alterada. Por ello es necesario usar modelos de membrana que sean flexibles, deformables, como por ejemplo vesículas y NTs lipídicos.

1.3.1. Vesículas

En el caso de las vesículas, es posible formarlas de diferentes tamaños, y por tanto curvaturas, pudiendo clasificarse como SUV, LUVs o GUVs, en función de su tamaño (Small, Large, Giant, por sus siglas en inglés) y, en consecuencia, curvatura. Esa diferencia en la curvatura resulta útil para establecer la preferencia por la curvatura de las proteínas, a través de ensayos de sedimentación en los que, tras incubar la proteína con vesículas de diferente curvatura, se compara el grado de unión a la membrana. Estos ensayos nos pueden dar información sobre la fracción de proteína unida a las poblaciones de LUVs de diferente tamaño. Por ejemplo, en el caso de la α -sinucleína, la

preferencia por la curvatura se determinó empelando vesículas unilamelares de diferente tamaño, y por tanto diferente radio y curvatura; en concreto LUVs vs SUVs (small unilamellar vesicles por sus siglas en inglés), donde la unión de la proteína a la membrana de los SUVs, de menor tamaño y mayor curvatura era hasta 15 veces mayor (Middleton & Rhoades, 2010). Este método también se ha empleado con proteínas que contienen dominios BAR, donde tras incubar proteínas que contienen esos dominios con liposomas de diferente tamaño y curvatura, los ensayos de sedimentación revelaron una mayor unión a los liposomas de menor tamaño y por tanto mayor curvatura (Peter et al., 2004).

Es posible estudiar estos modelos de membrana empleando microscopía de epifluorescencia. Sin embargo, esta unión genera un claro límite de resolución, además de ser imposible observar el efecto a nivel local sobre la membrana de moléculas individuales de proteína.

No obstante, estos métodos sí que permiten determinar si se puede discriminar forma y geometría. Modelos de membrana de diferente forma y por tanto geometría nos van a permitir caracterizar la importancia de la geometría respecto a la curvatura. Los modelos más usados para comparar el efecto de la geometría son estructuras cilíndricas, como los NTs, y esféricas, como las vesículas. Estos modelos presentan geometrías que son muy frecuentes en la célula, y, aunque ambas estructuras tengan la misma curvatura, ¿es posible que la geometría afecte a la preferencia por una u otra? Una estructura cilíndrica y otra esférica pueden tener la misma curvatura media, resultado de la suma de sus curvaturas principales. Sin embargo, pueden tener una curvatura gaussiana, que es el producto de las curvaturas principales, diferente (Larsen et al., 2020). Recientes estudios experimentales, apoyados por modelos y simulaciones, en los que se emplean proteínas y ciertos dominios presentes en proteínas, muestran que, en estructuras cilíndricas y esféricas con la misma curvatura media, la unión a las esféricas es varios órdenes mayor, por efecto de la curvatura gaussiana, existiendo así una discriminación o una preferencia por ciertas geometrías ligadas a ciertas curvaturas (Fig. 1.18) (Larsen et al., 2020).

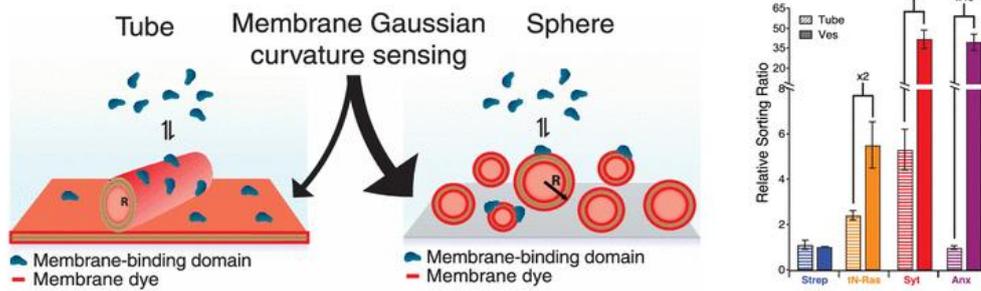


Fig. 1.18. Efecto de la geometría y la forma sobre la interacción de las proteínas con la membrana. No solo la forma, sino también la geometría, que afecta a la curvatura, influye en la unión de las proteínas a la membrana. Considerados modelos de membrana con la misma curvatura media pero distinta geometría, las proteínas muestran una clara preferencia por uno de ellos. Reproducido de Larsen et al, 2020. Copyright © 2020 con permiso de American Chemical Society

Estos modelos de membrana son particularmente útiles si se acoplan a fluorescencia para observar el efecto colectivo sobre la membrana. Así, se han empleado para estudiar y observar la remodelación de la membrana por efecto de proteínas como, por ejemplo, el dominio ENTH. De este modo, GUVs que contienen una fracción molar variable de PI(4,5)P₂ se incuban con el dominio ENTH marcado para poder detectar la unión a la membrana por fluorescencia. De este modo, se observa la tubulación de membranas de GUVs a los que la proteína se ha unido gracias al PI(4,5)P₂ presente; esta deformación de la membrana aumenta con el tiempo y la concentración de proteína, y tiene lugar a través de un proceso de acumulación de proteína en la membrana (Fig. 1.19) (J. C. Stachowiak et al., 2013; Yoon et al., 2010).

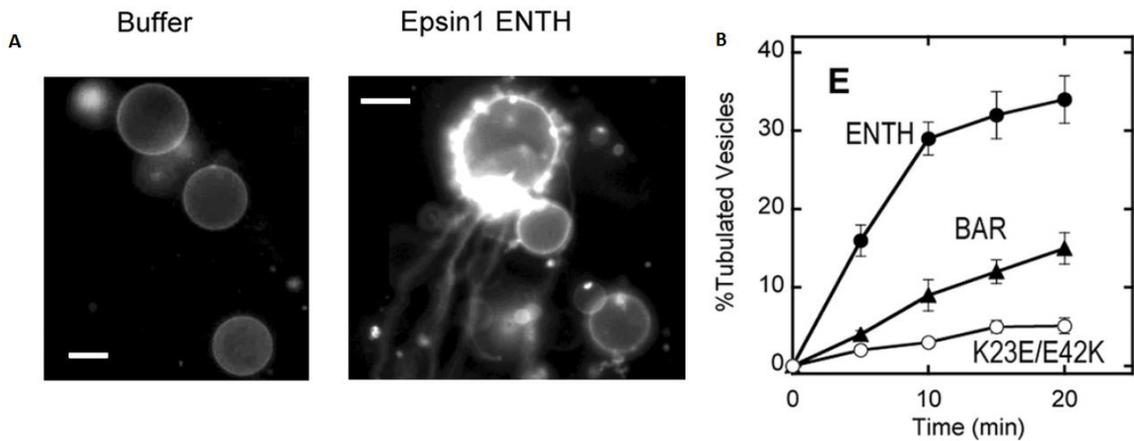


Fig. 1.19. Tubulación de membrana por efecto del dominio ENTH de la epsina. **A.** Tras la adición de la proteína, la membrana de las GUVs resulta tubulada. **B.** el número de vesículas tubuladas aumenta con el tiempo. Reproducido de Yoon et al, 2009. Artículo bajo licencia Creative Commons CC-BY. Con permiso de Elsevier.

Se puede superar el límite de resolución asociado a la fluorescencia, acoplado estos modelos de membrana a técnicas como como la crio EM, donde las deformaciones de membrana de escala molecular pueden ser resueltas. Así, por ejemplo, es posible observar el efecto de las proteínas sobre la membrana y la remodelación que producen en ella, como en el caso de la sinucleína, que, incubadas con vesículas multilamelares, tubulan la membrana, pudiéndose identificarse los tubos fácilmente mediante Crio-EM (Varkey et al., 2010). Del mismo modo, la remodelación de la membrana producida por la dinamina también ha podido ser observada incubando dicha proteína con vesículas unilamelares y empleando esta técnica (Sweitzer & Hinshaw, 1998) (Fig 1.20).

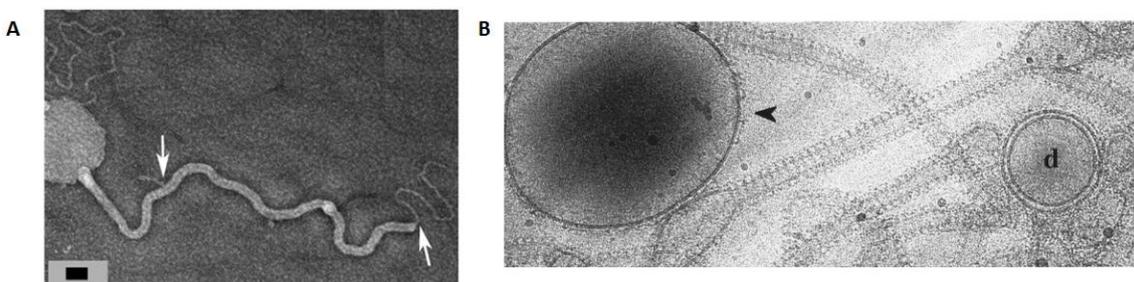


Fig. 1.20. Remodelación de la membrana de vesículas por efecto de la sinucleína y la dinamina. **A.** Reproducido de Varkey et al, 2010, con permiso de Elsevier. Artículo bajo licencia Creative Commons CC-BY. **B.** reproducido de Sweitzer y Hinshaw, 1998. Copyright © 1998 con permiso de Cell Press

En este mismo sentido, emplear vesículas unilamelares de diferentes tamaños, permite observar diferencias en la unión a la membrana de una determinada proteína, pudiendo observar la preferencia por la curvatura de la misma, superando el límite de resolución impuesto por la fluorescencia o la observación indirecta de la preferencia por la curvatura que supone un ensayo de sedimentación. También es posible observar y comparar la morfología de vesículas desnudas, en ausencia de proteína, obtenidas mediante diferentes procedimientos, o bajo diferentes condiciones (Emelyanov et al., 2020). Esta técnica supuso la confirmación directa, por ejemplo, de la generación de curvatura por parte de los dominios BAR, la cual comienza con un reconocimiento de la curvatura por parte de las proteínas que contienen estos dominios. De esta forma es fácil detectar el efecto colectivo ya que el estado inicial (esférico) y el final (tubular) están bien definidos. Sin embargo, la detección por crioEM solo ofrece la imagen estática del antes y el después, perdiéndose toda la información sobre la dinámica del proceso. Por eso se hace necesario buscar otras maneras de detectar las deformaciones locales. Las observaciones iniciales de la tubulación producida como efecto colectivo sobre la membrana de diferentes vesículas revelan que la geometría tubular puede ser adecuada para resolver cambios dinámicos de la curvatura. Así, los NTs lipídicos se han convertido en uno de los modelos de membrana más empleados para interrogar a la membrana sobre los procesos de deformación producidos por proteínas y lípidos.

1.3.2. NTs

Los NTs lipídicos son uno de los modelos de membrana más empleados. Tienen un tamaño y radio variable, que oscila entre los 2 y 200 nm de radio, y hasta los 100 micrometros de longitud. Es posible producirlos mediante diferentes procedimientos *in vitro*, que incluyen la manipulación de membranas de bicapas gigantes soportadas, GSBs o GUVs (Velasco-Olmo et al., 2019), el uso de chips de microfluídica o el empleo de motores moleculares (Leduc et al., 2004), entre otros.

1.3.2.1. Monitorización de NTs largos por microscopía de fluorescencia

Es posible monitorizar la remodelación de NTs por microscopía de fluorescencia, empleando lípidos marcados con un fluoróforo adecuado (como por ejemplo rodamina-PE, Rh-PE). Usando los NTs lipídicos preformados es posible observar los cambios en la membrana del NT producidos por la interacción de las proteínas con los lípidos de la membrana, en forma de, por ejemplo, constricciones o estrechamientos localizados de la membrana (Espadas et al., 2019).

Entre los diferentes métodos que permiten la formación de NTs largos, podemos citar dos, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. Por un lado, tenemos la manipulación de la membrana de una bicapa soportada gigante, mediante aspiración con una pipeta (Prévost et al., 2017) en este caso, se emplea una pipeta de borosilicato que se pone en contacto con la membrana de una GUV. Mediante aspiración se consigue fijar el GUV y controlar la tensión de la membrana. A continuación, se emplean pinzas ópticas para desplazar una microesfera que se pone en contacto con la membrana del GUV. Al retraer la microesfera con ayuda de las pinzas ópticas, se genera un NT (Fig. 1.21).

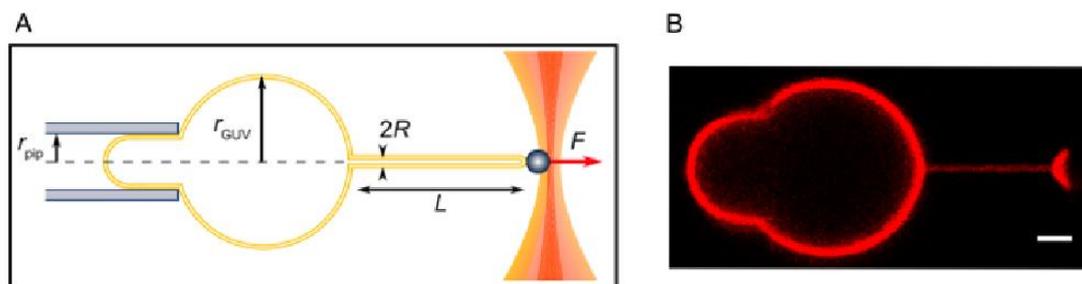


Fig. 1.21. Formación de NT a partir de la membrana de un GUV. A. representación esquemática del sistema para formar el NT. El GUV se sujeta mediante aspiración con una pipeta, mientras que las pinzas ópticas se emplean para poner en contacto una microesfera con la membrana del GUV. La retracción de la microesfera provoca la formación del NT. B. imagen confocal del NT formado a partir de la membrana del GUV. Reproducido de Prévost et al, 2017. Copyright © 2017, con permiso de Journal of Visualized Experiments

También es posible formar NTs con un método similar, en el que el NT se forma directamente con una pipeta de borosilicato que se pone en contacto con la

membrana de un GUV soportado. El movimiento de la pipeta se controla para, tras tocar la membrana, retraerse. Al haber quedado bloqueada la punta de la pipeta con lípido de la membrana, al retraerse es posible formar un NT lipídico (Velasco-Olmo et al., 2019).

Por otro lado, es posible emplear chips de microfluídica para generar NTs, como se ha descrito con anterioridad (Martinez Galvez et al., 2020). En este caso, los NTs se obtienen haciendo rodar microesferas de sílice recubiertas de lamelas lipídicas, de manera controlada, sobre los pilares de polímero que conforman el chip de microfluídica. De este modo es posible conseguir varios NTs de manera simultánea (Fig 1.22.)

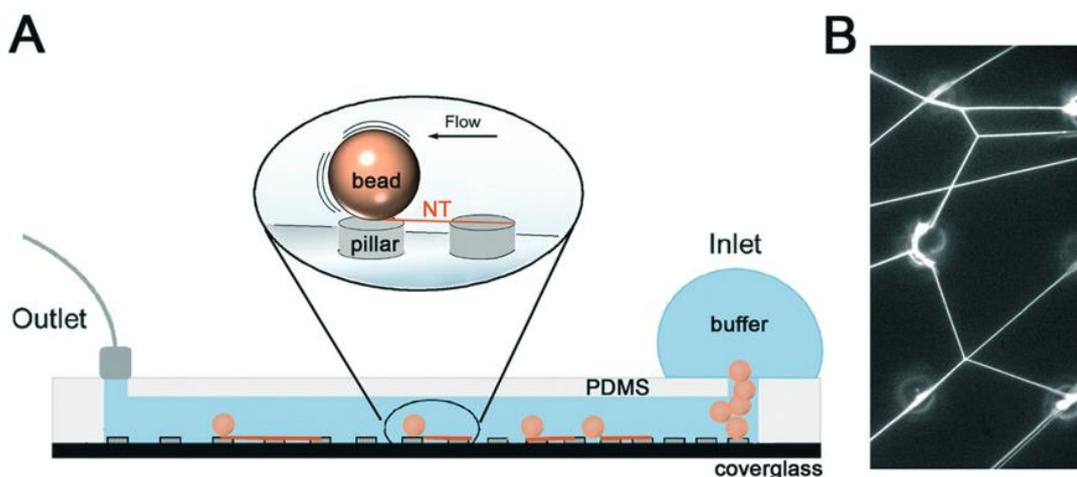


Fig. 1.22. Formación de NTs empelando un chip de microfluídica. A. Representación esquemática del dispositivo. **B.** Obtención de NTs de manera simultánea sobre los pilares que forman parte del chip de microfluídica. Reproducido de Martinez Galvez et al, 2020, con permiso de la Royal Society of chemistry. Artículo bajo licencia Creative Commons No comercial 3.0.

Los NTs tienen una ventaja muy clara: es un sistema unidimensional, nanoscópico considerando únicamente el tamaño del radio, y permite observar y calcular variaciones en el mismo por efecto de las proteínas sobre la membrana del NT.

Es posible calcular el radio de los NTs formados, en base a su fluorescencia. Como hemos dicho, estos NTs pueden formarse antes de la adición de la proteína, así que es posible calcular el radio del NT antes y después de la interacción de la proteína con la membrana del NT, como ya se ha realizado con anterioridad (Dar et al., 2015). Para ello, es necesario aplicar la siguiente ecuación,

$$r_{NT}(2 * \Pi * \rho_0 * L_{ROI}) = I_{ROI}$$

Donde r_{NT} es el radio del NT; ρ_0 es la constante de calibración que relaciona la intensidad de fluorescencia con el área de la membrana; L_{ROI} hace referencia a la longitud de una región de interés escogida en la membrana del NT, y por último, I_{ROI} hace referencia a la intensidad de la fluorescencia para esa región de interés. Así, según el método mencionado anteriormente, y conociendo cada término de la ecuación, en primer lugar es necesario realizar una calibración, empleando para ello parches lipídicos sobre los cuales se van a seleccionar varias regiones de interés de área creciente. De aquí, representando las intensidades de fluorescencia de cada área frente al área, va a ser posible obtener la constante de calibración. A continuación, es necesario seleccionar una región de interés en el NT, y determinar su longitud, y la intensidad de fluorescencia asociada. Una vez conocidos todos los términos, basta emplear la ecuación para calcular el radio del NT. Por tanto, el radio de los NTs se puede calcular fácilmente, de tal manera que, a menor radio, mayor es la curvatura.

La resolución que se alcanza con este método en lo referente al r_{NT} es muy buena. Sin embargo, esto solo es así para NTs muy largos, donde se pueda ver el efecto colectivo de las proteínas en forma de constricciones. Así, este sistema de NTs se ha empleado para emular el sistema de tubos del retículo endoplasmático y caracterizar la constricción producida por la proteína reticulón, presente en el retículo endoplasmático y responsable de dar forma y estabilizar el mismo (Espadas et al., 2019) (Fig. 1.23.).

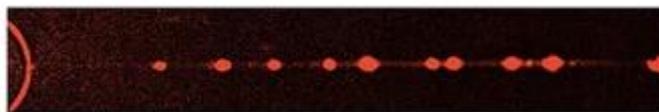


Fig. 1.23. Constricciones producidas por reticulón en la membrana de un NT largo. La imagen muestra la señal de fluorescencia en el canal de lípido (Rh-PE), donde son visibles las constricciones producidas por la proteína reticulon. Reproducido de Espadas et al, 2019, con permiso de Nature Publishing group.. Artículo bajo licencia Internacional Creative Commons Attribution 4.0

Tal y como dijimos antes, los NTs largos no solo permiten observar el efecto colectivo sobre la membrana en forma de constricciones, sino que también permiten establecer la preferencia por la curvatura, el CCC, como ocurría con las vesículas. En el caso de que el NT esté conectado a un reservorio como la membrana del GSB o del GUV, que puede considerarse plana a efectos prácticos, se puede determinar la preferencia por la curvatura de una proteína, comparando la unión la proteína de interés a la membrana del GUV respecto a la membrana del NT (Tian & Baumgart, 2009). El ratio entre ambos valores es lo que se conoce como coeficiente de clasificación, que no es más que la redistribución de una molécula en un gradiente de curvaturas por efecto de la misma (Fig. 1.24.)

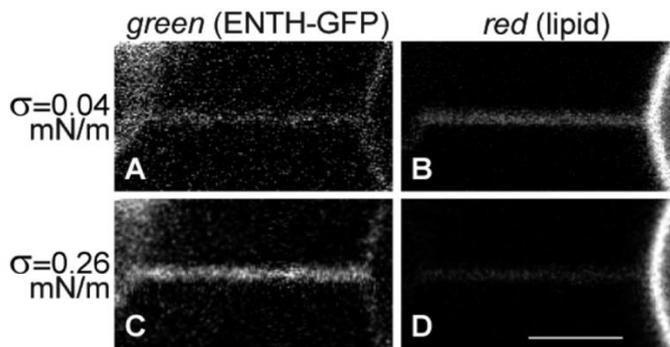


Fig.1.24. **Sorting del dominio ENTH de la epsina en un gradiente de curvaturas.** La proteína se distribuye y acumula en la membrana del NT, en mayor medida cuanto más pequeño es el radio y por tanto la curvatura, frente a la membrana plana del reservorio. Reproducido con permiso de Capraro et al 2009, Copyright 2010 con permiso de American Chemical Society

Existen varios estudios en los que este método se emplea para determinar la preferencia por la curvatura no sólo de proteínas, sino también de lípidos. En lo que respecta las primeras, podemos citar por ejemplo el dominio ENTH o la subunidad B de la toxina del Cólera (Tian & Baumgart, 2009). En ambos casos, el sistema de NTs formados por manipulación de la membrana de GUVs se ha empleado para obtener un gradiente de curvatura, entre la membrana cuasi-plana del GUV, y la curva del NT. Tanto el dominio ENTH como la subunidad B tienen una clara preferencia por la curvatura, acumulándose en la membrana del NT. Esta acumulación puede monitorizarse empleando proteína marcada, como es el caso. A menor r_{NT} , mayor es la acumulación favorable a la membrana del NT. (Capraro et al., 2010; Heinrich et al., 2010;

Tian & Baumgart, 2009). En lo que respecta a los lípidos, algunos presentan una geometría cónica, lo que hace que se sientan más “cómodos” en membranas con una curvatura que coincida con su geometría y curvatura intrínseca. Los NTs conectados a un reservorio se han empleado también para ver si la curvatura propicia una clasificación o reorganización de los lípidos, es decir, si éstos tienen una preferencia por la curvatura y si ésta puede detectarse. Aunque algunos estudios, como los anteriormente citados que sí establecen una preferencia por la curvatura de ciertas proteínas (Heinrich et al., 2010; Tian & Baumgart, 2009), sostienen que es difícil observar el efecto de la curvatura sobre lípidos individuales, en otras ocasiones sí que ha sido posible observar, o predecir, esta reorganización de los lípidos por efecto de la curvatura. Es el caso de la CL, un lípido de geometría cónica presenta en las crestas mitocondriales. Empleando NTs lipídicos conectados a un reservorio plano, y CL marcada para poder monitorizarla por fluorescencia, se ha observado una acumulación de la misma en la membrana de los NTs. No obstante, se sugiere que este ordenamiento se ve favorecido por la existencia de interacciones entre las moléculas individuales de CL (Beltrán-Heredia et al., 2019).

De este modo, los procedimientos descritos con anterioridad confirman una fuerte preferencia por la curvatura de ciertas proteínas, un claro acoplamiento entre curvatura y composición, que es más débil para los lípidos. Sin embargo, estos datos son insuficientes para poder obtener información sobre deformaciones locales debido a los límites en la resolución citados anteriormente.

1.3.2.3. Uso de la microscopía de fuerza atómica de alta velocidad (HS AFM) para la caracterización de NTs largos

Por último, también es posible estudiar modelos de membrana mediante Microscopía de Fuerza Atómica, AFM. Esta técnica es muy versátil, y ofrece una gran resolución, incluso a nivel nanoscópico, ya que permite estudiar estructuras nanométricas e incluso moléculas individuales de proteína, y ofrece información sobre las propiedades mecánicas de las membranas (Unsay et al., 2015). Sin embargo, a pesar de las

evidentes ventajas de este método, las velocidades a las que puede trabajar no son suficientes para capturar y caracterizar procesos moleculares dinámicos. Precisamente el interés y la necesidad de estudiar estos procesos ha llevado a la mejora de la técnica, hasta desarrollar la llamada Microscopía de Fuerza Atómica de Alta Velocidad (HS AFM), que permite simultáneamente estudiar la estructura y la dinámica de moléculas individuales de proteína.

Esta técnica se ha empleado para obtener imágenes de la topografía y para estudiar las propiedades mecánicas de GUVs, LUVs (García-Manyes & Sanz, 2010) y recientemente, NTs lipídicos (Lamour et al., 2020), tanto en presencia de proteína como sin ella, e incluso vesículas extracelulares, purificadas a partir de muestras de sangre o líquido cefalorraquídeo (Gazze et al., 2021; Vorselen et al., 2020). El HS AFM se ha empleado para obtener imágenes a nivel submicrométrico de vesículas individuales, tanto sintéticas como extracelulares, trabajando en condiciones fisiológicas o cercanas a ellas; observar forma y tamaño de las vesículas; caracterizar propiedades mecánicas de la membrana, observar cambios en la curvatura y deformaciones de la membrana debidas a la interacción con proteínas y estimar la rigidez de la membrana mediante curvas de fuerza (Vorselen et al., 2020).

Aplicar HS AFM sobre un modelo de membrana flexible, deformable, es difícil, ya que requiere que la vesícula o el NT esté debidamente fijado sobre un soporte rígido. No obstante, se ha empleado la técnica recientemente para caracterizar las propiedades mecánicas de NTs individuales, obteniendo información sobre la altura, grosor, rigidez de la membrana y por extensión, de la resistencia a la flexión de la membrana de varios NTs simultáneamente (Lamour et al., 2020).

Hay que subrayar que la técnica de HS AFM se ha adaptado para poder monitorizar interacciones de proteína con la membrana del NT. Así, incubando la muestra de NT con la actina, y monitorizando la unión de los filamentos de actina y la polimerización de los mismos, ha sido posible determinar cómo cambian las propiedades mecánicas de los NTs por efecto de la proteína (Lamour et al., 2020). En lo que a la interacción de las proteínas con la membrana se refiere, HS AFM también se ha aplicado al estudio de las anexinas. La anexina V se une a fosfolípidos con carga negativa en una unión

mediada por el calcio, y estabiliza la membrana cuando surgen lesiones en la misma, tales como poros. La AFM ha permitido observar la organización supramolecular de esta proteína en trímeros y en estructuras que recubren la membrana, y su unión a la membrana en cuestión de segundos en condiciones que simulan daño celular (Miyagi et al., 2016). Por último, también se ha empleado dinamina en experimentos de HS AFM. Las dinaminas son una superfamilia de GTPasas implicados en procesos de fusión y fisión de membranas intracelulares (Schmid & Frolov, 2011). Son particularmente difíciles de estudiar, ya que los procesos mediados por esta proteína ocurren muy rápido. Sin embargo, empleando HS AFM ha sido posible monitorizar la unión de la proteína a la membrana de NTs y los cambios conformacionales producidos en la característica hélice de dinamina tras la hidrólisis de GTP (Colom et al., 2017), como se muestra la Fig. 1.25.

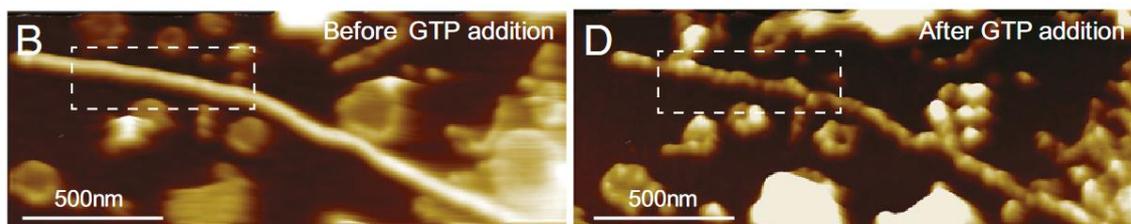


Fig. 1.25. Imagen de HS AFM sobre NT enriquecidos en PS y cubiertos de dinamina. La imagen muestra el NT cubierto de dinamina, antes y después de la adición e hidrólisis de GTP. Reproducido de Colom et al, 2017. Con permiso de National Academy of Sciences of the United States of America.

Sin embargo, tampoco ha sido posible observar la deformación que provoca la dinamina a nivel individual o en forma de pequeños oligómeros sobre la membrana.

1.3.2.4. Monitorización de la remodelación del NT mediante registros electrofisiológicos

Los métodos electrofisiológicos han sido usados con diferentes modelos de membrana para obtener información sobre propiedades eléctricas y mecánicas de la membrana (Zhang et al., 1998). Así, por ejemplo, canales iónicos individuales han sido registrados mediante la técnica de patch clamp tras su reconstrucción en GUVs (Garten et al.,

2017). En estos experimentos, los canales iónicos primero se reconstituían en la membrana del GUVs, el cual a continuación era “parcheado” con una micropipeta que contenía el electrodo de medida, mientras que otro electrodo de referencia se introducía en la cámara de observación de la muestra para microscopía. De esta forma se formaba un circuito eléctrico entre el interior y el exterior del GUV, haciendo posible registrar la actividad de los canales iónicos aplicando una corriente eléctrica entre los electrodos de medida y de referencia, pudiendo discriminar hasta el nivel de un único canal (Garten et al., 2017). También hay estudios en los que las propiedades de la membrana se estudian a partir de NTs formados a partir de la membrana de GUVs; el electrodo en la pipeta y en la célula de microscopía permiten aplicar y medir una corriente eléctrica a través del lumen del NTs (Velasco-Olmo et al., 2019) (Fig 1.26), siempre y cuando el GUV sea un GUV soportado, es decir, que haya defectos que permitan el paso de la corriente en la superficie de contacto del GUV y su soporte. Y como ya hemos dicho, los registros electrofisiológicos también pueden emplearse para medir las propiedades eléctricas de la membrana de células, estableciendo el potencial transmembrana de las células, y detectando la apertura de canales iónicos sensibles al voltaje (Kamiya et al., 2018; Zhang et al., 1998).



Fig. 1.26. Formación de un NT a partir de la membrana de un GSB. Es posible acoplar este método a registros electrofisiológicos para medir la conductancia en el lumen del NT y obtener información sobre las propiedades mecánicas de la membrana. **A.** Representación esquemática de la formación del NT mediante una micropipeta que tira de la membrana de un GSB (beige) soportado en la superficie de una microesfera de sílice (gris). **B.** Imagen de fluorescencia de un NT formado como en A. Barra de escala 10 micras.

