



Universitat de València



Instituto de Ciencia Molecular

Actividad en Membranas Modelo de Péptidos Apoptóticos

Edel Cunill Semanat

Tesis Doctoral: Biomedicina y Biotecnología

Director: Jesús Salgado

Universitat de València, 2017

Actividad en Membranas Modelo de Péptidos Apoptóticos

Edel Cunill Semanat

3 de octubre de 2017

ICMOL, Universitat de València (2017)



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Jesús Salgado Benito, Doctor en Ciències Químiques y Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICO:

Que Don Edel Cunill Semanat, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título: *Actividad en Membranas Modelo de Péptidos Apoptóticos*, que aquí presenta para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste y produzca los efectos oportunos, firmo la presente en Paterna a 7 de julio de 2017.

Fdo: Jesús Salgado Benito

Índice general

Abstract	1
1 Introducción	3
1.1 Motivación	3
1.2 Membranas biológicas	4
1.2.1 Modelos clásico y actual de membranas biológicas	5
1.2.2 Composición de la membrana	6
1.2.3 Propiedades de la membrana	8
Curvatura	8
Mecanismos de generación de curvatura de membrana	9
Influencia de la curvatura intrínseca lipídica en la forma de las membranas	12
1.2.4 Organización lateral de la membrana	13
Dominios de membrana	13
Fases lipídicas	15
Polimorfismo lipídico y función celular	17
1.2.5 Presión lateral	18
1.2.6 Membranas modelo de tipo vesicular	18
Vesículas unilamelares gigantes, GUVs	19
1.3 Péptidos membrano activos	20
1.3.1 Tipos de péptidos membrano activos	21
1.3.2 Propiedades físico-químicas de los péptidos membrano activos	21
1.3.3 Interacción péptido-membrana	22
1.3.4 Interacción péptido-péptido en membranas	23
1.3.5 Permeabilidad de membranas por péptidos anfipáticos	24
Mecanismos de permeabilización	24
1.4 Apoptosis y función mitocondrial	26
1.4.1 Familia de proteínas Bcl-2	27
1.4.2 Las mitocondrias	29
1.4.3 Cardiolipina	30
1.4.4 Poro apoptótico	31
1.4.5 Dinámica mitocondrial	32
1.5 Fisión de membrana	33
1.5.1 Fisión mitocondrial	33
1.5.2 Fisión en sistemas modelo	34
1.5.3 Proteínas Bcl-2 y fisión mitocondrial	35

1.6	Objetivos	36
2	Materiales y Métodos	39
2.1	Preparación de vesículas	39
2.1.1	Preparación de LUVs y SUVs	39
2.1.2	Preparación de GUVs	41
2.2	Preparación de los péptidos	42
2.2.1	Síntesis semiautomática en fase sólida de Bax α 5	42
2.2.2	Tratamiento pos-síntesis: Solubilización y cuantificación de los péptidos	45
2.2.3	Marcaje fluorescente de los péptidos	47
2.3	Espectroscopia de fluorescencia	49
2.3.1	Fundamentos teóricos de fluorescencia	49
2.3.2	Detección de dimerización en membranas mediante la formación de excímeros de pireno	50
	Formación de excímeros de pireno	50
	Registro de datos cinéticos	52
2.4	Espectroscopia de dicroísmo circular	52
2.4.1	Fundamentos de dicroísmo circular	52
2.4.2	Caracterización estructural de péptidos mediante dicroísmo circular	54
2.5	Experimentos en vesículas lipídicas individuales	55
2.5.1	Microscopía confocal láser de barrido (LSCM)	55
2.5.2	Difusión de marcadores a través de la membrana	55
2.5.3	Remodelado de membranas de GUVs	59
2.6	Análisis de las cinéticas	59
2.6.1	Fundamentos del fenómeno de difusión	59
	Ley de Fick	59
	Ecuación de Stokes-Einstein	60
2.6.2	Flujo a través de una membrana	61
	Velocidad de flujo	62
	Velocidades de flujo en vesículas lipídicas individuales	65
2.6.3	Difusión restringida: Estimación del tamaño de los poros	65
3	Estructura e interacciones de Bax-α5 y Bax-α56 en la membrana	69
3.1	Péptidos objeto de estudio. Propiedades físico-químicas	69
3.2	Análisis estructural mediante dicroísmo circular	72
3.2.1	Estructura en ambiente micelar	72
3.2.2	Estructura en vesículas lipídicas	73
	Efectos de la densidad del péptido en la membrana y de la composición lipídica	73
	Estado de oligomerización de los péptidos	77
3.3	Interacción Péptido-membrana	78
3.3.1	Reordenamiento lipídico por Bax- α 5 y Bax- α 56	78

3.3.2	Interacción péptido-membrana a través de la fluorescencia intrínseca del Trp	80
3.4	Interacción péptido-péptido mediante excímeros de pireno	83
3.4.1	Interacción péptido-péptido en ambiente micelar	84
3.4.2	Interacción péptido-péptido en membranas zwitteriónicas (POPC)	85
3.4.3	Interacción péptido-péptido en membranas con CL	86
3.4.4	Dinámica de los excímeros en el estado unido a la membrana	87
4	Poros mediados por Bax-α5 en membranas modelo	89
4.1	Objeto y estrategia de estudio	89
4.1.1	Sistema molecular elegido	89
4.1.2	Estrategia experimental y de análisis	90
4.2	Poros de membrana formados o inducidos por Bax- α 5	91
4.2.1	Observación directa de la permeabilidad de GUVs individuales mediante microscopía de fluorescencia	91
4.2.2	Ajuste de las cinéticas de difusión	95
4.2.3	Análisis e interpretación de los resultados	97
	Distribución de constantes de velocidad	97
	Deducciones relacionadas con el análisis del régimen de difusión de las sondas.	99
4.2.4	Tamaño de los poros y número de poros por vesícula	102
	Área individual de los poros	102
	Distribución del número de poros por GUV	105
	Densidad de poros en las membranas	107
4.3	Poros en equilibrio	109
4.3.1	Evolución temporal de los poros iniciales	109
	Ideas previas sobre el mecanismo de formación de los poros y su estabilidad	109
	Evidencias a favor de la evolución temporal de los poros y de la reducción de su tamaño a partir del análisis de las cinéticas iniciales	110
4.3.2	Cinéticas de los poros en estado de equilibrio	112
5	Remodelado de membranas por fragmentos de Bax y Bak	115
5.1	Objeto y método de estudio	116
5.2	Morfología dinámica intrínseca de membranas con CL	116
5.2.1	Propiedades inherentes a la presencia de CL	116
5.2.2	Observaciones en GUVs sin péptidos	117
	Distribución lipídica en la membrana	118
	Presencia de poros lipídicos	119
	Pequeñas estructuras fibrilares y emisiones lipídicas	120
5.3	Efectos de la unión de los péptidos sobre las membranas de las GUVs	120
5.3.1	Reorganización de la membrana por Bax- α 5 y Bax- α 56	122
5.3.2	Preferencia de Bax- α 56 por dominios desordenados	126

Índice general

5.3.3	Interacción de Bak- α 56 con GUVs	127
5.4	Cambios morfológicos en membranas inducidos por los péptidos	129
5.4.1	Ondulaciones de la membrana	131
5.4.2	Tubulaciones	132
	Composición y formación de los túbulos	132
5.4.3	Fenómenos de <i>tethering</i>	132
5.5	<i>Budding</i>	133
5.5.1	Patrones de formación de las <i>bud</i>	134
5.5.2	Composición lipídica de las <i>buds</i>	134
5.5.3	Tamaño y frecuencia de las buds	136
5.5.4	Mecanismos de <i>budding</i> en sistemas modelo	136
5.6	Fisión de membranas inducida por Bax- α 56 y Bak- α 56	137
5.6.1	Transitoriedad de los procesos de fisión	138
5.7	Mecanismo de acción de los fragmentos de Bax- α 56 y Bak- α 56	138
5.8	Péptido <i>vs</i> proteína: Repercusión de esta investigación	143
6	Discusión general, perspectiva y conclusiones	145
6.1	Estrategia y metodología	145
6.2	Estructura e interacciones	145
6.3	Cinéticas de permeabilidad y características individuales de los poros	149
6.4	Remodelado de la membrana	150
6.5	Perspectiva	152
6.6	Conclusiones	153
	Índice de figuras	155
	Índice de tablas	159
	Índice de abreviaturas	163
	Bibliografía	167

Abstract

Minimal fragments of **Bax** are able to reproduce the membrane permeabilizing activity of the protein, including capacity to release cytochrome c from mitochondria and to activate apoptosis in cells. These facts mean that the activity of the protein can be viewed as the addition of activities of constituent parts, which is the basis of any reductionist strategy for investigating complex systems. However, the molecular mechanism of **Bax** protein fragments were poorly known. In particular, while the active species of **Bax** in the membrane is an oligomer, the aggregation state of the active fragments was unknown. Additionally, the size of the pores and their density in the membrane had not been determined. On the other hand, **Bax** has been show to exhibit membrane remodelling activity, but this had not been investigated in minimal active fragments of this protein. Finding satisfactory solutions to these problems constituted the objective of the Thesis. The single-pore properties were investigated for the case of a fragment containing the helix 5 of **Bax** (**Bax- α 5**). For that, we first developed a methodology based on leakage measurements in single giant unilamellar vesicles (**GUVs**), using simultaneously two probes of different size. Through an exhaustive analysis of probe diffusion kinetics we were able to size and count single pores in single **GUVs**. The pores have a radius of ~ 5.6 nm and a surprisingly low density, meaning that only a minority of membrane bound peptides are actually forming pores. By means of circular dichroism spectroscopy and through labelling of the peptide with pyrene we were able to find evidence of an oligomeric state in the membrane (possibly a dimer) for a fragment of **Bax** including parts of helices $\alpha 5$ and $\alpha 6$ (**Bax- α 56**), but not for **Bax- α 56**, which appears to be monomeric. We also found that **Bax- α 56** exhibits marked membrane remodelling activity in **GUVs**. In contrast, the remodelling activity of **Bax-5** was weak. We hypothesize that the remodelling activity is linked to the membrane curving capacity of peptide dimers, with a coiled-coil structure similar to the association of helices $\alpha 5$ and $\alpha 6$ in a well characterized **Bax** domain-swapping dimer. We also observed strong membrane remodelling activity for the case of **Bak- α 56**, designed from the protein **Bak**, which also has been found to form a domain-swapping dimer. From these data we suggest that helices $\alpha 5$ and $\alpha 6$, in a dimeric state, are responsible of the membrane remodelling activity in both **Bax** and **Bak**, via membrane curvature induction. We also propose that the two proteins may have a direct role in mitochondrial dynamics, through membrane remodelling, and that this new function is played by structures corresponding to the domain-swapping dimers, which were considered to be non functional.

1 Introducción

1.1 Motivación

El reduccionismo, como estrategia de estudio, siempre ha acompañado a la ciencia, permitiendo abordar la complejidad a través de sistemas simplificados. Para la química, la biología, la biotecnología o la medicina, poder reducir toda la capacidad funcional de las moléculas a su mínima expresión estructural es una tarea difícil, pero en caso de éxito ofrece enormes recompensas, ya que además de facilitar su comprensión pone al alcance el desarrollo de aplicaciones.

Por otro lado, uno de los retos más excitantes de la ciencia es poder hacer llegar moléculas con actividad biológica al interior de las células, y el éxito en ese empeño está en gran medida, a merced de la permeabilidad de las membranas celulares. Pero disminuir la permeabilidad de la membrana puede destruir su integridad y eliminar las condiciones de homeóstasis, por lo que a menudo resulta tóxico. Por ello no es fácil utilizar esta idea con fines positivos. Existen escenarios de mucho interés para hallar respuestas a todos estos problemas. La actividad membrano-lítica de algunas proteínas y péptidos naturales constituye un ejemplo excelente donde observar detenidamente los mecanismos naturales de permeabilización y es además de una importancia monumental para el diseño y la ingeniería de novedosos y potentes agentes anticancerígenos o antimicrobianos.

En este trabajo, como continuación de investigaciones previas de nuestro laboratorio, nos hemos centrado en los miembros pro-apoptóticos **Bax**¹ y **Bak**² de la familia de proteínas *B-cell linfoma 2* (Bcl-2), que actúan como mediadoras directas en el equilibrio *vida-muerte* de las células a través de su alta capacidad de interacción con las membranas biológicas.

Hemos seleccionado este sistema por diversas razones, algunas de ellas ya expuestas, que queremos remarcar por su importancia. En primer lugar, el escenario en el que se desenvuelve **Bax** es inmejorable: La apoptosis, o lo que es lo mismo, la elección de las células entre seguir viviendo o morir, queda a merced de la capacidad de proteínas como **Bax** para permeabilizar o distorsionar membranas lipídicas. La segunda razón está soportada en el hecho de que con anterioridad en nuestro laboratorio se ha identificado y aislado el fragmento de **Bax** responsable de su actividad permeabilizante, al demostrar que péptidos derivados de las hélices 5 y 6 de esta proteína [1] pueden inducir directamente la liberación de citocromo *c* desde el espacio inter-membrana mitocondrial [2]. Además, los mismos péptidos son capaces de actuar como potentes activadores de

¹ **Bax**: Proteína X (también conocida como proteína 4) de la familia Bcl-2.

² **Bak**: Proteína *killer* antagonista de Bcl-2.

1 Introducción

la apoptosis y manifiestan actividad anti cancerígena [3], motivo por el cual han sido patentados como anti tumorales [4].

Sin embargo, no se conocen aún las características de las estructuras que dan lugar a la actividad de estos péptidos en la membrana ni los mecanismos moleculares que posibilitan su formación. Por ello, este sistema brinda una magnífica oportunidad de ser investigado en profundidad desde un punto de vista minimalista, con el fin de encontrar respuesta a cuestiones tan complejas como el comportamiento de las membranas lipídicas y de los péptidos permeabilizantes cuando ambos sistemas entran en contacto. En este trabajo de Tesis hemos abordado esos problemas acercándonos principalmente a tres aspectos puntuales: Las interacciones entre péptidos en el seno de la membrana, las características individuales, estabilidad y densidad en la membrana de los poros formados por estos péptidos y la capacidad de los mismos para activar fenómenos de remodelado de membranas.

1.2 Membranas biológicas

Las membranas biológicas constituyen la estructura celular más común en la materia viva, pudiendo ser consideradas un ejemplo de alta tecnología natural de microencapsulación. Innumerables procesos fisiológicos de vital importancia para la homeostasis celular ocurren o son mediados por las membranas, ya sea protagonizando un rol de carácter mecánico, como en los procesos de movilidad y la fagocitosis en organismos unicelulares, o llevando a cabo funciones esenciales, como la producción de energía y el inmunoreconocimiento en organismos altamente organizados [5]. A pesar de parecer infranqueables, las membranas se comportan como barreras mecánicas semipermeables, regulando el tránsito y la señalización de los compartimentos celulares con el exterior. A su vez, son extremadamente dinámicas tanto de manera global como a pequeña escala espacial [6]. Tal y como las conocemos hoy en día pueden definirse principalmente como la consecuencia del efecto hidrofóbico, ya que es este fenómeno quien gobierna el comportamiento de las moléculas de lípido en medio acuoso y el principal responsable de la estabilidad de la estructura de las membranas biológicas [7].

Las bicapas lipídicas (**Fig. 1.1**), dada su composición y arquitectura, exhiben una serie de propiedades que condicionan su interacción con otras biomoléculas, especialmente con las proteínas. Algunas de esas propiedades (**Sec. 1.2.3**) como su espesor, la curvatura intrínseca de los lípidos, su compresión elástica o su heterogeneidad lateral, han sido foco de atención en los últimos 30 años. [8]. Se ha postulado [9] que tales propiedades materiales tienen la capacidad de modular la interacción entre las proteínas embebidas en su matriz, ya que la propia membrana es capaz de ejercer como un regulador alostérico de la interacción proteína-proteína. Hallazgos bioquímicos y biofísicos revelan la existencia de distintos niveles de organización dinámica, tanto en la dirección transversal de la bicapa lipídica (asimetría lipídica) como en la dimensión lateral (dominios lipídicos) [10]. A medida que se han desarrollado distintos métodos de investigación, se han ido descubriendo nuevos e interesantes aspectos de la estructura y la organización de las membranas lipídicas. Entre ellos, el polimorfismo lipídico y la topografía de la membrana

han sido abordados en profundidad y comprendidos mediante la experimentación *in vitro*. Sin embargo, *in vivo*, todavía nos asisten numerosas incógnitas.