Este procedimiento puede resultar especialmente útil para estudiar las deformaciones en la membrana, ya que aporta información sobre la geometría en tiempo real del NT, en base a la conductancia a través del lumen del NT. Considerando el NT un cilindro, la conductancia del mismo depende de la longitud del cilindro, pero también del radio del mismo. De este modo, si se forma un andamio proteico alrededor de la membrana del NT (por ejemplo, por la acción de la dinamina), esto va a provocar una constricción

y por tanto reducción del r_{NT} , que se va a traducir en un descenso en la conductancia (Fig. 1.27.)

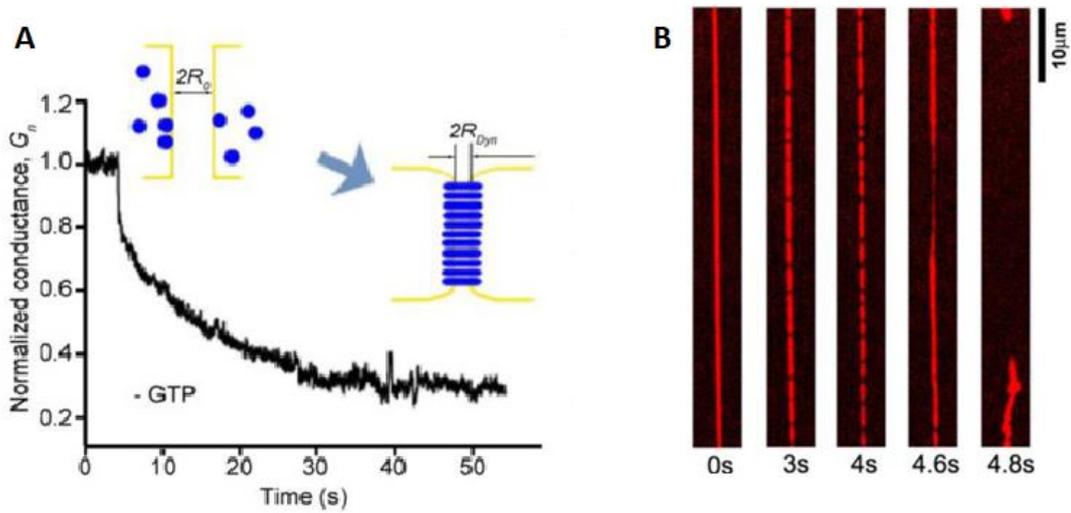


Fig. 1.27. Caída en la conductancia en el lumen del NT debido a la constricción de la membrana por acción de la dinamina 1. **A.** La suave caída en el valor de la conductancia se debe a una disminución en el radio del NT por efecto de la constricción por la acción de la dinamina sobre el NT. En tubos largos se hace imposible discriminar el efecto de moléculas individuales de proteína. **B.** Imagen de fluorescencia de un NT donde se observa la constricción producida por la dinamina sobre la membrana, correspondiente a la gráfica en A. Reproducido de Shnyrova et al, 2013. Copyright © 2013, con permiso de The American Association for the Advancement of Science

El sistema de NT lipídico puede ser miniaturizado para aproximarse a la escala de moléculas individuales, haciéndolo así adecuado para el estudio de deformaciones locales de la membrana producidas por moléculas individuales.

1.3.2.5. Nts ultracortos

Es posible reducir la longitud del NT a escala submicrométrica, lo que resulta en un volumen luminal de zeptolitros, comparable al de una molécula individual. Estos tubos ultracortos permitieron caracterizar y resolver por primera vez la constricción de la membrana del NT y su fisión por efecto de una hélice individual de dinamina 1 (Shnyrova et al., 2013). Además, el ensamblaje de las hélices de dinamina también pudo ser caracterizado, precisamente en base a los sucesivos cambios en la

conductancia medida a través del lumen del NT, a medida que este ensamblaje ocurría (Fig. 1.28.) (Shnyrova et al., 2013).

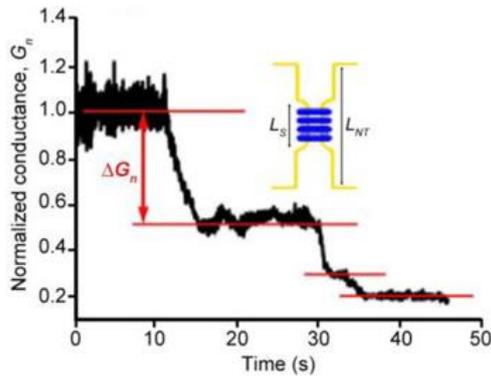


Fig. 1.28. Constricción secuencial de la membrana del NT por Dinamina 1. La formación del anillo de dinamina 1 provoca la constricción secuencial del NT y las correspondientes caídas en la conductancia. Reproducido de Shnyrova et al, 2013. Copyright © 2013, con permiso de The American Association for the Advancement of Science

Estos saltos o variaciones en la conductancia son consecuencia de la reducción del volumen del lumen debido a constricciones locales, que son, en esencia, bloqueos parciales del lumen del NT. Este tipo de detección de señales de conductancia basada en bloqueos parciales del lumen son propias de sensores moleculares, como los nanoporos. La detección de moléculas individuales empleando nanoporos se basa en la detección de cambios en la conductancia producidos por el bloqueo del nanoporo cada vez que una molécula individual lo atraviesa (Howorka & Siwy, 2009).

En lo que respecta a los nanoporos, la detección molecular basada en nanoporos formados por proteínas, por ejemplo, es un procedimiento en rápido desarrollo. Canales proteicos sintéticos y celulares se incorporan a membranas modelo para la detección de moléculas de pequeño tamaño y secuenciación de ADN (Haque et al., 2013). Otros poros de mayor tamaño, los llamados de estado sólido se han empleado para la detección e identificación de moléculas de mayor tamaño, como por ejemplo partículas víricas (Akhtarian et al., 2021; Arima et al., 2018).

El principio que subyace detrás de la detección de moléculas individuales es sencillo: cuando una molécula atraviesa el lumen del nanoporo, bloquea temporalmente la

corriente que atraviesa el lumen del mismo, que produce unos cambios característicos en la conductancia, con una duración definida por el tiempo que la molécula bloquea el nanoporo.

Para conducir una molécula al interior del nanoporo y que lo atravesase, se emplean procedimientos electroforéticos, es decir, se aplica una corriente eléctrica. Para poder trabajar con moléculas que pueden unirse a la membrana, es necesario recubrir el poro con una bicapa lipídica (Eggenberger, Leriche, et al., 2019; Eggenberger, Ying, et al., 2019). El lumen de ese nanoporo cubierto de lípido se asemeja al lumen del NT, aunque los poros sólidos no son deformables. Conducir una molécula que pueda unirse a la membrana del interior del lumen del NT lipídico no solo produce un bloqueo que puede ser identificado, sino que además deforma la membrana. Diferenciar los cambios en la conductancia producidos por el mero bloqueo del lumen de los producidos por la deformación de la membrana puede suponer una dificultad. Sin embargo, la ventaja del NT es que puede ser deformado desde el exterior, de tal manera que la perturbación en las medidas de la conductancia va a ser producida únicamente por las moléculas individuales unidas desde el exterior, a diferencia de lo que ocurre con los nanoporos recubiertos de lípido, donde discriminar una de otra se hace difícil.

Así, considerando todo lo anterior, planteamos la siguiente hipótesis: si un usNT puede detectar deformaciones producidas por pequeñas hélices de Dyn1, entonces debería ser posible, optimizando el sistema, llegar a detectar un número progresivamente menor de moléculas, llegando potencialmente al límite de moléculas individuales. Esperamos de este modo que el sistema de usNT permita no solo detectar y caracterizar las deformaciones producidas por moléculas individuales en tiempo real, sino también determinar los mecanismos que subyacen a estas deformaciones, su efecto sobre las propiedades mecánicas de la membrana, y su diferencia respecto al efecto colectivo de las proteínas.

2.Objetivos

2.OBJETIVOS

Esta tesis se centra en la verificación experimental de las utilidades del NT como un sensor molecular.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Específicamente, los objetivos propuestos son:

- Crear NTs de tamaño molecular a partir de diferentes composiciones lipídicas
- Caracterizar el efecto de los lípidos en las propiedades elásticas de esos NTs
- Comprobar la capacidad de los tubos de actuar como sensores moleculares (para proteínas y lípidos)
- Desarrollar procedimientos electroforéticos para incorporar moléculas a esos NTs

3. Resultados y Discusión

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cuantificación de los parámetros elásticos y geométricos del NT ultracorto

En el desarrollo de esta tesis, se ha trabajado en un sistema para estudiar las deformaciones locales de la membrana asociadas a moléculas individuales y pequeños oligómeros. Este sistema está basado en registros electrofisiológicos, en particular en medidas de la conductancia a través del lumen de un NT ultracorto (usNT por sus siglas en inglés). Este sistema fue desarrollado en nuestro grupo con anterioridad en colaboración con el grupo de la Dra. Shnyrova (Universidad del País Vasco, UPV/EHU) y del Dr. Bashkirov (Instituto de Electroquímica A.N. Frumkin, Moscú) (Bashkirov et al., 2020). El proceso de formación de los usNT, los instrumentos empleados para llevar a cabo las medidas de conductancia, así como la determinación del radio del usNTs a través de las medidas de la conductancia de su lumen están descritos en la sección correspondiente de Materiales y Métodos.

Una característica importante del sistema de los usNT es su longitud, que es submicrométrica, por debajo de 1 μm (Fig. 3.1). El Panel A de la Fig. 3.1. muestra como la conductancia del NT depende inversamente de la longitud del mismo, de tal manera que, a mayor longitud, menor conductancia, y, viceversa, a menor longitud, mayor conductancia. De esta forma, si conocemos cuál es el cambio de la longitud del NT (que se obtiene usando un nanomanipulador calibrado, ver Materiales y Métodos), podemos usar la señal de conductancia para el cálculo del radio del lumen del NT, R_{NT} . Para un NT cilíndrico:

$$G_{NT}L_{NT} = \frac{\pi r_{NT}^2}{\rho} \text{ (Ec. 3.1.)}$$

Si representamos la dependencia experimental de $G_{NT}L_{NT}(L_{NT})$, obtenemos una línea recta horizontal (Fig. 3.1B.) que permite obtener vía regresión lineal el radio del NT

usando la Ec. 3.1., tal y como está descrito en Materiales y Métodos, Sección 5.2.14. Es importante destacar que $G_{NT}L_{NT}(L_{NT})$ permanece horizontal, sin alteraciones, constante (es decir, independiente de L_{NT}) hasta unas longitudes del NT de aproximadamente $L_{NT} \sim 100$ nm.

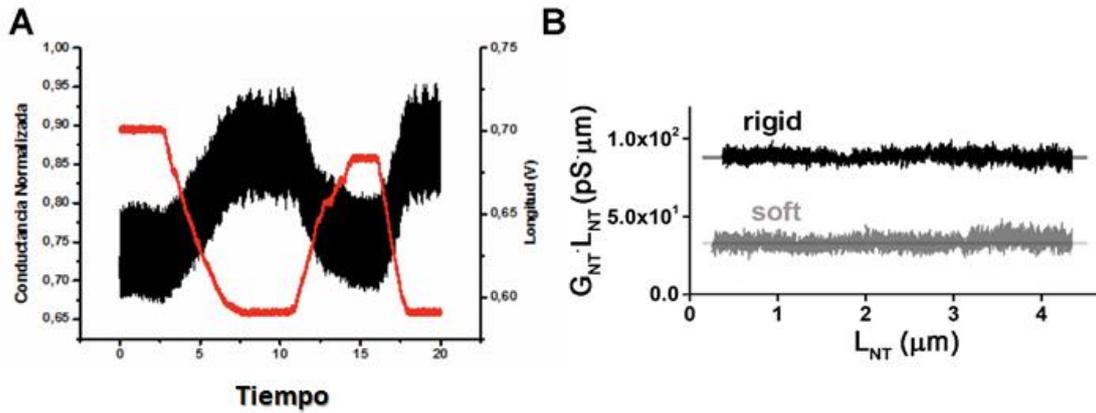


Fig.3.1. Cambios en la conductancia eléctrica a través del lumen del NT asociados a cambios en L_{NT} . A. Ejemplo de un registro de conductancia frente al tiempo (registro negro) que muestra como la conductancia cambia con los cambios en L_{NT} (registro rojo) medidos con el nanomanipulador calibrado. B. Gráfica que muestra la independencia de $G_{NT}L_{NT}$ respecto a L_{NT}

Los NTs normalmente presentan una señal de conductancia estable durante todo el periodo de observación (hasta 30 minutos), para varias composiciones lipídicas biomiméticas, que incluyen lípidos como PE y PolyPE. Por tanto, podemos concluir que el NT mantiene su forma cilíndrica con un radio constante hasta llegar a longitudes extremadamente cortas (~ 100 nm).

El radio del NT cilíndrico depende del módulo de la resistencia a la flexión, k , como recoge la ecuación 3.2:

$$r_{NT} = \sqrt{\frac{k}{2\sigma}} \text{ (ec. 2.2.)}$$

Donde k es el módulo de la resistencia a la flexión, y σ la tensión lateral de la membrana reservorio. La Fig. 3.1B. indica cómo esta simple relación se mantiene hasta

llegar a longitudes submicrométricas, de modo que la mecánica de usNTs depende de los mismos parámetros elásticos que los NTs de longitudes micrométricas.

En estudios previos se ha establecido que las membranas que contienen lípidos poliinsaturados, con una menor resistencia a la flexión y por tanto mayor flexibilidad, resultan en NTs con radios más pequeños que los que no tienen poliinsaturaciones. En acuerdo con esto, los radios calculados para los usNT, en general, oscilan entre los 2-8 nm, siendo los correspondientes a NTs con lípidos poliinsaturados los más bajos. Este hecho puede además traducirse en inestabilidades de la membrana, ya que se llega a alcanzar valores críticos para la remodelación de la membrana debido al gran estrés de curvatura generado.

A pesar de su pequeño tamaño y radio, los NTs de escala submicrométrica, pueden deformarse de manera reversible aplicando una fuerza externa. Esta cualidad es muy importante para la detección molecular, basada en perturbaciones de la membrana provocadas por moléculas individuales u oligómeros. Así, el valor del módulo k de la membrana puede ser calculado aplicando una fuerza externa que perturbe ligeramente la forma del NT, y afecte por lo tanto a su radio, y a la señal de conductancia a través del mismo.

En la figura 3.2.A. se puede observar el esquema del circuito eléctrico correspondiente a las medidas de conductancia realizadas en esta tesis en el lumen de los usNTs. Se puede apreciar que la solución de electrolitos externa al NT se mantiene a un potencial cero gracias a un electrodo de referencia insertado en la misma (Fig. 3.2.A.). De este modo, al aplicar un campo eléctrico a través del lumen del usNT, se crea un campo eléctrico transmembrana que se disipa gradualmente desde la micropipeta, donde está el electrodo de medida, hasta la membrana el reservorio (Fig. 3.2.A.). El campo eléctrico a través de la membrana define la parte electrostática de la energía libre de la membrana del NT. La energía libre de una membrana de un NT ligeramente dilatado debido al efecto de un campo eléctrico puede definirse con la siguiente ecuación:

$$F(z) = 2\pi r(z) \left(\frac{k}{2(r(z))^2} \right) + \sigma - \frac{c_{sp}(u(z))^2}{2} \text{ (ec. 3.3.)}$$

donde $r(z)$ representa la deformación del NT debido al campo eléctrico. La expansión es directamente proporcional a la intensidad del campo transmembrana, decreciendo gradualmente desde la intensidad del voltaje aplicado a un lado del NT (U), hasta cero en el extremo opuesto del NT (Fig. 3.2.A.).

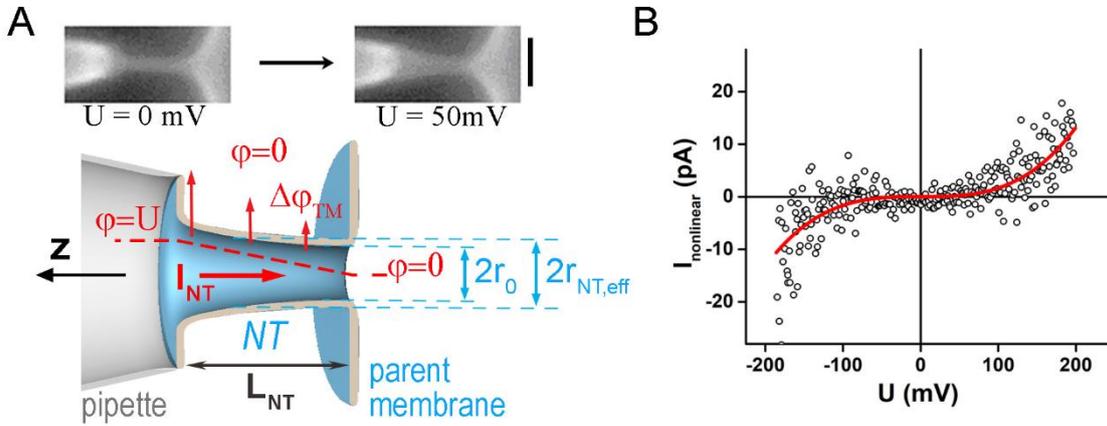


Fig. 3.2. Expansión del NT por efecto del campo eléctrico transluminal. **A.** El dibujo muestra la expansión del NT, extendido entre el parche de membrana dentro de la micropipeta (izquierda) y la membrana del reservorio (derecha) promovida por la aplicación de un campo eléctrico. El gradiente del potencial eléctrico, ϕ , creado entre el extremo de la pipeta (donde $\phi=U$), y el extremo conectado al reservorio del NT (donde $\phi=0$), resulta en la corriente iónica I_{NT} a través del lumen del NT. Como el potencial eléctrico en el exterior de la NT es cero (Ivchenkov et al., 2021) se crea un campo eléctrico transmembrana que aumenta gradualmente desde el reservorio hacia el extremo del NT conectado a la pipeta (flechas rojas). Si no hay gradiente de campo eléctrico, el NT mantiene su forma cilíndrica con el radio igual a r_0 . Tras la aplicación del campo, el NT se expande proporcionalmente a la amplitud local del campo transmembrana. Sin embargo, la conductancia de NT todavía se puede describir como la de un cilindro con el radio $r_{NT,eff}$ (ver texto). **B.** Un ejemplo característico del comportamiento de la corriente frente al voltaje de la conductancia luminal del NT. La expansión, proporcional al cuadrado del potencial transmembrana, conduce al aumento de la conductancia con el voltaje.

La expansión del NT debido al campo eléctrico aplicado y la presencia del campo eléctrico transmembrana provoca que la intensidad del campo eléctrico no sea lineal respecto al U aplicado, de modo que la forma del NT se desvía de la de un cilindro. La minimización $\sigma \gg \frac{c_{sp}(u(z))^2}{2}$ de la Ec. 3.3. resulta en una forma parabólica (Ivchenkov et al., 2021). Hay que hacer notar que la conductancia integrada del NT parabólico retiene la dependencia lineal de la longitud del NT $G_{NT}L_{NT} = \frac{\pi r_{NT,eff}^2}{\rho}$, de forma semejante a la descrita por al Ec. 3.1. Sin embargo, la conductancia ahora no se define

a través del radio de un cilindro real, sino por el radio efectivo ($r_{NT,eff}$) que se sitúa entre los valores de los radios de ambos extremos del NT (Fig. 3.2.A, (Ivchenkov et al., 2021).

A continuación, mostramos que esta expansión del NT puede emplearse para cuantificar los principales parámetros mecánicos de la membrana del NT: el módulo k , y la tensión lateral, σ .

Mientras que el campo eléctrico expande el NT de manera no uniforme, vemos que integrando la ecuación 3.4,

$$r_{NT,eff} = \sqrt{\frac{L_{NT}\rho G_{NT}}{\pi}} \quad (\text{Ec.3.4})$$

Al igual que el radio r_{NT} de un NT cilíndrico (es decir a $U = 0$ mV) es independiente de L_{NT} (Fig. 3.1.B), el radio efectivo del NT es independiente de L_{NT} a un voltaje arbitrario cualquiera. Básicamente, el $r_{NT,eff}$ es el radio de NT cilíndrico que tenga la misma conductancia que el NT expandido por efecto del campo eléctrico. La independencia de $r_{NT,eff}$ respecto a la longitud del NT se comprobó experimentalmente para diferentes voltajes (Fig. 3.3, recuadro). Es importante destacar que el radio permanece inalterable en un amplio rango de longitudes, desde las micras a los 100 nm, lo que permite que los NTs de escala submicrométrica puedan ser expandidos cuantitativamente por efecto de un campo eléctrico.

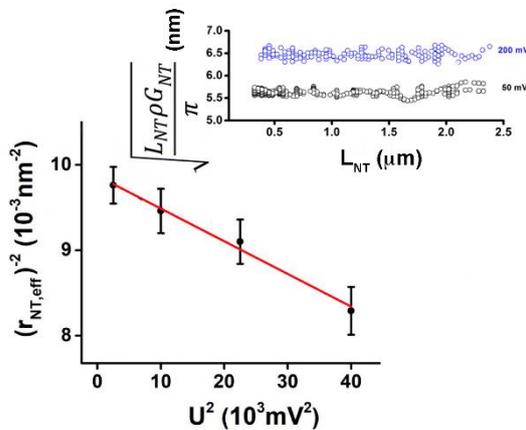


Fig. 3.3. Cambios en el radio efectivo del NT debidos al campo eléctrico transluminal ($\Delta\varphi_{TM}$, Fig. 2.2.A). El recuadro muestra la independencia del radio efectivo del NT respecto a L_{NT} en un rango que va de varias micras hasta los 100 nm. Reproducido de Bashkirov, 2020.

Esta expansión puede ser empleada para la determinación de los parámetros elásticos de usNT, donde el aumento del radio efectivo del NT $r_{NT,eff}$ con el voltaje depende paramétricamente de k y σ (Ivchenkov et al., 2021), según:

$$r_{NT,eff}^{-2} = \frac{2\sigma}{k} - \frac{C_{SP}U^2}{3k} \quad (\text{Ec.3.5})$$

, donde consideramos C_{sp} como la capacitancia específica de la bicapa plana y C_m , una propiedad material independiente del campo eléctrico transmembrana. Por tanto, ajustando la Ec.5 respecto al voltaje, podemos obtener los parámetros mecánicos de la membrana del usNT. A continuación, pasamos a enumerar los valores mecánicos obtenidos en usNT de diferentes composiciones lipídicas. En especial, hemos querido caracterizar cuál es el efecto de PE y lípidos poliinsaturados (polyPE y PolyPC) sobre la mecánica de la membrana, ya que estos lípidos afectan de manera efectiva el funcionamiento de varias proteínas, tal y como ha sido establecido con anterioridad (Pinot et al., 2014; Tiberti et al., 2020).

Para ello, hemos formado usNT a partir de bicapas lipídicas planas (ver Materiales y Métodos) que contenían estos lípidos. La Tabla 3.1. refleja los valores obtenidos para las diferentes composiciones de los usNTs. Se observó que tanto el DOPE como las poliinsaturaciones afectan al módulo k de manera similar, reduciéndola sustancialmente.

Composición lipídica, relación molar	k , $\text{J}\times 10^{-19}$
DOPC:(18:1)PE 7:3	0.58 ± 0.12
DOPC:(18:1)PE 6:4	0.51 ± 0.15
DOPC:(20:4)PE 7:3	0.52 ± 0.10
DOPC:(20:4)PE	0.42 ± 0.11

6:4	
DOPC:(20:4)PC	0.58 ± 0.11
7:3	
DOPC:chol	0.88 ± 0.16
7:3	

Tabla 3.1. Valores de resistencia a la flexión, k , calculados a partir de las medidas de conductancia a través del lumen de usNTs que contienen DOPE y lípidos poliinsaturados, empleando el procedimiento descrito con anterioridad.

Discusión

Los NTs han sido clave para el análisis mecanístico de diversos procesos celulares, como, por ejemplo, la remodelación de la membrana, la reorganización mediada por la curvatura de los componentes de la membrana o la formación de dominios de membrana (Roux, 2013; Roux et al., 2005; Tian & Baumgart, 2009). La posibilidad de formar usNTs con longitud submicrométrica para reconstituir y analizar los procesos de deformación de la membrana debidos a moléculas individuales de proteína fue propuesta por primera vez hace casi una década (Bashkirov et al., 2020; Shnyrova et al., 2013). La creación de curvatura por parte de pequeños polímeros helicoidales de la dinamina 1 (Dyn1, proteína que orquesta la fisión de la membrana durante la endocitosis), se detectó como pequeños cambios en la conductancia eléctrica medida a través del lumen de los usNT (Fig. 1.28.). Sin embargo, lo que se realmente se observó en ese estudio fueron los cambios conformacionales de la hélice de la Dyn1 y no la interacción de una única molécula de Dyn1 con la membrana del NT. No obstante, *a priori*, conocer la estructura de la hélice de Dyn1 permite interpretar los cambios en la conductancia eléctrica registrados como constricciones locales de la membrana del usNT: los parámetros de la constricción, la longitud axial, la curvatura se estimaron a partir de la amplitud de los cambios en la conductancia (Shnyrova et al., 2013).

Además de demostrar que es posible detectar y caracterizar deformaciones de membrana pequeñas, el estudio citado resaltó que la detección de estas deformaciones requiere de cambios en la conductancia eléctrica medibles, de manera similar a como ocurre en la detección de moléculas individuales a través de nanoporos de estado sólido. En estos poros, el paso de una molécula a través del lumen del poro se detecta como un bloqueo del mismo, que está asociado a cambios medibles en la conductancia a través del nanoporo (Xue et al., 2020). Cada vez que una molécula atraviesa el nanoporo, se detectan estos cambios en la conductancia eléctrica. Así, este trabajo se ha desarrollado bajo la premisa de que los usNT permiten detectar los cambios en la conductancia producidos por moléculas individuales, similares a los eventos de bloqueo del nanoporo mencionados, considerando que las moléculas individuales que se unen a la membrana externa del NT puede deformarla del mismo modo que lo hace la hélice de Dyn1, pero con menor intensidad; es decir, dando lugar a cambios en la conductancia de menos amplitud.

Antes de explorar la incorporación a la membrana del usNT de moléculas individuales, decidimos no solo tratar de detectar la incorporación colectiva de moléculas de interés, sino además determinar y calcular el valor de los parámetros mecánicos y geométricos del NT y cómo se ven afectados por dicha incorporación. Para ello, nos centramos en dos de los parámetros más importantes, como son el radio del NT (r_{NT}) y la resistencia a la flexión de la membrana del NT (k). Si la incorporación colectiva de moléculas producía un cambio detectable en esos parámetros, entonces razonamos que debería ser posible optimizar el método para la detección de un número de moléculas cada vez más pequeño, alcanzando potencialmente el límite de una única molécula.

Como los usNTs empelados para la detección de la actividad de la Dyn1 sobre la membrana del NT son muy cortos (alrededor de 80 nm) (Shnyrova et al., 2013; Bashkirov et al., 2020), y muy estrechos, alcanzado radios luminales de incluso 2 nm (Bashkirov et al., 2020), comenzamos por comprobar si los métodos existentes para medir tanto el r_{NT} como k en tubos más largos y anchos podían ser aplicados al sistema de usNT. En tubos largos, estos parámetros pueden ser medidos por una serie de

técnicas, como por ejemplo las pinzas ópticas acopladas a microscopía de fluorescencia, microscopía de fuerza atómica AFM o medidas de conductancia eléctrica a través del lumen del NT. (Bashkirov et al, 2020; Roux, 2005; Lamour et al., 2020); sin embargo, en el caso del sistema de usNT, solo pueden emplearse las medidas de conductancia eléctrica, debido al carácter submicroscópico del sistema. Es importante destacar que diferentes procedimientos, incluida la medida de conductancia eléctrica, reflejan valores muy similares de resistencia a la flexión de la membrana para las diferentes composiciones lipídicas de carácter biomimético en las que se ha probado (Bashkirov et al., 2020). Esto a su vez justifica el uso de medidas de conductancia para medir estos parámetros, ya que los valores que ofrece son comparables a los de otras técnicas. Nuestra estrategia consistió en formar NT cada vez más cortos para verificar que los parámetros calculados para tubos largos no variaban con la longitud del NT, y se mantenían constantes hasta valores propios de un usNT (100-200 nm).

En primer lugar, vemos que el r_{NT} permanece constante en todo el rango de longitudes del NT, como hemos visto en la Figura 3.1.

Hay un límite inferior para el tamaño del NT; esto se debe a que cuando se alcanza cierta longitud crítica, se da un cambio de forma espontáneo entre el NT y un catenoide, mucho más amplio (Frolov et al., 2003). Cuando nos aproximamos a esta longitud crítica, la forma del NT comienza a volverse inestable (Frolov et al., 2003; Ivchenkov et al., 2021). Sin embargo, encontramos que la inestabilidad en la forma del NT no afecta al r_{NT} hasta que se vuelve extremadamente corto, alrededor de los 50-100 nm de longitud, como se ve en las Figuras 3.1. y 3.3. Esta longitud crítica depende del diámetro de la micropipeta, su ángulo respecto a la normal de la membrana y la tensión de la membrana reservorio, parámetros que pueden variar entre experimentos. Así, concluimos que el límite inferior de L_{NT} debía ser establecido experimentalmente, mediante varios ciclos de formación del NT y vuelta al catenoide, de manera sucesiva (Frolov et al., 2003). Permaneciendo a unos 10-20 nm sobre el límite crítico, el r_{NT} permanece constante para cualquier longitud del NT, y puede, por lo tanto, ser empleado como un parámetro robusto y fiable para definir la curvatura del usNT.

Para determinar el valor de k , fue necesario cuantificar la expansión del NT por efecto de un campo eléctrico a través del lumen, como refleja la Figura 3.2. Encontramos que esta expansión ocurre para el sistema de usNT, dando como resultado una dependencia del r_{NT} respecto al potencial eléctrico aplicado, como refleja la Figura 3.3. En el caso de composiciones lipídicas básicas, los valores obtenidos para k tras llevar a cabo la regresión lineal de la dependencia del r_{NT} respecto al voltaje aplicado, $r^2(U^2)$, coincidían con valores calculados con anterioridad (ver Tabla 3.1, Bashkirov et al., 2020).

Además, es importante destacar que detectamos una importante reducción de la rigidez de la membrana en presencia de lípidos que, por lo general, están asociados con procesos de remodelación de la membrana, como los lípidos cónicos o lípidos con poliinsaturaciones en las colas hidrofóbicas (Bashkirov et al., 2022; Lamour et al., 2020), tal como recoge la Tabla 3.1.

En tanto en cuanto el efecto principal de estos lípidos es facilitar la unión y la inserción de las proteínas a la membrana, además de mitigar el estrés asociado a la curvatura, vimos que la presencia de estos lípidos facilitaba las deformaciones de la membrana al reducir el valor de k . Llama la atención que la reducción asociada a la presencia de un 30 mol% de dioleoil-PE (DOPE) era similar en magnitud a la producida por Poly-PC, un lípido cuya presencia se considera importante para la flexibilidad de la membrana (Manni et al., 2018), aunque el efecto de cada especie lipídica para conseguir dicho efecto sea en principio diferente. Mientras que en el caso del Poly-PC el efecto se debe a las colas poliinsaturadas y al desorden que provocan en la membrana, en el caso del DOPE este efecto fue asociado previamente al fenómeno de CCC, es decir, la incorporación y expulsión del DOPE hacia y desde la membrana del NT (Bashkirov et al., 2011, 2022; Callan-Jones et al., 2011).

2.2. Incorporación de proteínas y lípidos a la membrana del usNT debido al gradiente curvatura de membrana

Como hemos visto en el capítulo anterior, el sistema de usNT caracterizado mediante registros electrofisiológicos, permite determinar el efecto de los lípidos sobre las propiedades elásticas de la membrana. Una observación interesante fue el hecho de que la presencia de DOPE en la composición hacía la membrana más flexible, es decir, afectaba la resistencia a la flexión disminuyendo el valor k . Este fenómeno ya fue observado por otros grupos (Shi & Baumgart, 2015). Esta reducción se detectó en composiciones donde los demás lípidos tenían las colas hidrofóbicas de la misma longitud que el DOPE, es decir, en mezclas de DOPE:DOPC (ver Tabla 3.1). Como las colas lipídicas son consideradas como un determinante de la rigidez de la membrana (Harayama & Shimizu, 2020; Tiberti et al., 2020), nos preguntamos por qué el efecto sobre k era similar para DOPE y el PE con colas poliinsaturadas.

Para responder a esta pregunta, quisimos imitar el fenómeno de CCC para lípidos, predicho previamente por diferentes modelos (Baoukina et al., 2018). Estos modelos teóricos prevén la distribución de los lípidos con determinada geometría a las zonas con mayor curvatura. De este modo, la composición del usNT y la de la membrana del reservorio deberían ser diferentes. Sin embargo, es imposible determinar la composición del usNT. Por tanto, hipotetizamos que, si la composición del NT debiera ser diferente, este ajuste en la composición debía ocurrir después de la formación del NT desde la membrana plana del reservorio. El NT se forma de manera espontánea en cuanto ocurre el colapso del catenoide (Fig.3.4.A).

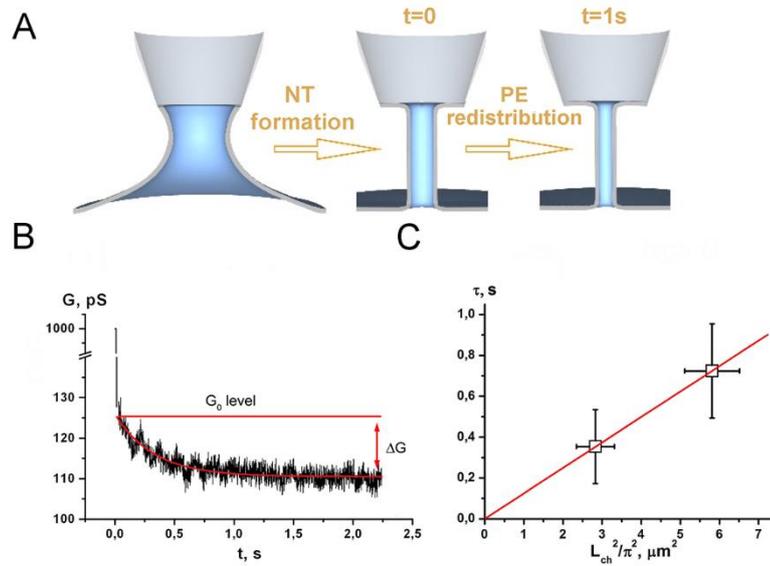


Fig. 3.4. A. Representación esquemática de los cambios de forma del NT tras el colapso debido a la redistribución de DOPE. B. Disminución en la conductancia provocada por esa redistribución, observados como una disminución gradual del valor de la conductancia luminal. C. Dependencia del tiempo característico de redistribución con la longitud del NT. La pendiente es coherente con el proceso de difusión lipídica.

Las medidas de conductancia a través del NT permitieron identificar un proceso de relajación inmediatamente después del colapso. Este proceso, que implica una suave caída en la conductancia tras el colapso del NT, solo ocurría en NTs conteniendo lípidos cónicos (DOPE), en 25 de 25 casos, pero no así si solo contenían lípidos cilíndricos (DOPC), en 11 de 11 casos (Fig. 3.5.).

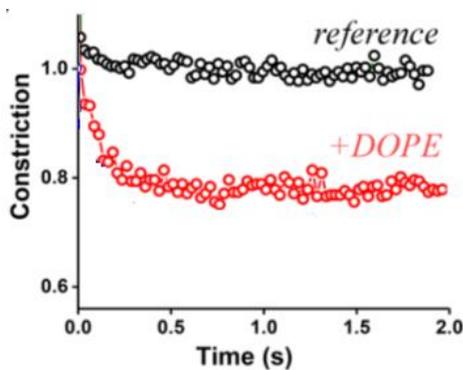


Fig. 3.5. Comparación del comportamiento post-colapso del NT que contiene sólo lípidos cónicos (DOPC, en negro) o una mezcla de lípidos cónicos y cilíndricos (DOPC:DOPE, rojo)

Realizando un ajuste adecuado de la relajación en la conductancia:

$$\frac{G}{G_0} = \frac{G_0 - \Delta G}{G_0} + \frac{\Delta G}{G_0} \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right), \text{ (ec. 3.6)}$$

, se observa que el tiempo característico de relajación, que dependía de L_{NT} , corresponde a un coeficiente de difusión de $D \sim 8 \mu\text{m}^2/\text{s}$, consistente con la libre difusión de lípidos (Macháň & Hof, 2010). Además, empleando la ecuación 3.7,

$$\frac{G_0 - \Delta G}{G_0} = \frac{k_0 - \Delta k}{k} \text{ (ec. 3.7.)}$$

fue posible determinar la reducción en el valor de la resistencia a la flexión efectiva. Así, obtuvimos que $\Delta k = k_{DOPC} - k_{DOPC:DOPE}$, lo que indica que la flexibilización de la membrana se debía a la presencia de DOPE. Una relajación en la conductancia similar se detectó en presencia de PE con poliinsaturaciones. De este modo concluimos que las medidas de conductancia, y en concreto el proceso de relajación, proporciona información sobre el intercambio de lípidos entre el reservorio y la membrana del NT, también en el caso de los usNT. Así, en principio, el sistema de usNT puede proporcionar información sobre el intercambio de lípidos debido a la deformación de la membrana producida por una proteína.

Esta reorganización de los componentes de la membrana por efecto del CCC, o sorting lipídico, permite ajustar la composición de la membrana a nivel local durante la deformación, y reducir así el estrés elástico asociado, al acercar la membrana a un nuevo estado de referencia. La fuerza que rige este fenómeno es el desajuste entre la geometría de la membrana y la curvatura espontánea del DOPE, que es muy elevada (-0.4nm^{-1} , (Fuller & Rand, 2001)). De este modo el DOPE se va a acumular en la membrana interna del NT, cuya curvatura coincide con la del lípido, escapando de la membrana externa, donde la curvatura es positiva. Como la cantidad de DOPE total sigue siendo la misma en el NT, la microscopía de fluorescencia no puede proporcionar información sobre esta reorganización. Si la zona donde ocurre la deformación está conectada a un reservorio, como ocurre en el sistema de usNT, las moléculas con curvatura espontánea van a difundir libremente en el gradiente de curvaturas entre el reservorio plano y la membrana curva del NT. Esto provocará un cambio en la curvatura y en la

composición a nivel local. Precisamente la llamada resistencia a la flexión efectiva depende de la composición local, y es por eso por lo que este fenómeno de relajación provoca una flexibilización de la membrana y una reducción de la resistencia a la flexión efectiva.

Tomando como base los colapsos en la formación de NTs de diferente composición y la presencia o ausencia de relajación, puede establecerse la geometría de otros lípidos, y su efecto sobre la curvatura de la membrana y la resistencia a la flexión efectiva. Tal es el caso de los lípidos poliinsaturados. Los lípidos poliinsaturados pueden ser simétricos o asimétricos, es decir, presentar las insaturaciones en ambas colas, o sólo en una de ellas. Se sabe que estos lípidos tienen un efecto similar al de los lípidos cónicos (DOPE) sobre la membrana, disminuyen la rigidez de la misma.

En el desarrollo de esta tesis, se han testado diferentes lípidos poliinsaturados, simétricos y asimétricos; en concreto PolyPE 18:0 22:6; PolyPE 18:0 20:4; PolyPE 20:4; PolyPC 20:4, todos ellos con unos valores similares de flexibilización de la membrana, como se ve en la Tabla 3.1. Es interesante destacar que incluso en presencia de PolyPC, se puede detectar esta relajación en la conductancia, lo que indica que la acumulación de colas lipídicas con poliinsaturaciones tiene como consecuencia una curvatura espontánea negativa.

No obstante, a pesar de que nuestras observaciones coinciden con las de otros grupos para otros lípidos como la cardiolipina (CL). Por ejemplo, se ha detectado en experimentos *in vitro* que aprovechando la diferencia de curvatura entre la membrana de un NT y la del reservorio del que se forma, la cardiolipina se acumulan en el NT (Beltrán-Heredia et al., 2019). Sin embargo, otros estudios sostienen que observar y detectar el sorting de lípidos individuales no es posible, y que la redistribución de los mismos depende de interacciones lípido-lípido y lípido-proteína (Tian & Baumgart, 2009).

Por el contrario, el sorting de proteínas, es decir, la preferencia de ciertas proteínas por elevadas curvaturas de membrana está bien establecido. Un ejemplo de ello es la preferencia del dominio ENTH de la epsina por la membrana de NTs formados

a partir de GUVs, respecto a la membrana de los propios GUVs, considerada plana a efectos prácticos (Capraro et al., 2010).

En el caso particular de esta tesis, con la intención de usar el dominio ENTH de la epsina para validar el sistema de usNT, ha sido necesario en primer lugar caracterizar la proteína, su funcionalidad y el coeficiente de distribución en función de la curvatura. Estos experimentos se llevaron a cabo con el dominio ENTH de la epsina amablemente cedida por el grupo de Dr. Baumgart (Laboratorio de biofísica y bioquímica de membranas, Universidad de Pennsylvania, EEUU), y con proteína purificada en nuestro propio grupo (Materiales y Métodos). El dominio ENTH se sitúa en el extremo N-terminal de la epsina, y es un dominio de afinidad por fosfoinosítidos, como el PI(4,5)P₂ y por otros fosfolípidos con carga negativa, como el PS, siendo en este último caso la unión de tipo electrostática y, por tanto, reversible (Rozovsky et al., 2012b).

Hay que subrayar, que en la literatura se establece que el dominio ENTH es capaz de detectar la curvatura de membrana (por lo tanto, puede reorganizarse en zonas de elevada curvatura), y que es capaz de remodelar la membrana mediante la inserción de una hélice anfipática, o por su acumulación sobre la membrana (efecto "crowding", (Steinem & Meinecke, 2021). Nuestros propios experimentos confirman la unión de la proteína a determinadas composiciones, y su capacidad para sentir y generar curvatura.

No obstante, la interacción con el PS está menos documentada, y no se han reportado evidencias sobre la distribución según curvatura de membrana o la remodelación de la membrana cuando el dominio ENTH interacciona con la membrana a través de la unión a este lípido. Debido al contexto fisiológico, caracterizar la interacción del ENTH con el PS se convierte en una cuestión relevante. Así, en primer lugar, quisimos caracterizar la interacción del dominio ENTH con GUVs y NTs que contienen una elevada cantidad de dioleoil-PS (DOPS).

Como vemos en la Fig. 3.6., el dominio ENTH de la epsina es capaz de remodelar la membrana de GUVs que contienen un 40 mol% de DOPS, fosfolípido por

el que siente afinidad y al que se une por interacción electrostática (Rozovsky et al., 2012b).

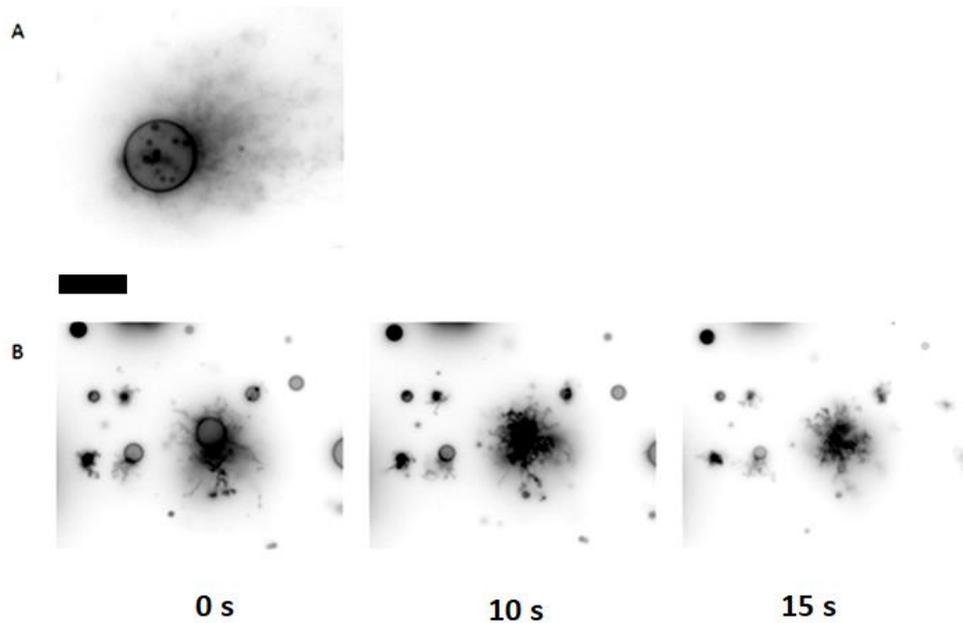


Figura. 3.6. Remodelación de la membrana mediada por la interacción con el dominio ENTH. A. Tubulación de un GUV compuesto de DOPC:DOPE:DOPS:Coolesterol:Rh-PE 20:29:40:10:1 mol% tras añadir 10 μM de ENTH a la solución externa. Se observa la fluorescencia de la Rh-PE. El contraste ha sido invertido para mayor claridad. Barra de escala 20 μm . **B.** Secuencia temporal de la tubulación de un GUV mediada por la acción de ENTH (2.5 μM). La acumulación de proteína acaba por desestabilizar la membrana del GUV. Escala de barra 20 μm

También hemos detectado remodelación de la membrana en los límites de parches lipídicos formados sobre un cristal portaobjetos, así como sobre micro-esferas de sílice recubiertas de lamelas lipídicas (Materiales y Métodos) (Fig. 3.7.).

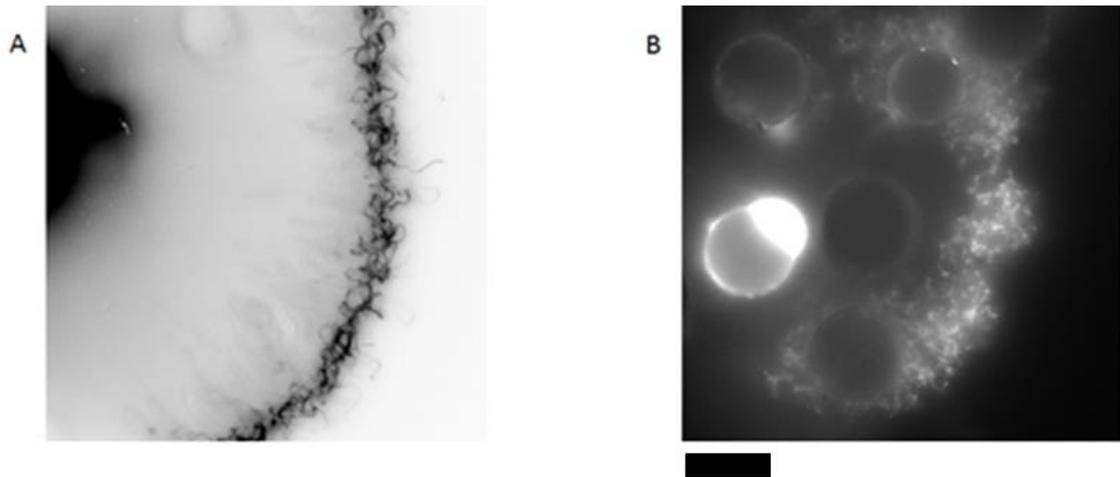


Figura. 3.7. Remodelación de la membrana producida por el dominio ENTH purificado. A. Tubulación producida por ENTH en el límite de un parche que contiene 60 % mol DOPS . B. Tubulación sobre las lamelas lipídicas que rodean las microsferas de sílice de 40 micras de diámetro, producida por ENTH. Escala 40 μm .

A continuación, pasamos a documentar la preferencia por la curvatura del ENTH empleando el sistema de NTs formados a partir de GSBs, empleando lípido marcado con rodamina y proteína unida a la proteína fluorescencia verde (GFP). Aunque está explicado en su correspondiente sección de Materiales y Métodos, para calcular el coeficiente de sorting es necesario comparar la intensidad de la señal asociada a lípidos y proteína, cada uno con su respectivo fluoróforo, en la membrana plana del reservorio y la curva del NT, para una misma área seleccionada (Fig. 3.8). La formación de NTs a partir de la membrana de GSBs también está explicada en su correspondiente sección de Materiales y Métodos. La Fig. 3.8. muestra la preferencia por la curvatura del ENTH-GFP.

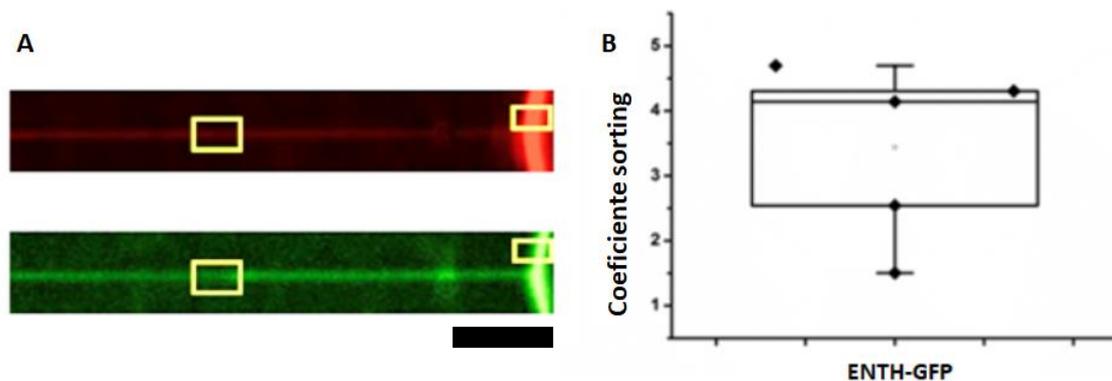


Fig. 3.8. Coeficiente de distribución según preferencia de curvatura del dominio ENTH-GFP. A. NTs formado por

aspiración con pipeta de borosilicato. Se muestran los canales de lípido (rojo) y proteína (verde), con las regiones de interés escogidas para el cálculo del sorting. **B.** Valores de coeficiente de sorting. Barra de escala 10 micras.

De esta forma hemos comprobado que la proteína es funcional y que puede, efectivamente, puede discriminar gradientes de curvatura y remodelar la membrana. Sin embargo, el cálculo del coeficiente de sorting por fluorescencia, sólo nos permite ver el estado final, una vez que la reorganización mediada por curvatura ya ha ocurrido.

Por ello, a continuación registramos la distribución del ENTH por medidas de conductancia en usNTs. La Fig. 3.9. muestra la relajación registrada tras la formación de NTs a partir de membranas que contienen ENTH, frente a membranas formadas por lípidos de geometría cilíndrica, como el DOPC, en ausencia de proteína. Podemos apreciar que en ausencia de moléculas con curvatura intrínseca, no se registra el fenómeno de la relajación en las curvas de conductancia (Fig. 3.9.).

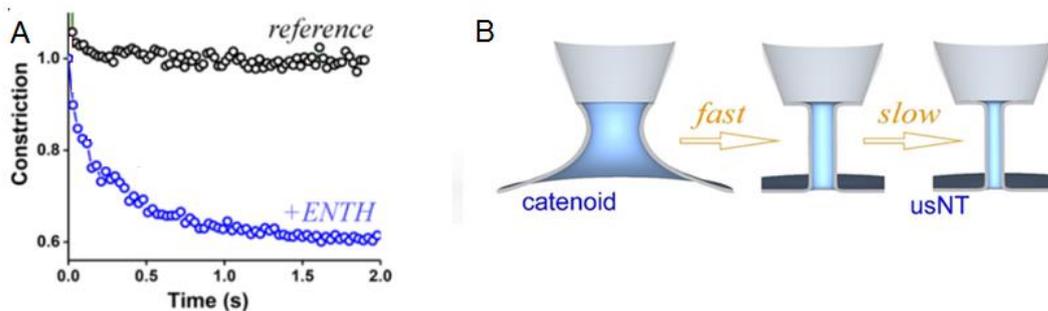


Figura. 3.9. Relajación en presencia de proteína tras la formación del usNT. **A.** Comparación del colapso de dos NT de composición diferente. En negro, composición de referencia, se observa un registro de conductancia en ausencia de lípidos cónicos (recalculado como porcentaje de constricción del NT tras el colapso). En azul, el mismo registro en presencia de ENTH en el reservorio. Se observa la relajación tras el colapso. **B.** Representación esquemática del proceso de relajación tras la formación del NT. Inmediatamente después del colapso, el NT tiene la misma composición que la membrana plana. La posterior reorganización de elementos por efecto del sorting provoca la disminución del radio del NT.

Como se ve en la figura anterior, es posible registrar el proceso de reorganización, el sorting, mediante métodos electrofisiológicos basados en medidas de conductancia, y además se puede hacer *in situ*. Para verificar que esta relajación es debida a la reorganización, en este caso, de una proteína como el ENTH, se deben emplear otros métodos complementarios, como hemos visto.

De este modo, la presencia de la relajación tras el colapso en la formación de un usNT nos da información sobre la geometría de la molécula en cuestión, ya que este fenómeno sólo está presente cuando en la composición hay lípidos con curvatura espontánea (como el DOPE), o proteínas que pueden sentir la curvatura y tienen afinidad por ella (como el ENTH). Además de permitirnos observar *in situ* el proceso de reorganización de proteínas, las medidas de conductancia en el sistema de usNT nos permiten determinar el efecto colectivo que esta reorganización tiene sobre las propiedades mecánicas de la membrana, como la resistencia a la flexión.

Como ya hemos visto anteriormente, es posible calcular el valor de la resistencia a la flexión efectiva mediante las medidas de conductancia a través del NT. En el desarrollo de esta tesis se han empleado estas medidas para caracterizar el efecto colectivo de proteínas sobre la resistencia a la flexión efectiva de la membrana del NT, y por tanto sobre su curvatura.

Hemos visto cómo el dominio ENTH de la epsina tiene un efecto “flexibilizador” sobre la membrana, que además está establecido en la literatura (Pinot et al., 2014). Los registros electrofisiológicos permiten determinar este efecto y compararlo con los valores establecidos. Como podemos ver en la Figura 3.10., la presencia de ENTH disminuye la resistencia a la flexión de la membrana del NT lipídico, respecto a valor en ausencia de la proteína.

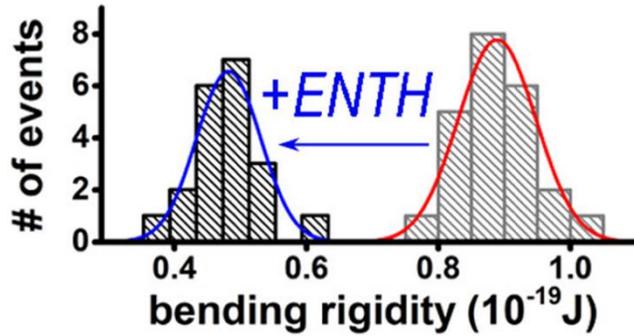


Fig.3.10. Efecto colectivo del dominio ENTH de la epsina sobre la resistencia a la flexión de la membrana. La adición de ENTH y la unión de esta proteína a la membrana del NT tiene como consecuencia la flexibilización del mismo; su resistencia a la flexión disminuye

Así, vemos que es posible determinar las propiedades mecánicas de la membrana en ausencia de proteína, y en presencia de la misma, y observar el efecto colectivo que las proteínas tienen sobre dichas propiedades.

El análisis de los datos nos muestra que, aunque es imposible llegar al límite de resolver una única molécula de lípidos, podemos discriminar el efecto colectivo de alrededor de cien moléculas de lípidos, y de decenas de proteínas, lo cual se acerca bastante a nuestro objetivo, y a la cantidad de moléculas que esperamos encontrar en una deformación local de la membrana. Sin embargo, el principal inconveniente de incorporar las moléculas de interés desde la membrana plana a la curva del NT es el siguiente: el sorting de estas moléculas se ve claramente y se da en ciertas longitudes del NT, longitudes que están muy por encima de la necesaria para poder identificar con claridad el efecto individual de las moléculas de interés sobre la membrana y la deformación que en ella provocan.

Discusión

La incorporación espontánea de moléculas a la membrana del NT es un fenómeno altamente improbable. Por lo tanto, es necesaria una fuerza que propicie e impulse la incorporación de estas moléculas al NT. Una de las fuerzas que propicia la migración de moléculas en las células de un punto a otro de la membrana es el gradiente de estrés debido a la curvatura de membrana (Bashkirov et al., 2022;

Markin, 1981; Svetina et al., 1990). Está bien establecido que la composición de la membrana está ligada a la curvatura y que este emparejamiento se basa en las preferencias geométricas de las proteínas, que dependen de su forma, y en dinámicas conformacionales, como ha sido descrito en la introducción. Las proteínas que tienen preferencia por la curvatura, como aquellas implicadas en procesos de remodelación de la membrana, se ven atraídas hacia zonas de la membrana celular con alta curvatura, y, cuando son purificadas, muestran preferencia por la membrana de NT (Baumgart et al., 2011). Una de las dificultades que encontramos para detectar esta migración de moléculas mediada por la curvatura es que el fenómeno de CCC ocurre de manera muy rápida. Por ejemplo, cuando un NT es formado a partir de la membrana reservorio, el proceso de formación del NT va acompañado del “sorting” o reorganización de las moléculas. Si el NT se forma a velocidades fisiológicamente relevantes, consideradas lentas, la composición se reajusta en base a la curvatura durante el propio proceso de formación del NT (Espadas et al., 2019). Para crear un gradiente de curvatura desacoplado del gradiente de concentración de las moléculas debido a la curvatura, son necesarias velocidades muy altas en la formación del NT (100 $\mu\text{m/s}$)(Espadas et al., 2019). Alternativamente, los NTs pueden ser formados prácticamente de manera instantánea a partir de un cuello de geometría catenoidal, como en el caso de los usNT (Frolov et al., 2003), como muestra la Figura 3.4A.

Durante la realización de esta tesis observamos que el colapso del catenoide que lleva a la formación del usNT, puede usarse para cuantificar cambios en r_{NT} y k debidos al fenómeno de CCC.

El fenómeno de CCC se identificó como una lenta caída en la conductancia en el NT inmediatamente después del colapso, tal como se ve en la Figura 3.4B. En sistemas constituidos únicamente por lípidos, este descenso en la conductancia no fue observado en membranas constituidas por un único componente, pero sí que se observó tras la adición de lípidos de geometría cónica (Fig. 3.5.).

Se observó que la cinética del descenso en la conductancia es coherente con la acumulación por difusión de lípidos cónicos en el usNT. De la dependencia entre el tiempo que dura esta reducción en la conductancia y la longitud del NT, se estimó un

coeficiente de difusión de $\sim 8\mu\text{m}^2/\text{s}$, coincidente con la difusión libre de lípidos en la membrana del NT (Macháñ & Hof, 2010). Observamos que el colapso ocurre a longitudes fuera del rango de longitudes del usNT. La longitud a la que ocurre el colapso se define por el diámetro de la pipeta empleada para formar el NT y, por lo tanto, no puede ser más pequeño (Frolov et al., 2003). Sin embargo, la independencia del valor de k respecto a la longitud del NT nos permite extrapolar la dinámica del CCC al usNT, donde debería ocurrir extremadamente rápido, del orden de milisegundos.

Para confirmar que esa disminución de la conductancia se debe a la redistribución del DOPE entre la membrana reservorio y la membrana del NT, se analizó la reducción en el valor de k (Bashkirov et al., 2011). Aquí decidimos llevar a cabo una comparación cualitativa del efecto del CCC sobre los parámetros del NT para lípidos y proteínas. Para validar que la caída en la señal de conductancia se debe al CCC, empleamos una molécula cuya preferencia por la curvatura está bien establecida, el dominio ENTH de la epsina, cuya capacidad de generar curvatura está asociada a la inserción de una hélice anfipática mediada por la presencia de fosfatidil-inosítidos (Capraro et al., 2010; Lai et al., 2012). Esta hélice anfipática participa en la creación de curvatura, pero además facilita la agregación del dominio ENTH en la membrana aumentando su efecto sobre la curvatura a nivel local (Lai et al., 2012). Para evitar la complejidad asociada a esta agregación de la proteína, empleamos membranas en las que el fosfoinosítido fue sustituido por DOPS, el cual propicia una unión reversible de monómeros de ENTH a la membrana (Rozovsky et al., 2012b). El empleo de microscopía de fluorescencia permitió determinar que el comportamiento del dominio ENTH sobre membranas ricas en DOPS era similar al esperado en membranas que contienen fosfoinosítidos; tubula la membrana y se redistribuye con preferencia por las membranas curvas (Fig. 3.7.).

De manera importante, las medidas de conductancia en presencia de ENTH permitieron observar un descenso en la conductancia tras el colapso, similar al que ocurre en presencia de DOPE (Fig. 3.9A). Este descenso, que es proporcional al área que ocupa una molécula en la membrana plana (Bashkirov et al., 2022) era mucho más

pronunciado en presencia de ENTH; además, la reducción del valor de resistencia a la flexión también era mayor (como se observa en la Tabla 3.1. y Fig. 3.10.).

Además, se pudo demostrar que la reducción en el valor de la resistencia a la flexión se relacionaba con el sorting molecular, la diferencia en la distribución del dominio ENTH entre la membrana plana del reservorio y la curva del NT, como se ve en la Fig. 3.8., confirmando así que la reducción en la conductancia se debía a la incorporación del dominio ENTH a la membrana del NT.

En el siguiente capítulo nos centraremos en cómo detectar la incorporación de moléculas individuales.