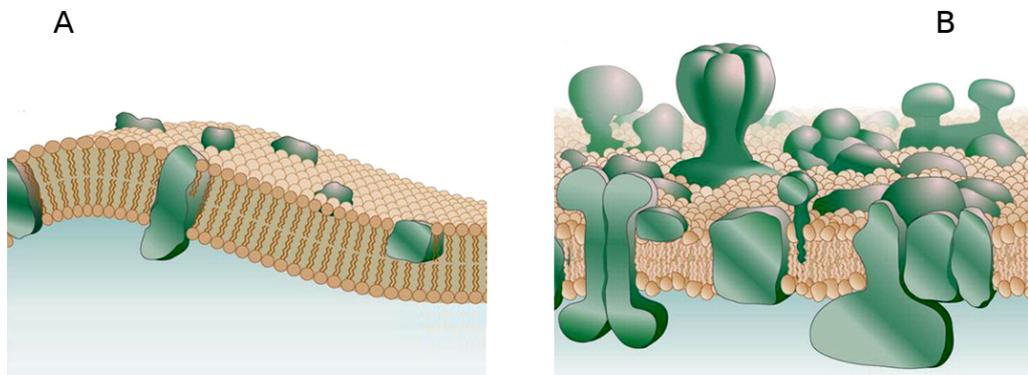


Fig. 1.1: Modelos de membrana biológica. (A) Modelo del mosaico fluido propuesto en 1972 por S. J. SINGER y G. L. NICOLSON [11]. (B) Adaptación del modelo de SINGER y NICOLSON 33 años después por D. M. ENGELMAN [12]. Imagen adaptada con permiso de Macmillan Publishers Ltd: *Nature* [12], copyright (2005).

1.2.1 Modelos clásico y actual de membranas biológicas

El modelo estructural de membrana plasmática más aceptado es el conocido como *mosaico fluido* (Fig. 1.1), propuesto en 1972 por SEYMOUR JONATHAN SINGER y GARTH L. NICOLSON [11], que en cierta forma hereda los conceptos postulados por DANIELLI and DAVSON en 1935 [13]. El modelo se basa en principios termodinámicos y evidencias experimentales que apoyan la simetría y la movilidad lateral dentro de la matriz membranosa, cuya base estructural es una bicapa de lípidos inmersa en el medio acuoso. Este modelo representa a la membrana como una matriz lipídica viscosa de dos dimensiones, en la que las proteínas difunden libremente e interaccionan con los lípidos mediante fuerzas hidrofóbicas [14, 15] (Fig. 1.1 A).

Sin embargo, desde aquella propuesta original han emergido en las últimas décadas nuevos e interesantes aspectos sobre la naturaleza y organización molecular de las membranas [16, 17]. Ante la urgente necesidad de actualizar el modelo, han sido tenidas en cuenta consideraciones de distinto tipo [18], principalmente relacionadas con la altísima acumulación de proteínas presentes en las membranas biológicas, tanto de manera integral (atravesando la bicapa), como periférica (asociadas a su superficie), así como el gran número de proteínas citosólicas que se unen a la membrana con carácter temporal. Otro aspecto importante tenido en cuenta en las revisiones actuales del modelo es la existencia de fases o intermediarios no lamelares en zonas de la membrana o bajo determinadas condiciones, así como la alta heterogeneidad lateral existente y su funcionalidad biológica. Todo ello fue recogido por DONALD ENGELMAN en su adaptación del modelo clásico de SINGER y NICOLSON [12] (Fig. 1.1 B). Hoy en día, algunos autores parecen

1 Introducción

ir más allá, y proponen considerar la membrana como un mosaico de zonas de orden, relacionadas con dominios (**Sec. 1.2.4**) similares a los *raft* (o balsas lipídicas, ver *nota 8 en la página 13*), que conviven con zonas más desordenadas y cuya dinámica estaría influenciada por la actividad celular e interacciones lípido-proteína [19].

1.2.2 Composición de la membrana

La base estructural de la membrana está formada por lípidos, los cuales se encuentran organizados en dos monocapas, con sus cadenas acílicas enfrentadas en una región central hidrofóbica y las cabezas polares expuestas hacia el medio acuoso. En el interior de esta matriz y soportadas por ella se encuentran las proteínas de membrana, que pueden ser de tipo integral o periférico, dependiendo de si están situadas transmembranalmente o asociadas a la superficie sobre una de las monocapas (**Fig. 1.1**). Por otro lado, las proteínas y algunos lípidos se encuentran con frecuencia glicosilados con azúcares de diversa naturaleza y complejidad estructural.

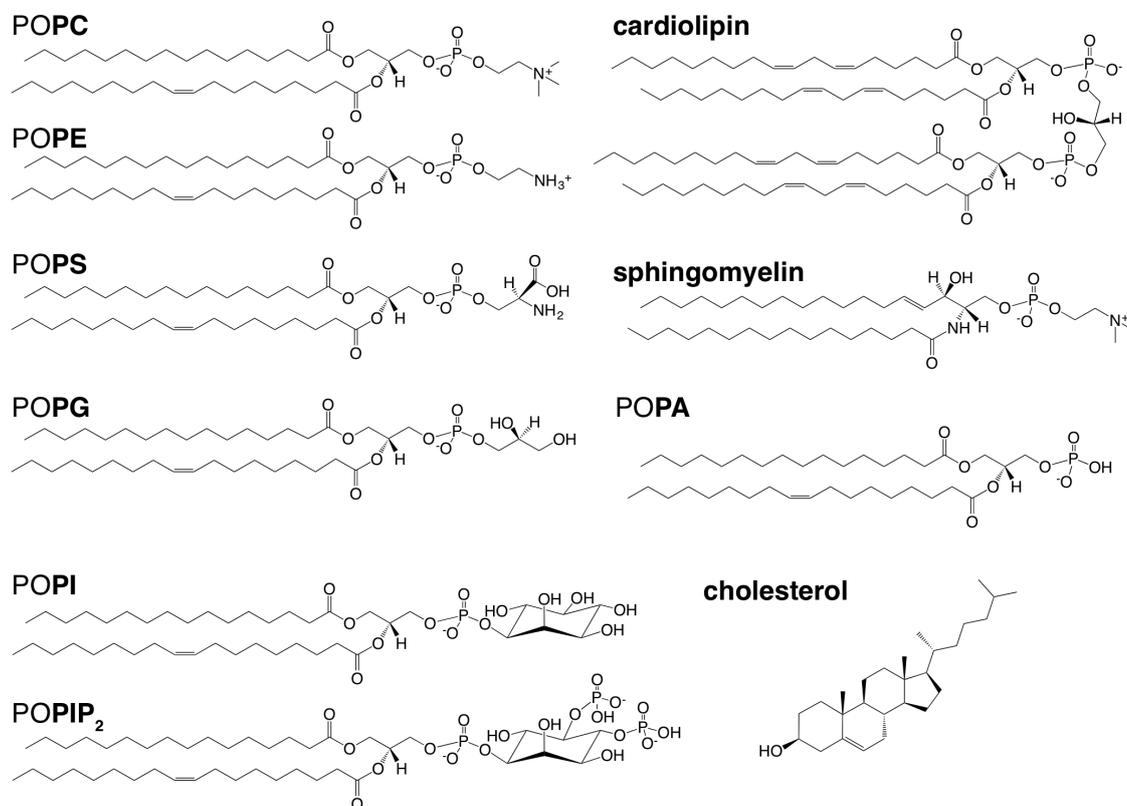


Fig. 1.2: Estructura química de los principales lípidos encontrados en membranas biológicas. Se muestran las estructuras de los lípidos más comunes en membranas naturales. En los fosfolípidos, el glicerol se encuentra acilado en posiciones sn1 y sn2 con grupos palmitoil (16:0, abreviado P) y oleoil (18:1, 0). Las abreviaturas que corresponden a las cabezas polares se aclaran en el texto. Imagen tomada con permiso de [20].

Los principales lípidos estructurales que encontramos en las membranas eucariotas son los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los esteroides. Los primeros son más abundantes y sus representantes mayoritarios son: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y cardioplipina (CL); ver la **Fig. 1.2**. Todos ellos pueden presentar insaturaciones de tipo *cis* en sus cadenas acílicas, cualidad esta que confiere fluidez a la membrana. Los esfingolípidos por su parte, tienen un núcleo hidrofóbico compuesto por ceramida, la cual puede aparecer como glucosil- o galactosilceramida en el caso particular de los glicoesfingolípidos, y también pueden contener insaturaciones tipo *trans*. Los representantes mayoritarios de esta familia de lípidos en organismos superiores son la esfingomiéline (SM), los glicoesfingolípidos (GSL) y los gangliósidos, estos últimos son glicoesfingolípidos con ácidos siálicos terminales [10]. Entre los esteroides, el más importante es sin duda el colesterol (Chol).

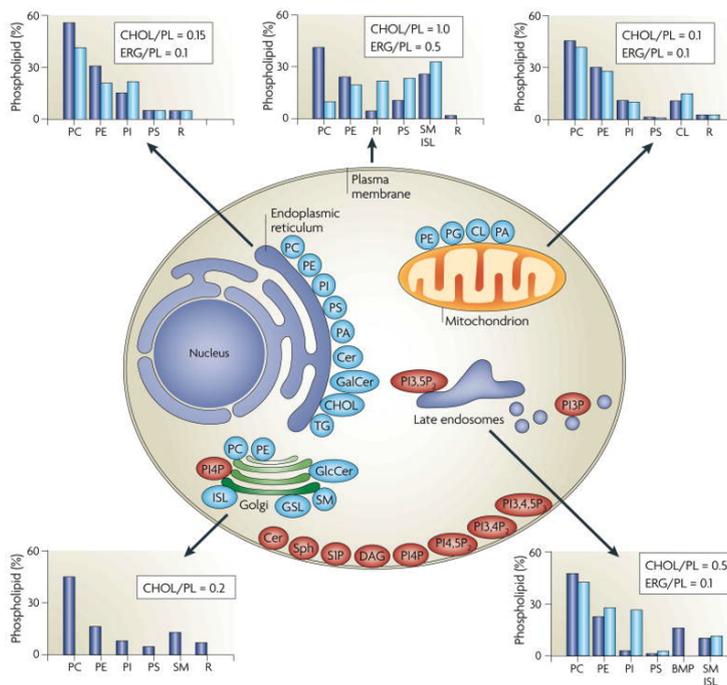


Fig. 1.3: Composición lipídica de diferentes membranas celulares. expresada en porcentaje de fosfolípidos totales. Los lípidos están situados en su lugar (orgánulo) de síntesis. Los lípidos relacionados con la señalización celular se muestran en rojo. Las barras de las gráficas expresan valores porcentuales sobre la cantidad de fosfolípidos totales, tanto para mamíferos (azul) como para levaduras (azul claro). Imagen tomada con permiso de Nature Publishing Group [21], copyright (2008).

Como regla general, la composición lipídica de las membranas es heterogénea, no sólo entre organismos, sino también entre los diferentes tipos celulares dentro de un mismo organismo (**Fig. 1.3**). Existe incluso asimetría entre monocapas, dentro de una misma bicapa [22]. Por otro lado, en estudios teóricos y experimentales de membranas modelo se observa con frecuencia que estas poseen estructura lateral que se relaciona con diversos

1 Introducción

factores, como su composición, la posible coexistencia de fases en temperaturas cercanas a la temperatura de transición, o, en caso de que existan proteínas en la membrana, el comportamiento cooperativo del sistema lípido-proteína en general [23].

Otro aspecto de interés es la influencia de la longitud las cadenas acílicas de los lípidos y de las insaturaciones que éstas pueden presentar en la fluidez de las membranas. Aunque en condiciones fisiológicas estándar la mayoría de las membranas biológicas se encuentran en estado fluido, pueden coexistir bajo ese estado zonas de distinto orden y fluidez. Como veremos más adelante, los cambios localizados en la fluidez de las membranas determinan en muchos casos su forma física y los procesos que pueden ocurrir.

1.2.3 Propiedades de la membrana

Curvatura

La forma no es una mera propiedad física de las células y sus organelos. Actualmente existe un raudal de evidencias teóricas y experimentales que permiten considerar a la forma celular como una importante propiedad, que está determinada, entre otros factores, por las membranas y que presenta un rol preponderante en muchos procesos fisiológicos. La forma física de una estructura está determinada básicamente por su grado de *curvatura intrínseca*.³ De igual manera, esta propiedad evidencia la tendencia que tienen los lípidos a formar fases no lamelares [9]. Su carácter dinámico se ve influenciado por varios factores, entre los que se incluye la composición lipídica, la oligomerización y otras variantes físico-ambientales. [25]. En un contexto puramente biológico dicha propiedad tiene una importancia capital.

La capacidad de controlar la forma que adquiere la membrana bajo determinadas condiciones es vital en procesos como la fisión, la fusión o el tráfico vesicular mediado por endocitosis o fagocitosis. Incluso, varias enzimas muestran actividad sensible a la curvatura de membrana, como es el caso de la PI-fosfatasa sinaptojanina [26, 27] o las GTPasas Arf, Arl y Sar1 [27, 28], las cuales incrementan su actividad de manera considerable en membranas altamente curvadas. Así mismo, en el caso de la enzima F1Fo-ATP sintetasa de corazón bovino (de la familia de las ATPasas rotatorias), los complejos monoméricos convergen en regiones preexistentes de alta curvatura de membrana donde se ensamblan en dímeros, que después se auto-asocian en filas para llevar a cabo su función biológica [29].

Por otra parte, la morfología intrínseca de organelos como el aparato de GOLGI, el retículo endoplasmático o la mitocondria, podría entenderse como una sucesión de regiones de membrana con distintos tipos de curvatura, las cuales son dinámicas y contribuyen a la relación estructura-función de estos organelos en concomitancia con las exigencias celulares [27]. Así, tanto en el retículo endoplasmático liso como en la mitocondria se conforman estructuras cilíndricas altamente curvadas con un diámetro aproximado entre 30 y 100 nm. Por su parte, el aparato de GOLGI, es un complejo estructural muy diná-

³ La denominación “curvatura intrínseca” se refiere al grado de curvatura que adopta una estructura si no se encuentra afectada por una fuerza física que limite su forma natural [24].

mico, compuesto por el apilamiento de membranas denominadas *cisternae* localmente conectadas por túbulos. Además, todos estos organelos se caracterizan por mantener un intercambio constante con la membrana plasmática mediante procesos de gemación (*budding*)⁴ y fusión de pequeñas vesículas o estructuras tubulares con curvaturas superiores a $0.01 - 1 \text{ nm}$ [30].

Como se verá, la curvatura de membrana tiene una importancia especial en relación con múltiples aspectos de esta Tesis. Por ejemplo, en general la acción de los péptidos membrano-activos da lugar a deformaciones de la membrana como resultado de cambios en la curvatura, tanto locales como globales. La generación de curvatura positiva se asocia en gran medida con la formación de poros toroidales o la formación de micelización y la curvatura negativa con fenómenos de agregación del péptido y/o la traslocación del mismo [31]. Por otro lado, se ha descrito que la actividad formadora de poros de la proteína pro-apoptótica Bax está muy influenciada por la curvatura lipídica intrínseca, de manera que lípidos con curvatura intrínseca positiva aumentan la actividad de Bax. Por el contrario, dicha actividad es mucho menor en presencia de curvatura intrínseca negativa [32-34].

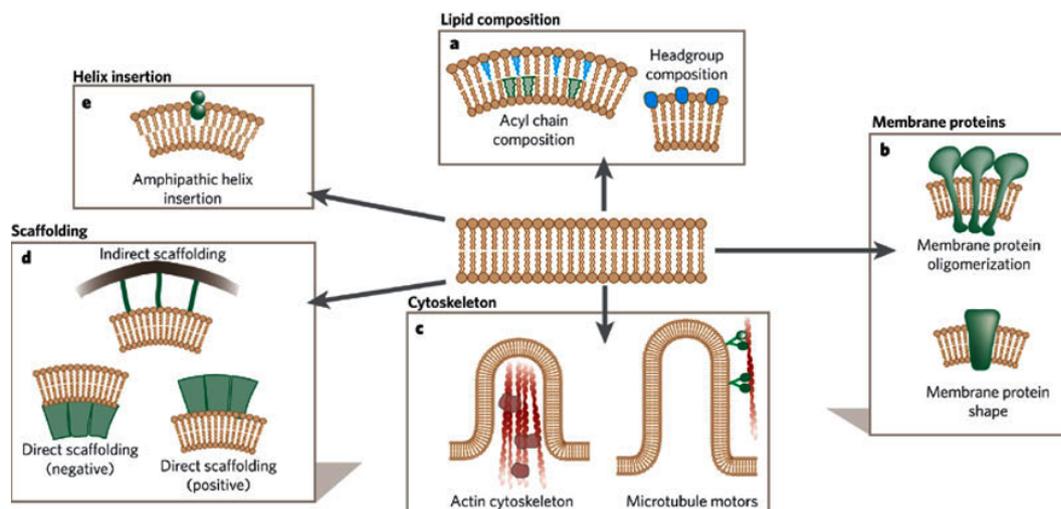


Fig. 1.4: Mecanismos de generación de curvatura en membranas biológicas. Se muestran distintos ejemplos en los cuales los actores responsables de la aparición de curvatura pueden ser lípidos (recuadro **a**) o proteínas (**b – e**). Tomado de [35], LibreTexts, University of California Davis, con licencia CC BY-NC-SA 3.0 US.

Mecanismos de generación de curvatura de membrana

La curvatura de membrana es un concepto de la geometría diferencial que sirve para caracterizar la forma de objetos curvados a nivel de su superficie. Para ello se definen

⁴ Para mayor claridad en referencias posteriores a este proceso utilizaremos preferentemente en el anglicismo, *budding* (así como *bud*, cuando se nombre a las estructuras que se forman).

1 Introducción

en cada punto de la superficie dos *curvaturas principales*,⁵ c_1 y c_2 , correspondientes a valores extremos de la curvatura normal en el punto considerado y que cuantitativamente equivalen al inverso del radio de curvatura [35]. Para describir la curvatura de la superficie se puede utilizar el producto (curvatura *gausiana*, $K = c_1 \cdot c_2$) o la suma (curvatura *total*, $J = c_1 + c_2$) de las curvaturas principales. Atendiendo al valor de estas curvaturas se distinguen cuatro formas geométricas básicas: planar ($J = 0$, $K = 0$), cilíndrica ($J +$, $K = 0$), silla de montar ($J = 0$, $K -$) y esférica ($J +$, $K +$). En las membranas biológicas la curvatura puede tener su origen en los componentes lipídico o proteico, que dan forma a la membrana por diversas vías [37].

Proteínas. La simple inserción de proteínas en la matriz lipídica hace posible la generación de zonas con curvatura (Fig. 1.4). A su vez, las proteínas son sensibles a la curvatura de las membranas. Existen varios mecanismos mediante los cuales las proteínas pueden detectar, generar o estabilizar localmente curvatura de membrana [27], Aunque en la célula pueden ocurrir algunos de ellos de manera aislada, la mayoría de los procesos de remodelado de membranas ocurren de forma coordinada. Se han identificado varios mecanismos utilizados por las proteínas para generar curvatura:

1. Mecanismo de andamiaje: Es el de más relevancia biológica, donde una proteína suficientemente rígida constituye el molde por el cual la membrana se curva. Ejemplos de este caso son los dominios BAR, con forma de banana, y los complejos de clatrina (Fig. 1.5).
2. Deformaciones causadas por la inserción de hélices anfipáticas cortas en una de las monocapas, generalmente la externa, que a su vez pueden ser de distintos tipos, como defectos del empaquetamiento de las cabezas polares de la monocapa en la que se produce la unión del péptido o expansión asimétrica del área de esa monocapa con respecto a la monocapa adyacente. Este tipo de interacción se ha relacionado con los procesos de formación de poros por péptidos anfipáticos [31, 38].
3. Inducción de dominios lipídicos o lipo-proteicos con propiedades (de curvatura) diferenciadas.
4. Acción sinérgica de varios de los mecanismos anteriores.

Lípidos. El concepto que relaciona la influencia de los lípidos sobre la curvatura de la membrana y las morfologías asociadas a los distintos tipos de curvatura se

⁵ La *curvatura normal* de una superficie se define para un punto determinado de la misma como el valor que caracteriza su desviación con respecto al plano tangente en ese punto, y es igual al valor de la curvatura de la sección normal de la superficie. Como la sección normal puede ser trazada en distintas direcciones, cada valor de curvatura normal se define para una dirección determinada. De entre todas las direcciones posibles, las *direcciones principales* son aquellas en las cuales la superficie asume valores extremos de curvatura, los cuales se conocen como *curvaturas principales* [36] (https://www.encyclopediaofmath.org/index.php/Principal_curvature).

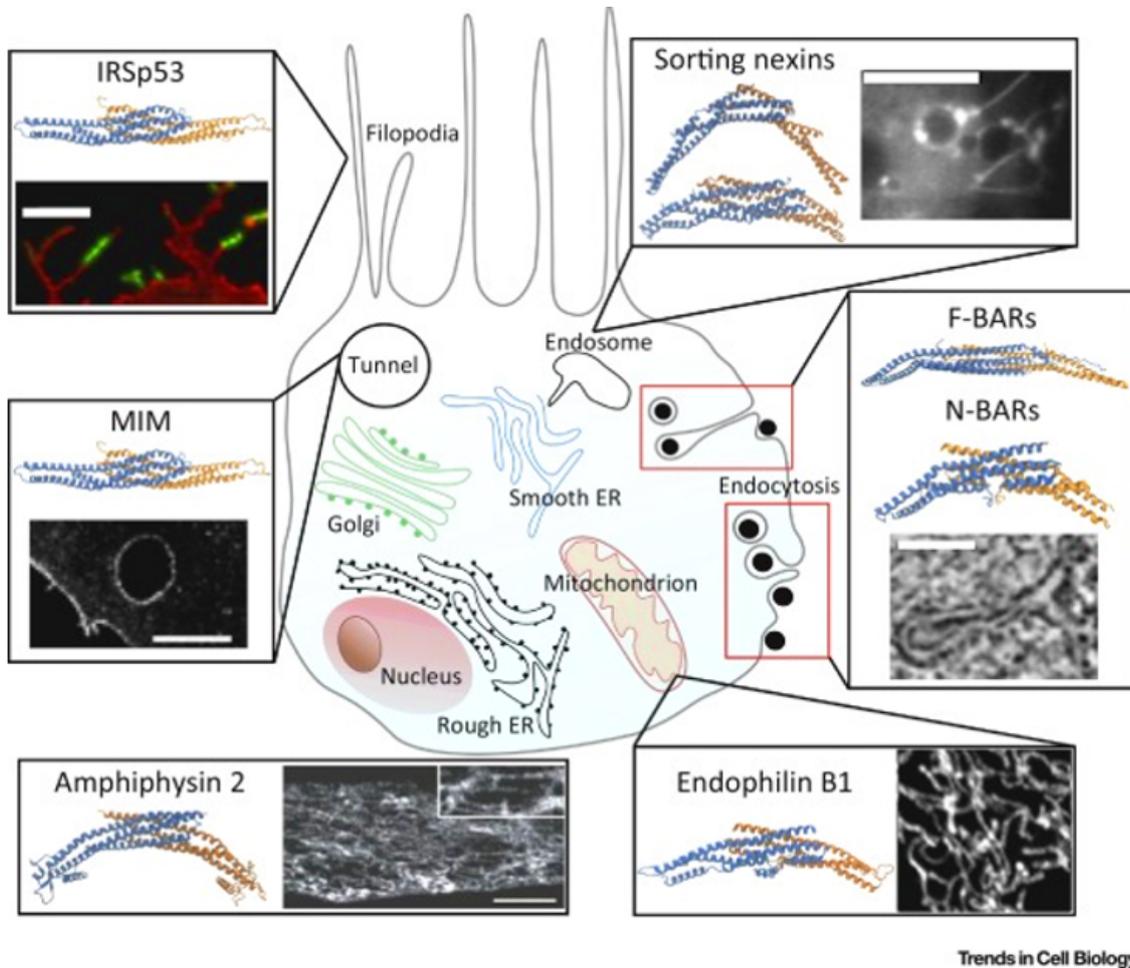


Fig. 1.5: Ejemplos de membranas biológicas con curvatura intrínseca y sus dominios proteicos sensores relacionados. Imagen tomada con permiso de Elsevier [39], copyright (2015).

1 Introducción

denomina *polimorfismo lipídico*, discutido con más detalle entre las páginas 12 y 17. Dada la problemática que trataremos más adelante en esta Tesis y debido a su significación biológica, haremos un paréntesis en la generación de formas tubulares y de silla de montar por parte de los lípidos. Existen dos mecanismos esenciales mediante los cuales los lípidos pueden organizarse en formas tubulares:

1. Mediante la creación de asimetría local, por agrupación de lípidos generadores de curvatura negativa en la monocapa interna.
2. A través de la expansión de área de la monocapa externa con respecto a la interna.

Para la generación de las formas tubulares cilíndricas, se requiere de la presencia de lípidos que garanticen una curvatura de membrana negativa, como es el caso de CL, colesterol y PE y que éstos además se encuentren ubicados preferentemente en la monocapa interna. Por ejemplo, para dar lugar a una curvatura espontánea de la bicapa de $\sim (1/50) \text{ nm}^{-1}$ es necesaria una diferencia del $\sim 15\%$ en la fracción molar de moléculas como Chol o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) entre las monocapas interna y externa [37]. Por otro lado, en presencia de lípidos con forma cónica, como PE y CL, que aparecen como componentes predominantes en las membranas citoplasmáticas de bacterias y organelos como la mitocondria, el aumento en el volumen de las cadenas hidrocarbonadas incrementa a su vez la presión lateral (Sec. 1.2.5) en el centro de la bicapa. Por otra parte, lípidos como fosfatidilglicerol (PG) o PC, que favorecen la formación de fases lamelares debido a su forma cilíndrica, exhiben una presión lateral más uniforme en la región de las cadenas hidrocarbonadas [31, 38].

Evidentemente, los factores lipídico y proteico (o peptídico) se combinan para definir la curvatura de membrana. Por ejemplo, de acuerdo con cálculos realizados no se prevé que la simple variación de la composición lipídica sea suficiente para cambiar el signo del módulo de curvatura gaussiana. Por lo tanto, desde el punto de vista termodinámico, para formar ondulaciones o estructuras de silla de montar es necesaria la participación de proteínas u otro agente causante no lipídico [37].

Influencia de la curvatura intrínseca lipídica en la forma de las membranas

La disposición de los lípidos en la bicapa está directamente relacionada con su forma intrínseca o geométrica, que también condiciona el modo en que estas moléculas se *empaquetan* e interaccionan entre sí. La forma efectiva de un lípido viene determinada por la razón entre los volúmenes (también efectivos)⁶ del grupo polar y su cola hidrofóbica, y mide la capacidad de un tipo específico de lípido para encajar en un ordenamiento determinado. Las membranas compuestas por lípidos cilíndricos; es decir, lípidos sin curvatura intrínseca, forman estructuras lamelares (*lamelares*) sin estrés geométrico alguno.

⁶ Se dice formas o volúmenes *efectivos* por el hecho de que importan ambas propiedades promediadas en el tiempo, ya que se trata de moléculas muy dinámicas.

En el caso contrario, el sistema será propenso a la aparición de formas curvadas (**Fig. 1.6**).

Si partimos de la presencia de vesículas en fase lamelar fluida, como ocurre en la mayoría de las estructuras biológicas, pero gradualmente aumentamos el contenido de lípidos con curvatura intrínseca, la membrana intentará mantener el empaquetamiento lamelar inicial, forzando a las moléculas de geometría diferente a empaquetarse en dicha estructura. Esto genera un estrés debido a la presión lateral (**Sec. 1.2.5**). Cuando dicho estrés es máximo, se favorece la transición a un reordenamiento lipídico de tipo no lamelar. Por ejemplo, los lípidos que favorecen la curvatura negativa, como CL y Chol, son responsables de la formación de estructuras no lamelares en membranas biológicas [40, 41]. Todos estos aspectos se tratan con mayor detalle a continuación.

1.2.4 Organización lateral de la membrana

En células vivas, la segregación lateral de los componentes de la membrana es necesaria para generar barreras con distinta composición y por tanto con funciones diferentes. Los mecanismos a través de los cuales esto ocurre son poco conocidos [42]. Estudios realizados en sistemas modelo con mezclas binarias de fosfolípidos demostraron que las diferencias en las longitudes de las cadenas de acilo pueden desencadenar heterogeneidades laterales [43, 44]. Éstas se conocen en general como dominios, y como ahora veremos están también íntimamente relacionadas con las fases lipídicas y con la forma intrínseca de los lípidos.

Dominios de membrana

Las interacciones de los lípidos entre sí y con otras moléculas presentes en las membranas (principalmente proteínas) son determinantes para muchas funciones, como la señalización, los procesos de fusión y fisión o la adhesión celular. Por ello, uno de los fenómenos físico-químicos más ampliamente estudiados de las membranas biológicas es la separación en dominios.

Un dominio pueden considerarse como un reordenamiento espacial de la membrana, como resultado de la segregación lateral espontánea de sus componentes, que a su vez cuenta con una composición, estructura, estabilidad, dinámica y por ende función biológica distintas con respecto a la membrana circundante. Los términos dominio y fase⁷ con frecuencia se usan como sinónimos. La diferencia entre ambos radica en que el dominio se refiere siempre a una región determinada de la membrana, confinada y con características de composición y propiedades físicas que se diferencian de otras regiones, con las cuales coexiste. En general, un tipo de dominio lleva implícito un tipo de fase. Sin embargo, a diferencia de los dominios las fases pueden afectar a toda la membrana en su conjunto, y no solo a una zona.

El ejemplo más conocido de dominio lipídico es el *raft*,⁸ que corresponde a fases líqui-

⁷ Sobre las fases ver más adelante, en la página 15.

⁸ Este término puede traducirse como *balsa*, aunque es más común, y por tanto más claro, el uso del anglicismo *raft*.

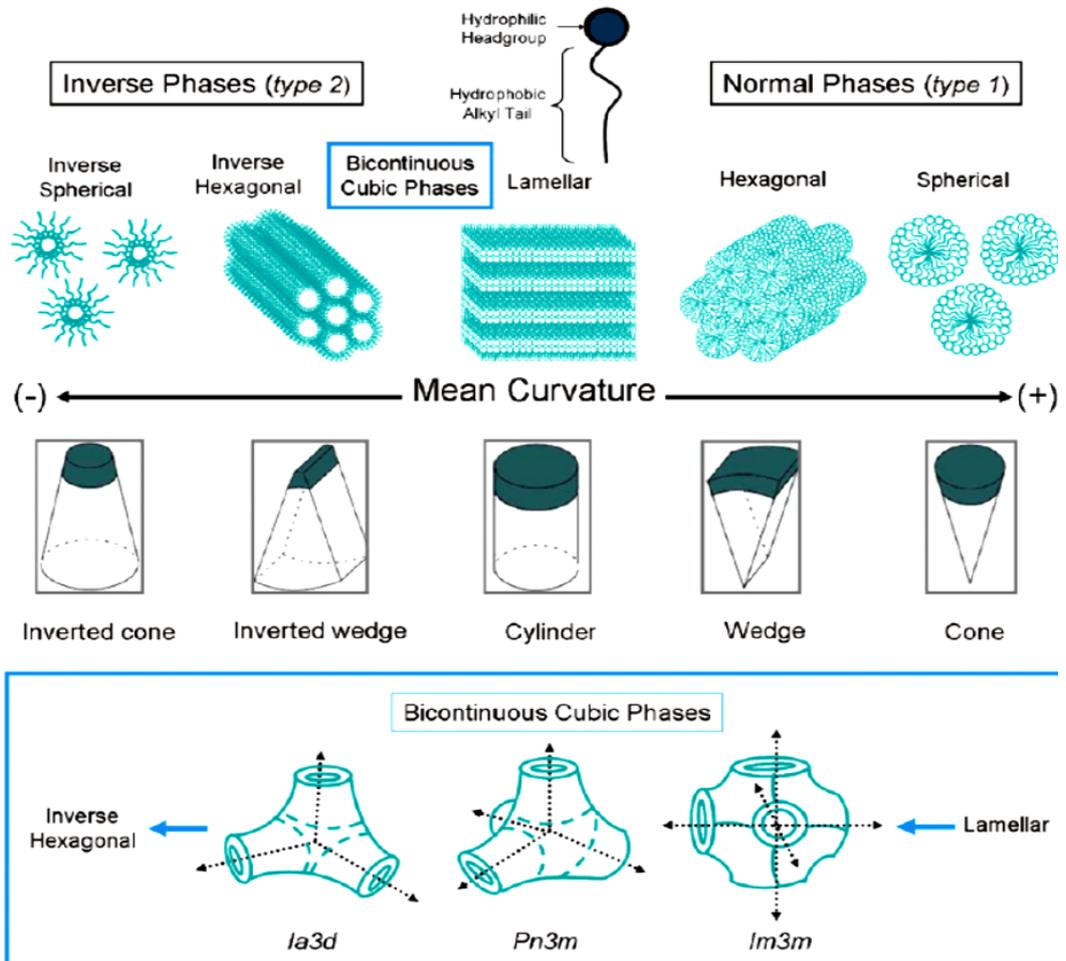


Fig. 1.6: Polimorfismo lipídico en relación con los distintos tipos de fases posibles en membranas. Arriba se representan los distintos tipos de fases lipídicas ordenadas según su curvatura (en sentido creciente, de izquierda a derecha). Entre las fases lamelar y hexagonal invertida (HII) se encuentran las fases cúbicas, cuyas estructuras se representan con detalle en el recuadro inferior. Bajo cada tipo de fase (centro) se representan los distintos tipos de lípido que pueden dar lugar a su formación. Tomada con permiso de *Langmuir* [45], copyright (2011), American Chemical Society

do ordenadas segregadas de fases líquido desordenadas (ver más abajo) en membranas que contienen esfingomielina y colesterol. Por otro lado, en condiciones cercanas a la transición entre fases, éstas pueden separarse a gran escala y coexistir en dominios distintos. Algo parecido puede también ocurrir como consecuencia de fluctuaciones locales en cuanto a la composición y la densidad de la membrana, que pueden dar lugar a la formación de dominios a pequeña escala [46]. Sin embargo, todos estos dominios se han definido a partir de estudios teóricos o investigaciones *in vitro*, generalmente con membranas modelo, donde se ha observado la presencia de dominios de escala microscópica (de 1 – 10 μm).