3.3. Incorporación de moléculas individuales y colectivas en la membrana de usNT mediada por moléculas bolaanfílicas sintéticas

3.3.1 Detección aleatoria de moléculas individuales

Como ya hemos visto, el usNT es deformable, y esas deformaciones, que se traducen en cambios en el radio, pueden ser detectadas mediante medidas de conductancia. Una vez formado el NT, y tras comprobar su sensibilidad a las perturbaciones, es necesario validarlo para proteínas y lípidos, ver si el sistema es capaz de detectar las perturbaciones provocadas por moléculas individuales o pequeños oligómeros de proteínas y lípidos. La incorporación de estas moléculas a la membrana del NT debería poder detectarse en forma de perturbaciones en la señal de conductancia a través del NT (Fig 3.11.).

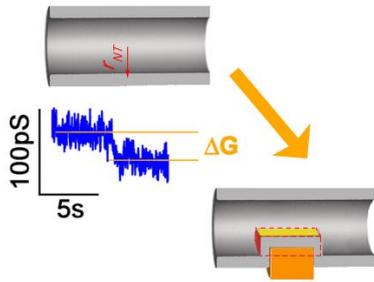


Fig. 3.11. Disminución en la conductancia del usNT, producto de una pequeña deformación que puede ser asociada con la unión de una proteína. Estos cambios se observaron cuando el usNT fue expuesto a ENTH o a mutantes de Dyn1 incapaces de llevar a cabo el auto-ensamblaje (Bashkirov et al, 2020).

El principal problema es que, dado el reducido tamaño del NT, la probabilidad de que una molécula individual de proteína, o un reducido grupo de ellas se una a la membrana del NT es muy pequeña. Una forma de aumentar esta probabilidad es añadiendo una alta concentración de proteína al medio. Sin embargo, una elevada concentración provocaría que las moléculas de interés se unan también al reservorio a partir del cual se ha formado el NT, modificando sus propiedades. También podrían unirse de manera masiva a la membrana del NT, haciendo imposible discriminar el efecto de una molécula individual.

Una opción alternativa es aplicar la proteína cerca del usNT de forma local, empleando una segunda micropipeta posicionada lo suficientemente cerca del NT. De esta forma, la solución con la proteína de interés difundiría desde la pipeta al medio. Sin embargo, nos enfrentamos de nuevo al mismo problema: es muy poco probable que las moléculas de proteína se unan a la membrana del usNT, dado su reducido tamaño. Y si no podemos controlar la concentración, acabarán uniéndose al reservorio, a la membrana plana, modificandola.

Una posible solución a este problema pasaría por incorporar la molécula de interés a la membrana del usNT directamente desde el reservorio, desde la membrana plana, empleando una fuerza externa.

3.3.2. Detección asistida por foldámeros

Durante el desarrollo de esta tesis, se han empleado unas moléculas sintéticas denominadas foldámeros, sintetizadas por el grupo del Dr. Ivan Huc, en Munich, Alemania.

Los foldámeros son, por definición, oligómeros sintéticos que en solución pueden adoptar estructuras predecibles y bien definidas (Rinaldi, 2020). . Una de las ventajas de los foldámeros es que son fácilmente modificables, pudiendo alterar sus propiedades de manera controlada. Las unidades fundamentales de estos foldámeros pueden ser, por un lado, peptídicas, empleándose péptidos no proteínogénicos, como los beta-péptidos, o aminoácidos aromáticos, que, con las modificaciones pertinentes, constituyen foldámeros con una mejor solubilidad en agua y permeabilidad en la membrana celular. Este tipo de foldámeros se pueden emplear para formar los llamados "cell-penetrating foldamers", estructuras que pueden atravesar la membrana celular y ser útiles en el transporte y liberación de medicamentos (Yokoo et al., 2020). Pero por otro lado, también es posible construir foldameros cuyas unidades fundamentales no sean de tipo peptídico, como por ejemplo oligo-amidas aromáticas (Gillies et al., 2007).

En el caso concreto de los foldámeros que hemos utilizado, se trata de oligo-amidas rígidas, con dos cabezas polares y un cuerpo hidrofóbico, y que han sido diseñados con cierto carácter lipofílico y para abarcar toda la bicapa lipídica, dada su longitud (aprox. 4 nm). Su estructura recuerda a la de los bolalípidos, lípidos transmembrana con dos cabezas polares (Mouritsen, 1998), que contienen enlaces tetraéter, presentes en la membrana de arqueas, y que confieren mucha estabilidad a las mismas al atravesar toda la membrana plasmática (Bulacu et al., 2012).

En principio, trabajamos con cuatro variantes de foldámeros, identificados por números: #156, #165, #168 y #179 (también identificados como 1, 2, 3, y 4, respectivamente). La variante #156, de cierto carácter lipofílico, fue el modelo sobre el que se aplicaron una serie de modificaciones para dar lugar al resto de variantes, de tal modo que #165 y #168 están diseñados para promover la agregación, mientras que

#179 tiene un mayor carácter lipofílico, gracias a la presencia de cadenas laterales. La Figura 3.12 muestra la estructura de las variantes #156 y #179, similares excepto por la presencia de las cadenas laterales.

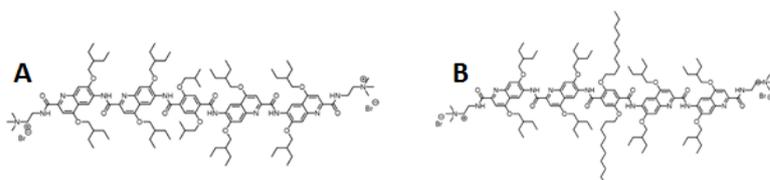


Fig. 3.12. Estructura química de los foldámeros utilizados.

A. Estructura química de la variante #156. **B.** Estructura química de la variante #179, que destaca por la presencia de cadenas laterales.

En un principio, el objetivo era caracterizar apropiadamente los foldámeros, incorporarlos a modelos de membranas y aprovechar la capacidad de modificar su estructura (alterando su geometría, aumentando o disminuyendo la afinidad por lípidos, alterando su tamaño) y su rigidez intrínseca, para determinar cómo afectaban a las propiedades mecánicas de la membrana. Pero, además, resultaba interesante ver si estas moléculas de pequeño tamaño, rígidas, eran compatibles con el sistema de usNT, y si era posible incorporarlas a la membrana del NT. Por sus propiedades, los foldámeros son moléculas interesantes para validar el sistema de usNT para la detección de perturbaciones provocadas por moléculas individuales. Durante la caracterización de los mismos, se observó que estas moléculas son sensibles a campos eléctricos, lo que nos permitía usar una fuerza externa para facilitar su incorporación a la membrana del usNT, como veremos más adelante. Además, se observó que estas moléculas podían actuar como receptores de proteínas, al existir interacción y unión de ciertas proteínas a membranas que contienen foldámeros. Unidos estos dos factores, existe la posibilidad de que los foldámeros permitan incorporar moléculas individuales de proteína a la membrana del NT, manteniendo la longitud de éste a escala submicrométrica, sin necesidad de recurrir únicamente al "sorting" por curvatura como promotor de la incorporación de proteínas a la membrana del NT.

3.3.2.1 Caracterización de los foldámeros

Se estudiaron las propiedades de los foldámeros de la siguiente manera:

A.-Fluorescencia intrínseca de foldámeros

Los foldámeros no están químicamente marcados con fluoróforos ni unidos a proteínas fluorescentes, de tal manera que, si se incorporan a las membranas, es necesario poder detectar su presencia de algún modo. Descubrimos que estas moléculas, disueltas en una mezcla de cloroformo y metanol 1:1, emiten fluorescencia a unos 450 nm si se excitan en el rango del UV, siendo el pico de emisión máximo la excitación se produce a 370 nm de longitud de onda (Fig. 3.13.).

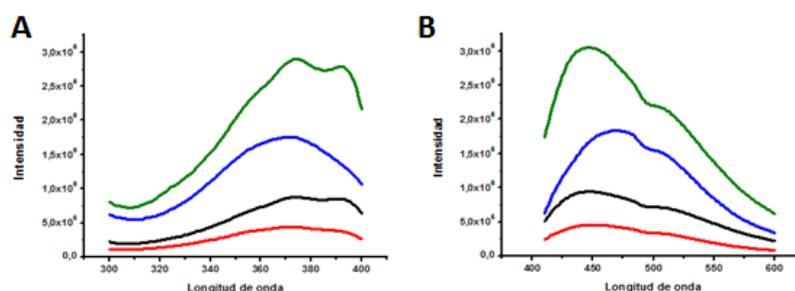


Fig. 3.13. Emisión de fluorescencia detectada en foldámeros. A. Espectro de excitación de foldámeros en solución de cloroformo:metanol. B. Espectro de emisión de foldámeros en solución de cloroformo:metanol.

Los colores de las gráficas corresponden a los foldámeros de la siguiente forma: negro - #156; rojo - #165; azul - #168; verde - #179.

B.-Incorporación de foldámeros a membranas modelo

Una vez que observamos que los foldámeros pueden emitir una señal de fluorescencia que permite su detección, intentamos incorporarlos a membranas modelo. La preparación de los stocks de foldámero y el protocolo para la formación de los diferentes modelos de membrana se llevó a cabo como viene explicado en su correspondiente sección en Materiales y Métodos.

La incorporación a vesículas multilamelares (MLVs) se comprobó por fluorimetría. Las diferentes composiciones lipídicas en las que se ha comprobado la incorporación de

los foldámeros se pueden observar en la Tabla 3.2. Como podemos ver, los foldámeros pueden interactuar con varias especies lipídicas. Los primeros intentos de incorporación se llevaron a cabo con una composición simple de DOPC:foldámero, pero se observó que era imposible incorporar más de un 40 %mol de foldámero en esta composición. Además, la variante #168 no se incorporó a esta composición, y no se pudieron formar MLVs, ni siquiera reduciendo su porcentaje molar (Tabla 3.2.).

Variante	COMPOSICION LIPÍDICA						
	PC		PC:PE		DOTAP	SM	PC:poly-PE
	≤40 mol% foldámero	>40 mol% foldámero	≤ 40 mol% foldámero	>40 mol% foldámero	>70mol% foldámero		
156	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
165	Sí	No	-	-	Sí	Sí	-
168	No	No	-	-	No	Sí	-
179	Sí	No	Sí	Sí	Sí	-	Sí

Tabla 3.2. Incorporación de las variantes de foldámero a diferentes composiciones lipídicas caracterizado en MLV por fluorimetría.

Curiosamente, descubrimos que la adición de un 10 %mol de colesterol a la mezcla lipídica permitía la incorporación efectiva de foldámeros a las membranas de los MLVs. Sin embargo, porcentajes mayores de colesterol inhibían la formación de MLVs en todas las variantes. Esto puede deberse a un ligero desajuste en la incorporación de los foldámeros a la membrana, de tal manera que no se insertan del todo perpendicularmente, dejando expuesta parte de la cadena hidrofóbica. De esta forma, se produce la formación de agregados entre los foldámeros y el colesterol, dando lugar a estructuras muy grandes y rígidas, incapaces de integrarse en la membrana.

En presencia de PolyPE fue posible sustituir parte del DOPC por colesterol en proporciones mayores al 10 %mol, cosa que no ocurre sin el lípido poliinsaturado. Esto puede deberse a un mejor encaje del foldámero en membranas con lípidos poliinsaturados, reduciéndose la interacción con el colesterol.

Como se observa en la Tabla 3.2. y los espectros de la Figura 3.14., las variantes #156 y #179 son las que presentan un mejor comportamiento tanto en su interacción con lípidos como en la detección de su emisión, así que son las especies que mejor se han caracterizado y con las que se han llevado a cabo la mayor parte de los experimentos asociados a los foldámeros en esta tesis.

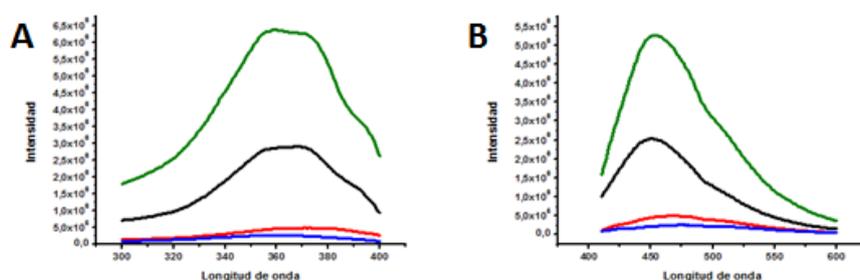


Figura. 3.14. A. Espectro de excitación de MLVs constituidos por foldámero:DOPC:colesterol. B. Espectro de emisión de MLVs constituidos por foldámero:DOPC:colesterol. Los colores de las gráficas corresponden a los foldámeros de la siguiente forma: negro - #156; rojo - #165; azul - #168; verde- #179

Además, estas medidas de fluorescencia se completaron con medidas de absorbancia de las muestras a la misma longitud de onda, 370 nm, pudiendo observarse como la fluorescencia y la absorbancia aumentan con la concentración de foldámero en la muestra (Fig. 3.15.).

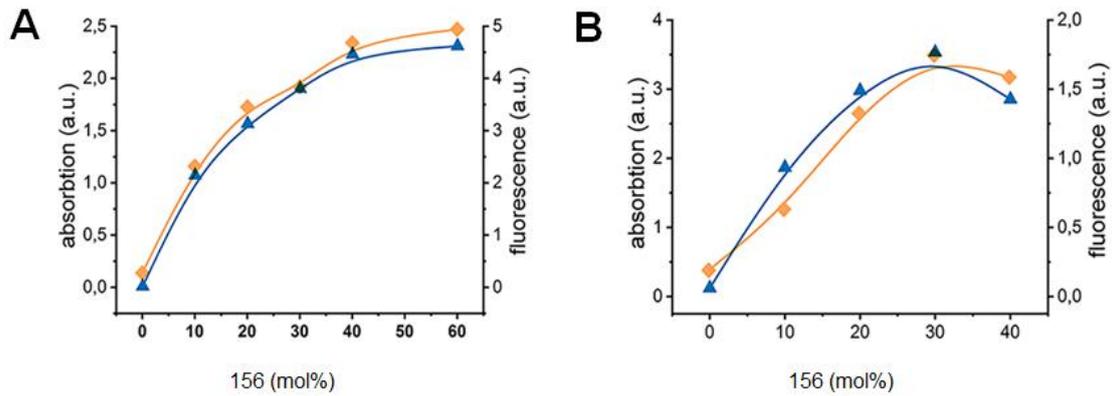


Figura. 3.15. Caracterización de la variación de la fluorescencia (azul) y absorbancia (naranja) integrales versus concentración del foldámero #156 para A. MLVs de DOTAP y B. MLVs de DOPC:DOPE.

Tras su caracterización por fluorimetría, decidimos observar las muestras de MLVs por microscopía confocal excitando con una fuente de luz ultravioleta. En este caso, debido a las limitaciones del equipo, la excitación de la muestra conteniendo MLVs se realizó a 405 nm, y la emisión se recogió en el rango de 430-470 nm. Según los datos recogidos por fluorimetría, a ese rango de excitación/emisión los foldámeros #156 y #179 deberían ser detectables (Fig. 3.14.). En la Figura 3.16. se pueden observar algunas de las imágenes de los MLVs incorporando los foldámeros. No obstante, los MLVs son difíciles de caracterizar por microscopía, y es difícil discriminar si los foldámeros están integrados en la membrana del MLV o simplemente pegados formando agregados y no están realmente incorporados a la membrana.

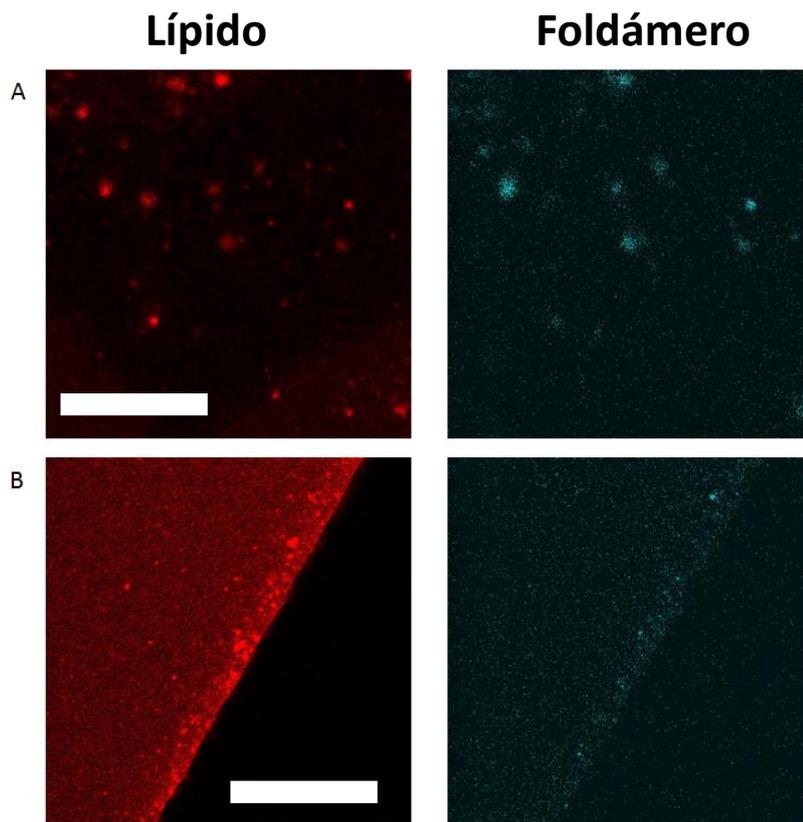


Figura. 3.16. MLVs con foldameros observados con un microscopio confocal. A. MLVs de DOPC:DOPE dopados con un 1 mol% de RhPE conteniendo un 40 %mol de foldámero #179. Izquierda, canal de lípido. Emisión de RhPE. Derecha, canal de foldámero, emisión de foldámero. B. Límite de la gota donde se ha depositado la muestra de MLVs. Se observa la acumulación de MLVs de DOPC:DOPE:Foldamero:Rh-PE, 45:15:40:1 %mol. Izquierda, canal de fluorescencia de RhPE; Derecha, fluorescencia de foldámero. Barras de escala: A, 100 micras., B, 300 micras

Teniendo en cuenta lo anterior, y para poder observar mejor los foldámeros en la membrana por microscopía, se hizo un intento de incorporación de los foldámeros en la membrana de GSBs y GUVs. La preparación de las muestras de GSBs y GUVs se realizó según se detalla en Materiales y Métodos y se confirmó usando el microscopio confocal Leica SP5.

Como en el caso de los MLVs, para observar su incorporación a la membrana en el microscopio confocal, se excitó la muestra a 405 nm y se detectó la emisión a 430-470 nm, debido a las limitaciones del equipo.

Las diferentes variantes de foldámero se incorporaron con éxito a las membranas de GSBs y GUVs de diferente composición lipídica (Fig. 3.17.).

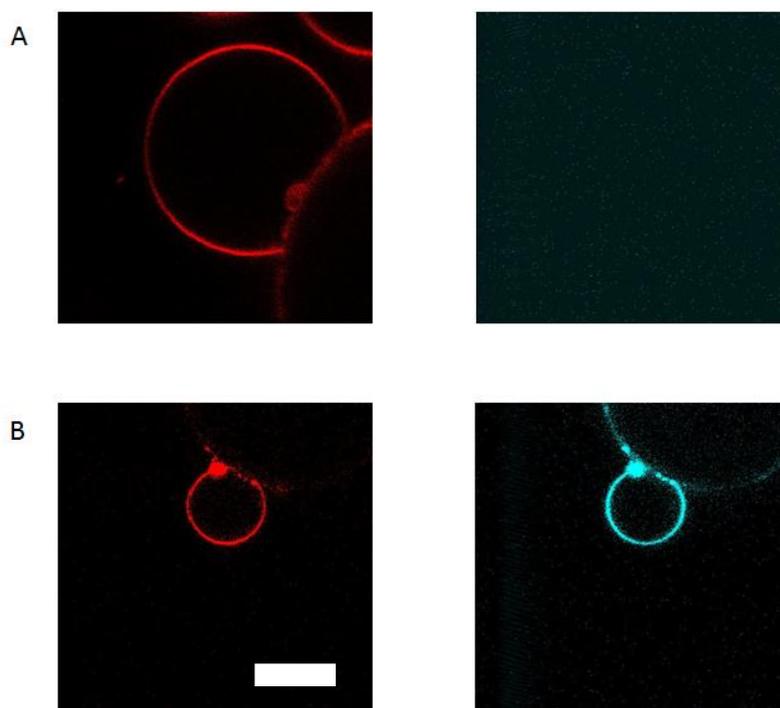


Figura. 3.17. Imágenes de GSBs obtenidas con un microscopio confocal, en ausencia de foldámeros (A) y con un 60 mol% de foldámeros en la composición (B). A. GSBs de DOPC:DOPE:Rh-PE. B. GSBs compuestos de DOPC:DOPE:Rh-PE + 60 %mol #179. A la izquierda, señal de Rh-PE; a la derecha, emisión de fluorescencia del foldámero detectada en el rango 450-470 nm. Barra de escala 5 micras.

No obstante, debido a las diferencias en la estructura química de cada variante, la interacción de cada una de ellas con las especies lipídicas es diferente. Así, por ejemplo, la presencia de #168 es indetectable en presencia de DOTAP, un lípido con carga neta positiva, a pesar de que es posible formar tanto MLVs como GUVs; sin embargo, en esta composición no hay ninguna emisión UV detectable, lo cual parece indicar que esta variante en concreto no se incorpora a vesículas que contienen DOTAP (Fig 3.18.).

Por otro lado, cuando se trata de esfingomielina (SM), un lípido de relevancia biológica, es posible incrementar el %mol de los foldámeros en la composición hasta un 90%mol, y seguir obteniendo vesículas donde la presencia de foldámeros es fácilmente detectable

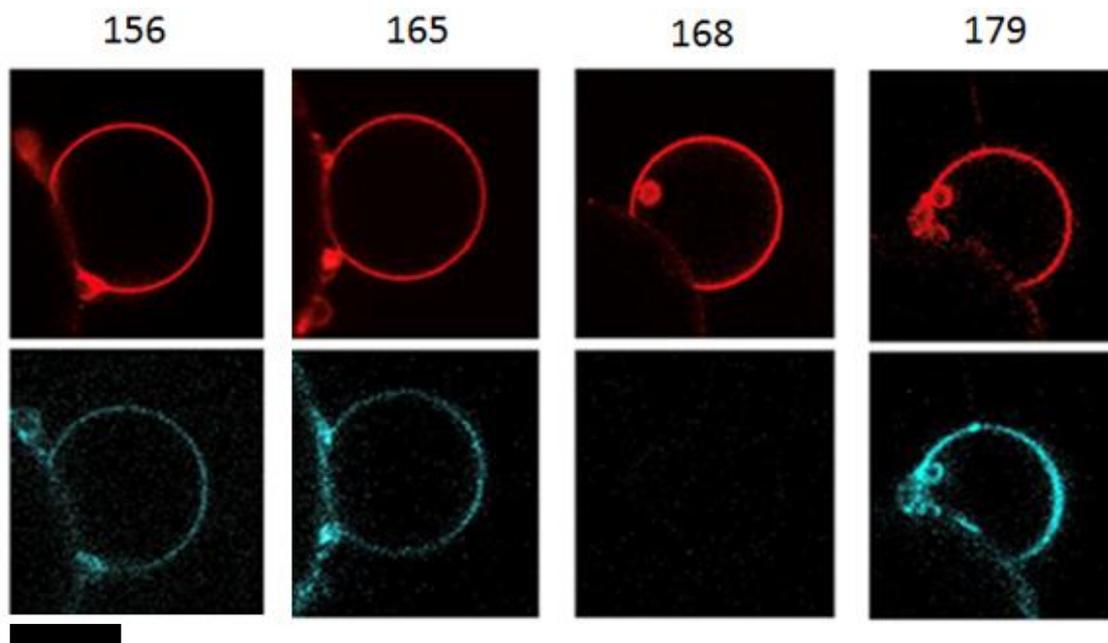


Figura 3.18. GSBs formados por DOTAP dopado con 1 %mol de RhPE con diferentes variantes de foldámero, según indicado. La concentración de foldámero en cada composición es de 60 %mol. Arriba: señal de RhPE. Abajo: señal de foldámero detectada en cada caso a la misma intensidad de fuente de luz ultravioleta. Barra de escala 5 micras.

Además, observamos que a medida que aumentamos la concentración de foldameros en la composición, aumenta el porcentaje de incorporación de los foldámeros en los GSBs y GUVs. Para cuantificar la incorporación a diferentes %mol, tuvimos en cuenta la relación entre la señal del foldámero y la señal del RhPE ($\text{Fluo}_{\text{Fold}}/\text{Fluo}_{\text{RhPE}}$), para una misma región de interés en la membrana del GUV o del GSB. De esta manera pudimos observar que a medida que aumenta el %mol de foldámero en la composición, aumenta también la relación $\text{Fluo}_{\text{Fold}}/\text{Fluo}_{\text{RhPE}}$. No podemos afirmar que esta relación de fluorescencia sea igual al porcentaje molar del foldámero en la composición, pero sí podemos decir que la incorporación aumenta cuando aumenta el porcentaje molar de estas moléculas en la mezcla lipídica inicial (Fig 3.19.).

Sin embargo, diferentes variantes de foldámeros presentan un grado de incorporación diferente para una misma composición lipídica y a un mismo porcentaje molar de foldámero. Así, por ejemplo, cuando las diferentes variantes de foldámero se combinan con DOTAP, el grado de incorporación a la membrana para un porcentaje teórico del 20 %mol en la composición, es mayor para unas variantes que para otras.

Esto se debe a las diferencias en la estructura química de cada variante y en su mayor o menos carácter lipofílico. Así, #179 resulta ser el más versátil y lipofílico. En esto ayudan las cadenas laterales que presenta en su estructura. De acuerdo con esto, existen estudios en los que la presencia de cadenas laterales ayuda a la incorporación de los bolalípidos sintéticos a membranas con composición fosfolipídica (Müller et al., 2019).

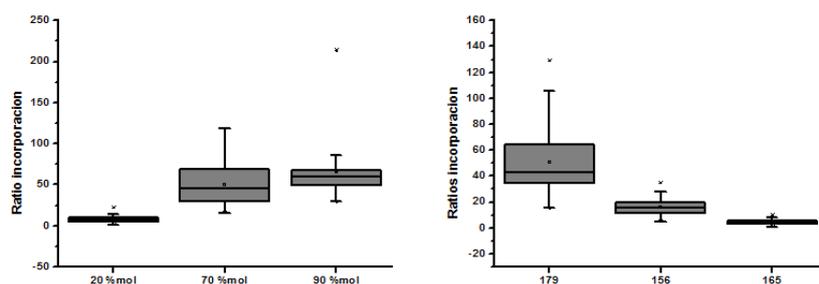


Figura 3.19. Diferente incorporación de variantes de foldámeros a la membrana del GSB. Izquierda, grado de incorporación para la variante 156 en presencia de SM. A mayor %mol de foldámero en la composición, mayor es la incorporación final a la membrana de GSBs. Derecha, la incorporación a la membrana de los GSBs es diferente para cada variante de foldámero. Composición: DOTAP:foldámero:Rh-PE 79:20:1 %mol.

También hemos podido detectar la presencia de foldámeros en NTs. Para ello, los GSBs con foldámeros en su composición fueron sometidos a flujo laminar en una célula microfluídica. Los NTs que se obtienen mediante este método están conectados a la membrana reservorio del GSBs, mientras que el otro extremo del NT se adhiere a la superficie del cubreobjetos (Fig 3.20).

La presencia de los foldámeros en estos NTs se detectó por microscopía confocal de la misma manera que en el caso de los GSBs.

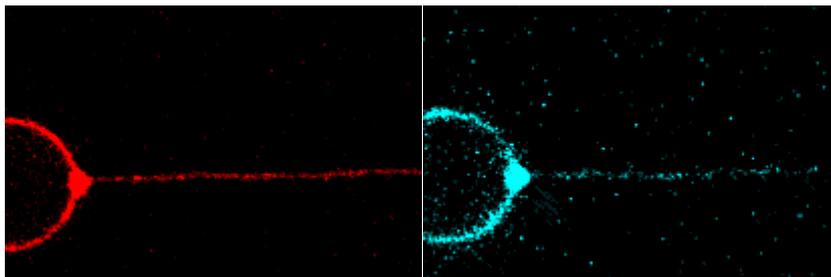


Figura. 3.20. NT formado aplicando flujo laminar a una GSB. A la izquierda, imagen confocal del GSB y el NT detectados en el canal de la RhPE. A la derecha, la fluorescencia del foldámero es detectable en la membrana tanto del GSB como del NT. Composición DOTAP:Foldamero:Rh-PE 59:40:1 %mol, variante de foldámero 4. Barra de escala 5 micras.

C.-Preferencia de los foldámeros por membranas planas vs curvas

Hemos visto que tanto los lípidos como las proteínas pueden tener una curvatura intrínseca y poder sentir y tener preferencia por membranas curvas. En el caso de los foldámeros, dado que son moléculas rígidas, resultaba de interés determinar si existía alguna diferencia en la incorporación a membranas planas o curvas.

Para ello, empleamos los NT obtenidos a partir de GSBs mediante flujo laminar. Para calcular el coeficiente de distribución en el gradiente de curvatura, el ratio entre la fluorescencia del foldámero y la fluorescencia del lípido ($F_{\text{fold}}/F_{\text{lípido}}$) de un ROI en la membrana del NT se divide por el mismo ratio en la membrana del GSB (Fig. 3.21.):

$$\text{Coeficiente de distribución} = \frac{F_{\text{Fold}}^{\text{NT}} F_{\text{lípido}}^{\text{GSB}}}{F_{\text{Fold}}^{\text{GSB}} F_{\text{lípido}}^{\text{NT}}} \text{ (ec. 3.8)}$$

De esta forma, si el valor de este coeficiente es 1, significa que la molécula está distribuida de igual manera entre ambas membranas; si es mayor que 1, significa que la molécula tiene preferencia por las membranas curvas; y si es menor que 1, significa que la molécula tiene preferencia por las membranas planas.

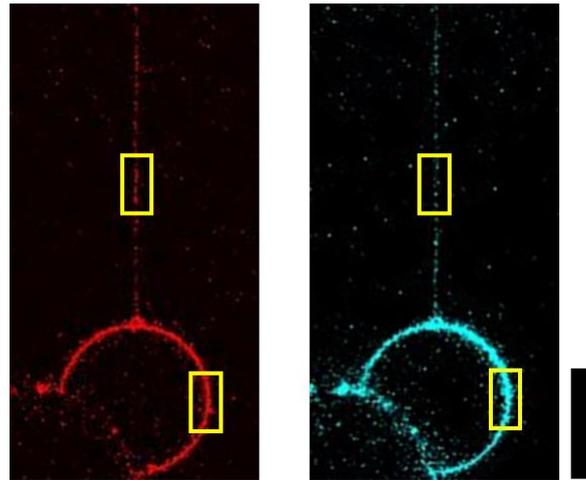


Figura 3.21. Ejemplo de imagen de microscopía confocal empleada para el cálculo de distribución en el gradiente de curvatura para el sistema GSB + NT. En rojo se observa la fluorescencia de RhPE, el canal azul corresponde a la emisión del foldámero. Los rectángulos amarillos señalan los ROIs usados para el cálculo de la distribución según curvatura según la ecuación 3.8 . Composición DOTAP:Foldámero:Rh-PE 59:40:1 %mol. Barra de escala 10 micras.