Para las membranas biológicas, la visión que había dominado durante décadas correspondía el modelo clásico de SINGER y NICOLSON (**Fig. 1.1**), por lo que hasta hace poco se asumía que los componentes de la membrana (lípidos y proteínas) difundían aleatoriamente en el medio bidimensional de la bicapa. No obstante, resultados experimentales recientes apoyan la hipótesis de que “el orden impera sobre el desorden”, dando paso a una nueva visión [12, 47] que postula que la gran mayoría del componente proteico embebido en la matriz lipídica está formando oligómeros, en lugar de unidades aisladas. La presencia de estos *clusters* proteicos tiene gran repercusión en la percepción física que se tenía de las membranas biológicas puesto que son capaces de generar abundante variabilidad en los valores de tensión y otras propiedades mecánicas de la superficie de las membranas, afectando a su contexto energético y a la manera de entender su dinámica y su morfología.

Hoy en día se acepta mayoritariamente que las membranas celulares poseen dominios con una amplia gama de tamaños y de propiedades físico-químicas [48]. Sin embargo, su detección sigue siendo un gran reto, ya que éstos pueden alcanzar tamaños de tan solo entre 10 y 100 *nm* y además estar sometidos a un intercambio rápido de moléculas con otras zonas de la membrana.

Fases lipídicas

Los lípidos son moléculas anfifílicas que pueden autoensamblarse en una amplia gama de mesofases líquido-cristalinas en solución acuosa [10]. Una fase se define como la región del espacio donde todas las propiedades físico-químicas de la materia son uniformes [18]. Desde un óptica funcional, estas estructuras confieren a la membrana la arquitectura correcta para que ocurran determinados procesos fisiológicos a nivel celular. Desde un punto de vista más estructural las fases pueden clasificarse en dos grupos: normales o de tipo 1 e invertidas, también llamadas de tipo 2. Las fases lamelares, la interdigitada, la micelar y la hexagonal-I (HI) pertenecen al grupo de fases normales, mientras que la fase HII y la cúbica-II (QII) pertenecen al grupo de fases invertidas [7, 45] (**Fig. 1.6**).

Las fases lamelares son en general de mayor interés biológico y se caracterizan por tener dos monocapas de lípidos opuestas con sus cadenas de hidrocarburos enfrentadas entre sí. Teniendo en cuenta el estado de las cadenas acílicas, las fases lamelares se clasifican, de mayor a menor orden, en fase *cristalina* (también llamada gel, $L\beta$ o L_c) y fase *líquida cristalina* (también conocida como fluida, $L\alpha$). En algunos casos pueden observarse también otras fases próximas a las anteriores, como la fase sólido-ordenada

1 Introducción

($L\beta'$). Por otro lado, para algunas composiciones lipídicas pueden coexistir fases líquido desordenadas (L_d) y líquido ordenadas (L_o) [30]. La separación de los lípidos en fases tiene lugar cuando la pérdida de energía libre debida a sus interacciones en el sistema segregado supera a la energía libre (ganancia en estabilidad) debida al mayor desorden que correspondería a su estado en una única fase. El cambio entre las dos fases lamelares principales se denomina transición principal de fase. La temperatura de transición entre fases (T_c) es un valor característico para membranas de lípidos puros y varía en mezclas de éstos según sus proporciones. Por ello, la interconversión entre fases depende de la temperatura y de la composición de la membrana (Fig. 1.7).

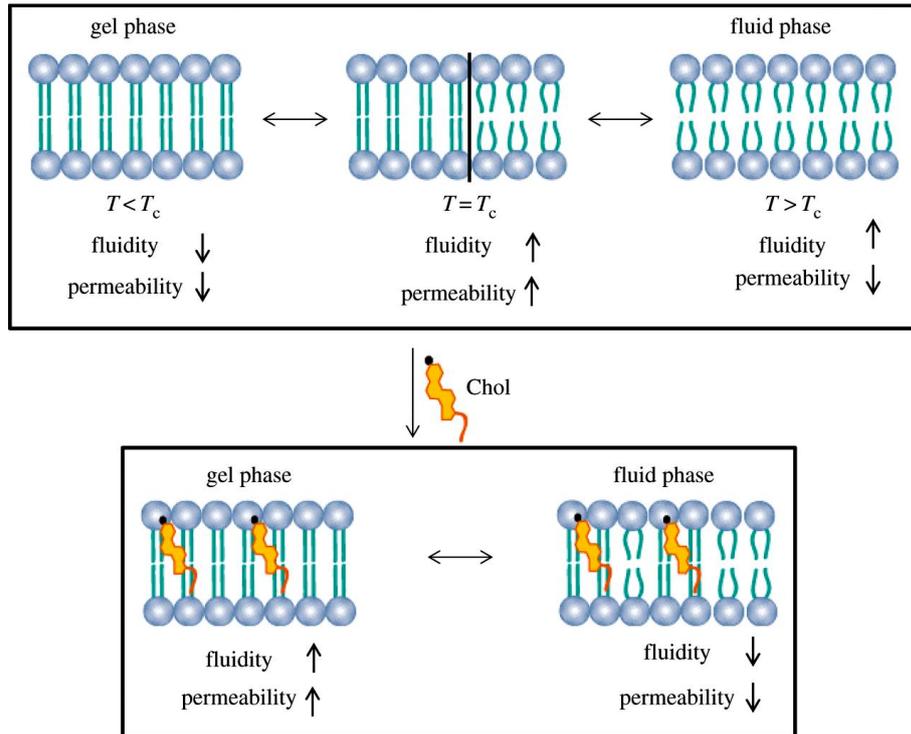


Fig. 1.7: Fluidez y permeabilidad en membranas lipídicas dependiendo de su estado de fase.

En una membrana compuesta por un solo tipo de lípido (arriba) la fluidez aumenta a medida que cambia la fase, al aumentar la temperatura con respecto a la T_c . La permeabilidad, sin embargo, solo aumenta en torno a la temperatura de transición de fase. La presencia de Chol a temperaturas por debajo de la transición de fase (abajo, izquierda) aumenta tanto la fluidez como la permeabilidad de la membrana con respecto a membranas sin Chol. A temperaturas por encima de la transición de fase (abajo, derecha) el colesterol disminuye la fluidez y la permeabilidad con respecto a membranas sin Chol. Tomada con permiso de [49], copyright (2014), The Royal Society.

El estado $L\beta$ siempre asume una estructura en bicapa, ya que es el ordenamiento más favorecido termodinámicamente, a diferencia de otras mesofases como las hexagonales, que corresponden a un ordenamiento no lamelar. Las mesofases no-lamelares pueden ser observadas en estados líquido-cristalinos y dependen también del nivel de hidratación

en que se encuentran los lípidos. Entre las fases lipídicas no lamelares se encuentran las fases hexagonal normal (HI) e invertida (HII) y las fases cúbicas normal (QI) e invertida (QII). En las fases hexagonales los lípidos forman estructuras tubulares y en las fases cúbicas se encuentran agregados, formando una red tridimensional (**Fig. 1.6**).

Polimorfismo lipídico y función celular

Como ya se ha comentado, la forma geométrica de los fosfolípidos condiciona tanto la estructuración lateral como la curvatura, y por tanto la morfología, de la membrana (**Fig. 1.6**). Los lípidos con dos cadenas acíclicas saturadas tienden a adoptar una forma cilíndrica y dan lugar a fases de membrana de tipo lamelar. Sin embargo, si las cabezas lipídicas son significativamente menores que la sección correspondiente a las cadenas acíclicas el resultado es una estructura cónica que resulta en membranas con tendencia a formar fases como HII. Por ejemplo, los lípidos con cadenas hidrocarbonadas insaturadas favorecen este tipo de estructuras no lamelares. Lo mismo ocurre en membranas con PE o CL en su composición. Sin embargo, lípidos como los anteriores, que no favorecen la fase de bicapa planar, pueden verse forzados a adoptar una estructura lamelar por la presencia de proteínas de membrana o por la abundancia de otros lípidos que si prefieren ese tipo de conformación.

La presencia e importancia de fases no lamelares en las membranas biológicas en su estado natural es un indicio claro del papel que juega el llamado *polimorfismo lipídico* en la funcionalidad celular. Así, aunque se acepta que las membranas biológicas en su estado natural se encuentran mayoritariamente en fase lamelar fluida, las fases cúbicas [50] están relacionadas con procesos biológicos importantes que implican deformaciones en la bicapa. Entre ellas, las fases Pn3m e Im3m son las más relevantes y se asocian con el mecanismo de acción de muchos péptidos antimicrobianos [51, 52]. La fase HI se relaciona con fenómenos de curvatura de membrana, aunque también ciertos péptidos antimicrobianos pueden inducir fases de tipo HI localizadas espacialmente, que pueden estar íntimamente relacionadas con sus mecanismos de acción a través de la alteración del empaquetamiento lipídico [25]. Por otro lado, las membranas biológicas en general contienen casi un 40% de lípidos que tienen preferencia por adoptar la fase hexagonal invertida (HII).

Existen varios factores capaces de modular el *polimorfismo lipídico*. La presencia de Ca^{2+} , por ejemplo, favorece la transición hacia fases HII en membranas que contienen CL. Otros factores como el pH y la fuerza iónica tienen también gran influencia en el comportamiento de los lípidos no formadores de bicapas, entre los cuales además de CL se encuentran PS y PE (ambos con cadenas acíclicas insaturadas). Sin embargo la forma intrínseca de los lípidos es el factor principal que rige la estructura de la fase adoptada. Por ello, tan solo variando la composición lipídica es posible modular el comportamiento y la arquitectura de fases de la membrana, lo cual parece ser un mecanismo eficaz de regulación, implicado en dar respuesta a las necesidades y funciones biológicas, tanto de la célula como de los distintos compartimentos subcelulares. Por ejemplo, las estructuras no lamelares de corta duración son esenciales para que ocurran procesos de fusión y fisión de membranas [53]. La proteína quinasa C, por su parte, aumenta considerablemente

1 Introducción

su actividad específica en presencia de fases no lamelares cúbicas [54]. Y los microdominios ordenados de tipo *raft* se han relacionado con eventos de señalización y tráfico transmembranal [53].

Como se puede ver, son múltiples los argumentos en favor de una estrecha relación entre el estado de fase de la membrana y determinadas funciones celulares. *In vitro* y mediante el empleo de sistemas de membranas modelo se puede observar y controlar en cierta medida este tipo de comportamiento. Varios parámetros físicos y químicos como la curvatura espontánea de la monocapa externa, la naturaleza de los lípidos, la temperatura, los niveles de hidratación y presión, son determinantes en la formación y el comportamiento de las fases. Un hecho interesante es que incluso sistemas lipídicos de un solo componente son capaces de generar y mantener una organización estructural de fases estable y heterogénea [55, 56].

1.2.5 Presión lateral

Un cambio en la presión conduce a una variación del volumen y, como respuesta adaptativa, un re-ensamblaje de la matriz lipídica. Las cadenas laterales de los lípidos resultan ser más compresibles que sus cabezas polares. Por ello, aunque en general las variaciones de presión conducen solo a cambios en la organización lateral de los lípidos [57], dependiendo de la composición de la bicapa pueden venir acompañadas de cambios en la curvatura de la membrana. En composiciones con lípidos de forma cónica, como PE y CL, que aparecen como componentes predominantes en las membranas citoplasmáticas de bacterias y organelos como la mitocondria, el mayor volumen de las cadenas hidrocarbonadas incrementa la presión lateral en el centro de la bicapa. Por otra parte, lípidos como PG o PC, con forma cilíndrica, exhiben una presión lateral más uniforme en la región de las cadenas hidrocarbonadas [31, 38]. Estos efectos debidos a la composición lipídica pueden acentuarse por la interacción con moléculas no lipídicas. Por ejemplo, en general la acción de los péptidos membrano-activos da lugar a deformaciones de la membrana como resultado de cambios en la curvatura, tanto locales como globales. Tales cambios de forma serían facilitados en presencia de lípidos con forma cónica, debido a la distribución inhomogénea de la presión lateral a lo largo de la normal de la membrana.

1.2.6 Membranas modelo de tipo vesicular

A pesar de su naturaleza anfipática, los lípidos son inmiscibles en agua, debido al gran tamaño de sus cadenas acílicas en relación con su cabeza polar. Por ello, en disolución acuosa agregan de manera espontánea mostrando sus grupos polares hacia el exterior donde interaccionan con el agua circundante, lo cual reduce la energía interfacial dando lugar a una emulsión estable. Esta propiedad permite preparar de manera fácil sistemas lipídicos que estructuralmente se asemejan a las bicapas presentes en membranas naturales.

En los sistemas sintéticos, la complejidad de las membranas biológicas puede simplificarse mediante la selección de unos pocos tipos de lípidos característicos para formar membranas modelo. Los sistemas modelo de uno o de dos componentes son relativamen-

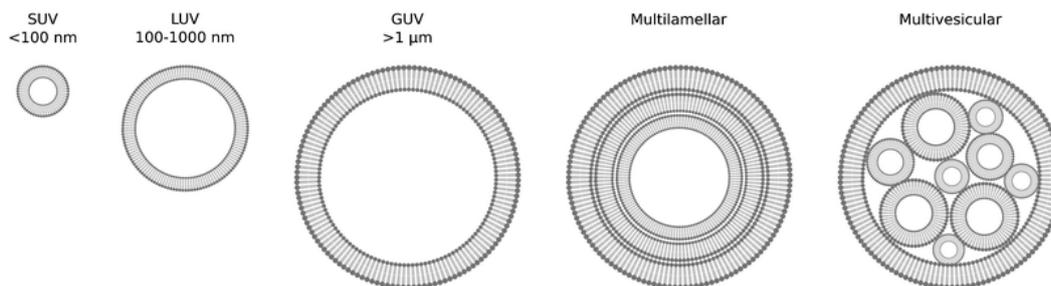


Fig. 1.8: Tipos de vesículas lipídicas sintéticas. Todos ellos corresponden a sistemas modelo de membranas en suspensión libre, es decir, completamente inmersas en la disolución acuosa y no soportadas sobre superficies. Los tres primeros casos, desde la izquierda, se muestran ordenados por su tamaño, y su denominación (que en la figura corresponde a sus siglas en inglés) hace referencia a la presencia de una sola bicapa lipídica: SUV (vesícula unilamellar pequeña), LUV (vesícula unilamellar grande), GUV (vesícula unilamellar gigante). Los dos últimos casos pueden ser de tamaño variable y su característica principal es su composición multicapa, bien a través de membranas multiadyacentes aproximadamente concéntricas (multilamellar), o bien como una gran vesícula que contiene múltiples vesículas más pequeñas en su interior (multivesicular). Tomado de [58] (<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/lc/c2lc41121k>).

te fáciles de preparar⁹ y su comportamiento no es complicado. Sin embargo las mezclas lipídicas de tres o más componentes pueden exhibir comportamientos de fases complejos [59]. Los sistemas de membranas modelo, formados por vesículas en suspensión libre, normalmente utilizados en investigación biofísica se muestran en la **Fig. 1.8**. En este trabajo hemos utilizado los tres tipos de vesículas de una sola membrana (unilamelares), de tamaños pequeño, grande y gigante (SUV, LUV y GUV, por sus siglas en inglés). Las de menor tamaño, SUVs y LUVs, son empleadas en estudios *in vitro* en los que se investiga el comportamiento promedio de una población de vesículas en en una suspensión. Entre ellas, las SUVs son en general más estables, aunque pueden presentar complicaciones funcionales debido a su mayor curvatura. En nuestro caso se utilizaron en estudios de tipo estructural mediante espectroscopía de dicroísmo circular (**Sec. 2.4**), ya que son las que presentan menor dispersión de luz en la zona del espectro de interés. Por su parte, las LUVs se utilizaron en estudios de dimerización de los péptidos en medio lipídico (**Sec. 2.3.2**).

En cuanto a las GUVs, se describen a continuación con mayor detalle dado que se trata del sistema preferentemente utilizado en esta Tesis.

Vesículas unilamelares gigantes, GUVs

Las GUVs tienen un tamaño en escala micrométrica que corresponde a las dimensiones de la mayoría de las células, siendo su diámetro del orden de $\sim 1 - \sim 20 \mu m$, dependiendo

⁹ Los métodos de síntesis para los casos utilizados en esta Tesis se describen en el **Cap. 2 (Sec. 2.1.1 y 2.1.2)**.

1 Introducción

del método utilizado para su preparación. Su obtención puede llevarse a cabo a partir de mezclas de extractos lipídicos naturales o utilizando lípidos sintéticos. Los métodos más comunes para su preparación son electroformación [60–63], utilizado en esta Tesis (**Sec. 2.1.2**), que permite obtener incluso proteoliposomas [64], y rehidratación ([65, 66]), cuando se trata de una mezcla de lípidos depositada como una fina capa sobre una superficie. La ventaja de utilizar electroformación en lugar del método de rehidratación recae en que las **GUV** que resultan del primero son mucho más homogéneas en su tamaño, además de que el rendimiento de formación es mucho mayor. Las **GUVs** también pueden obtenerse a partir de membranas nativas a través de un procesamiento algo más complejo [67].

En los últimos años ha aumentado su uso como sistema lipídico modelo, resultando muy útiles en la determinación del comportamiento de fase de mezclas de lípidos en bicapas y para visualizar la actividad de péptidos y proteínas mediante microscopía óptica. La principal ventaja del empleo de **GUVs** como sistema modelo es que pueden ser observadas de manera directa e individualizada mediante distintos tipos de microscopía óptica. Además, las **GUVs** permiten su micro-manipulación, estrategia que ha amplificado aún más sus potencialidades, siendo utilizadas en estudios de tipo mecánico y termodinámico [68]. Otras ventajas de este tipo de vesículas son que su curvatura es muy similar a la encontrada en la membrana plasmática de muchas células y que se puede controlar su composición lipídica, lo cual permite discriminar el papel de distintos lípidos en los procesos estudiados. Ahora bien, su gran desventaja, cuando se obtienen mediante electroformación, radica en que su producción necesita un entorno de muy baja fuerza iónica, lo cual condiciona pasos posteriores de su uso en condiciones que se acerquen a parámetros fisiológicos de la disolución.

En esta Tesis las **GUVs** han tenido gran protagonismo, puesto que en ellas se basan las investigaciones, mediante estrategias de partícula individual, de las propiedades de los poros (**Cap. 4**) y las características de fenómenos de remodelado de membranas (**Cap. 5**), ambos inducidos por péptidos activos.

1.3 Péptidos membrano activos

Las membranas biológicas son barreras de tipo semipermeable que permiten la comunicación entre compartimentos celulares en su contexto fisiológico. Por tanto, la capacidad de algunas biomoléculas de perturbar el umbral normal de permisividad de las membranas, convierte a las primeras en la llave de muchos procesos a nivel celular. Por otra parte, los mecanismos tanto de defensa como de ataque de muchos organismos dependen de moléculas cuya actividad biológica consiste en perturbar la integridad de las membranas celulares. La gran mayoría de estas moléculas son proteínas o péptidos, y tanto sus propiedades estructurales como los mecanismos por los que llevan a cabo su acción, han sido y siguen siendo objeto de estudio con fines médicos y biotecnológicos. Desde esta óptica, los péptidos membrano-activos, son candidatos potenciales a fármacos antibióticos o anticancerígenos [69, 70]. Estas moléculas están siendo ampliamente estudiadas y actualmente son la base del diseño racional computarizado de nuevas secuencias que

pretenden suplantar a macromoléculas con actividades biológicas destacadas, como por ejemplo los anticuerpos.

Por otro lado, desde una perspectiva reduccionista, los péptidos constituyen un modelo fiable para el estudio de la funcionalidad de las proteínas, así como de su interacción con las membranas lipídicas. Una de sus principales ventajas radica en la facilidad de su obtención a gran y pequeña escala, a diferencia de las proteínas, donde su principal vía de obtención es mediante expresión recombinante. De igual forma, el estudio de muchas proteínas se hace difícil ya que la obtención de mutantes biológicamente activos es complicada, afectándose en muchos casos la viabilidad celular.

1.3.1 Tipos de péptidos membrano activos

En la naturaleza podemos encontrar tres familias principales de péptidos membrano activos [71]: antimicrobianos (AMP), amiloides y de penetración celular (PPC). Los primeros son componentes del sistema inmune innato con capacidad de distorsionar la membrana de los microorganismos. Los amiloides por su parte contribuyen a la patología de diversas enfermedades, como el Alzheimer, y pueden actuar como toxinas cuando se encuentran en estados pre-amiloides tempranos ya que estos presentan la capacidad de permeabilizar la membrana celular. Y por último los péptidos de penetración celular pueden traslocarse espontáneamente a través de las membranas biológicas.

Aparte de los tres tipos anteriores, otra familia no menos importante y de gran interés investigativo son los llamados péptidos fusogénicos. Los estudios realizados en este campo dejan ver que existen similitudes en cuanto a secuencia, estructura y actividad entre los miembros de todas estas familias. Lo cual sugiere que probablemente actúan bajo una serie común de principios físicos [72].

1.3.2 Propiedades físico-químicas de los péptidos membrano activos

Las propiedades físico-químicas son muy frecuentemente analizadas para caracterizar un péptido determinado y/o predecir su comportamiento en diferentes entornos. Quizás la propiedad más destacable de los péptidos membrano-lítics es su carácter anfipático, aunque también comparten otras similitudes. Por lo general, los péptidos membrano lítics se caracterizan por tener un tamaño de menos de 50 residuos y se presentan desestructurados en disolución acuosa, pero cuando se asocian con membranas adoptan conformaciones correspondientes a estructura secundaria tales como α -hélice o cadena extendida β ; en este último caso como parte de una horquilla β o bien de una hoja β de pequeño tamaño. Desde la década de los años ochenta se han llevado a cabo estudios con la finalidad de establecer una relación entre las distintas propiedades físico-químicas y la actividad antibacteriana o hemolítica de péptidos con actividad biológica, como *melitina* o *magainina*. Un claro ejemplo de ello son los trabajos realizados por EISENBERG y colaboradores [73], quienes crearon una herramienta físico-matemática denominada “momento hidrofóbico” (μH) de gran utilidad para caracterizar secuencias de péptidos y proteínas. Este parámetro, junto con la hidrofobicidad (H) y la carga neta (z) de los péptidos, ha sido muy utilizado en estudios y análisis racional de las interacciones

1 Introducción

péptido-membrana [74].

El momento hidrofóbico, es una medida cuantitativa directa de la anfipaticidad. Se calcula como la suma de los vectores individuales de la hidrofobicidad de cada aminoácido presente en la secuencia de un péptido o proteína [75] y nos dice si una secuencia dada, considerada idealmente helicoidal, exhibe potencialmente una ubicación espacial asimétrica (opuesta) de residuos hidrofóbicos y polares. Es decir, nos informa de la existencia de una cara hidrofóbica y otra polar en la estructura helicoidal asumida para el péptido. Los cambios en la hidrofobicidad de una secuencia están estrechamente relacionados con su capacidad de permeabilizar membranas eléctricamente neutras. Según WIEPRECHT [76], un aumento de μH de un péptido, manteniendo todos los demás parámetros físico-químicos constantes, incrementa considerablemente su actividad permeabilizante sobre vesículas compuestas principalmente por lípidos zwitteriónicos, lo que se atribuye a un aumento de la afinidad del péptido por la membrana. A finales de los 90 DATHE *et al.* fueron más allá y llegaron a sugerir que la actividad hemolítica de los péptidos catiónicos y potencialmente helicoidales es sustancialmente modulada e incrementada con el aumento de la hidrofobicidad, el momento hidrofóbico y el ángulo de la cara polar de la hélice [77]. Por otro lado, de manera opuesta, la selectividad anti-bacteriana parece ser óptima en péptidos de hidrofobicidad moderada que a su vez presentan un momento hidrofóbico y un ángulo de la cara polar reducido. En membranas bacterianas modelo, se ha observado que los péptidos con mayor hidrofobicidad tienen mayor tendencia a auto-asociarse y agregar, en comparación con aquellos de menor hidrofobicidad [78].

1.3.3 Interacción péptido-membrana

Los péptidos membrano-activos, independientemente de la familia a la cual pertenezcan, muestran diferencias en cuanto a la especificidad celular y a su actividad en membranas, lo cual guarda relación, como hemos dicho anteriormente, con la composición, estructura y propiedades de la membrana. Sin embargo, a pesar del gran número de investigaciones realizadas hasta la fecha, los mecanismos de la interacción péptido-membrana no han sido establecidos completamente, sobre todo en los casos de los AMP y los CPP. Los mecanismos de remodelado de membrana mediado por este tipo de péptidos dependen de los tipos de lípidos que componen la bicapa, ya que tales mecanismos pueden variar con la carga del grupo polar lipídico y con la longitud de sus cadenas de acilo. Por ejemplo, la interdigitación y la micelación de la membrana por parte de péptidos membrano-activos ocurren mayormente cuando ésta se encuentra en fase gel.

Mediante estudios de difracción de rayos X se ha observado que estos péptidos adoptan una orientación paralela al plano de la membrana, con su eje central situado a nivel del grupo glicerol de los lípidos, de manera que los residuos hidrofóbicos se insertan entre las cadenas de acílicas y las cadenas laterales de los residuos polares miran hacia la parte polar de la membrana [74]. Uno de los modelos mecanísticos de interacción péptido-membrana más aceptados comprende en primer lugar, la acumulación del péptido desestructurado en la vecindad de las membranas cargadas negativamente, debido su atracción electrostática. A continuación, el péptido se transfiere a la membrana a través de un proceso entrópico mediado por el efecto hidrofóbico, que corresponde a la inserción

de las cadenas laterales no polares entre las cadenas de acilo lipídicas, con la consecuente liberación de moléculas de agua. Por último, ocurre una transición conformacional del péptido desde una estructura de cadena aleatoria a hélice α , en la mayoría de los casos, lo que reduce la energía libre y representa entre el 50 y el 60% del valor de ΔG de unión del péptido a la membrana, al evitar la exposición de los enlaces peptídicos libres en ambiente hidrofóbico [79].

A pesar de la formación de estructura secundaria, debido a la polaridad del esqueleto peptídico, la inserción en la membrana no es fácil. Hallazgos recientes obtenidos a través de experimentos con aminoácidos no proteicos han demostrado que el área de la superficie hidrofóbica de la cadena lateral de los aminoácidos es directamente proporcional a la profundidad de su inserción en la membrana. Ello quiere decir, que el efecto hidrofóbico promueve la inserción de un péptido en la membrana cuando dicho péptido contiene un cierto número de cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos [16].

Existen muchos parámetros que influyen en la capacidad de un péptido para insertarse en la membrana. Entre ellos se incluyen la relación molar péptido/lípido, la temperatura, la hidratación de la muestra, el pH, la composición lipídica de la membrana, el carácter anfipático del péptido, su actividad interfacial y la curvatura intrínseca de los lípidos en la membrana. Una vez se ha insertado el péptido, el ángulo de inclinación de la hélice está gobernado por el *ajuste* hidrofóbico. [80, 81]. Por otra parte, un gran número de defensinas bactericidas con actividad de remodelación de membranas son capaces de generar curvatura gaussiana negativa en membranas modelo con presencia de lípidos como CL ó PE. Esta forma de interacción basada en la generación localizada de estructuras tipo silla de montar puede contemplarse como un estadio estructural intermedio de la membrana en procesos como la formación de poros, la vesiculación, el *budding* o la propia fisión.

Según SCHMIDT, *et al.* [82], la capacidad de generación de zonas con estructura de silla de montar por los péptidos antimicrobianos está restringida por la secuencia aminoacídica de estos. En la denominada “regla de selección de curvatura gaussiana”, uno de los requerimientos más importantes para poder generar este tipo de estructuras implica que una disminución en el contenido de **Arg** en la secuencia se compense con el incremento en el número de residuos de **Lys** así como de residuos de tipo hidrofóbico. Esta regla estructural se apoya en otros paradigmas, como el hecho de que los aminoácidos hidrofóbicos presentes en las secuencias insertadas en membranas generan curvatura positiva, mientras que el aminoácido catiónico **Arg** genera curvatura gaussiana, a diferencia de la **Lys**, que solamente da lugar a curvatura negativa [82].

1.3.4 Interacción péptido-péptido en membranas

En principio, es necesario más de un péptido para formar un poro en la membrana. Sin embargo se desconoce cómo oligomerizan y forman poros los péptidos membrano-activos. Los mecanismos de acción propuestos son variados, en función del tipo de péptido, de su concentración, y de la composición de la membrana. Por otro lado, las diferencias en el modo de acción de los AMP con relación a los CPP no están claras. Una posibilidad podría ser que los CPP son capaces de actuar como un monómero y que por ello no permanecen

1 Introducción

unidos a la membrana, a diferencia de los AMP, que si podrían oligomerizar para formar agregados que permanecerían en la bicapa, actuando en su conjunto de alguna manera como una proteína formadora de poros o un complejo péptido-lípido que desestabiliza la membrana [83].

Otro aspecto a destacar en estos sistemas es su cooperatividad. Se acepta casi como regla general que el grado de actividad de los péptidos depende de su concentración sobre la membrana. Excluyendo la importancia que reviste el efecto electrostático para la unión inicial, los experimentos de tipo dosis-respuesta reflejan que su actividad permeabilizante es producto de un fenómeno colectivo [84].

1.3.5 Permeabilidad de membranas por péptidos anfipáticos

Las membranas son sistemas altamente dinámicos, por lo que en su superficie se generan continuos cambios o alteraciones energéticas espontáneas (mecánicas, térmicas y/o electrostáticas) que derivan en la formación y disipación de microdefectos. En ocasiones tales deformaciones ocurren a gran escala (por ejemplo, la formación de poros y los procesos de fusión y fisión). Sin embargo, la unión de péptidos o proteínas a la membrana puede derivar en la estabilización de dichos defectos transitorios o en la consolidación de cambios significativos en la estructura de la membrana [71].

Los péptidos membrano-activos tienen diferentes mecanismos para desestabilizar bicapas lipídicas. Por otro lado, un mismo péptido puede manifestar más de una manera de interactuar con membranas [85]. Los poros en sí mismos son fenómenos naturales que pueden ocurrir incluso en ausencia de proteínas o péptidos, lo cual constituye una manifestación interesante de la capacidad intrínseca de los lípidos de la membrana para auto-organizarse y dar lugar a su formación. Dichos poros, exclusivamente lipídicos, se han observado experimentalmente a temperaturas cercanas a la temperatura de transición de fases. Ejemplo de ello son los denominados canales de lípidos, que manifiestan conductividad iónica y pueden incluso ser inhibidos por fármacos [86, 87].

Los poros lipo-peptídicos, por su parte, son vistos como una respuesta al exceso de área interfacial de la bicapa, debido a la unión del péptido [87–89]. Existen diferentes plataformas y métodos mediante los cuales se ha estudiado el proceso de formación de poros en membranas modelo. En un estudio reciente, desarrollado en nuestro laboratorio [88], donde se reportan poros lipo-peptídicos, se observa por primera vez y de forma directa mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) la presencia de poros de escala nanométrica, inducidos por melitina en monocapas soportadas bajo distintas condiciones experimentales.

Mecanismos de permeabilización

Las moléculas membrano-activas, especialmente los péptidos, pueden presentar distintos mecanismos de acción dependiendo de la composición de la membrana y las condiciones experimentales. La **Fig. 1.9** muestra los modelos clásicos de formación de poros por parte de péptidos antimicrobianos. A continuación se describen estos modelos y sus principales características.

Barril de hélices. Este modelo describe la formación de poros transmembrana por hélices anfipáticas mediante estructuras que son características de canales iónicos, de manera que sus superficies hidrófobas interactúan con el núcleo lipídico de la membrana y sus superficies hidrófilas apuntan hacia la luz del poro, que estaría ocupada por la disolución acuosa. En este caso la formación de poros obedece a los pasos siguientes: En primer lugar, los monómeros deben presentar afinidad por la membrana y unirse a ella, adoptando una estructura α -helicoidal. El segundo lugar, los monómeros deben reconocerse y unirse entre sí, aunque su concentración superficial en la membrana sea baja. En tercer lugar, un oligómero incipiente de hélices se insertaría en el núcleo hidrofóbico de la membrana. Por último, se produce el reclutamiento progresivo de monómeros adicionales para aumentar el tamaño de poro. El paso crítico en este mecanismo es la oligomerización mínima en la superficie de la membrana previa a la inserción, ya que es energéticamente desfavorable que una sola hélice anfipática atraviese la membrana como monómero [90, 91].

Alfombra. En este modelo los péptidos no se insertan en el núcleo hidrofóbico de la membrana, ni se aglomeran u oligomerizan con sus superficies hidrofílicas enfren-tadas. De manera general tampoco es una condición que el péptido adopte una estructura secundaria al tomar contacto con la membrana [92]. Según este modelo, los péptidos líticos están en contacto con la cabeza polar de los fosfolípidos durante todo el proceso de permeación de membrana. Estos se unen inicialmente a la superficie de la membrana diana y la cubren de una manera similar a una *alfombra*, de manera que la permeación ocurre solamente si existe una alta concentración local del péptido unido. Esa alta concentración local en la superficie de la membrana puede ocurrir bien debido a que toda la superficie de la membrana se encuentre cubierta con monómeros peptídicos o alternativamente si ocurre oligomerización de cantidades menores en determinados puntos de la membrana que formarían una alfombra localizada.

Toroidal. El mecanismo de formación de poros toroidales más aceptado comprende, en primer lugar, la adsorción del péptido proveniente de la fase acuosa sobre la región interfacial de la membrana lipídica en forma de monómero y asumiendo una conformación helicoidal. La adsorción va seguida de la expansión de la monocapa externa la cual se deforma debido a la presión adicional existente. Luego se produce la oligomerización (paso limitante de la velocidad en la formación de poros) lo cual estabiliza la deformación estructural en la membrana. Esta deformación actúa como un sitio de nucleación para otros péptidos para dar paso a un poro lipo-proteico [93].

Existe otros mecanismos menos convencionales, pero muy efectivos mediante los cuales los péptidos pueden inducir la formación de poros, incluyendo cambios en el polimorfismo lipídico de la membrana y mediante la generación de curvatura en las membranas, pudiendo facilitar energéticamente mediante ambos procesos la formación de poros al menos de forma transiente. Algunos péptidos tienen la capacidad de inducir fases lipídicas

1 Introducción

cúbicas que pueden conducir a una estructura de membrana porosa o a la fragmentación de la bicapa en estructuras similares a micelas, como por ejemplo MSI-78 [94].