En este caso, se observa que la distribución de los foldámeros se ve afectada por la curvatura, siendo su incorporación mayor en membranas planas (Fig. 3.22). Podemos hablar así de un sorting negativo; es decir, los foldámeros prefieren concentrarse en membranas planas. Esto es debido a que son moléculas rígidas, y acaban siendo expulsadas del NT hacia la membrana plana del GSB.

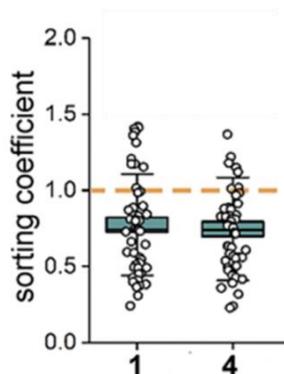


Figura 3.22. Coeficiente de distribución para las variantes 156 (1) y 179 (4) incorporadas a membranas que contienen DOTAP calculado a partir del sistema descrito en la Figura 2.21. y empleando la ecuación 2.8.. Un coeficiente menor de 1 indica una preferencia por la membrana del GSB, más plana. Es decir, los foldámeros están siendo expulsados del NT.

D.-Incorporación de foldámeros a la membrana de usNTs y detección de moléculas individuales

Una vez caracterizada la interacción de los foldámeros con las membranas lipídicas, y tras ver que es posible incorporarlos a diferentes modelos de membrana, el siguiente paso fue tratar de incorporarlos a las membranas de los usNT, y determinar si esa incorporación y su efecto pueden ser detectados.

Para ello, se formaron usNT a partir de membranas en los que los foldámeros eran parte integrante. Aunque los foldámeros tengan preferencia por membranas planas, como indica su coeficiente de distribución debido a la curvatura (Fig. 3.22), las medidas de fluorescencia indican que pueden incorporarse a la membrana de los NTs. No obstante, para detectar que los foldámeros se estaban incorporando a la membrana del usNT, comparamos medidas de k en presencia y ausencia de foldámero en la composición. Tal y como se esperaba, la incorporación de los foldámeros a la membrana resulta en un considerable aumento de la resistencia a la flexión de la última (Fig. 3.23).

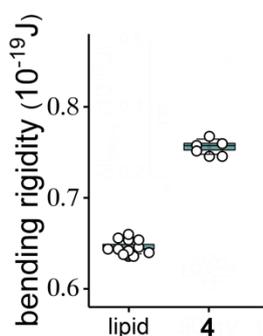


Figura 3.23. Efecto de la variante 179 (4) sobre la resistencia a la flexión de una membrana compuesta por DOPC.DOPE:Foldamero, conteniendo un 60 mol% de la variante 4.

Como mediante la microscopía de fluorescencia detectamos que el coeficiente de distribución para los foldámeros es negativo (Fig. 3.22), la rigidez a la flexión de la NT se puede aumentar aún más si de alguna manera obligamos a los foldámeros a regresar a la membrana del NT. Para hacerlo, hemos usado el campo eléctrico. Usando

mediciones del potencial z , encontramos que los foldámeros inducían un potencial de membrana negativo dependiente del pH (-5 a -10 mV a pH = 7). Por tanto, el extremo del foldámero expuesto al lumen del NT debe sentir el gradiente del campo eléctrico luminal (Fig. 3.24A). Las mediciones de la rigidez a la flexión con $U = +50$ mV y $U = +150$ mV revelaron que la aplicación de alto voltaje positivo produce un aumento pronunciado de la rigidez a la flexión mientras que no se observaron cambios con los NT que contenían cantidades equivalentes del lípido DOPS, con carga neta negativa (Fig. 3.24B).

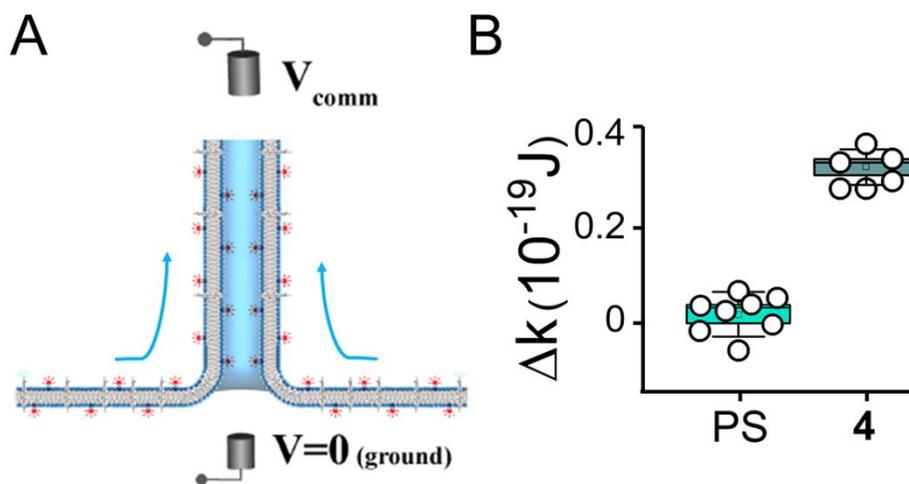


Figura 3.24. Cambio en el valor de la resistencia a la flexión de la membrana tras aplicar un volate de 150 mV en presencia de foldámeros. **A.** Esquema explicativo del mecanismo de incorporación de los foldámeros desde el reservorio a la membrana del usNT aplicando un campo eléctrico. V_{comm} corresponde a U . **B.** Diferencia en la resistencia a la flexión de la membrana de un NT que contiene la variante #179 (4) o el lípido PS. Voltaje aplicado $U=+50$ y $+150$ mV.

Una posible explicación para este fenómeno es que los foldámeros son sensibles a campos eléctricos, y que aplicando cierto voltaje, es posible movilizarlos desde la membrana plana a la curva del NT, en contra de su tendencia natural, mediante un procedimiento electroforético. Al acomodarse en la membrana del NT, imponen su geometría rígida al NT haciendo que aumente la resistencia a la flexión de su membrana.

Observamos que el usNT, de hecho, conecta dos membranas planas, un gran reservorio (del que se extrajo la NT) y un pequeño parche de membrana en la punta de la pipeta de parcheo. La aplicación de un U grande impulsa los foldámeros desde el reservorio grande hasta el parche, de modo que justo después del aumento de voltaje se puede esperar que los foldámeros individuales pasen a través del usNT. Dicho paso producirá cambios transitorios de la conductancia del usNT. De hecho, utilizando usNT extremadamente finos ($r = 1.9 \pm 0.2$ nm), nosotros, en colaboración con el grupo del Dr. Bashkirov (Instituto de Electroquímica A.N. Frumkin, Moscú), pudimos resolver estos cambios de conductancia transitorios (Fig. 3.25.). Los interpretamos como la incorporación de los foldámeros a la membrana del usNT que produce un bloqueo transitorio del lumen del usNT durante la incorporación a la membrana del NT. La amplitud de esos saltos en la medida de conductancia nos da información sobre el volumen de la molécula individual responsable del bloqueo del lumen, de esa caída en la conductancia. En este caso, el volumen estimado a partir de la amplitud del salto coincide con el volumen estimado para una molécula de foldámero en base a su estructura (Fig 3.25).

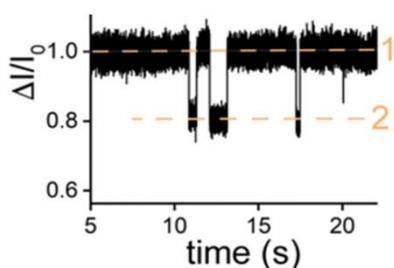


Figura 3.25. Eventos de caída de conductancia luminal del usNT debidos al paso de foldámeros individuales a través de los usNT.

No obstante, para estar seguros de que el efecto en la resistencia a la flexión se debía a la incorporación de los foldámeros, y que éstos se podían movilizar por efecto de un campo eléctrico, procedimos a realizar las mismas mediciones en presencia de proteínas. Es de destacar que durante la caracterización de los foldámeros se observó que podían interactuar con ciertas proteínas, como veremos a continuación, escogiendo la anexina V para el desarrollo de la presente tesis.

2.3.2.2 Interacción foldámero-proteína

Teniendo en cuenta el carácter lipofílico de los foldámeros con los que se ha realizado este trabajo, su capacidad para integrarse en diferentes modelos de membrana y su capacidad para actuar como un elemento constituyente más de la membrana, cabía preguntarse si el carácter biomimético de estas moléculas llegaba al punto de poder interactuar con proteínas. Anteriormente, varios grupos han estudiado la interacción de foldámeros de estructura helicoidal, modificados para presentar cadenas laterales de carácter proteinogénico, con diferentes proteínas (Vallade et al., 2019), pero no existen casos documentados de foldámeros diseñados para integrarse en las membranas biológicas y abarcar todo el grosor de la misma.

Intrigados por las posibilidades de nuestros foldámeros, pusimos las muestras de GSBs y GUVs con foldámeros incorporados a la membrana en contacto con proteínas de relevancia biológica unidas a GFP, o bien marcadas químicamente. De este modo, se estudió la interacción de los foldámeros con Dyn1-meGFP, el dominio ENTH de la epsina ENTH-meGFP, y anexina V químicamente marcada con Alexa fluor 488. Las dos primeras proteínas fueron purificadas en nuestro grupo siguiendo el procedimiento explicado en Materiales y Métodos, mientras que la anexina era de origen comercial.

Los primeros intentos se llevaron a cabo con Dyn1 y el dominio ENTH. Tanto la Dyn1 como el dominio ENTH son proteínas que se unen a fosfolípidos de membrana cargados negativamente, como el $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ o el PS. Sorprendentemente, se observó que ambas proteínas podían unirse a membranas con las variantes 156 y 179 integradas en ausencia de otras especies lipídicas con carga negativa. (Fig. 3.26.).

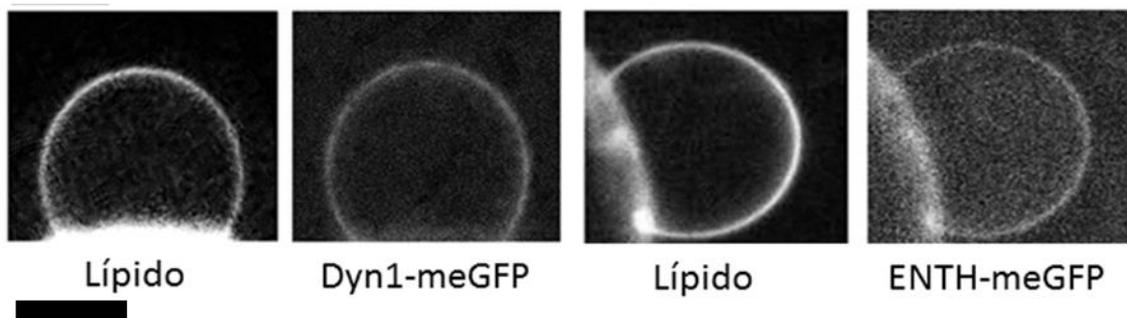


Figura 3.26. Interacción de diferentes proteínas con la membrana de GSBs que contienen foldámero. Imagen de microscopía de epifluorescencia, que muestra la unión de Dyn1 y ENTH, marcadas con GFP, a la membrana de GSBs

que contienen un 60 mol% de foldámero, en ausencia de otros lípidos con carga negativa. Barra de escala 5 micras.

Por su parte, la anexina V pertenece a una familia de proteínas implicadas en procesos de endo y exocitosis, interacciones con el citoesqueleto o regulación de canales de calcio. Están formadas por dominios de 70 aminoácidos que se repiten varias veces, formando un anillo ligeramente doblado en cuyo centro se encuentra un poro de carácter hidrofílico (Lizarbe et al., 2013). Las anexinas se unen a fosfolípidos con carga negativa (Fig 3.27.) en una unión mediada por calcio. Los sitios de unión al calcio y a los fosfolípidos se encuentran en la cara cóncava de la estructura en forma de anillo de las anexinas.

La unión a los fosfolípidos dependiente de calcio es reversible (Trotter et al., 1995) y también se ha visto que se ve afectada por el pH (Köhler et al., 1997).

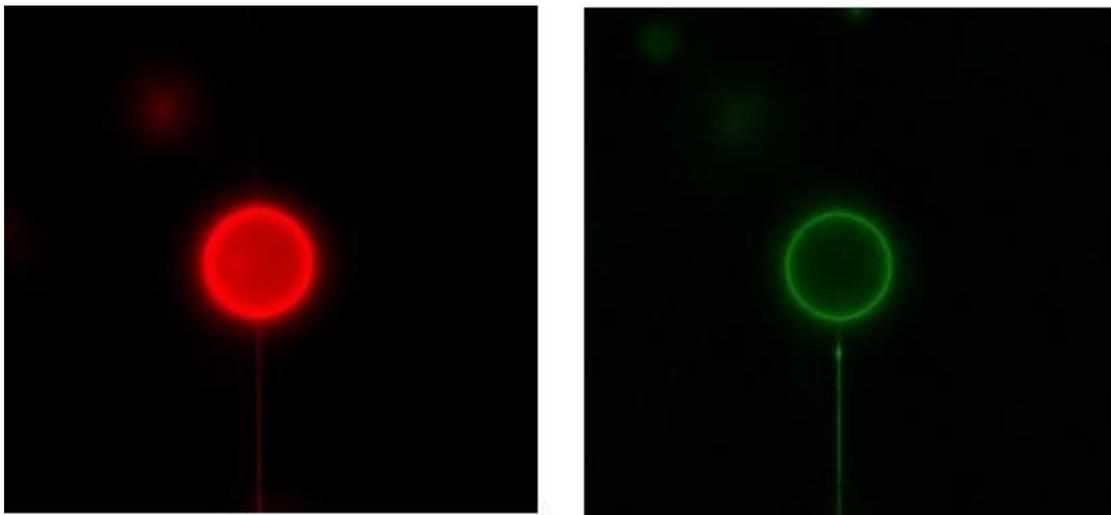


Figura 3.27. Interacción de anexinas con lípidos cargados negativamente. Imagen de microcopía de epifluorescencia. **Izquierda**, GUV y NT compuestos de DOPC:DOPE:DOPS:RhPE. **Izquierda**, anexina V químicamente marcada con Alexa fluor 488, unida a la membrana del GUV y del NT. Barra de escala 10 micras.

La anexina V, en presencia de calcio, también fue capaz de unirse a la membrana de GSBs y de NTs que contenían diferentes foldámeros en ausencia de DOPS (Fig. 3.28.).

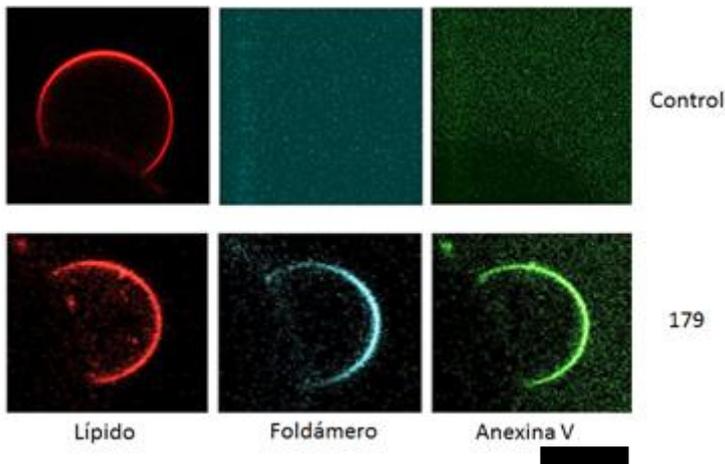


Figura 3.28. Interacción de anexina V con membranas que contienen foldámero. Control, GSBs compuesto por DOPC:DOPE:RhPE sin foldámero. 179, GSBs de DOPC:DOPE:foldamero:RhPE. La incorporación de foldameros se detecta por la correspondiente emisión de fluorescencia; la unión de anexina V se confirma excitando a 488 nm, y recogiendo emisión a 510nm. Barra de escala 5 micras.

Pero además de a la membrana del GSBs que contienen foldámero, la anexina V también pueden unirse a la membrana de los NTs en presencia de los foldámeros (Fig. 3.29.).

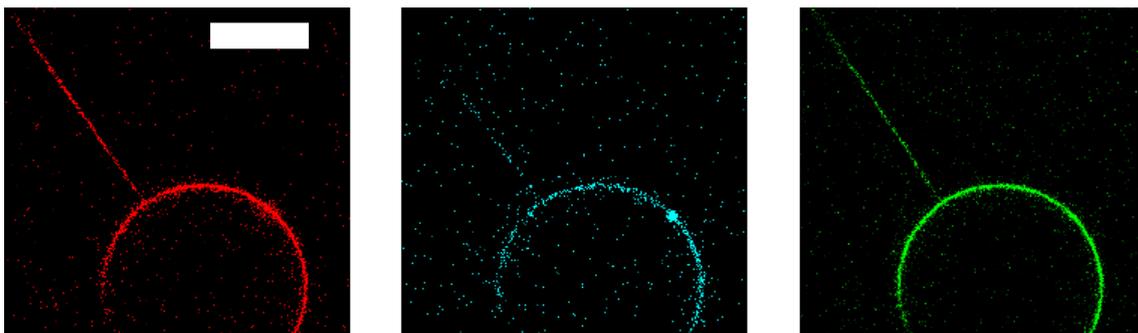


Figura 3.29. Interacción de anexina V con membranas de NTs que contienen foldámero. La imagen muestra un NT conectado a la membrana de un GSB. Rojo, señal de fluorescencia emitida por el lípido marcado con Rh-PE. Cyan, emisión de foldámeros. Verde, emisión de anexina V marcado con Alexa 488. Barra de escala 10 micras.

Como hecho curioso, aunque las anexinas se unían tanto al DOPS como a los foldámeros, tanto en la membrana del NT como la del GSB, su comportamiento era diferente en un caso u otro. Mientras que en presencia de lípido la anexina V muestran una clara preferencia por la membrana curva del NT, en presencia de foldámeros su distribución entre ambas membranas, el coeficiente de sorting, se ve afectado por la distribución de los foldámeros (Fig 3.30.).

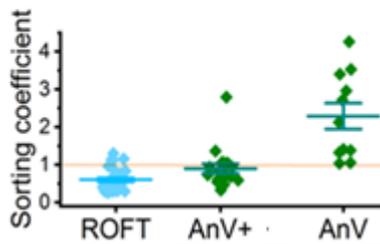


Figura 3.30. Coeficiente de distribución según curvatura para anexina V. El coeficiente de distribución para la anexina V en presencia de DOPS (AnV), es claramente favorable a la membrana del NT, mientras que en presencia de foldámeros (AnV+), su distribución se ve afectada por la distribución de los foldámeros (ROFT), siendo similar a la que presentan los foldámeros por sí solos.

Para confirmar que los efectos sobre las propiedades mecánicas de la membrana en presencia de foldámeros se debían precisamente a éstos, se comprobó el efecto sobre las propiedades mecánicas de la membrana en presencia de Anexina V y foldámeros. De nuevo, se observó que, en presencia de foldámeros y anexina, la resistencia de la membrana en la flexión seguía siendo superior a la del NT; aunque en esta ocasión, ambos valores (reservorio y NT) eran superiores a los calculados en presencia de solo foldámeros. (Fig. 3.31).

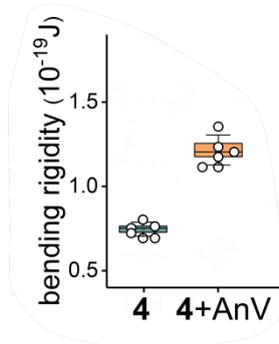


Figura 3.31. Aumento de la rigidez al doblamiento de membranas que contienen foldámeros en presencia y ausencia de anexina V.

Ya hemos visto con anterioridad que los foldámeros tienden a acumularse en la membrana plana. Y hemos visto que la anexina V pueden interaccionar con los foldámeros en ausencia de cualquier otra especie lipídica a la que puedan unirse (como por ejemplo PS). De este modo, las anexinas van a unirse más a la membrana plana del reservorio, por ser allí donde se acumulan las moléculas con las que pueden interaccionar (foldámeros), aunque también van a unirse, en menor medida a la membrana del NT, donde también hay algunas moléculas de foldámeros. La

acumulación de anexinas también contribuye a la resistencia a la flexión. La anexina V se parece a un disco rígido ligeramente cóncavo que puede oligomerizar formando trimeros y estructuras de orden superior. De esta manera, el aumento en la rigidez al doblamiento de la membrana indica la unión de la anexina V a la membrana, de la misma forma que lo indicaba para los foldámeros.

Debido a que la unión de la anexina es dependiente de la presencia de los foldámeros en la membrana (ver Fig. 3.28.), a continuación comprobamos si el movimiento de los foldámeros hacia el NT tras la aplicación de +150 mV puede también traer a la anexina con ellos. Sorprendentemente, encontramos que la rigidez aumentó dramáticamente (Fig. 3.32.), lo que demuestra que los foldámeros incorporados en la membrana pueden transportar moléculas de Anexina V a usNTs.

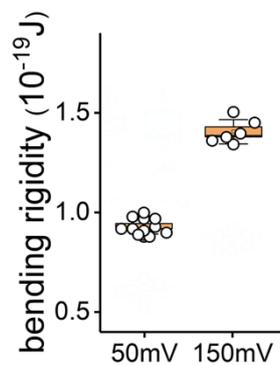


Figura 3.32. Cambios en los valores de resistencia a la flexión con el voltaje para usNT que contienen foldámeros debido al influjo electroforético de Anexina V transportada por los foldámeros.

La explicación a este fenómeno es que el voltaje aplicado está modificando la composición de la membrana del NT, pero en esta ocasión, no está movilizándolos únicamente a los foldámeros, sino que está incorporando también las anexinas unidas a los foldámeros.

Sabiendo esto, se intentó observar la incorporación de los foldámeros y las anexinas de manera conjunta, igual que se había hecho para ver la incorporación de los foldámeros tomando como base las alteraciones en la medida de conductancia. Así, se procedió a la formación de usNT desde membranas planas, en presencia de anexina V y con calcio en el medio. Tras aplicar un campo eléctrico igual al empleado para movilizar los foldámeros, se observó que era posible registrar, de nuevo, la incorporación de los

foldámeros. Sin embargo, esta vez la amplitud de los saltos en la conductancia era mayor, con un volumen estimado diez veces superior al de la molécula individual de foldámero. Fue posible emplear el valor asociado a una molécula individual de anexina, que ya está establecida, y compararlo con el volumen estimado en base a las medidas de conductancia. En este caso, lo que se está registrando es la incorporación no solo del foldámero, sino también de la anexina unida a los foldámeros, que migran juntos a la membrana del usNT (Fig 3.33.).

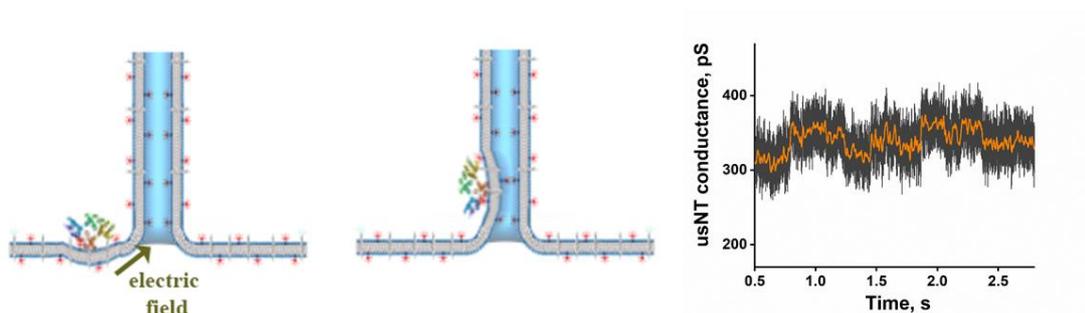


Figura 3.33. Representación gráfica de la incorporación de foldámero + anexinaV desde la membrana plana a la curva del usNT, junto con los saltos en la medida de conductancia a través del NT asociados a la incorporación de foldámero + anexina V.

No obstante, el mecanismo por el que ocurre esta interacción no está claro del todo. Por un lado, podría deberse a la formación de nanodominios por parte de los foldámeros en la membrana en la que se han incorporado. Esto podría provocar la aparición de zonas donde se acumula carga negativa de las cabezas polares de los foldámeros, pero también puede deberse a un desajuste en la incorporación de los foldámeros a la membrana, de tal manera que no se insertan exactamente en perpendicular, dejando expuesta parte de la cadena hidrofóbica, lo cual puede facilitar la inserción y unión de las proteínas.

Así, vemos que los foldámeros, dadas sus propiedades, pueden actuar como un receptor para las proteínas, ayudando a controlar la incorporación de las moléculas de interés a la membrana del usNT. De este modo, ayudándonos de los foldámeros y su sensibilidad a los campos eléctricos para incorporar proteínas a la membrana del NT, podemos ir más allá del efecto colectivo de las proteínas, hasta el efecto individual de

las mismas, manteniendo la longitud del NT a escala submicrométrica. Esto nos proporciona la sensibilidad suficiente para poder detectar las deformaciones en la membrana provocadas por moléculas individuales, tanto de foldámeros como de foldámero + proteína.

Discusión

Empezamos esta parte del presente trabajo analizando la conductancia del usNT en presencia de ENTH, tratando de detectar incorporaciones individuales a la membrana del usNT. A pesar de la clara y robusta detección de la entrada colectiva de moléculas (Ver capítulo 3.2.), los eventos de incorporación individuales no eran muy frecuentes. Identificamos dos razones que obstaculizaban la detección de moléculas individuales: en primer lugar, la incorporación colectiva de moléculas a la membrana del NT se llevó a cabo con tubos por encima de la micra de longitud, y para cuando determinamos la geometría del NT (reduciendo su longitud), la concentración de ENTH en la membrana era ya muy elevada. Con tantas moléculas de ENTH moviéndose hacia y desde la membrana del NT, la detección de eventos individuales era casi imposible. En segundo lugar, disminuir la concentración de ENTH también disminuía la probabilidad de que la proteína se incorporase a la membrana del usNT. Problemas similares son bien conocidos entre quienes desarrollan métodos de detección de moléculas individuales mediante nanoporos (Miles et al., 2013). En estos casos, para guiar la molécula al interior del nanoporo se emplea un receptor adecuado (Saharia et al., 2021). Este receptor puede ser una pequeña molécula con carga (como un péptido o un oligonucleotido), que se une por afinidad a la molécula de interés. El receptor es entonces guiado al interior del nanoporo aplicando el mismo campo eléctrico que se emplea para llevar a cabo las medidas de conductancia. Este método electroforético permite no solo guiar la molécula de interés al interior del nanoporo sino también controlar el tiempo que permanece en el interior del nanoporo, incluyendo nanoporos recubiertos de lípido (Eggenberger, Leriche, et al., 2019).

En nanoporos recubiertos de lípido, este procedimiento electroforético puede emplearse para mover moléculas hacia la capa lipídica que recubre el lumen del nanoporo (Chekashkina et al., 2017; Eggenberger, Leriche, et al., 2019). Sin embargo, el gradiente del campo eléctrico es imposible de crear en la membrana externa del usNT, que está expuesta a un espacio abierto. Para trasladar este proceso electroforético de la membrana interna a la externa, empleamos una molécula transmembrana, una molécula rígida de carácter bola-anfifílico, con dos cabezas polares unidas por un cuerpo hidrofóbico, como puede apreciarse en la Fig. 2.12.

Estas moléculas fueron sintetizadas por el grupo del Dr. Ivan Huc, (University of Munich, Germany) a partir de foldámeros compuestos de oligoamidas (OF) ensambladas en forma de estructuras rígidas diseñadas para abarcar toda la membrana en su dirección normal. Una vez incorporados a la membrana del usNT, uno de los extremos cargados de la molécula queda expuesto al lumen del usNT e interacciona con el campo eléctrico aplicado. La fuerza electroforética aplicada al extremo expuesto al lumen moviliza la molécula de foldámero a lo largo del eje del usNT y a la vez facilita la incorporación del foldámero desde la membrana plana del reservorio a la curva del usNT, como se ve en la Figura 2.25.

Nuestra hipótesis consistió en que, si una proteína periférica podía unirse al otro extremo de estas moléculas rígidas, entonces el foldámero incorporado a la membrana podría actuar como el tipo de receptor que se emplea en los nanoporos y movilizar la proteína a la membrana del usNT. Esta hipótesis se confirmó mediante una serie de experimentos que demostraron la incorporación de los foldámeros a la membrana del usNT, su interacción con diferentes proteínas disponibles en el laboratorio, y por último, su capacidad para guiar e incorporar la anexina V, una proteína que normalmente prefiere configuraciones planas de la membrana, a la membrana del usNT.

4. Conclusiones generales

4.CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales de la presente tesis pueden resumirse en los siguientes puntos:

1.- La incorporación de lípidos con colas poliinsaturadas y forma cónica conduce a una reducción eficaz de la resistencia a la deformación de la membrana en NTs lipídicos conectados a un reservorio plano.

2.- Una resistencia a la flexión reducida permite la creación de NT lipídicos cortos ($L_{NT} \sim 100$ nm), estrechos ($r_{NT} \sim 2$ nm) y estables adecuados para la detección y análisis en tiempo real de deformaciones de la membrana extremadamente pequeñas.

3.- El sensor basado en el sistema de usNT permite resolver en tiempo real el intercambio de lípidos y proteínas entre la membrana del NT y el reservorio, y determinar los cambios en la resistencia a la flexión asociados a ese intercambio.

4.- Las moléculas sintéticas bola-anfifílicas y rígidas (los foldámeros) pueden ser incorporadas con éxito a la membrana del usNT, y su incorporación puede ser controlada por un campo eléctrico.

5.- Las moléculas bola-anfifílicas pueden actuar como receptores de proteínas y controlar y facilitar la incorporación de las mismas a la membrana externa del usNT.

6.- El sensor molecular basado en usNTs permite resolver y caracterizar deformaciones locales de membrana producidas por moléculas individuales de proteína que interactúan con lípidos de membrana o con los foldámeros incorporados a la misma.