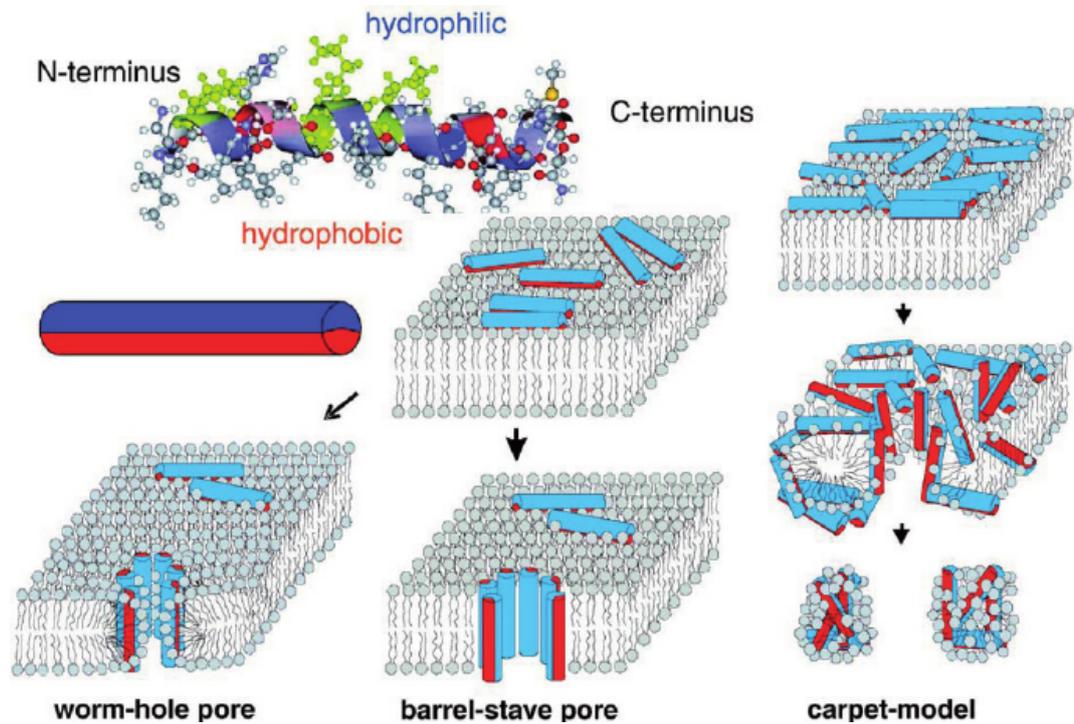


Fig. 1.9: Modelos del mecanismo de actividad de péptidos antimicrobianos capaces de permeabilizar bicapas lipídicas. (Arriba, izquierda) Muchos AMPs se pliegan formando hélices α anfipáticas, con zonas hidrófilas e hidrófobas. Esta conformación se representa aquí esquemáticamente como un cilindro anfifílico con una cara hidrofóbica (*roja*) y otra hidrofílica (*azul*). (Centro) Los péptidos antimicrobianos se unen a la superficie de la membrana con las cadenas laterales hidrofóbicas ancladas en el núcleo lipídico hidrofóbico de la bicapa, dando lugar a diferentes resultados. (Abajo, izquierda) Modelo de poro toroidal, propuesto para magainina. (Abajo, centro) Modelo de poro de barril de hélices, propuesto para alameticina (un péptido antibiótico producido por el hongo *Trichoderma viridis*). (Abajo, derecha) Modelo de alfombra: los péptidos antimicrobianos se aglomeran sobre la superficie de la membrana y conducen posteriormente a su destrucción mediante un proceso de la micelización. Tomado de [95].

1.4 Apoptosis y función mitocondrial

La apoptosis es una secuencia ordenada de eventos, altamente regulados mediante una compleja red de proteínas [96], que conducen a la muerte de una célula estresada o innecesaria, sin liberar sustancias nocivas en el tejido circundante [97]. Este mecanismo es frecuentemente alterado en células cancerígenas, lo cual habla por sí solo de su importancia para encausar nuevas y eficaces líneas de investigación.

Los mecanismos de apoptosis se dividen en dos vías principales. La vía *extrínseca* es

inducida por “ligandos de muerte” extracelulares, reconocidos por sus “receptores de muerte” específicos. La vía *intrínseca* o mitocondrial por su parte se activa por señalización en presencia de daño intracelular [98, 99]. La vía extrínseca (**Fig. 1.10**) se activa debido a la unión de ligandos extracelulares como Fas-L y -TNF a sus receptores de muerte que se encuentra en la membrana citoplasmática (Fas-R y TNFR1, respectivamente). Cuando se producen estímulos de muerte debido a la unión FAS-L/FAS-R, ocurre el reclutamiento por parte de este complejo, de la proteína FADD, la cual a su vez se asocia con la pro-caspasa-8. Este nuevo agregado multiproteico recibe la denominación de complejo de señalización inductor de muerte (DISC). En consecuencia, el complejo DISC activa a pro-caspasa-8, que a su vez procede a activar a pro-caspasa-3, penúltima enzima de la ejecución del proceso de apoptosis. La vía intrínseca (**Fig. 1.10**) también conduce a la apoptosis, pero bajo el control de proteínas mitocondriales. En ambos casos, tanto por estímulos extracelulares como señales intracelulares, la membrana mitocondrial externa se hace permeable a factores pro-apoptóticos como el citocromo *c*, que se libera al citosol. El citocromo *c* recluta a Apaf-1 y pro-caspasa-9 para componer el complejo llamado apoptosoma, lo que desencadena una cascada de señalización/activación cuyo desenlace es la muerte celular.

La ruta mitocondrial se encuentra bajo el control de la familia de proteínas Bcl-2 que regulan la eficiencia de la liberación de factores pro-apoptóticos como citocromo *c*, SMAC o DIABLO desde el espacio intermembrana mitocondrial. una vez fuera de la mitocondria, tales factores cooperan con otras proteínas citosólicas como por ejemplo, Apaf-1 (proteasa apoptótica factor de activación 1) la cual es necesaria para inducir la activación de caspasas, y dar lugar a fenotipos asociados con la muerte celular (como condensación del material nuclear y vesiculación celular) [101–103].

1.4.1 Familia de proteínas Bcl-2

La familia Bcl-2 comprende a las proteínas reguladoras por excelencia de la vía mitocondrial de la muerte celular [2, 104, 105]. En la **Fig. 1.11** se muestra la clasificación en grupos de las proteínas Bcl-2 tomando como criterio su homología funcional y estructural. Dichos grupos son:

Anti-apoptóticas. Contienen dominios de homología con Bcl-2 (BH) de los tipos BH1 a BH4 y se encuentran generalmente asociadas a la membrana mitocondrial externa, de cuya integridad son responsables, aunque también pueden aparecer en otras localizaciones, ya sea en forma citosólica o asociadas al retículo endoplásmico. El papel que juegan estas proteínas dentro de la ruta apoptótica es el de unirse e inhibir a los miembros Bcl-2 pro-apoptóticos [106].

Pro-apoptóticas multidominio. Son moléculas efectoras que contienen los dominios BH1–4 y permeabilizan la membrana mitocondrial externa mediante la formación de poros proteo-lipídicos responsables de la liberación del citocromo *c*.

Pro-apoptóticas BH3-only. Normalmente se encuentran desestructuradas y en estado inactivo en disolución. Se activan mediante diferentes vías como señal de que

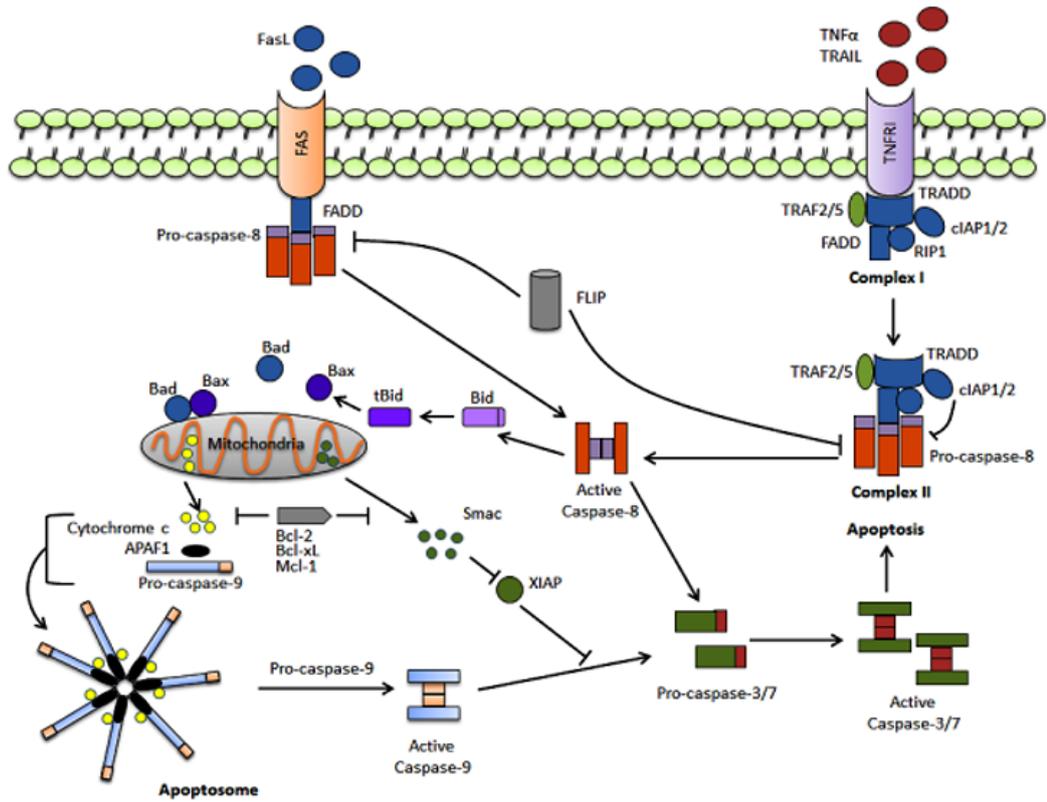


Fig. 1.10: Esquema general de la apoptosis. Se representan las vías *intrínseca* y *extrínseca* del proceso de muerte celular, así como el rol de la familia de proteínas Bcl-2. Tomado de [100], con licencia CC BY 3.0 US.

a ocurrido algún tipo de estrés celular y su función es establecer interacciones proteína-proteína con otros miembros de la familia u otras moléculas efectoras [102, 106].

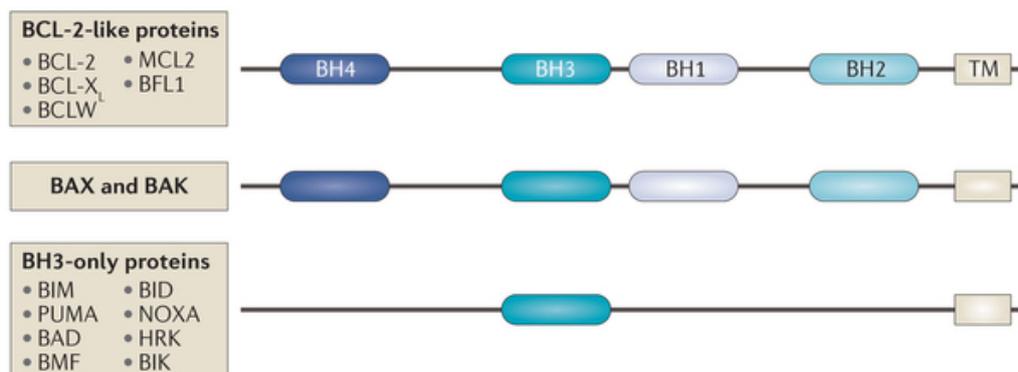


Fig. 1.11: Miembros y dominios de homología en la familia de proteínas Bcl-2.

Bax es un regulador crítico en el mecanismo de la muerte celular apoptótica. Es la encargada, entre otras funciones, de aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y facilitar así la liberación de los llamados factores de apoptosis. Bax se compone de 9 hélices separadas por bucles bien estructurados, con dos hélices centrales ($\alpha 5$ y $\alpha 6$) de carácter anfipático que constituyen el núcleo de la proteína. Esta proteína permanece soluble en su conformación nativa citosólica. Posteriormente, durante la apoptosis, se produce un cambio conformacional, inducido por interacción con τ -Bid¹⁰ que favorece su unión e inserción a la membrana mitocondrial. En la forma activada, varios dominios que se encuentran ocultos en la conformación nativa por su carácter mayormente hidrofóbico, quedan expuestos, aumentando así la afinidad de Bax por membranas biológicas [96]. Los mecanismos moleculares mediante los cuales Bax lleva a cabo su función aún están siendo estudiados, pero todo indica que dicha proteína induce la formación de poros parcialmente lipídicos [32, 97, 107, 108].

1.4.2 Las mitocondrias

La mitocondria es un organelo de células eucariotas con características muy especiales: tiene su propio genoma y su función principal es proporcionar energía a las células a través de la fosforilación oxidativa [109], por lo que es considerada como el “generador” de la célula. Pero su enorme aportación no termina ahí, ya que la mitocondria tiene un rol determinante en otros procesos fisiológicos importantes, como la señalización

¹⁰ Bid: proteína de muerte con dominio de interacción de tipo BH3, también conocida como BH3-only. τ -Bid es la versión activada de Bid por corte proteolítico.

1 Introducción

celular mediada por calcio y la regulación de la apoptosis, de la que es considerada como punto neurálgico. Su complejidad e importancia es tal que se puede entender como una minicélula devenida en compartimento subcelular.

La mitocondria consta de 4 subcomponentes: la matriz, el espacio intermembranal y dos membranas interrelacionadas estructuralmente; las membranas mitocondriales interna (MMI) y externa (MME).

1.4.3 Cardioplipina

La cardioplipina, CL (**Fig. 1.2**) es un fosfolípido dimérico; atípico si lo comparamos con otros fosfolípidos, aunque esencial para las funciones y la dinámica mitocondrial. Es uno de los lípidos más sintetizados por la célula y se encuentra mayormente en la MMI (13%), donde se encuentra implicado en la asociación periférica del citocromo *c* en la MMI [98]. Está compuesto por cuatro cadenas acílicas, con predominio del tipo *linoleil* C18:2 en eucariotas superiores. La cabeza polar de la CL natural tiene un área de sección transversal y un volumen pequeño en comparación con las dimensiones de sus cuatro cadenas de acilo, por lo que en principio presenta forma cónica (**Fig. 1.6**). En consecuencia, es un lípido con propensión a estabilizar curvatura negativa en de membrana, a la vez que favorece la transición de fases lamelares a fases no lamelares, principalmente de tipo HII [110–112]. Esta propiedad es relevante sobre todo para eventos que implican el reordenamiento de lípidos y remodelado de la membrana, como la fisión y la fusión de membranas, especialmente en el contexto de la dinámica de la membrana mitocondrial [111, 113, 114]. Por ejemplo, se ha podido comprobar que este lípido estimula la activación de Bax, inducida por τ -Bid [115]. De manera similar, la GTPasa dinamina OPA1, localizada en la MMI, depende críticamente de CL para promover la fusión de la membrana mitocondrial [111, 116]. En condiciones fisiológicas de apoptosis, la MME puede contener hasta un 40% (en porcentaje de moles de lípido) de CL [117].

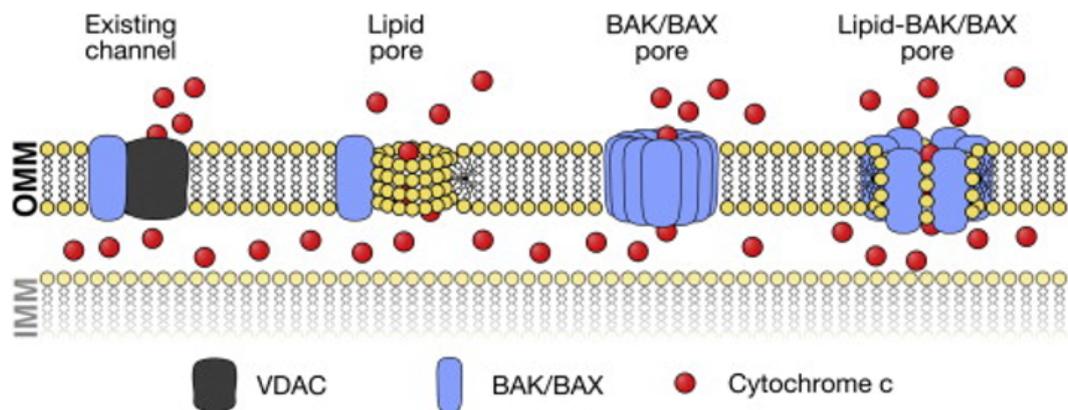


Fig. 1.12: Tipos de poro apoptótico descritos o propuestos en la membrana mitocondrial. Tomado con permiso de [98], copyright (2014).

1.4.4 Poro apoptótico

La estructura del poro apoptótico es aún desconocida. La **Fig. 1.12** representa los modelos más aceptados acerca de la naturaleza del poro apoptótico. A día de hoy existen numerosas hipótesis con distinto soporte experimental, desde investigaciones realizadas con sistemas lipídicos modelo unilamelares hasta experimentos en células que apoyan una naturaleza lipídica, ya que el citocromo *c* puede ser liberado de membranas que contienen CL incluso en ausencia de proteínas como Bax y Bak (**Fig. 1.13**).