5. Materiales y métodos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Material y equipo general

STOCKS	
Cloruro potásico, KCl	#P9333, SigmaUltra, Sigma-Aldrich, EEUU
Cloruro cálcico, CaCl ₂	#21115, Fluka
HEPES, 1M pH 7.3	#BP299 Fisher Bio reagents, ThermoFisher Scientific, EEUU
Ácido etilendiaminitetraacético, EDTA 0.5 M, pH 8.0	#03690, Sigma-Aldrich, EEUU
1,4-Ditiotreitol, DTT	#GE17-1318-01, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
PIPES 1M pH 7.5	#J62494.AK Thermo Fisher Scientific, EEUU
Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético, EGTA	#E3889, Sigma-Aldrich, EEUU
Imidazol	#122021000 Thermo Fisher Scientific, EEUU
Cloruro Magnésico, MgCl ₂	1M, #63069, Fluka, Sigma-Aldrich, EEUU
D-(+)-Trehalosa dihidratada, TRH	#T9449, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
Albúmina de suero bovino 2 g/l, BSA	#10829410, Thermo Scientific, EEUU
Triton x-100	#T8787, Sigma, Sigma-Aldrich, USA
Buffer para geles SDS	Tris-Glicina SDS Buffer 10X #LC26754, Invitrogen™ Novex™, EEUU

SOLVENTES ORGÁNICOS	
Cloroformo para HPLC	#366927, Sigma-Aldrich, EEUU
Metanol (≥ 99,8%)	NORMAPUR, #20847, VWR, EEUU
Etanol (≥99,5%)	EMSURE, #100983, Merck Millipore, EEUU

SOLUCIONES TAMPÓN	
Buffer de trabajo	150 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA
Buffer anexina V	150 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM CaCl ₂
Buffer de diálisis Dyn1	20 mM Hepes (pH 7.2), 150mM KCl, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 1 mM EGTA
Buffer de elución Dyn1	20 mM PIPES, pH 6.1-6.5, 1.2 M NaCl, 10 mM CaCl ₂ , 1 mM DTT
Buffer de lisis Dyn1	20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT
Buffer de diálisis ENTH	150 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Buffer lisis ENTH	150 mM KCl, 50 mM HEPES 5 mM Imidazol, inhibidor de proteasas y 1 mM DTT
Buffers de elución ENTH	Gradiente de imidazol
Buffer MLVs	1 mM HEPES pH 7.4
Buffer de hidratación	1 M Trehalosa, 1 mM HEPES pH 7.4

EQUIPO GENERAL	
Balanza	CP32025, CP225D y ME36S-OCE, Sartorius, Alemania
Cubeta de electroforesis	Mini gel tank #A25977, Invitrogen™, EEUU
Vortex	Zx4, Velp Scientifica, Italia
Baño termostático	462-0556, Grant InstrUments Ltd, Reino Unido
Centrífuga de mesa	Biocen 22R, Orotalresa, España
Mini centrífuga	E29129, Nahita,
Baño Sonicador	FB15049, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, EEUU
Sistema de purificación de agua ultrapura	Ultrapure Direct-Q® 3 UV, Merck-Millipore, Alemania
Espectrofotómetro para microvolúmenes, Nanodrop	SD-11, DeNovix, EEUU
Pipetas de volumen variable	0.1-2, 2-20, 20-200, 100-1000 ul, Discovery Comfort, HTL, Alemania
Pipeteador automatizado	Fisherbrand, Fisher Scientific, EEUU
Incubador	Galaxy® 48 R, Eppendorf, Alemania
Incubador Agitador	Modelo 200, Labolan, España
Cabina de flujo laminar	Telstar Bio II A, Telstar Technologies, España
Campana de gases, ácidos	Captair SMART 321, ErLab, Francia
Bomba de vacío	Vacubrand GmbH, Alemania
Agitador termal	Thermal shake Lite, VWR, EEUU
Plasma Cleaner	PDC-002-CE, Harrick Plasma

MATERIAL GENERAL	
Columnas cambio de buffer	Zeba™ spin desalting columns 7K MWCO, #89882, Thermo Scientific, EEUU
Cassettes de diálisis	Slyde-A-Lyzer™,
Capilares de borosilicato	GB-150-10, Science Products, Alemania
Cubreobjetos 25 mm diam.	41001125, Glaswarenfabrik Karl Hecht HmbH &Co, Alemania
Tiras pH	Macherey-Nagel, Alemania
Tubos de microcentrifuga safe-lock 1.5 ml	#0030121872, Eppendorf, Alemania
Tubos cónicos para centrifuga de polipropileno estériles, 15 ml	#339650 ThermoFisher scientific, EEUU
Tubos cónicos para centrifuga de polipropileno, estériles, 50 ml	#339652, ThermoFisher scientific, EEUU
Viales ambar 4 ml para stocks de lípido	27083-U Merck, EEUU
Parafilm	4'' Parafilm® M Barrier Film, SPI Supplies, EEUU
Placa 96 pocillos Nunc™ Microwell™	Nunclon Delta-treated, Flat-Bottom Microplate, #167008, ThermoFisher Scientific, EEUU
Marcador de proteínas Blue Safe	GelCode™, #24594, ThermoFisher Scientific, EEUU
Marcador SDS	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 a 250 kDa, #26620, Thermofisher Scientific, EEUU
Gel electroforesis SDS-PAGE	Novex™ 4-20% Mini geles Tris-Glicina, Formato WedgeWell™, 12 pocillos, #XP04202BOX, ThermoFisher Scientific, EEUU

5.1.2. Microscopía

EPIFLUORESCENCIA	
<i>Microscopio invertido Eclipse Ti-e, Nikon, Japón</i>	
Mesa óptica	Newport, EEUU
Ordenador de trabajo	Dell Inc, EEUU
Cámara Zyla	Zyla 4.2 sCMOS, Andor, Oxford Instruments, Reino Unido
Filtro de fluorescencia TRITC	560/585 EX7EM, Semrock, EEUU
Filtro de fluorescencia FITC	485/505 ex/em, Semrock, EEUU
Lámpara de fluorescencia	PE-4000, CoolLED, Reino Unido
Lente	CFI Apo TIRF 100x oil (NA=1.49), Nikon, Japón
<i>Microscopio invertido IX-71, Olympus, Japón</i>	
Cámara Andor	iXon EM+, Andor, Irlanda
Lámpara de fluorescencia	Series 120PC, Q, X-Cite, Lumen dynamics, EEUU
Lente	UApo 150X/1,45 Oil TIRFM, Olympus, Japón
Filtro de fluorescencia FITC	485/505 ex7em, SeMrock, EEUU
Filtro de fluorescencia TRITC	560/585 ex/em, Semrock, EEUU
Mesa óptica	Newport, EEUU
Estación de trabajo	Dell Inc, EEUU

CONFOCAL	
<i>Microscopio Confocal TCS SP5 II, Leica Instruments GmbH, Alemania</i>	
Detectores Fotomultiplicadores PMT	Air-cooled R9624 Hamamatsu Photonics, Japón
Lente	HCX PL APO 65X/1.20W CORR Ibd. Blue (NA=1.2), Leica Microsystems GmbH, Alemania
Mesa óptica	Newport, EEUU
Estación de trabajo	Dell Inc, EEUU

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA	
Ultra Speed AFM	JPK Instruments, Alemania
Mesa anti-vibración	JPK Instruments, Alemania
Cierre acústico	JPK Instruments, Alemania
Cantilevers V-shaped MLCT Si ₃ N ₄	Bruker, Bilerica, MA
Microscopio fluorescencia	Leica Instruments GmbH, Alemania
BioCell controlador de temperatura	JPK Instruments, Alemania

5.1.3. Fluorimetría

PTI Quantamaster 40 espectrofluorímetro	Horiba Scientific, EEUU
Cubeta cuarzo macro cell 101-QS 10 mm	Hellma Analytics, Alemania
Cubetas plástico estándar	MAPS-F10-100, Labbox Labware, España

5.1.4. Software de adquisición y análisis de datos

PTI FelixGX	Horiba Scientific, EEUU
LAS AF 2.6.3	Leica Microsystems, GmbH, Alemania
MicroManager	Versión 1.4 NIH, EEUU
Image J	64, 1.50n, NIH, EEUU
Origin 8	SR4, OriginLab Inc., EEUU
Patch Master	Heka elektronik GmbH, Germany

5.1.5. Purificación de proteínas

Dinaminas y ENTH	
Células de insecto Sf9	#89070101, Sigma-Aldrich, EEUU
Kit cuantificación proteína BCA	Kit BCA Pierce™ #23227, ThermoFisher Scientific Inc, EEUU
Centrífuga	Ultra optima L90K Beckman Coulter, Beckman Coulter Inc, EEUU
Rotor	Ti70, Beckman Coulter, Beckman Coulter Inc, EEUU
Columna cromatografía por gravedad	Column de cromatografía Econo-Pack® , Bio-Rad, Bio-Rad laboratories Inc, EEUU
Resina GST	Pierce™ Glutation Agarosa #16102BID, ThermoFisher Scientific Inc, EEUU
Cocktail inhibidor de proteasas	#04693116001, Roche, Alemania
Tubos de ultra centrífuga	Tubos polipropileno Open-Top Thinwall, Beckamn Coulter Inc, EEUU
Células bacterianas	E coli
Resina Ni-NTA	Sigma-Aldrich, EEUU
Centrífuga	Optima Max, Beckman Coulter Inc, EEUU

5.1.6. Modelos de membrana

Stocks de lípido	
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocolina, 18:1 (Δ 9-cis) PC, DOPC	#850375, Avanti PolarLipids Inc, USA
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamina, 18:1 (Δ 9-cis) PE, DOPE	#850725, Avanti PolarLipids Inc, USA
Colesterol (lana ovina, >98%), Chol	#700000, Avanti PolarLipids Inc, USA
L- α -fosfatidylinositol-4,5-bisfosfato (cerebro, porcino), PI(4,5)P ₂	#840046, Avanti Polar Lipids Inc, USA
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfo-L-serina, 18:1 PS, DOPS	#840035, Avanti Polar Lipids Inc, EEUU
1,2-dioleoyl-3-trimetilamonio-propano, DOTAP	#890890C, Avanti Plar Lipids Inc, EEUU
1-estearoyl-2-docosaheptaenoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamina, (18:0 22:6 PE)	#850806, Avanti Polar Lipids Inc, EEUU
1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamina (20:4 PE)	#850800C, , Avanti Polar Lipids Inc, EEUU
1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanoamina(18:0 20:4 PE)	#850804C, , Avanti Polar Lipids Inc, EEUU
1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-fosfocolina (20:4 PC)	#850397C, , Avanti Polar Lipids Inc, EEUU
1,2-dioleil-sn-gliceo-3-fosfoetanolamina-N-(sulfonil lisamina rodamina B), 18:1 RhPE	#810150, Avanti Polar Lipids Inc, EEUU
Foldámeros	Amablemente proporcionados por el grupo del Dr. Ivan Huc

Materiales y equipo general para formación de modelos de membrana	
Capilares de vidrio borosilicato, sin filamento	GB-150-10, Science Products, Alemania
Cubreobjetos de cristal 25 mm diam., Nº 1	41001125, Glaswarenfabrik Karl Hecht HmbH &Co, Alemania
Cubreobjetos de cristal 13 mm diam.	41001113, Glaswarenfabrik Karl Hecht HmbH &Co, Alemania
Tubos de microcentrifuga safe-lock 1.5 ml	#0030121872, Eppendorf, Alemania
Vortex ZX4	Velp Scientifica, Italia
Baño de temperatura	462-0556, Grant InstrUments Ltd, Reino Unido
Lámina de parafina	4" Parafilm® M Barrier Film, SPI Supplies, EEUU
Bomba de vacío	Vacubrand GmbH, Alemania
Microesferas de sílice 40 um diam.	#140256, Corpuscular, EEUU
Nitrógeno líquido	Air Liquide, Francia
Gas argón	Alphagaz™, Air Liquide, Francia
Mini-extrusor de liposomas	#610000-1EA, Avanti Polar Lipids, EEUU
Membranas de policarbonato 0.1 micras	Whatman™ Nucleopore Track-Rtched membranes, 25 mm diam. Tamaño de poro 0.1 micras #11065, Merck Millipore, Alemania
Membranas de policarbonato 0.4 micras	Whatman™ Nucleopore Track-Rtched membranes, 25 mm diam. Tamaño de poro 0.4 micras, #110607, Merck-Millipore, Alemania
Chamber de microscopía para cubreobjetos 25 mm diam.	QR-40LP, Warner Instruments, EEUU
Soportes para filtros de extrusor	
Jeringuillas para extrusora de liposomas, 250 ul	#610015, Avanti Polar Lipids, EEUU
Jeringuillas para extrusora de liposomas, 1000 ul	#610017, Avanti Polar Lipids, EEUU
Posicionadores capilar de borosilicato	High-resolution NanoPZ actuators,

	Newport, EEUU
Micromanipulador	ESA-CXA uDrive controlador en tres ejes, Newport, EEUU
Puller de micropipetas	P-1000, Sutter Instruments, EEUU

5.1.7. Electrofisiología

Posicionadores	High-resolution NanoPZ actuators, Newport, EEUU
Capilares de vidrio borosilicato sin filamento	GB-150-10, Science Products, Alemania
Amplificador	Axopatch 200B, Axon instruments
Amplificador	HEKA PC 10 , Heka Elektronik, Alemania
Osciloscopio	TDS 3014, Tektronix, EEUU
Micromanipulador	ESA-CXA uDrive controlador en tres ejes, Newport, EEUU
Mesa óptica	Newport, EEUU
PC	Dell Inc, EEUU

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Preparación de stocks de foldámeros

Los foldámeros fueron disueltos en una solución 1:1 de cloroformo/metanol, a la concentración deseada para los stocks. La fluorescencia intrínseca de las muestras (370nm/450nm Exc/Em) se verificó mediante fluorímetro PTI, usando una cubeta de cuarzo (Hellma Analytics).

5.2.2. Preparación de MLVs de lípido y lípido-foldámero

Durante el desarrollo de esta tesis, se han empleado los siguiente lípidos para la formación de los diferentes modelos de membrana: 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS), 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), Esfingomielina (Cerebro) (brainSM), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-(lissaminerhodamine B sulfonyl) (RhPE), Colesterol, 1-estearoil-2-docosahexaenoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (18:0 22:6 PE), 1,2-diaraquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (20:4 PE), 1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina(18:0 20:4 PE), 1,2-diaraquidonoil-*sn*-glicero-fosfocolina (20:4 PC), de Avanti Polar Lipids (USA)

Tras mezclar un volumen apropiado de lípido y foldámero la mezcla se secó al vacío durante 30 minutos, para evaporar el solvente.

Los MLVs, vesículas multilamelares, se formaron hidratando la capa de lípido resultante tras evaporación en buffer 1mM HEPES, pH 7.0, y aplicando agitación hasta resuspender de nuevo todo el lípido, como ha sido descrito con anterioridad (Velasco-Olmo et al., 2019).

La Fig.5.1 ofrece una representación esquemática del proceso de formación de los MLVs.

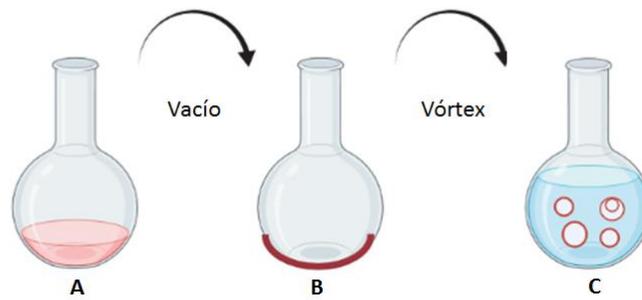


Fig. 5.1. Preparación de MLVs. A. La mezcla de lípidos en cloroformo se seca al vacío, hasta obtener una capa de lípido pegada a las paredes del recipiente. B. A continuación, se resuspende la capa de lípido en una solución Hepes 1 mM, o en buffer de trabajo, para obtener los MLVs, C.

La incorporación de los foldámeros a la membrana de los MLVs de diferente composición se comprobó en un fluorímetro PTI, usando cubetas de plástico para fluorimetría (Labbox), en las que un volumen determinado de MLVs se diluyó en el buffer correspondiente, y excitando la muestra a 370 y 405 nm. La emisión se detectó a 450 nm. Verificar la excitación a 405 nm es necesario debido a las limitaciones en las longitudes de onda disponibles en el microscopio confocal Leica SP5.

5.2.3. Preparación de Vesículas unilamelares, LUVs

La muestra de LUVs se preparó a partir de los MLVs, realizando 10 ciclos de congelación-descongelación, usando nitrógeno líquido. A continuación, la muestra se pasó por una extrusora de liposomas, a través de un filtro de policarbonato de 400 nm de tamaño de poro (Avanti Polar Lipids, USA) como se ha descrito con anterioridad (Espadas et al., 2019) (Fig. 5.2.).

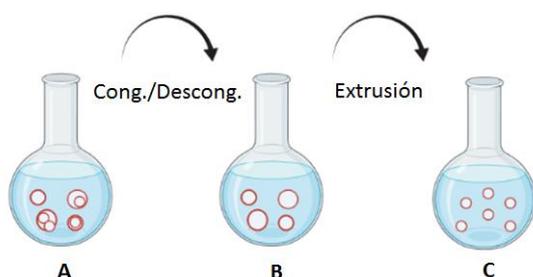


Figura 5.2. Obtención de LUVs a partir de la muestra de MLVs. La muestra de MLVs, (A), se somete a 10 ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido. De este modo se obtienen vesículas unilamelares. B. Pasando la muestra a través de un filtro de tamaño de poro adecuado (100-400 nm), usando un extrusor de liposomas, se obtienen los LUVs de interés, (C).

Alternativamente, para la muestra de LUVs, los MLVs pueden prepararse en buffer de trabajo (150 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA), en vez de en la solución 1 mM HEPES.

5.2.4. Formación de Bicapas soportadas Gigantes GSBs sobre microesferas de sílice

Se depositaron 15 μ L de la muestra de MLVs, divididos en 3 gotas, sobre Teflon. A continuación, se añadió una pequeña cantidad de microesferas de sílice de 40 μ m de diámetro (Microspheres-Nanospheres, USA) a cada gota. Las gotas de MLVs más las microesferas se secaron al vacío durante 30 minutos, hasta evaporar toda el agua de las gotas, y obtener microesferas recubiertas de lamelas de lípido. A continuación, una punta de plástico para pipeta de 10 μ L se cortó a aproximadamente 2 cm del extremo inferior, y se empleó para tomar 6 μ L de una solución 1M de trehalosa + 1 mM HEPES. Parte de las microesferas cubiertas de lípido se añadieron, con ayuda de una pipeta de vidrio, a la trehalosa en la punta cortada, y a continuación se incubaron a 60 $^{\circ}$ C para hidratar las lamelas de lípido sobre las microesferas. Tras la hidratación, las microesferas se depositaron en un volumen determinado de buffer de trabajo (150 mM KCl 20 mM HEPES 1 mM EDTA) en un cristal portaobjetos sobre un chamber de microscopía. El cristal para la observación de los GSBs fue tratado con albumina de suero bovino (BSA) a una concentración de 0.2 g/l, temperatura ambiente, para evitar que los lípidos se peguen a la superficie del cristal (Fig. 5.3.).

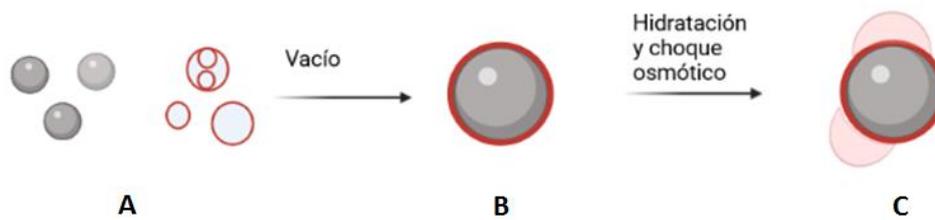


Fig. 5.3. Formación de GSB sobre microesferas de sílice. **A.** Una pequeña cantidad de la muestra de MLVs o LUVs se mezcla con microesferas de sílice sobre teflón. **B.** Tras secar al vacío las gotas de MLVs o LUVs, se obtienen microesferas recubiertas de lamelas de lípido. **C.** Tras hidratar las lamelas de lípido de las microesferas en trehalosa 1M a 60 °C, y depositarlas en buffer de trabajo, se pueden observar los GSBs formados sobre la superficie de las microesferas, a partir de las lamelas hidratadas.

Algunas Vesículas Gigantes Unilamelares, GUVs, se forman al mismo tiempo que los GSBs, al desprenderse éstos de la superficie de las microesferas. Para mejorar la formación de GUVs, si se desea, las microesferas pueden ser depositadas en el volumen deseado de buffer de trabajo, tras la hidratación. Tras incubar unos 30 minutos, agitar la muestra suavemente con una punta de pipeta hará que las vesículas se separen de las microesferas. Entonces, el buffer con los GUVs en suspensión puede transferirse a una cámara de microscopía (Velasco-Olmo et al., 2019).

5.2.5 Formación de NTs lipídicos

Para la formación de NTs lipídicos se han empleado los siguientes procedimientos:

Formación de NTs aplicando flujo a la muestra de GSB

Este protocolo simplificado permite obtener NTs de manera sencilla. En primer lugar, es necesario tratar con BSA 0.2 g/l el cristal para la observación de muestras en el microscopio, durante unos 30 minutos. A continuación, se añaden las microesferas recubiertas de lamelas de lípido a la célula de observación, para la formación de GSBs

(como se ha descrito en la sección correspondiente). Tras comprobar de manera visual en el microscopio la formación de los GSBs, se aplica flujo con sumo cuidado, empleando una pipeta de volumen adecuado.

La acción del flujo hace rodar las microesferas donde se han formado los GSBs, y permite obtener NTs lipídicos entre las microesferas o, más deseable, NTs conectados a la membrana de GSBs (Fig. 5.4.).

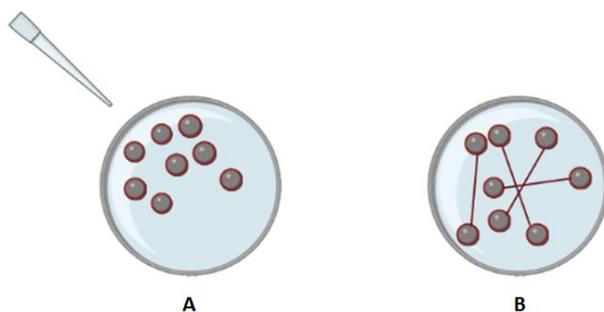


Figura 5.4. Formación de NTs lipídicos aplicando flujo. A. Las microesferas de sílice recubiertas de lamelas lipídicas se depositan en la cámara de observación del microscopio, en buffer de trabajo. B. tras aplicar flujo suavemente con la punta de la pipeta, las microesferas se deslizan, resultando en la formación de NTs lipídicos.

Formación de NTs mediante micromanipulación de los GSBs

En primer lugar, es necesario formar GSBs como se ha descrito en el apartado correspondiente, y depositar la muestra en la celda de observación de microscopía. Se utilizó el puller P-1000 (Sutter Instruments, EEUU) para la formación de las micropipetas necesarias para la obtención de NTs mediante este procedimiento. Una vez localizado el GSB de interés, la punta de la pipeta se pone en contacto con la membrana del mismo, con la ayuda de un sistema de microposicionamiento formado por posicionadores (High-resolution NanoPZ actuators, Newport, EEUU) para los tres ejes, y un micromanipulador (ESA-CXA uDrive controlador en tres ejes, Newport, EEUU), acoplados a un microscopio de epifluorescencia (Microscopio invertido IX-71, Olympus, Japón).

Una vez en contacto la punta de la pipeta y la membrana del GSB, tras esperar unos segundos, la pipeta se retrae con ayuda del micromanipulador, lo que va a permitir la obtención de un NT de longitud controlable (Fig.5.5). La formación del NT se verifica

por observación directa a través del software Micromanager Versión 1.4 NIH, EEUU) y la cámara del microscopio (iXon EM+, Andor, Irlanda).

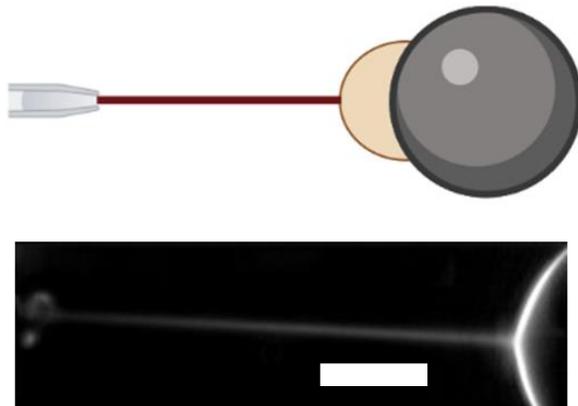


Figura 5.5. Formación de NT lipídico a partir de la manipulación de la membrana de un GSB. Arriba, representación esquemática de la formación del NT lipídico. Tras tocar la membrana con la pipeta, ésta se retrae suavemente y de manera controlada, propiciando la formación del NT. **Abajo**, imagen de microscopía de epifluorescencia del NT lipídico ya formado. Barra de escala 10 micras.

Formación de NTs sobre micropilares de polímero

El siguiente procedimiento ha sido descrito con anterioridad (Martinez Galvez et al., 2020). Para obtener los NTs, se emplea un chip de microfluidica, y los micropilares de polímero, soportados sobre un cristal cubreobjetos de 25 mm de diámetro. Los NTs se forman haciendo rodar las microesferas de sílice recubiertas de lamelas de lípido sobre los micropilares, aplicando un flujo controlado. De este modo, los NTs se forman entre los pilares, pudiendo obtener varios de estos NTs de manera simultánea (Fig. 5.6.).

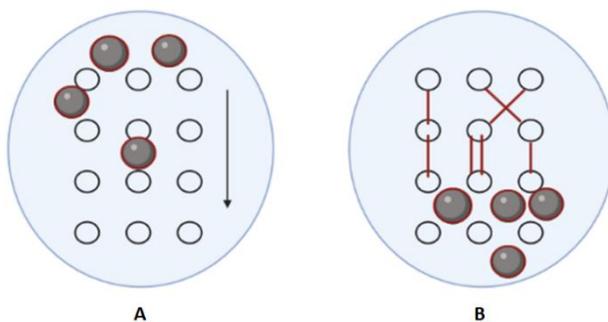


Figura 5.6. Representación esquemática de la formación de NTs lipídicos sobre columnas de polímero. **A**, las microesferas de sílice recubiertas de lamelas de lípido se depositan sobre el chip de microfluidica donde se encuentran las columnas. La aplicación de un flujo controlado provoca que las microesferas se desplacen sobre las columnas. **B**, por efecto del desplazamiento de las microesferas, se forman NTs lipídicos conectados entre los pilares de polímero.

5.2.6 Cálculo del radio de NTs lipídicos por fluorescencia

El procedimiento empleado para calcular el área de los NTs por fluorescencia ya ha sido descrito con anterioridad (Dar et al., 2015, Martínez Galvez et al., 2020). En primer lugar, se realizó una curva de calibración de la fluorescencia empleando parches lipídicos formados sobre un cristal portamuestras, con la misma composición que la de la muestra de interés. Los parches sirvieron para calcular la constante de calibración ρ_0 para la señal de fluorescencia de la membrana.

La intensidad total de fluorescencia (I_{ROI}) de un área (A) determinada en una membrana puede describirse como sigue:

$$I_{ROI} = \rho_0 * A \quad (\text{ec. 5.1.})$$

Así, se toman varios ROI de diferente tamaño y área dentro de un mismo parche, y se calcula la intensidad de fluorescencia integrada para cada ROI, usando el software ImageJ (Fig. 5.7).



Figura. 5.7. Parche para calibración. Ejemplo de parche para calcular la constante de calibración. Los ROI seleccionados se muestran en rojo

Al representar la curva de calibración para cada área y sus intensidades, la pendiente de la recta será la constante de calibración ρ_0 (Fig. 5.8.).

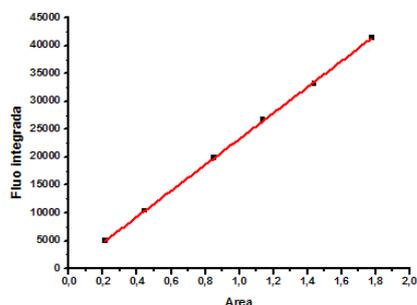


Figura 5.8. Recta de calibración a partir del área de los ROIs seleccionado en el parche y la intensidad de fluorescencia asociada. La pendiente equivale a la constante de calibración.

Las imágenes de los NT deben tomarse a la misma intensidad de lámpara y exposición a la que se ha hecho la calibración; tras eliminar la señal de fondo, se escoge un ROI a lo largo del eje del NT, y se calcula la intensidad de fluorescencia integrada para ese ROI. Como la geometría del NT puede ser considerada aproximadamente cilíndrica, y teniendo en cuenta la longitud (L) del ROI empleado en el NT, tenemos que el radio puede calcularse de la siguiente manera:

$$R_{NT} = I_{ROI} / (2 * \pi * \rho_0 * L_{ROI}) \quad (\text{ec.5.2})$$

5.2.7 Incorporación de foldámeros a la membrana de GSBs, GUVs y NTs lipídicos

La incorporación de los foldámeros a la membrana de GSBs, GUVs y NTs lipídicos se comprobó por observación directa, mediante microscopio confocal TCS SP5 II, usando un objetivo 63x (Leica Microsystems GmbH). La muestra con los diferentes modelos de membrana fue en primer lugar excitada con un laser de Argón a 543 nm, y la emisión detectada a 560-590 nm, para verificar la formación de GSBs, GUVs y NTs marcados

con RhPE. Después, la muestra se excitó con luz ultravioleta a una longitud de onda de 405 nm, y la emisión detectada en un rango de longitud de onda de 435-470 nm, para verificar la incorporación de los foldámeros a la membrana.

Las imágenes fueron procesadas mediante el software ImageJ, como ya ha sido descrito (Schneider et al., 2012).

5.2.8. Cálculo de la distribución de los foldámeros y proteínas entre membranas planas y curvas (coeficiente de distribución según curvatura)

El coeficiente de distribución según curvatura nos da información sobre la preferencia de una molécula en cuestión por las membranas curvas o planas, en función de la geometría intrínseca de la molécula, pudiendo ser ésta lípidos, proteínas, o foldámeros. Para calcularlo, es necesario comparar el ratio de incorporación de la molécula a un área dada de la membrana curva y de la plana. Para ello, se calcula el ratio entre la fluorescencia del foldámero, y del lípido marcado con RhPE para una misma región de interés (Fig. 5.9.). El mismo procedimiento se emplea para calcular el coeficiente de distribución de las proteínas, siendo necesario que estén marcadas con un fluoróforo como el GFP para poder calcular el ratio entre las fluorescencias de cada molécula.

Para ello, necesitamos un NT lipídico conectado a un reservorio, por ejemplo, el modelo de membrana más empleado en este caso es el de los NTs obtenidos a partir de la membrana de GSBs (Fig. 5.9.), formados como se ha explicado en su sección correspondiente.