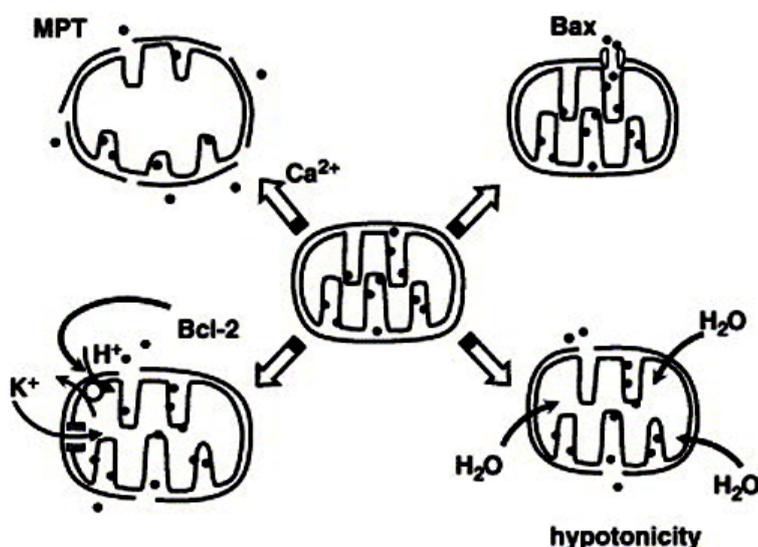


Fig. 1.13: Permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Transición de estado de permeabilidad, MPT (esquina superior izquierda), proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (esquina superior derecha), modulación de los flujos iónicos (ángulo inferior izquierdo) e hipotonicidad (ángulo inferior derecho). Tomado de [118].

Investigaciones realizadas en varios sistemas modelo y en vesículas aisladas de membranas mitocondriales externas (OMV) confirmaron que la formación de poros mediada por Bax en mitocondrias es un proceso mucho más complejo que en liposomas miméticos. La principal diferencia en la cinética de formación de poros entre ambos sistemas radica en el período de latencia observado en OMVs, ausente en LUVs o GUVs. Este desfase temporal en el sistema natural con respecto al sistema modelo se ha adjudicado a la presencia de factores y/o acontecimientos biológicos, como la presencia de la proteína inhibidora B-cell linfoma *extra large* (Bcl-x1) o a la transición de Bax desde su forma citosólica a la forma activa en la membrana [97]. Por otra parte, aunque no hay un consenso total en este tema, se han propuesto dos modelos de poro apoptótico para la proteína Bax. Un primer modelo responde a la existencia de un poro generado a partir de la multimerización de Bax en la membrana (poro completamente proteico). Sin embargo, la evidencia científica existente no avala del todo esta hipótesis ya que los modelos estructurales obtenidos mediante métodos de resolución atómica desvelan la formación de dímeros como el orden oligomérico preferido de estos sistemas [119]. Un segundo modelo

1 Introducción

habla de un poro lipoproteico, donde las hélices más anfipáticas de la proteína reordenan la membrana e inducen a los lípidos a estructurar poros altamente curvados [97]. En este contexto, parece haber un consenso en cuanto a la idea de que la presencia de **Bax** y **Bak** en la membrana externa de las mitocondrias aumenta la permeabilidad de éstas mediante la generación de poros, cuya naturaleza lipoproteica es apoyada por estudios en membranas modelo.

1.4.5 Dinámica mitocondrial

Los cambios que sufren las mitocondrias a lo largo del ciclo celular se conocen como dinámica mitocondrial. Fue observada por primera vez en 1914 en un estudio de microscopía [120]. Sin embargo, a día de hoy estos fenómenos siguen siendo difíciles de descifrar.

Mientras la célula se encuentra en interfase, las mitocondrias aparecen formando una red tubular. Previamente a la mitosis comienza su fragmentación, facilitando la segregación celular, y posteriormente al proceso de división celular la red mitocondrial se restablece. Tales transiciones morfológicas son controladas a través de un equilibrio entre procesos de *fusión* y *fisión* [121–123].

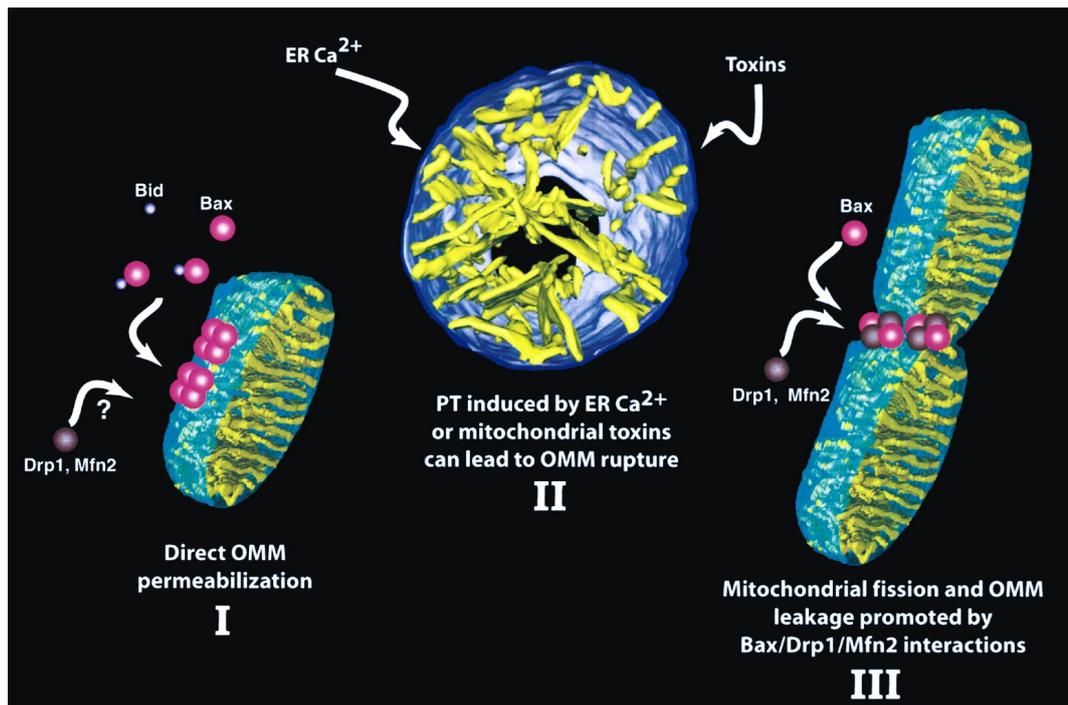


Fig. 1.14: Dinámica mitocondrial. Se representan los cambios principales que pueden sufrir las mitocondrias. (I) Apoptosis mediada por permeabilización de la MME. (II) Disrupción de la membrana, llevada a cabo por el poro de transición (PT) y mediada por Ca²⁺. (III) Fisión mitocondrial. La proteína Bax (esferas de color magenta) juega un papel importante en los procesos I y III.

Las mitocondrias también sufren cambios como consecuencia de procesos de degradación celular. Cuando se alcanza un umbral de daño, las mitocondrias se eliminan en gran medida por autofagia. Las mitocondrias más gravemente afectadas son segregadas mediante procesos de fisión para preservar la salud de la red mitocondrial. La fisión también ocurre para regular la morfología de la red de mitocondrias y facilitar el tráfico mitocondrial [124, 125]. Todos estos procesos, que implican deformación y remodelación de membranas están regulados por su tensión lateral [126].

En esta sucesión de eventos celulares que tienen a las mitocondrias como principal escenario se ven implicadas un gran número de proteínas reguladoras y efectoras. La **Fig. 1.14** muestra de manera esquemática algunos ejemplos, enfatizando la estrecha relación existente entre **Bax** y estos organelos. La descripción de la maquinaria encargada de la dinámica mitocondrial y de la relación entre las distintas proteínas que la componen es fundamental en cuanto a la capacidad que podemos tener para poder modular su acción en provecho de la salud humana. Pero a pesar de su importancia, las bases moleculares de tales procesos no están aún bien establecidas. Una de las proteínas más activas en toda esta dinámica es **Bax** (**Fig. 1.14**), así como otros miembros la familia de **Bcl-2** (**Sec. 1.4.1**) a los que se atribuye un papel fundamental en la apoptosis [127, 128] y últimamente también en la fisión mitocondrial [129–131] (**Sec. 1.5.3**), aunque su aportación a la fisiología de este organelo puede haber sido aún minusvalorada.

1.5 Fisión de membrana

En general, la fisión de membranas se conoce mucho menos que la fusión. Puede dividirse en dos fases. En la primera, la vesícula toma una forma de un “ocho” en la que las dos vesículas (cuyo tamaño puede ser distinto) están conectadas por un cuello, formando lo que se conoce como *budding* (*nota 4 en la página 9*). En la segunda etapa, el cuello se rompe y se forman dos vesículas de composición similar [132]. Estudios *in vitro* han mostrado evidencias de que no es necesaria la presencia de proteínas o péptidos para que una vesícula lipídica por sí misma experimente cambios morfológicos que resultan en eventos de *budding* y posteriormente fisión [133], lo cual plantea la cuestión de hasta qué punto la fisión (incluso la que ocurre en membranas celulares) es un fenómeno físico o biológico.

1.5.1 Fisión mitocondrial

La fisión mitocondrial es una de las etapas de la apoptosis [134]. Se trata de un evento vital para la homeóstasis celular y presenta una alta complejidad, debido a la sinergia en la manifestación de varios fenómenos biofísicos y fisiológicos. A pesar de que en la actualidad se ha despertado un gran interés por encontrar las bases moleculares de este fenómeno, aún existen muchos eslabones perdidos.

La mayor parte de lo que conocemos a cerca de la fisión de membranas mitocondriales provienen de estudios en levaduras [135, 136]. En células humanas este evento involucra a proteínas ubicadas en la MME, entre las cuales se incluyen la proteína de fisión mitocondrial 1 (**Fis1**), el factor de fisión mitocondrial (**Mff**) y el factor de elongación

1 Introducción

mitocondrial 1 (MEF1), todos ellos reportados como iniciadores del proceso de fisión de mitocondrias mediante el reclutamiento de la GTPasa Drp1 (proteína similar a la dinamina de tipo 1) [137, 138]. Ésta última pertenece a la familia de las dinaminas. Actúa como una enzima mecanoquímica que utiliza la hidrólisis de GTP para llevar a cabo la constricción en los sitios de fisión mitocondrial. Inicialmente Fis1 se encuentra distribuida uniformemente en la MME, mientras que Drp1 se halla tanto en citosol como en la mitocondria. Al desencadenarse procesos de fisión, se producen zonas de curvatura profunda como resultado de la constricción de la mitocondria, de manera que en aquellas constricciones donde también se encuentre Drp1 tiene lugar la fisión [136] (Fig. 1.15). Aunque muchos autores están de acuerdo con este mecanismo, otros señalan que en eucariotas superiores Fis1 no es necesaria para que ocurra el proceso [139]. Por otro lado, la fisión está altamente regulada a través de reacciones de fosforilación y ubiquitinación, sumoilación, y nitrosilación [140]. Además, tanto la fisión como la fusión mitocondrial son mediadas por lípidos, que ocurren en estructuras de membranas altamente curvadas y desfavorecidos energéticamente. Generalizando, puede decirse que las proteínas y los lípidos se coordinan para posibilitar una catálisis geométrica, que emplea la superficie de la membrana para generar la geometría molecular local necesaria para la fisión. Los complejos proteicos se coordinan produciendo intermediarios de membrana altamente curvados, de cuello y hemifusión, cuyas formas se adaptan para minimizar tensiones elásticas de las monocapas lipídicas [141]. En la célula se ha identificado también dinamina citosólica activa que media la fisión e internalización de caveolas en el endotelio, habiendo sido localizada en el cuello que separa las caveolas de la membrana plasmática [142].

A nivel mitocondrial la tasa de fisión se incrementa en condiciones de apoptosis o ante la despolarización de la membrana mitocondrial. Aunque la fisión de mitocondrias se atribuye casi exclusivamente a la proteína Drp1, Ensayos *in vitro* relacionan a Bax con diversas formas de remodelado de membranas, incluyendo *budding* y fisión [143] y además existen evidencias de que esta proteína colocaliza con Drp1 en zonas de la membrana mitocondrial en eventos fisiológicos [144, 145]. Curiosamente, los poros toroidales, que se asocian con la función principal de Bax, son también estructuras con gran curvatura.

1.5.2 Fisión en sistemas modelo

En sistemas modelo los eventos de *budding* y fisión tienen otros protagonistas. En este tipo de contexto, no biológico, no ocurre hidrólisis de GTP para superar la energía requerida para curvar la membrana y adoptar geometrías complejas, o para constreñir la membrana hasta provocar fisión. En su lugar son las propiedades físicas y geométricas (curvatura intrínseca) de los lípidos las que juegan un papel determinante, permitiendo que estos fenómenos ocurran, aunque el un paso final, que implica la separación de dos vesículas, es difícil de alcanzar.

En de GUVs con determinadas composiciones lipídicas se han observado cambios morfológicos e incluso fisión en ausencia de péptidos o proteínas. En esos casos el proceso es facilitado solo con variaciones en parámetros ambientales o de la disolución, como presión, fuerza iónica o pH, que dar lugar a formaciones geométricas en la membrana

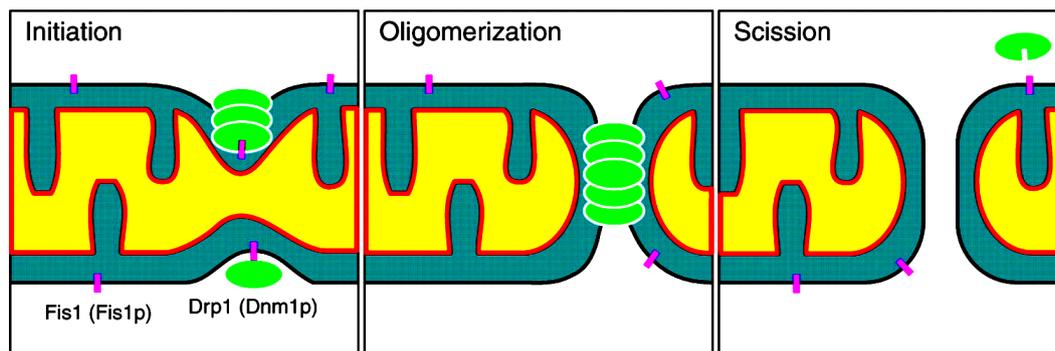


Fig. 1.15: Mecanismo de fisión mitocondrial por Drp1. La proteína de fisión Drp1 (homólogo en mamíferos de Dnm1p) contiene un dominio GTPasa N-terminal, un dominio GED C-terminal (dominio efector GTPasa) y una región hidrofílica central. Drp1 oligomeriza y se ensambla como una máquina de escisión alrededor de la MME. Fis1, homóloga en mamíferos de Fis1p, es una proteína de la MME y se cree que recluta a Drp1 por medio de proteínas adaptadoras.

y en ocasiones fisión. Se han propuesto algunos mecanismos mediante los cuales este fenómeno puede ocurrir [132], donde parece claro que estos factores actúan a través de las propiedades de empaquetamiento de la membrana. El mecanismo más ampliamente aceptado implica la segregación de fases en sistemas multicompuestos, donde el fenómeno se concibe como una forma de minimizar la tensión lineal entre dominios de diferente composición lipídica. En estos casos las morfologías exógenas, tales como túbulos o *buds*, se separan solo cuando ocurre segregación de fases entre ambas membranas [146]. Por otro lado, se ha visto que la inclusión de algunos péptidos membrano activos, tienen un efecto catalizador sobre los eventos de remodelado y fisión de membranas, ya que ayudan a estabilizar a los intermediarios de fisión. Sin embargo, aún en estos casos la fisión es poco probable y se desconoce el mecanismo implicado en ella. Hasta ahora no se ha descrito ninguna molécula capaz de fisionar membranas sin consumo de energía, por lo que se cree que las modificaciones observadas en presencia de estos péptidos o proteínas en sistemas lipídicos modelo están enfocadas hacia su influencia en las propiedades geométricas de la membrana.