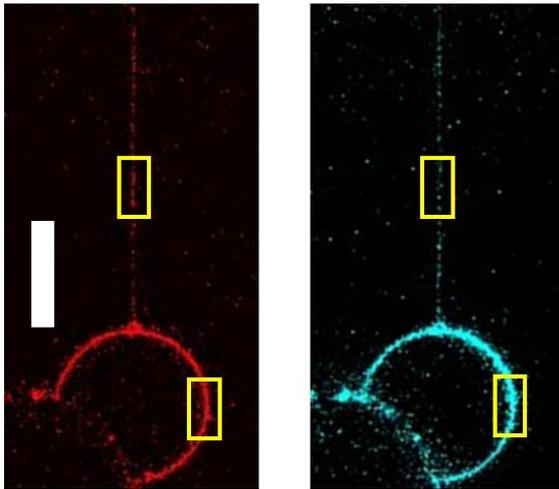


Figura 5.9. NT lipídico conectado a la membrana de un GSB para calcular coeficiente de sorting. Izquierda, Canal de lípido correspondiente a la fluorescencia de RhPE. Derecha, canal de foldámero. Se muestran las regiones de interés seleccionadas en ambas membranas, plana y curva. Composición de membrana DOTAP:Foldamero:Rh-PE, 59:40:1 %mol., variante 4. Barra de escala 5 micras.

Una vez formado el NT conectado a la membrana reservorio, es necesario escoger un ROI, una región de interés, siendo ésta igual en área para la membrana curva y la membrana del GSB. A continuación, es necesario calcular la fluorescencia integrada tanto del foldámero como del lípido para ese ROI dado, y el ratio entre fluorescencias para cada tipo de membrana. Si el coeficiente de sorting se calcula para una proteína marcada, se tendrá en cuenta la fluorescencia de GFP, por ejemplo. El coeficiente de sorting vendrá dado por la comparación de los ratios para cada tipo de membrana, de la siguiente manera:

$$\text{Coeficiente de sorting} = \left(\frac{\text{Fluo}_{\text{FoldGSB}} / \text{Fluo}_{\text{LipidGSB}}}{\text{Fluo}_{\text{FoldNT}} / \text{Fluo}_{\text{LipidNT}}} \right) \quad (\text{Ec. 2.8})$$

Aplicando la fórmula en la forma en la que figura arriba, un coeficiente de sorting mayor que uno indica una preferencia por la membrana del GSB, es decir, la membrana plana.

5.2.9. Expresión y purificación de proteínas

Todas las dinaminas empeladas durante el desarrollo de esta tesis (Dyn1, Dyn1-meGFP) fueron expresadas en células de insecto sf9, transfectadas con constructos

plex6. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad, en la que el ligando de afinidad es el dominio SH3 de la amfifisina-II unido a GST. El pellet celular se resuspendió en buffer que contiene 20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT y luego se lisó por sonicación. El lisado se sometió a ultracentrifugación para clarificarlo, y después se incubó con la resina conteniendo el ligando de afinidad. Tras la incubación, la resina con la proteína unida se lavó varias veces con el buffer anterior. La proteína se eluyó de la resina mediante un buffer que contiene 20 mM PIPES, pH 6.1-6.5, 1.2 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 1 mM DTT y tras recuperarla se dializó toda la noche en un buffer de 20 mM Hepes (pH 7.2), 150mM KCl, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 1 mM EGTA. La proteína se alicuotó en 5% de glicerol, congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80° C.

El dominio ENTH-meGFP domain se expresó en BL21 *E.coli*. El pellet celular se resuspendió en buffer de lisis que contiene 150 mM KCL, 50 mM HEPES 5 mM Imidazol, inhibidor de proteasas y 1 mM DTT y luego lisado por sonicacion; el lisado se centrifugó a 38000 g durante 30 minutos, a 4° C. El sobrenadante se incubó con una resina de Ni-NTA, y la elución se llevó a cabo con un gradiente de imidazol. A continuación, se dializó toda la noche en buffer de 150 mMm KCL, 20 mMm HEPES, 1 mM EDTA y 1 mM DTT. La proteína se alicuotó en 5% de glicerol, congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80° C.

Anexin-V, alexa fluor™ 488 Ready Flow™ Reagent fue comprada en Thermo Fisher Scientific.

5.2.10. Ensayo de unión proteína-foldámero

Mediante el el ensayo de unión, se determinó la interacción de proteínas marcadas (Dyn1-meGFP, ENTH-meGFP, y Anexina V químicamente marcada con Alexa fluor 488) con foldámeros incorporados a la membrana de GUVs, GSBs, y NTs lipídicos. La unión de las diferentes proteínas a los modelos de membrana conteniendo foldámeros se confirmó mediante observación directa en microscopio confocal TCS SP5 I, usando un objetivo 63x (Leica Microsystems GmbH).

En primer lugar, la formación de los diferentes modelos de membrana se confirmó por observación directa de la emisión de fluorescencia del fluoróforo rodamina añadido a la composición lipídica. Tras 15-20 minutos de incubación de las proteínas con la muestra en buffer de trabajo, la unión de las diferentes proteínas se verificó excitando las muestras con un láser de Argón a una longitud de onda de 488 nm, longitud de onda a la que absorben tanto el GFP como Alexa fluor 488, y detectando la emisión en un rango de 510-530 nm. Las imágenes fueron adquiridas con software del microscopio (LAS AF) y procesadas con ImageJ.

También se empleó microscopía de epifluorescencia para confirmar la unión de las proteínas a los diferentes modelos de membrana. Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E con una fuente de luz CoolLed pE-4000, un objetivo 100x/1.49 NA de aceite, y una cámara Andor Zyla sCMOS.

5.2.11 Preparación de muestras para AFM

Las muestras para AFM se prepararon como ha sido descrito con anterioridad (González-Ramírez et al., 2020), con ligeras modificaciones. Los parches de lípido, o de lípido + foldámero se formaron estrellando GUVs (formados como se ha descrito en la sección correspondiente) sobre un cubreobjetos (Glasswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, Alemania) en buffer de trabajo, tras limpiar el cristal con etanol y plasma de oxígeno (Harrick Plasma, Ithaca, NY).

El cristal previamente tratado se montó sobre el dispositivo Biocell diseñado para llevar a cabo medidas de microscopía de Fuerza Atómica (JPK instruments, Berlin, Alemania). Sobre el cristal se añadieron 120 μ L de buffer de trabajo (150 mM KCL, 20 mM HEPES y 1 mM EDTA) y 80 μ L de la solución de GUVs previamente formados. La muestra se mantiene así durante 30 minutos a 60 $^{\circ}$ C para favorecer la formación de bicapas lipídicas sobre la superficie del cristal. Para evitar la evaporación de la muestra y un aumento en la concentración de sales, durante estos 30 minutos y pasados los primeros cinco minutos, se añade buffer de trabajo a 60 $^{\circ}$ C periódicamente. La

muestra se equilibró durante otros 30 minutos a temperatura ambiente, eliminando las vesículas que no se han pegado a la superficie del cristal lavando la muestra 10 veces con buffer de trabajo a temperatura ambiente, lo cual además favorece la formación de bicapas lipídicas, como ha sido descrito con anterioridad (Oncins et al., 2005). Este procedimiento permite la obtención de bicapas separadas unas de otras, de tamaño adecuado pero que no cubren toda la superficie del cristal; la presencia de superficies libres de lípido cerca de las bicapas lipídicas permite cuantificar el grosor de las bicapas formadas, al tomar la superficie del cristal como referencia. Una vez formadas las bicapas, la muestra se mantiene a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de realizar las medidas pertinentes, para evitar la presencia de posibles artefactos (García-Manyes et al., 2005). Finalmente, el controlador de temperatura se fija en 23°C para mantener la muestra a esa temperatura y poder llevar a cabo las medidas pertinentes.

5.2.12. Toma de imágenes en AFM

La toma de imágenes se llevó a cabo en microscopio de fuerza atómica de alta velocidad (Ultraspeed AFM, JPK Instruments, Berlín, Alemania), usando el modo QI, que permite tomar imágenes de las bicapas a la vez que lleva a cabo curvas de fuerza sobre la bicapa, aplicando una fuerza < 1 nN. El microscopio de fuerza atómica está acoplado a un microscopio de fluorescencia Leica, que permite la visualización directa de las bicapas lipídicas marcadas con RhPE, y que está montado sobre una mesa antivibraciones y debidamente aislado (JPK Instruments). El setup empleado y las medidas se realizaron de manera similar a la descrita con anterioridad (García-Arribas et al., 2017). La muestra se mantuvo a la temperatura deseada empleando el soporte para muestras Biocell (JPK Instruments). Las bicapas de lípido se escanearon con cantilevers en forma de V MLCT Si_3N_4 (Bruker, Billerica, MA) con una constante nominal de 0.1 or 0.5 N/m, obteniéndose imágenes de 256×256 pixels en modo QI.

Este procedimiento se obtuvo para determinar la topografía de bicapas lipídicas que contenían foldámeros (Fig. 5.10.) formadas como se ha escrito en el apartado anterior.

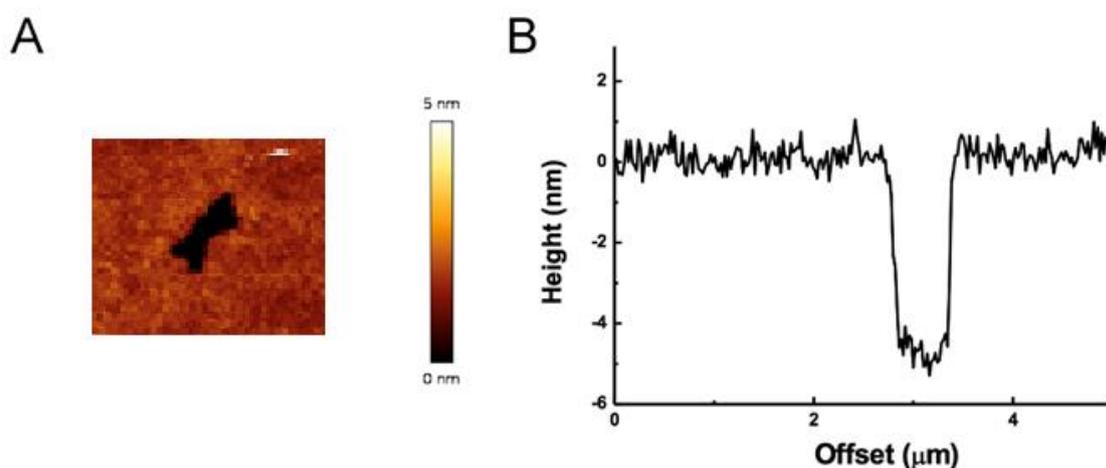


Fig. 5.10. Imagen de una bicapa lipídica que contiene foldámero, tomada mediante AFM. A. Imagen de AFM del parche. B. Topografía de la bicapa lipídica, que muestra un tamaño esperado de 4 nm.

5.2.13 Formación de NTs lipídicos ultra-cortos (usNT)

En primer lugar, es necesario preparar por duplicado las composiciones lipídicas de interés. Para ello, se toman los volúmenes oportunos de cada lípido, y tras mezclarlos, se secan al vacío hasta obtener una capa de lípido uniforme pegada a la pared del tubo donde se ha llevado a cabo la mezcla. A continuación, se disuelve una de las muestras en una mezcla de octano/decano, y la otra muestra en una mezcla de escualeno/octano. En este caso, el octano facilita que la muestra se disuelva en el escualeno, siendo necesario evaporar posteriormente el octano de la mezcla. De este modo tendremos una mezcla a la que llamaremos R (octano/decano) y otra a la que llamaremos M (sq/octano).

Sobre una rejilla de microscopía electrónica, se aplica una gota (aprox. 3 μL) de la mezcla R, y se seca bajo argón o nitrógeno. A continuación, la rejilla con el lípido se

deposita en una célula de observación de microscopía, soportado por los laterales sobre pequeños fragmentos de adhesivo, para evitar que la rejilla toque el fondo. Una vez colocada la rejilla, se añade el buffer de interés, hasta cubrir la rejilla. Si se observa a través del microscopio óptico, en este momento se puede observar a formación de la bicapa de soporte dentro de los agujeros que conforman la rejilla.

A continuación, es necesario aplicar, con ayuda de un pincel, una capa de la mezcla identificada como M. Al ponerla en contacto con el lípido previamente depositado, y si todo ha ido bien, se formarán múltiples membranas, una por cada agujero de la rejilla de microscopía electrónica.

Una vez formadas las membranas, es necesario formar una pipeta de vidrio borosilicato que se empleará para la formación del usNT, empleando para tal efecto un “puller”, formador de micropipetas (P-1000, Sutter Instruments, EEUU). Esta pipeta se llena del mismo buffer que la célula de observación. En el interior de la pipeta y en la célula de observación se sitúan el electrodo de medida y el electrodo de referencia, respectivamente. Este método de formación de NTs está acoplado a medidas de conductancia a través el lumen del NT, y estos electrodos nos van a permitir detectar la corriente aplicada a través del NT.

Para formar el usNT es necesario poner en contacto la punta de la micropipeta con la membrana de nuestra elección (Fig 5.11.). Para ello, se emplea un sistema de posicionadores (High-resolution NanoPZ actuators, Newport, EEUU), que permiten mover la pipeta en los tres ejes y un micromanipulador (ESA-CXA uDrive, Newport, EEUU), que permite un desplazamiento de la pipeta en el eje Z con mucha mayor precisión.

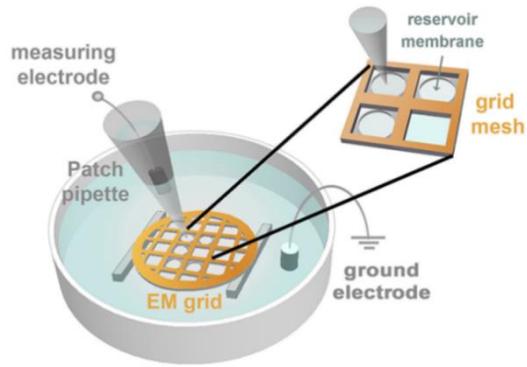


Fig. 5.11. Representación esquemática del sistema de formación de usNT. Se identifican la rejilla de microscopía electrónica sobre el que se forman las membranas, los electrodos y la pipeta para formar el usNT. Reproducido con permiso de Bashkirov, 2020

Para formar el NT, basta con tocar la membrana con la punta de la pipeta. Al hacerlo, la punta de la pipeta queda bloqueada, formándose un parche y el paso de corriente eléctrica se interrumpe. La calidad de este parche, que viene dado por su resistencia, depende del tamaño de la pipeta y de la ausencia de suciedad en el sistema.

Para lograr tener un NT, es necesario romper este parche y a continuación alejar la pipeta de la membrana. Una vez roto el parche que bloquea la punta de la pipeta, el paso de corriente eléctrica a través de la pipeta se reestablece. A medida que la punta de la pipeta se aleja de la membrana, usando un micromanipulador para ello, en primer lugar se forma un catenoide que comunica la pipeta con la membrana plana, y a continuación, se forma el NT.

La formación del NT puede identificarse por la caída súbita en la conductancia, que indica que ha ocurrido el colapso del catenoide (Fig. 5.12.).

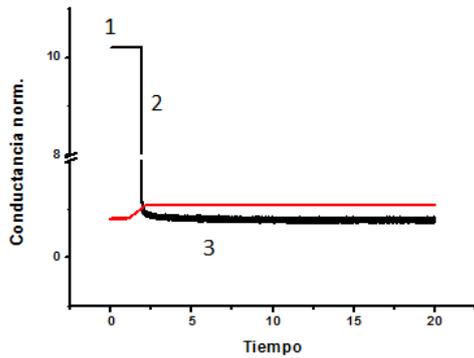


Figura. 5.12 Señal de conductancia normalizada durante la formación del usNT. En rojo, incremento en la longitud que provoca el paso del catenoide al NT. En negro, medidas de conductancia: **1**, valor de la conductancia medida en el catenoide. **2**, momento del colapso, en el que se pasa del catenoide al NT. **3**, conductancia a través del lumen del NT una vez formado.

En este momento, se ha formado un NT cuyo radio oscila entre los 3-10 nm. El radio del usNT se ve afectado por la corriente que se aplique; de este modo, al incrementar el voltaje se provoca una expansión del radio de NT. Sin embargo, cambios en la longitud del NT no afectan al radio del mismo. No obstante, considerando el tubo como un cilindro de longitud L , la resistencia al paso de la corriente a través del mismo y por lo tanto la conductividad, sí que dependen de la longitud.

A mayor longitud, mayor resistencia y menor conductividad; y viceversa. De este modo, cambiar la longitud del NT con el micromanipulador supone cambios en el valor de la conductancia a través del mismo (Fig. 5.13.).

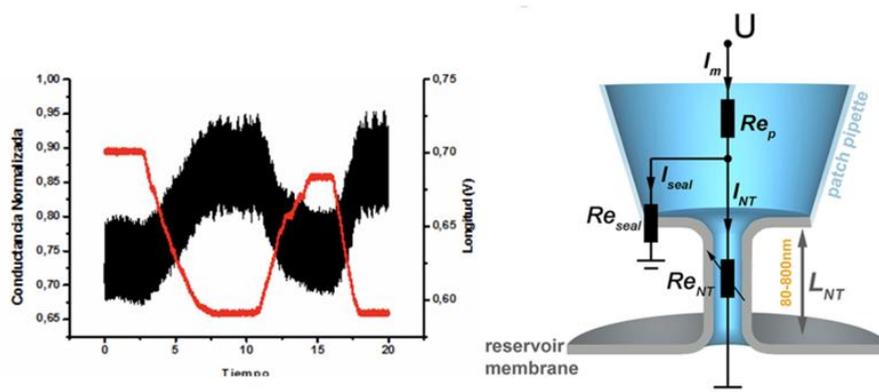


Figura 5.13. Cambio en conductancia a través del lumen del usNT asociados a cambios en la longitud del mismo. Izq. En rojo, cambios en la longitud del NT. En negro, cambios en la conductancia. Como se ve, reducir el tamaño del usNT supone un aumento en la conductancia y viceversa. Derecha, representación de un NT formado a partir de una membrana sobre la rejilla de microscopía electrónica.

De este modo, para comprobar que se ha formado el NT, es necesario cambiar la longitud del mismo, y registrar los cambios en la conductancia, si los hay. De haberlos, es porque se ha formado un NT.

5.2.14. Medidas de conductancia a través del lumen del usNT

La corriente que fluye a través del lumen del NT, la conductancia y los cambios en la conductancia se midieron a través de un amplificador HEKA EPC 10 (Heka Elektronik, Alemania), y en ocasiones se empleó también un amplificador Axopatch 200B (Axon instruments). El registro y visualización de la corriente aplicada, la conductancia y la variación en la misma se llevó a cabo con un software diseñado para tal efecto, PatchMaster. Este software también permite la visualización de los cambios en longitud del micromanipulador, que se registran como cambios en voltaje. Es necesaria una calibración del instrumento para convertir este voltaje en unidades de longitud reales. Al mismo tiempo, se dispuso de un osciloscopio TDS 3014, Tektronix, EEUU para la visualización de la corriente y el voltaje aplicado, conectado al amplificador.

Las mediciones se realizaron en el modo voltage-clamp, y el voltaje se aplicó en modo constante, un voltaje determinado durante un tiempo determinado, o bien aplicando rampas de voltaje, en las que se fija un valor inferior y superior, y la velocidad a la que el V aumenta o disminuye para pasar de un valor a otro. Por ejemplo, una rampa de -100 mV a 100mV, a 10 mV/s. Ambos modos, V constante y rampas, son necesarios para obtener información del usNT, como el radio y la longitud en el primer caso, o los parámetros elásticos en el segundo caso.

Para calcular la longitud del NT y su radio, es necesario ver la dependencia de la conductancia con los cambios de longitud del usNT. Para ello, aplicamos diferentes voltajes, de modo constante, durante un tiempo determinado; por ejemplo, 50, 100 y 150 mV. Y se registra los cambios en la conductancia asociados a cambios en longitud en cada uno de esos voltajes constantes que se han aplicado.

Los parámetros elásticos del NT, tales como la resistencia a la flexión, se calculan a una longitud fija del NT.

Cálculo del radio de NTs lipídicos por conductancia

A la hora de calcular el radio del NT en base a la conductancia a través del lumen, hay que tener en cuenta que la conductancia registrada por el software tras aplicar un voltaje constante, no se debe únicamente al NT. Si consideramos el sistema como un circuito eléctrico entre los dos electrodos, contaría de las siguientes partes: la pipeta, el parche a partir del cual se ha formado el NT y el NT propiamente dicho, cada uno ofreciendo una resistencia determinada al paso de la corriente eléctrica, y por tanto, con un valor de conductancia determinado (Fig. 5.14.).

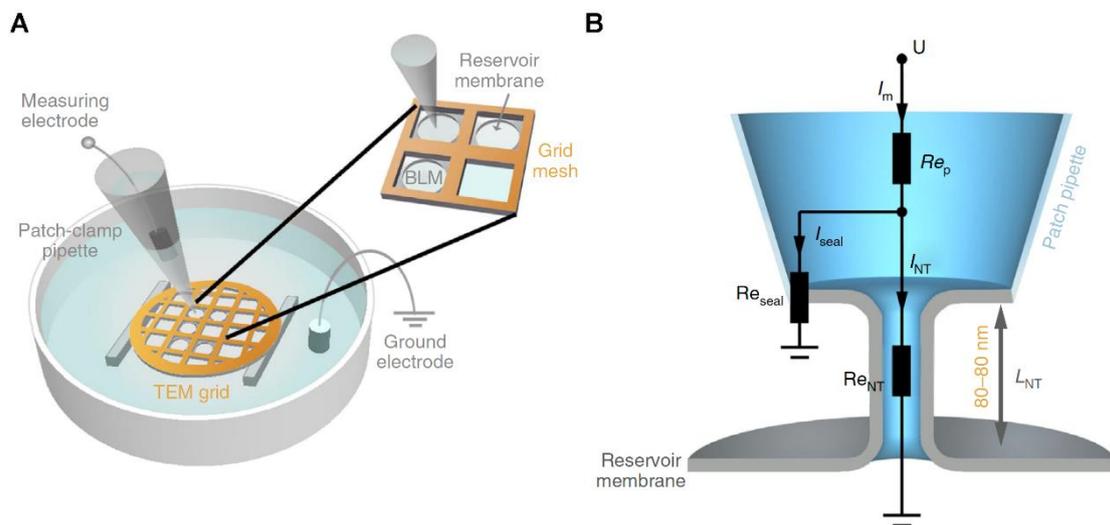


Fig.5.14. Representación esquemática del circuito eléctrico del sistema. Destacan los elementos principales: la pipeta, el parche y el NT. Tanto la pipeta como el parche ofrecen una resistencia determinada al paso de la corriente eléctrica, mientras que la del NT es variable y depende en cada momento de la longitud de mismo. Reproduciendo con permiso de Bashkirov, 2020.

Tanto la pipeta como el parche presentan una resistencia de valor determinado al paso de la corriente eléctrica; y por lo tanto, tienen un valor determinado de conductancia (la inversa de la resistencia). Sin embargo, tanto la resistencia, como la conductancia a través del NT dependen de la longitud del mismo. Por eso es necesario registrar el valor de la conductancia a diferentes longitudes del NT.

Así, hay que tener en cuenta que el valor de conductancia que registra el software no es solo el del NT, sino que es la conductancia atribuible a todos los elementos del sistema. Por eso es necesario identificar el valor atribuible al NT lipídico nada más. Para ello, si se representa la conductancia registrada, G , frente a la variación en el desplazamiento vertical de la pipeta, ΔL , y se realiza el ajuste adecuado obtenemos la siguiente gráfica (Fig 5.14).

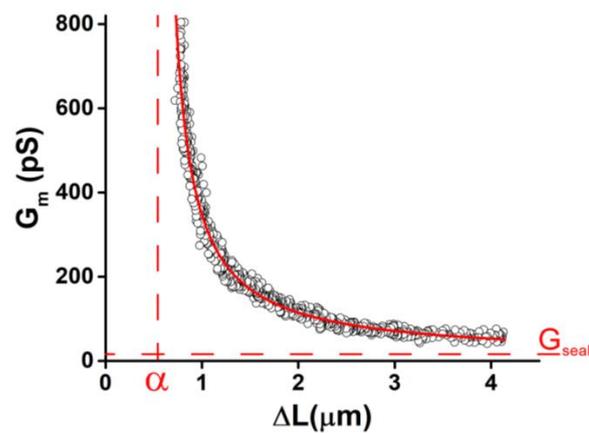


Figura 5.14. Gráfica valor de conductancia vs cambios en la longitud del usNT. El ajuste de la gráfica y los valores de las asíntotas permiten calcular el valor del radio del usNT.

El ajuste que hay que realizar, es hiperbólico, y tiene en cuenta tres parámetros: $p1$, $p2$ y $p3$, tal como indica la siguiente ecuación (ec. 5.3):

$$y = \left(\frac{p1}{x+p2} \right) + p3 \quad (\text{ec.5.3})$$

donde p_3 y p_2 representan la asíntota horizontal y vertical, respectivamente. El valor de estas asíntotas es importante porque el valor de la conductancia que se mide, G_m , no es exactamente la conductancia del NT, sino que es la suma de la conductancia del NT, G_{NT} y la conductancia asociada al sello, G_{sello} de tal manera que (ec.5.4):

$$G_m = G_{NT} + G_{sello} \quad (\text{ec.5.4})$$

, donde G_{sello} corresponde al valor de la asíntota horizontal, p_3 . De tal manera que, conociendo este valor fijo, podemos calcular el valor de la conductancia a través del NT para las diferentes longitudes del mismo. Los valores asociados a la pipeta se consideran negligibles.

Por su parte, la longitud real del NT, L_{NT} , es igual al valor del desplazamiento vertical de la pipeta, ΔL , menos el valor de la asíntota vertical (p_2), de tal manera que:

$$L_{NT} = \Delta L - p_2 \quad (\text{ec. 5.5.})$$

La asíntota vertical es un valor fijo que refleja el movimiento de la pipeta en sentido vertical hasta la formación del NT, por eso hay que restarla al desplazamiento total para calcular la longitud real del NT en cada momento.

De este modo, una vez que conocemos el valor de esas asíntotas gracias al ajuste hiperbólico, si sustraemos estos valores tanto al valor de la conductancia medida como al valor del desplazamiento de la pipeta, podemos llevar a cabo un ajuste mucho más sencillo, que relaciona directamente conductancia del NT y longitud del NT. De este modo, vamos a poder calcular la conductancia real para una longitud determinada.

De este modo, tras obtener los valores reales de conductancia para el NT y de longitud del NT, tras sustraer los valores de las asíntotas correspondientes, tendríamos que:

$$G_{NT} = \frac{P_1}{L_{NT}} \quad (\text{ec. 5.6.})$$

P_1 es un valor constante para cada ajuste que hacemos, y es producto de multiplicar $G_{NT} * L_{NT}$. A mayor longitud, menos conductancia, y viceversa. Así, para cada ajuste

hiperbólico, el producto de ambos valores es una constante, que no cambia con la longitud del NT (Fig. 5.16.).

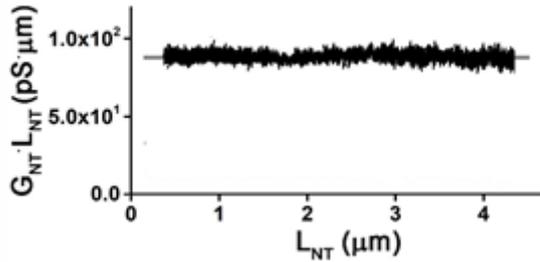


Fig. 5.16. Independencia de P1 respecto a la longitud del NT. El producto $G_{NT}L_{NT}$ es constante para cualquier longitud, y es igual al parámetro P1 del ajuste hiperbólico.

Si aplicamos la ley de Ohm para un cilindro:

$$G_{NT} = \frac{\pi r_{NT}^2}{\rho L_{NT}} \quad (\text{ec. 5.7})$$

, podemos llegar a la siguiente expresión,

$$G_{NT}L_{NT} = \left(\frac{\pi}{\rho}\right)r_{NT}^2 \quad (\text{ec.5.8})$$

Como hemos visto, $G_{NT}L_{NT}$ es igual a P1, que se obtiene del ajuste hiperbólico. Así,

$$P1 = \left(\frac{\pi}{\rho}\right)r_{NT}^2 \quad (\text{ec.5.9})$$

Podemos calcular el radio del NT, ya que conocemos el valor de π , y también de ρ , que es la resistencia específica del electrolito en el interior del NT, y que para una solución salina de cloruro potásico, KCl, 150 mM es 66.7 $\Omega \cdot \text{cm}$. Como el producto de $G_{NT}L_{NT}$ es una constante, y es constante a cualquier longitud, también el radio del NT es constante a cualquier longitud.

6. Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aimon, S., Callan-Jones, A., Berthaud, A., Pinot, M., Toombes, G. E. S., & Bassereau, P. (2014). Membrane Shape Modulates Transmembrane Protein Distribution. *Developmental Cell*, 28(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.012>
- Akhtarian, S., Miri, S., Doostmohammadi, A., Brar, S. K., & Rezai, P. (2021). Nanopore sensors for viral particle quantification: current progress and future prospects. *Bioengineered*, 12(2), 9189–9215. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1995991>
- Arima, A., Harlisa, I. H., Yoshida, T., Tsutsui, M., Tanaka, M., Yokota, K., Tonomura, W., Yasuda, J., Taniguchi, M., Washio, T., Okochi, M., & Kawai, T. (2018). Identifying Single Viruses Using Biorecognition Solid-State Nanopores. *Journal of the American Chemical Society*, 140(48), 16834–16841. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b10854>
- Arkhipov, A., Yin, Y., & Schulten, K. (2009). Membrane-bending mechanism of amphiphysin N-BAR domains. *Biophysical Journal*, 97(10), 2727–2735. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.051>
- Baoukina, S., Ingólfsson, H. I., Marrink, S. J., & Tieleman, D. P. (2018). Curvature-Induced Sorting of Lipids in Plasma Membrane Tethers. *Advanced Theory and Simulations*, 1(8), 1–4. <https://doi.org/10.1002/adts.201800034>
- Bashkirov, P. v., Chekashkina, K. v., Akimov, S. A., Kuzmin, P. I., & Frolov, V. A. (2011). Variation of lipid membrane composition caused by strong bending. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 5(2), 205–211. <https://doi.org/10.1134/S199074781101003X>
- Bashkirov, P. v., Kuzmin, P. I., Chekashkina, K., Arrasate, P., Vera Lillo, J., Shnyrova, A. v., & Frolov, V. A. (2020). Reconstitution and real-time quantification of membrane remodeling by single proteins and protein complexes. *Nature Protocols*, 15(8), 2443–2469. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0337-1>
- Bashkirov, P. v., Kuzmin, P. I., Lillo, J. V., & Frolov, V. A. (2022). Molecular Shape Solution for Mesoscopic Remodeling of Cellular Membranes. *Annual Review of Biophysics*, 51(1), 473–497. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-011422-100054>
- Bassereau, P., Jin, R., Baumgart, T., Deserno, M., Dimova, R., Frolov, V. A., Bashkirov, P. v., Grubmüller, H., Jahn, R., Risselada, H. J., Johannes, L., Kozlov, M. M., Lipowsky, R., Pucadyil, T. J., Zeno, W. F., Stachowiak, J. C., Stamou, D., Breuer, A., Lauritsen, L., ... Weikl, T. R. (2018). The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap. In *Journal of Physics D: Applied Physics* (Vol. 51, Issue 34). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aac998>
- Baumgart, T., Capraro, B. R., Zhu, C., & Das, S. L. (2011). Thermodynamics and mechanics of membrane curvature generation and sensing by proteins and lipids. *Annual Review of Physical Chemistry*, 62, 483–506. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.012809.103450>
- Beltrán-Heredia, E., Tsai, F. C., Salinas-Almaguer, S., Cao, F. J., Bassereau, P., & Monroy, F. (2019). Membrane curvature induces cardiolipin sorting. *Communications Biology*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0471-x>

- Blood, P. D., Swenson, R. D., & Voth, G. A. (2008). Factors influencing local membrane curvature induction by N-BAR domains as revealed by molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, *95*(4), 1866–1876. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.121160>
- Bozelli, J. C., & Epand, R. M. (2020). Membrane Shape and the Regulation of Biological Processes. *Journal of Molecular Biology*, *432*(18), 5124–5136. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.03.028>
- Brown, B. M., Nguyen, H. M., & Wulff, H. (2019). Recent advances in our understanding of the structure and function of more unusual cation channels [version 1; referees: 2 approved]. In *F1000Research* (Vol. 8). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17163.1>
- Brown, M. F. (2012). Curvature forces in membrane lipid-protein interactions. *Biochemistry*, *51*(49), 9782–9795. <https://doi.org/10.1021/bi301332v>
- Bulacu, M., Périole, X., & Marrink, S. J. (2012). In silico design of robust bolalipid membranes. *Biomacromolecules*, *13*(1), 196–205. <https://doi.org/10.1021/bm201454j>
- Callan-Jones, A., Sorre, B., & Bassereau, P. (2011). Curvature-driven lipid sorting in biomembranes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(2), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004648>
- Campelo, F., Fabrikant, G., McMahon, H. T., & Kozlov, M. M. (2010). Modeling membrane shaping by proteins: Focus on EHD2 and N-BAR domains. *FEBS Letters*, *584*(9), 1830–1839. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.023>
- Canham, P. B. (1970). The Minimum Energy of Bending as a Possible Explanation of the Biconcave Shape of the Human Red Blood Cell. In *J. Theoret. Biol* (Vol. 26).
- Capraro, B. R., Yoon, Y., Cho, W., & Baumgart, T. (2010). Curvature sensing by the epsin N-terminal homology domain measured on cylindrical lipid membrane tethers. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(4), 1200–1201. <https://doi.org/10.1021/ja907936c>
- Chakraborty, S., Doktorova, M., Molugu, T. R., Heberle, F. A., Scott, H. L., Dzikovski, B., Nagao, M., Stingaciu, L. R., Standaert, R. F., Barrera, F. N., Katsaras, J., Khelashvili, G., Brown, M. F., & Ashkar, R. (2020). How cholesterol stiffens unsaturated lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(36), 21896–21905. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004807117>
- Chekashkina, K. v., Galimzyanov, T. R., Kuzmin, P. I., Akimov, S. A., Romanov, S. A., Pozmogova, G. E., Klinov, D. v., & Bashkirov, P. v. (2017). Detection of DNA molecules in a lipid nanotube channel in the low ion strength conditions. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, *11*(3), 217–224. <https://doi.org/10.1134/S1990747817030047>
- Chen, Z., & Schmid, S. L. (2020). Evolving models for assembling and shaping clathrin-coated pits. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 219, Issue 9). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/JCB.202005126>
- Chernomordik, L. v., & Kozlov, M. M. (2003). Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 72, pp. 175–207). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161504>

- Colom, A., Redondo-Morata, L., Chiaruttini, N., Roux, A., & Scheuring, S. (2017). Dynamic remodeling of the dynamin helix during membrane constriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(21), 5449–5454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619578114>
- Cornet, J., Destainville, N., & Manghi, M. (2020). Domain formation in bicomponent vesicles induced by composition-curvature coupling. *Journal of Chemical Physics*, *152*(24). <https://doi.org/10.1063/5.0006756>
- Cox, C. D., Bavi, N., & Martinac, B. (2017). Origin of the Force: The Force-From-Lipids Principle Applied to Piezo Channels. *Current Topics in Membranes*, *79*, 59–96. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2016.09.001>
- Cui, H., Ayton, G. S., & Voth, G. A. (2009). Membrane binding by the endophilin N-BAR domain. *Biophysical Journal*, *97*(10), 2746–2753. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.043>
- Cullis, P. R., Hope, M. J., & T1lcock, C. P. S. (1986). LIPID POLYMORPHISM AND THE ROLES OF LIPIDS IN MEMBRANES. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 40).
- Dar, S., Kamerkar, S. C., & Pucadyil, T. J. (2015). A high-throughput platform for real-time analysis of membrane fission reactions reveals dynamin function. *Nature Cell Biology*, *17*(12), 1588–1596. <https://doi.org/10.1038/ncb3254>
- Dawson, J. C., Legg, J. A., & Machesky, L. M. (2006). Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 16, Issue 10, pp. 493–498). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.004>
- Day, K. J., & Stachowiak, J. C. (2020). Biophysical forces in membrane bending and traffic. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 65, pp. 72–77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.017>
- de Camilli, P., Chen, H., Hyman, J., Panepucci, E., Bateman, A., & Brunger, A. T. (2002). The ENTH domain. *FEBS Letters*, *513*(1), 11–18. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03306-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03306-3)
- Deuling, H. J. (n.d.). *RED BLOOD CELL SHAPES AS EXPLAINED ON THE BASIS OF CURVATURE ELASTICITY*.
- Drin, G., & Antony, B. (2010). Amphipathic helices and membrane curvature. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 9, pp. 1840–1847). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.022>
- Eggenberger, O. M., Leriche, G., Koyanagi, T., Ying, C., Houghtaling, J., Schroeder, T. B. H., Yang, J., Li, J., Hall, A., & Mayer, M. (2019). Fluid surface coatings for solid-state nanopores: Comparison of phospholipid bilayers and archaea-inspired lipid monolayers. *Nanotechnology*, *30*(32). <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab19e6>
- Eggenberger, O. M., Ying, C., & Mayer, M. (2019). Surface coatings for solid-state nanopores. In *Nanoscale* (Vol. 11, Issue 42, pp. 19636–19657). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9nr05367k>
- Emelyanov, A., Shtam, T., Kamyshinsky, R., Garaeva, L., Verlov, N., Miliukhina, I., Kudrevatykh, A., Gavrilov, G., Zabrodskaya, Y., Pchelina, S., & Konevega, A. (2020). Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid. *PLoS ONE*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227949>

- Epand, R. M., D'Souza, K., Berno, B., & Schlame, M. (2015). Membrane curvature modulation of protein activity determined by NMR. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1848, Issue 1, pp. 220–228). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.004>
- Espadas, J., Pendin, D., Bocanegra, R., Escalada, A., Misticoni, G., Trevisan, T., Velasco del Olmo, A., Montagna, A., Bova, S., Ibarra, B., Kuzmin, P. I., Bashkirov, P. v., Shnyrova, A. v., Frolov, V. A., & Daga, A. (2019). Dynamic constriction and fission of endoplasmic reticulum membranes by reticulon. *Nature Communications*, *10*(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13327-7>
- Fang, X. Z., Zhou, T., Xu, J. Q., Wang, Y. X., Sun, M. M., He, Y. J., Pan, S. W., Xiong, W., Peng, Z. K., Gao, X. H., & Shang, Y. (2021). Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. In *Cell and Bioscience* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00522-z>
- Frolov, V. A., Lizunov, V. A., Ya Dunina-Barkovskaya, A., Samsonov, A. v, Zimmerberg, J., & Frumkin, A. N. (2003). Shape bistability of a membrane neck: A toggle switch to control vesicle content release. In *National Institutes of Health*.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1432962100
- Frolov, V. A., Shnyrova, A. v., & Zimmerberg, J. (2011). Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(11).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004747>
- Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E. H., de Camilli, P., & Unger, V. M. (2008). Structural Basis of Membrane Invagination by F-BAR Domains. *Cell*, *132*(5), 807–817. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.041>
- Fuller, N., & Rand, R. P. (2001). The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophysical Journal*, *81*(1), 243–254.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75695-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75695-0)
- García-Arribas, A. B., González-Ramírez, E. J., Sot, J., Areso, I., Alonso, A., & Goñi, F. M. (2017). Complex Effects of 24:1 Sphingolipids in Membranes Containing Dioleoylphosphatidylcholine and Cholesterol. *Langmuir*, *33*(22), 5545–5554.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00162>
- Garcia-Manyes, S., Oncins, G., & Sanz, F. (2005). Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical Journal*, *89*(6), 4261–4274.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.065581>
- Garcia-Manyes, S., & Sanz, F. (2010). Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1798*(4), 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.019>
- Garten, M., Mosgaard, L. D., Bornschlöggl, T., Dieudonné, S., Bassereau, P., & Toombes, G. E. S. (2017). Whole-GUV patch-clamping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(2), 328–333.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1609142114>
- Gazze, S. A., Thomas, S. J., Garcia-Parra, J., James, D. W., Rees, P., Marsh-Durban, V., Corteling, R., Gonzalez, D., Conlan, R. S., & Francis, L. W. (2021). High content, quantitative AFM

- analysis of the scalable biomechanical properties of extracellular vesicles. *Nanoscale*, 13(12), 6129–6141. <https://doi.org/10.1039/d0nr09235e>
- Gillies, E. R., Deiss, F., Staedel, C., Schmitter, J.-M., Huc, I., Gillies, E. R., Deiss,] F, Schmitter, J.-M., Huc, I., & Staedel, C. (2007). Development and Biological Assessment of Fully Water-Soluble Helical Aromatic Amide Foldamers**. *Angew. Chem. Int. Ed*, 46, 4081–4084. <https://doi.org/10.1002/anie.200700301>
- González-Ramírez, E. J., García-Arribas, A. B., Sot, J., Goñi, F. M., & Alonso, A. (2020). C24:0 and C24:1 sphingolipids in cholesterol-containing, five- and six-component lipid membranes. *Scientific Reports*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71008-8>
- Gov, N. S. (2018). Guided by curvature: Shaping cells by coupling curved membrane proteins and cytoskeletal forces. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 373, Issue 1747). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0115>
- Haque, F., Li, J., Wu, H. C., Liang, X. J., & Guo, P. (2013). Solid-state and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA. *Nano Today*, 8(1), 56–74. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.12.008>
- Harayama, T., & Shimizu, T. (2020). Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *Journal of Lipid Research*, 61(8), 1150–1160. <https://doi.org/10.1194/JLR.R120000800>
- Hatzakis, N. S., Bhatia, V. K., Larsen, J., Madsen, K. L., Bolinger, P. Y., Kunding, A. H., Castillo, J., Gether, U., Hedegård, P., & Stamou, D. (2009). How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs. *Nature Chemical Biology*, 5(11), 835–841. <https://doi.org/10.1038/nchembio.213>
- Heinrich, M., Tian, A., Esposito, C., & Baumgart, T. (2010). Dynamic sorting of lipids and proteins in membrane tubes with a moving phase boundary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7208–7213. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913997107>
- Higgins, M. K., & McMahon, H. T. (2005). In vitro reconstitution of discrete stages of dynamin-dependent endocytosis. In *Methods in Enzymology* (Vol. 404, pp. 597–611). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)04052-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)04052-8)
- Horvath, C. A. J., vanden Broeck, D., Boulet, G. A. V., Bogers, J., & de Wolf, M. J. S. (2007). Epsin: Inducing membrane curvature. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(10), 1765–1770. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.004>
- Howorka, S., & Siwy, Z. (2009). Nanopore analytics: Sensing of single molecules. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2360–2384. <https://doi.org/10.1039/b813796j>
- Hu, J., Prinz, W. A., & Rapoport, T. A. (2011). Weaving the web of ER tubules. In *Cell* (Vol. 147, Issue 6, pp. 1226–1231). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.022>
- Hu, J., Shibata, Y., Voss, C., Shemesh, T., Li, Z., Coughlin, M., Kozlov, M. M., Rapoport, T. A., & Prinz, W. A. (2008a). Membrane Proteins of the Endoplasmic Reticulum Induce High-Curvature Tubules. *New Series*, 29(5867), 1247–1250. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>

- Hu, J., Shibata, Y., Voss, C., Shemesh, T., Li, Z., Coughlin, M., Kozlov, M. M., Rapoport, T. A., & Prinz, W. A. (2008b). Membrane Proteins of the Endoplasmic Reticulum Induce High-Curvature Tubules. *New Series*, 29(5867), 1247–1250. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Ikon, N., & Ryan, R. O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1859, Issue 6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.013>
- Ivchenkov, D. v., Kuzmin, P. I., Galimzyanov, T. R., Shnyrova, A. v., Bashkirov, P. v., & Frolov, V. A. (2021). Nonlinear material and ionic transport through membrane nanotubes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1863(10), 183677. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183677>
- Jacobson, K., Liu, P., & Lagerholm, B. C. (2019). The Lateral Organization and Mobility of Plasma Membrane Components. *Cell*, 177(4), 806–819. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.018>
- Jarin, Z., Tsai, F.-C., Davtyan, A., Pak, A. J., Bassereau, P., & Voth, G. A. (2019). Unusual Organization of I-BAR Proteins on Tubular and Vesicular Membranes. *Biophysical Journal*, 117(3), 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.06.025>
- Jiang, Y., Yang, X., Jiang, J., & Xiao, B. (2021). Structural Designs and Mechanogating Mechanisms of the Mechanosensitive Piezo Channels. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(6), 472–488. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.008>
- Kalappurakkal, J. M., Sil, P., & Mayor, S. (2020). Toward a new picture of the living plasma membrane. In *Protein Science* (Vol. 29, Issue 6, pp. 1355–1365). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3874>
- Kamiya, K., Osaki, T., Nakao, K., Kawano, R., Fujii, S., Misawa, N., Hayakawa, M., & Takeuchi, S. (2018). Electrophysiological measurement of ion channels on plasma/organelle membranes using an on-chip lipid bilayer system. *Scientific Reports*, 8(1), 2–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35316-4>
- Kessels, M. M., & Qualmann, B. (2021). Interplay between membrane curvature and the actin cytoskeleton. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 68, pp. 10–19). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.008>
- Kinnun, J. J., Bolmatov, D., Lavrentovich, M. O., & Katsaras, J. (2020). Lateral heterogeneity and domain formation in cellular membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 232. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104976>
- Kozlov, M. M. (2018). Spontaneous and intrinsic curvature of lipid membranes: Back to the origins. In *Physics of Biological Membranes* (pp. 287–309). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00630-3_12
- Kozlov, M. M., Campelo, F., Liska, N., Chernomordik, L. v., Marrink, S. J., & McMahon, H. T. (2014). Mechanisms shaping cell membranes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.03.006>
- Kumar, A., Baycin-Hizal, D., Zhang, Y., Bowen, M. A., & Betenbaugh, M. J. (2015). Cellular traffic cops: The interplay between lipids and proteins regulates vesicular formation, trafficking,

- and signaling in mammalian cells. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 36, pp. 215–221). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.006>
- Lai, C. L., Jao, C. C., Lyman, E., Gallop, J. L., Peter, B. J., McMahon, H. T., Langen, R., & Voth, G. A. (2012). Membrane Binding and Self-Association of the Epsin N-Terminal Homology Domain. *Journal of Molecular Biology*, *423*(5), 800–817. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.010>
- Lamour, G., Allard, A., Pelta, J., Labdi, S., Lenz, M., & Campillo, C. (2020). Mapping and Modeling the Nanomechanics of Bare and Protein-Coated Lipid Nanotubes. *Physical Review X*, *10*(1). <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.10.011031>
- Larsen, J. B., Rosholm, K. R., Kennard, C., Pedersen, S. L., Munch, H. K., Tkach, V., Sakon, J. J., Bjørnholm, T., Weninger, K. R., Bendix, P. M., Jensen, K. J., Hatzakis, N. S., Uline, M. J., & Stamou, D. (2020). How Membrane Geometry Regulates Protein Sorting Independently of Mean Curvature. *ACS Central Science*, *6*(7), 1159–1168. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00419>
- Leduc, C., Campàs, O., Zeldovich, K. B., Roux, A., Jolimaitre, P., Bourel-Bonnet, L., Goud, B., Joanny, J. F., Bassereau, P., & Prost, J. (2004). Cooperative extraction of membrane nanotubes by molecular motors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(49), 17096–17101. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406598101>
- Lin, Y. C., Chipot, C., & Scheuring, S. (2020). Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition. *Nature Communications*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14045-w>
- Lipowsky, R. (1995). Bending of Membranes by Anchored Polymers. In *EUROPHYSICS LETTERS Europhys. Lett* (Vol. 30, Issue 4).
- Lipowsky, R., & Dimova, R. (2021). Introduction to remodeling of biomembranes. *Soft Matter*, *17*(2), 214–221. <https://doi.org/10.1039/d0sm90234a>
- Macháň, R., & Hof, M. (2010). Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1798, Issue 7, pp. 1377–1391). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.014>
- Makowski, S. L., Kuna, R. S., & Field, S. J. (2020). Induction of membrane curvature by proteins involved in Golgi trafficking. In *Advances in Biological Regulation* (Vol. 75). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100661>
- Manni, M. M., Tiberti, M. L., Pagnotta, S., Lè Ne Barelli, H., Gautier, R., & Antonny, B. (n.d.). *Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage*. <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.001>
- Markin, V. S. (1981). Lateral organization of membranes and cell shapes. *Biophysical Journal*, *36*(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84713-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84713-3)
- Marsh, D. (1996). Intrinsic Curvature in Normal and Inverted Lipid Structures and in Membranes. In *Biophysical Journal* (Vol. 70).

- Martens, S., & McMahon, H. T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: Disparate players and common principles. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 9, Issue 7, pp. 543–556). <https://doi.org/10.1038/nrm2417>
- Martinez Galvez, J. M., Garcia-Hernando, M., Benito-Lopez, F., Basabe-Desmonts, L., & Shnyrova, A. v. (2020). Microfluidic chip with pillar arrays for controlled production and observation of lipid membrane nanotubes. *Lab on a Chip*, *20*(15), 2748–2755. <https://doi.org/10.1039/d0lc00451k>
- Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia: Molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(6), 446–454. <https://doi.org/10.1038/nrm2406>
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, *438*(7068), 590–596. <https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Middleton, E. R., & Rhoades, E. (2010). Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles. *Biophysical Journal*, *99*(7), 2279–2288. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.07.056>
- Miles, B. N., Ivanov, A. P., Wilson, K. A., Dogan, F., Japrun, D., & Edel, J. B. (2013). Single molecule sensing with solid-state nanopores: Novel materials, methods, and applications. *Chemical Society Reviews*, *42*(1), 15–28. <https://doi.org/10.1039/c2cs35286a>
- Miyagi, A., Chipot, C., Rangl, M., & Scheuring, S. (2016). High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. *Nature Nanotechnology*, *11*(9), 783–790. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.89>
- Mouritsen, O. G. (1998). Self-assembly and organization of lipid-protein membranes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *3*(1), 78–87. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(98\)80045-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(98)80045-9)
- Mukherjee, S., & Maxfield, F. R. (2000). Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *1*(3), 203–211. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010302.x>
- Nishimura, T., Oyama, T., Hu, H. T., Fujioka, T., Hanawa-Suetsugu, K., Ikeda, K., Yamada, S., Kawana, H., Saigusa, D., Ikeda, H., Kurata, R., Oono-Yakura, K., Kitamata, M., Kida, K., Hikita, T., Mizutani, K., Yasuhara, K., Mimori-Kiyosue, Y., Oneyama, C., ... Suetsugu, S. (2021). Filopodium-derived vesicles produced by MIM enhance the migration of recipient cells. *Developmental Cell*, *56*(6), 842-859.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.02.029>
- Oncins, G., Garcia-Manyes, S., & Sanz, F. (2005). Study of frictional properties of a phospholipid bilayer in a liquid environment with lateral force microscopy as a function of NaCl concentration. *Langmuir*, *21*(16), 7373–7379. <https://doi.org/10.1021/la050644q>
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Jonathan, P., Butler, G., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. In *New Series* (Vol. 303, Issue 5657).

- Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L. A., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antonny, B., & Barelli, H. (2014). Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science*, *345*(6197), 693–697. <https://doi.org/10.1126/science.1255288>
- Pomorski, T., & Menon, A. K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 63, Issue 24, pp. 2908–2921). <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6167-7>
- Prévost, C., Tsai, F. C., Bassereau, P., & Simunovic, M. (2017). Pulling membrane nanotubes from giant unilamellar vesicles. *Journal of Visualized Experiments*, *2017*(130), 1–9. <https://doi.org/10.3791/56086>
- Roux, A. (2013). The physics of membrane tubes: Soft templates for studying cellular membranes. In *Soft Matter* (Vol. 9, Issue 29, pp. 6726–6736). <https://doi.org/10.1039/c3sm50514f>
- Roux, A., Cuvelier, D., Nassooy, P., Prost, J., Bassereau, P., & Goud, B. (2005). Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO Journal*, *24*(8), 1537–1545. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600631>
- Rozovsky, S., Forstner, M. B., Sondermann, H., & Groves, J. T. (2012a). Single molecule kinetics of ENTH binding to lipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, *116*(17), 5122–5131. <https://doi.org/10.1021/jp210045r>
- Rozovsky, S., Forstner, M. B., Sondermann, H., & Groves, J. T. (2012b). Single molecule kinetics of ENTH binding to lipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, *116*(17), 5122–5131. <https://doi.org/10.1021/jp210045r>
- Saarikangas, J., Zhao, H., Pykäläinen, A., Laurinmäki, P., Mattila, P. K., Kinnunen, P. K. J., Butcher, S. J., & Lappalainen, P. (2009). Molecular Mechanisms of Membrane Deformation by I-BAR Domain Proteins. *Current Biology*, *19*(2), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.029>
- Sackmann, E. (2014). Endoplasmatic reticulum shaping by generic mechanisms and protein-induced spontaneous curvature. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 208, pp. 153–160). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.02.006>
- Saharia, J., Bandara, Y. M. N. D. Y., Karawdeniya, B. I., Hammond, C., Alexandrakis, G., & Kim, M. J. (2021). Modulation of electrophoresis, electroosmosis and diffusion for electrical transport of proteins through a solid-state nanopore. *RSC Advances*, *11*(39), 24398–24409. <https://doi.org/10.1039/d1ra03903b>
- Saotome, K., Murthy, S. E., Kefauver, J. M., Whitwam, T., Patapoutian, A., & Ward, A. B. (2018). Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature*, *554*(7693), 481–486. <https://doi.org/10.1038/nature25453>
- Schmid, S. L., & Frolov, V. A. (2011). Dynamin: Functional design of a membrane fission catalyst. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *27*, 79–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104016>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Schweitzer, Y., Shemesh, T., & Kozlov, M. M. (2015). A Model for Shaping Membrane Sheets by Protein Scaffolds. *Biophysical Journal*, 109(3), 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.001>
- Sharom, F. J. (2011). Flipping and flopping-lipids on the move. *IUBMB Life*, 63(9), 736–746. <https://doi.org/10.1002/iub.515>
- Shi, Z., & Baumgart, T. (2015). Membrane tension and peripheral protein density mediate membrane shape transitions. *Nature Communications*, 6(May 2014), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6974>
- Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M. M., & Rapoport, T. A. (2009). Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 25, pp. 329–354). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113324>
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W. A., Palazzo, A. F., Kozlov, M. M., & Rapoport, T. A. (2010). Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell*, 143(5), 774–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.007>
- Shnyrova, A. v., Bashkirov, P. v., Akimov, S. A., Pucadyil, T. J., Zimmerberg, J., Schmid, S. L., & Frolov, V. A. (2013). Geometric catalysis of membrane fission driven by flexible dynamin rings. *Science*, 339(6126), 1433–1436. <https://doi.org/10.1126/science.1233920>
- Shnyrova, A. v., Frolov, V. A., & Zimmerberg, J. (2009). Domain-Driven Morphogenesis of Cellular Membranes. In *Current Biology* (Vol. 19, Issue 17). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.063>
- Simunovic, M., Evergren, E., Callan-Jones, A., & Bassereau, P. (2019). Curving Cells Inside and Out: Roles of BAR Domain Proteins in Membrane Shaping and Its Cellular Implications. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617>
- Simunovic, M., Evergren, E., Golushko, I., Prévost, C., Renard, H. F., Johannes, L., McMahon, H. T., Lorman, V., Voth, G. A., & Bassereau, P. (2016). How curvature-generating proteins build scaffolds on membrane nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11226–11231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606943113>
- Simunovic, M., Voth, G. A., Callan-Jones, A., & Bassereau, P. (2015). When Physics Takes Over: BAR Proteins and Membrane Curvature. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 12, pp. 780–792). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.005>
- Snead, W. T., Hayden, C. C., Gadok, A. K., Zhao, C., Lafer, E. M., Rangamani, P., & Stachowiak, J. C. (2017). Membrane fission by protein crowding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(16), E3258–E3267. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616199114>
- Stachowiak, J. (2022). *Molecular Mechanisms of Steric Pressure Generation and Membrane Remodeling by Intrinsically Disordered Proteins*.

- Stachowiak, J. C., Brodsky, F. M., & Miller, E. A. (2013). A cost-benefit analysis of the physical mechanisms of membrane curvature. *Nature Cell Biology*, *15*(9), 1019–1027. <https://doi.org/10.1038/ncb2832>
- Stanishneva-Konovalova, T. B., Derkacheva, N. I., Polevova, S. v., & Sokolova, O. S. (2016). The Role of BAR Domain Proteins in the Regulation of Membrane Dynamics. *Acta Naturae*, *8*(4), 60–69. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-4-60-69>
- Steinem, C., & Meinecke, M. (2021). ENTH domain-dependent membrane remodelling. *Soft Matter*, *17*(2), 233–240. <https://doi.org/10.1039/c9sm02437a>
- Suetsugu, S. (2016). Higher-order assemblies of BAR domain proteins for shaping membranes. *Microscopy*, *65*(3), 201–210. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfw002>
- Sukharev, S., & Corey, D. P. (2004). Mechanosensitive channels: multiplicity of families and gating paradigms. In *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (Vol. 2004, Issue 219). <https://doi.org/10.1126/stke.2192004re4>
- Svetina, A., Zek, T., & Kardelj, E. (1990). *The Mechanical Behaviour of Cell Membranes as a Possible Physical Origin of Cell Polarity* (Vol. 146).
- Sweitzer, S. M., & Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, *93*(6), 1021–1029. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81207-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81207-6)
- Tian, A., & Baumgart, T. (2009). Sorting of lipids and proteins in membrane curvature gradients. *Biophysical Journal*, *96*(7), 2676–2688. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.067>
- Tiberti, M. L., Antony, B., & Gautier, R. (2020). The transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids determines their facilitating effect on membrane deformation. *Soft Matter*, *16*(7), 1722–1730. <https://doi.org/10.1039/c9sm02107h>
- Tonnesen, A., Christensen, S. M., Tkach, V., & Stamou, D. (2014). Geometrical membrane curvature as an allosteric regulator of membrane protein structure and function. *Biophysical Journal*, *106*(1), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.023>
- Unsay, J. D., Cosentino, K., & García-Sáez, A. J. (2015). Atomic force microscopy imaging and force spectroscopy of supported lipid bilayers. *Journal of Visualized Experiments*, *2015*(101), 1–9. <https://doi.org/10.3791/52867>
- Vamparys, L., Gautier, R., Vanni, S., Bennett, W. F. D., Tieleman, D. P., Antony, B., Etchebest, C., & Fuchs, P. F. J. (2013). Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophysical Journal*, *104*(3), 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3836>
- Varkey, J., Isas, J. M., Mizuno, N., Jensen, M. B., Bhatia, V. K., Jao, C. C., Petrova, J., Voss, J. C., Stamou, D. G., Steven, A. C., & Langen, R. (2010). Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(42), 32486–32493. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.139576>
- Velasco-Olmo, A., Ormaetxea Gisasola, J., Martinez Galvez, J. M., Vera Lillo, J., & Shnyrova, A. v. (2019). Combining patch-clamping and fluorescence microscopy for quantitative

- reconstitution of cellular membrane processes with Giant Suspended Bilayers. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43561-4>
- Vorselen, D., Piontek, M. C., Roos, W. H., & Wuite, G. J. L. (2020). Mechanical Characterization of Liposomes and Extracellular Vesicles, a Protocol. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00139>
- Wigge, P., & McMahon, H. T. (1998). The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends in Neurosciences*, 21(8), 339–344. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01264-8](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01264-8)
- Wu, J., Lewis, A. H., & Grandl, J. (2017). Touch, Tension, and Transduction – The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 42, Issue 1, pp. 57–71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.004>
- Xue, L., Yamazaki, H., Ren, R., Wanunu, M., Ivanov, A. P., & Edel, J. B. (2020). Solid-state nanopore sensors. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 5, Issue 12, pp. 931–951). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0229-6>
- Yokoo, H., Misawa, T., & Demizu, Y. (2020). De Novo Design of Cell-Penetrating Foldamers. *Chemical Record*, 20(9), 912–921. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000047>
- Yoon, Y., Tong, J., Lee, P. J., Albanese, A., Bhardwaj, N., Källberg, M., Digman, M. A., Lu, H., Gratton, E., Shin, Y. K., & Cho, W. (2010). Molecular basis of the potent membrane-remodeling activity of the epsin 1 N-terminal homology domain. *Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 531–540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068015>
- Yu, S., & Melia, T. J. (2017). The coordination of membrane fission and fusion at the end of autophagosome maturation. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 47, pp. 92–98). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.03.010>
- Zeno, W. F., Baul, U., Snead, W. T., DeGroot, A. C. M., Wang, L., Lafer, E. M., Thirumalai, D., & Stachowiak, J. C. (2018). Synergy between intrinsically disordered domains and structured proteins amplifies membrane curvature sensing. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06532-3>
- Zhang, J., Davidson, R. M., Wei, M. de, & Loew, L. M. (1998). Membrane electric properties by combined patch clamp and fluorescence ratio imaging in single neurons. *Biophysical Journal*, 74(1), 48–53. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77765-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77765-3)
- Zhukovsky, M. A., Filograna, A., Luini, A., Corda, D., & Valente, C. (2019). Protein Amphipathic Helix Insertion: A Mechanism to Induce Membrane Fission. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(December), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00291>