1.5.3 Proteínas Bcl-2 y fisión mitocondrial

En la última década, se han establecido muchas conexiones entre la apoptosis y la dinámica mitocondrial. Los altos niveles de estrés celular que conducen a la apoptosis también conducen a la fisión excesiva de las mitocondrias. Ambos procesos ocurren casi simultáneamente y son mediados por la proteína pro-apoptótica Bax. Sin embargo, hasta que punto están entrelazados ambos acontecimientos fisiológicos es aún una incógnita. Algunos autores apuntan a que tras la señal de apoptosis, Drp1 es reclutada a la membrana mitocondrial externa, donde colocaliza con Bax y mitofusina 2 (Mfn2) en sitios de fisión [145]. Se ha observado que la inhibición de la fisión mitocondrial en células sin Drp1 produce un retraso en la liberación de citocromo *c*, lo que indica que la fisión mito-

condrial participa en la permeabilización mediada por **Bax** en la membrana mitocondrial externa. Por otro lado, los procesos de hemifusión pueden estimular la oligomerización de **Bax** activada por τ -**Bid** [125, 147]. Sin embargo, otros trabajos recientes apuntan a que la remodelación de la red mitocondrial inducida por **Bak** o/y **Bax** está cuidadosamente regulada y separada de la liberación de citocromo *c* (Fig. 1.16). Al parecer, la fragmentación mitocondrial es más bien, un fenómeno que acompaña a la activación de **Bax** / **Bak** (o compete con ella). [148]. Tampoco la apoptosis asociada a la liberación de citocromo *c* se ve afectada por la ocurrencia de procesos de fusión mitocondrial. Otra dato interesante es que los miembros anti-apoptóticos de la familia de proteínas **Bcl-2** pueden inhibir la liberación de citocromo *c* hacia el exterior mitocondrial pero no tienen ningún efecto sobre la dinámica de fisión mitocondrial, lo que apunta a que dicho proceso cuando es iniciado por mediación de **Bak** y/o **Bax** es un evento independiente de la liberación del citocromo *c* y del proceso de apoptosis en si mismo. Como se puede apreciar, hay evidencias que soportan la participación de **Bax** en los eventos de remodelación, o al menos la sitúan en aquellos lugares donde ocurre, aunque no está claro cual es su papel real, más allá de su actividad formadora de poros.

1.6 Objetivos

El grupo de investigación donde se ha llevado a cabo esta Tesis se especializa en el estudio reduccionista de fragmentos mínimos activos de proteínas apoptóticas. En el pasado se han definido varios de estos fragmentos, tomando como base hélices concretas de proteínas como **Bax**, **Bcl-xL** y **Bid**, y se ha estudiado principalmente su actividad de permeabilización de membranas. Sin embargo, algunos aspectos críticos de dicha actividad permanecían sin dilucidar. En concreto, se desconocía si los péptidos unidos a la membrana se encuentran como monómeros o en forma oligomérica. En cuanto a la actividad de permeabilización, se asumía un carácter discreto de los poros, el cual sin embargo no había sido definido de manera clara. Tampoco se conocía si bajo unas condiciones dadas los poros son equivalentes entre sí o variados, ni había sido determinado su tamaño ni su densidad (poros por unidad de área) en la membrana. Todo ello exigía llevar a cabo un estudio cuantitativo exhaustivo, para lo cual no se disponía de una estrategia y una metodología adecuadas. Por último, era conocido en el momento de comenzar esta Tesis, que la actividad de **Bax** no se ciñe al aumento de la permeabilidad mitocondrial en relación con el desencadenamiento de la apoptosis, sino que puede participar en otros procesos, relativamente poco definidos, relacionados con la dinámica mitocondrial. Existe una relación entre los mecanismos básicos de dicha dinámica y cambios morfológicos que pueden observarse en vesículas individuales mediante microscopía de fluorescencia. Por ello, decidimos explorar la posibilidad de que los dominios mínimos de **Bax** que contengan solo la secuencia de la hélice $\alpha 5$ de la proteína (**Bax- $\alpha 5$**), o bien secuencias de dos hélices, $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (**Bax- $\alpha 56$**), fueran también capaces de inducir remodelado de membranas en nuestros sistemas modelo. Para este último aspecto incluimos también un fragmento activo de la proteína **Bak**, homóloga de **Bax**, con secuencias de las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (**Bak- $\alpha 56$**),

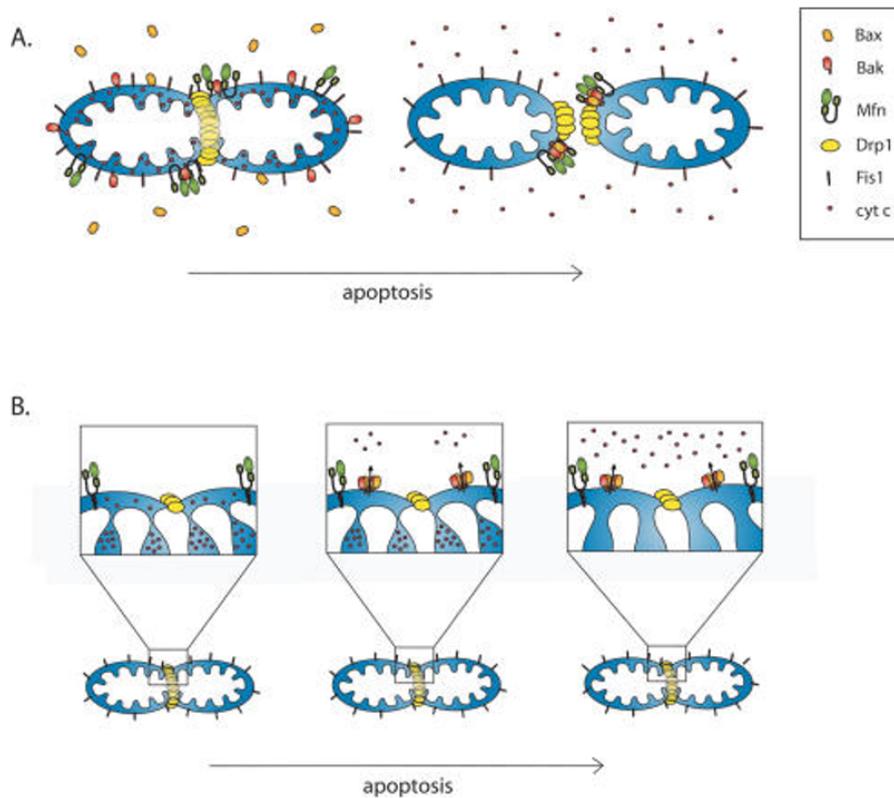


Fig. 1.16: Modelos de competencia entre la maquinaria de morfogénesis mitocondrial y la progresión de la apoptosis. (A) *foci* model. De izquierda a derecha, Bax (naranja) se trasloca a las mitocondrias y colocaliza en *foci* con Drp1, mitofusinas y Bak (ver leyenda), conducen a la división mitocondrial y a la liberación del citocromo *c* (pequeños círculos rojos) desde la mitocondria. (B) modelo de apoptosis (Cristae). Drp1 (amarillo) forma sitios de constricción en el MEM (izquierda), a continuación, pequeñas cantidades de citocromo *c* del espacio intermembrana se liberan a través de los poros de Bax / Bak (centro). Finalmente (derecha), las crestas experimentan remodelación, abriendo las uniones para liberar una mayor cantidad de citocromo *c* almacenado dentro de la matriz.

1 Introducción

Teniendo en cuenta todo ello, los objetivos concretos propuestos fueron los siguientes:

1. Investigar las interacciones péptido-péptido en un entorno lipídico (vesículas con y sin CL), de fragmentos mínimos de Bax que contienen secuencias de una sola hélice (Bax- α 5) y partes de dos hélices (Bax- α 56).
2. Estudiar la influencia de los péptidos anteriores en la organización lateral de la membrana.
3. Obtener información detallada acerca de los poros individuales formados por estos péptidos (tamaño, variabilidad y densidad de los poros en la membrana). Para ello se toma como base un caso (Bax- α 5) cuya actividad de permeabilización no se ve oscurecida por otros procesos.
4. Desarrollar una metodología de análisis cuantitativo que permita llevar a cabo el objetivo anterior. Ello implica la deducción de un modelo adecuado para el ajuste de las cinéticas de difusión y una estrategia que permita extraer el tamaño y número de poros a partir de medidas en vesículas individuales.
5. Caracterizar la actividad de remodelación de membranas de fragmentos mínimos activos de proteínas apoptóticas (Bax- α 5, Bax- α 56 y Bak- α 56).

2 Materiales y Métodos

2.1 Preparación de vesículas

En esta Tesis se emplearon diferentes sistemas de membranas modelo (vesículas unilamelares en todos los casos) para llevar a cabo estudios de funcionalidad de nuestros péptidos. Para investigar la capacidad formadora de poros y de remodelado de membranas a nivel de vesícula individual por parte de los péptidos, el sistema lipídico de elección fue **GUVs**, ya que su tamaño micrométrico permitía una visualización directa mediante el uso de microscopía confocal de fluorescencia. Los ensayos de actividad formadora de poros realizados a nivel poblacional (liberación de calceína encapsulada) y los de interacción péptido-péptido, fueron implementados en **LUVs**. Los experimentos de determinación de estructura secundaria y oligomerización, donde se empleó la metodología de dicroísmo circular, se llevaron a cabo en **SUVs**, dado que las vesículas de este tipo, por su menor tamaño, generan menos dispersión de la luz y ofrecen mayores garantías de obtener espectros de calidad. A continuación se describen los métodos de preparación de cada uno de los diferentes tipos de liposomas unilamelares con los que se trabajó en la Tesis.

2.1.1 Preparación de LUVs y SUVs

Los protocolos de preparación de **LUVs** y **SUVs** fueron idénticos, salvo en el paso de extrusión, donde la diferencia entre ellos radica únicamente en el uso de una membrana de policarbonato de 50 *nm* de tamaño de poro para la obtención de las **SUV**, en lugar de una de 100 *nm* que fue la empleada para las **LUV**. La metodología general para producir las **LUVs** es similar a la publicada en [34].



Fig. 2.1: Método de extrusión de suspensiones lipídicas. Este método es adecuado para preparar liposomas unilamelares de tamaños en el rango de decenas-centenas de *nm*, y consiste en la utilización de un mini-extruder comercial de Avanti Polar Lipid. La imagen ha sido tomada de <https://avantilipids.com/>.

Reactivos. Los lípidos 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilglicerol (POPG) y CL, extraída de corazón de bovino, fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids con una pureza del 99%. Los disolventes metanol y cloroformo fueron adquiridos de VWR. El tampón fosfato (PB), de pH 7.4, en algunos casos era preparado por nosotros partiendo de las cantidades correspondientes de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , de Sigma-Aldrich, y en otros fue adquirido de la anterior casa comercial, en cuyo caso estaba compuesto NaH_2PO_4 y K_2HPO_4 . Para la preparación de tampón fosfato salino (PBS) se utilizaban disoluciones de PB 10 *mM* a las que se añadía NaCl (de Sigma-Aldrich) hasta una concentración de 137 *mM*. Para la cuantificación de fosfolípidos se empleó un *kit* de reactivos de Wako diagnostic, comercializado por Rafer.

Equipamiento. Para llevar a cabo la preparación de liposomas unilamelares (**Fig. 2.1**) se utilizó el sistema de extrusión comercializado por Avanti Polar Lipids. Las membranas de policarbonato (de 13 *mm* de diámetro y 100 *nm* de tamaño de poro) y los discos de papel (de 10 *mm* de diámetro) empleados en el sistema de extrusión fueron de Whatman. Las separaciones por filtración en gel, para el caso particular de preparación de liposomas con calceína encapsulada, se llevaron a cabo con ayuda de columnas PD MiniTrap G-25, de GE Healthcare Life Sciences. Las medidas de absorbancia a 600 *nm* para la cuantificación de fosfolípidos se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis de Agilent Technologies. Otros equipos empleados para preparar SUVs y LUVs fueron una bomba de vacío de paletas rotatorias, comercializada por Edwards, y un agitador *vortex* de la compañía Stuarts. Las medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) se llevaron a cabo con la ayuda de un analizador de partículas ZetaSizer Nano ZS, de Malvern Instruments, y utilizando un programa de la compañía Dispersion Technology.

Procedimiento. Se prepararon soluciones madre en cloroformo de POPC, POPG o POPC:CL 80:20 (según los casos) a 50 *mg/mL* en viales de vidrio. Posteriormente, se pipetearon 100 μL de dichas disoluciones en un recipiente de vidrio pequeño y se evaporó el disolvente orgánico con ayuda de un flujo de argón o de nitrógeno, eliminándose el disolvente residual a vacío durante 2 *h*. La película de lípidos resultante fue hidratada con PBS a temperatura ambiente (~ 22 °C), que es claramente mayor que la temperatura de fusión (o temperatura principal de transición de fase, T_c). Para los lípidos POPC y POPG, el valor de T_c es -2 °C. Para facilitar la completa resuspensión de los lípidos, la muestra se mantuvo bajo agitación vigorosa durante 2 min, con ayuda de un agitador *vortex*. Posteriormente, se llevaron a cabo 10 ciclos de congelación/descongelación, cuya finalidad era mejorar la homogeneidad de la suspensión. El número de ciclos de congelación/descongelación se extendió hasta 20 cuando las muestras iban destinadas a la encapsulación de compuestos de alto peso molecular. Al final de este paso la muestra consiste en una suspensión de vesículas lipídicas multilamelares (MLVs). Para preparar LUVs, la suspensión de MLVs fue sometida a extrusión a través de membranas de policarbonato de 13 *mm* de diámetro con poros de 0.1 μm de diámetro medio. Para ello se utilizó un mini-

extruder de Avanti Polar Lipids, siguiendo las especificaciones del fabricante (**Fig. 2.1**). La concentración lipídica en las muestras de LUVs se determinó mediante el uso de un *kit* comercial de determinación de fosfolípidos de Wako, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez preparadas las LUVs se determinó la distribución de su tamaños mediante DLS, utilizando un analizador de partículas ZetaSizer.

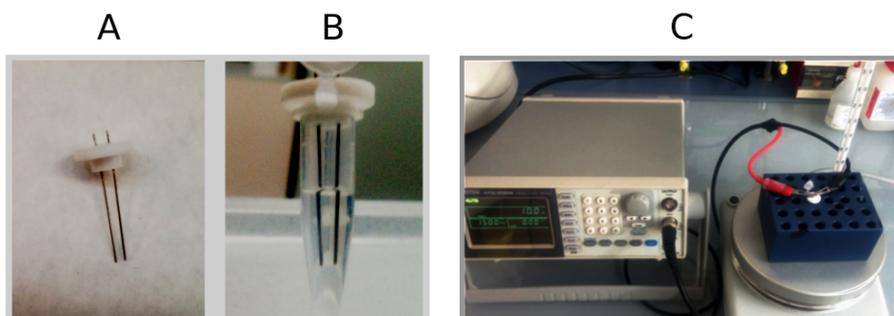


Fig. 2.2: Equipamiento utilizado en el proceso de electroformación de GUVs. (A) Diseño de fabricación casera que consta de dos electrodos de platino, donde se reparten los lípidos, insertados en una base de teflón. (B) Cámara de electroformación de GUVs donde los electrodos de platino se introducen en un vial eppendorf, sumergidos en la solución de electroformación (sacarosa). (C) sistema de electroformación compuesto por un generador de funciones, la cámara de electroformación y una placa calefactora.

2.1.2 Preparación de GUVs

Reactivos. Para preparar GUVs se utilizaron distintas mezclas de los fosfolípidos POPC y CL, adquiridos de Avanti Polar Lipids. Por otro lado, para visualizar las membranas lipídicas en experimentos de microscopia confocal se utilizó una pequeña cantidad (0,05% o 0.2% según los casos, en relación molar con respecto al total de lípidos) de marcador fluorescente lipofílico del tipo dialquilcarbocianina de cadena larga (DiI¹, DiO² o DiD³ C18 (3), todos ellos de Molecular Probes), o bien 1,2-dioleil-sn-3-glicerofosfoetanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il), NBD-PE. El cloroformo, de calidad analítica, y la sacarosa, fueron de VWR. La albúmina de suero bovino (BSA) era de Sigma-Aldrich.

Equipamiento. Para llevar a cabo la obtención de las GUVs se utilizó un generador de

¹ DiI (DiI C18 (3)): 3H-Indolium, 2-[3-(1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-octadecil-2H-indol-2-ilideno)-1-propenil]-3,3-dimetil-1-octadecil-, perclorato.

² DiO (DiO C18 (3)): Benzoxazolium, 3-octadecil-2-[3-(3-octadecil-2(3H)-benzoxazolilideno)-1-propenil]-, perclorato.

³ DiD (DiD C18 (3)): 3H-Indolium, 2-(5-(1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-octadecil-2H-indol-2-ilideno)-1,3-pentadienil)-3,3-dimetil-1-octadecil-, perclorato.

funciones de onda Instek AFG-2005, electrodos de platino de 0.2 mm de espesor insertados en una base de teflón (hecho en casa), viales eppendorf de 1.5 ml y una placa calefactora.

Procedimiento. Las GUVs se prepararon mediante el método de electroformación [60–63]. Para ello se diseñó y construyó en casa una pequeña celda compuesta por un tubo eppendorf provisto de un tapón perforado de teflón, el cual se atravesaba por dos electrodos de platino de 0.2 mm de diámetro y 2 cm de longitud. El extremo interior los electrodos se sumerge en el tampón de electroformación y su extremo exterior se conecta mediante pinzas cocodrilo a una fuente de alimentación del tipo generador de funciones de onda de forma definida (Fig. 2.2). Inicialmente se tomaban 6 μ L de una disolución madre de lípidos a 2 mg/ml de concentración, en cloroformo, y se dispersaban directamente sobre los dos electrodos de platino. A continuación se dejaban reposar los electrodos para evaporar el disolvente orgánico a temperatura ambiente durante 5-10 min. Posteriormente se llenaba la celda de electroformación con una disolución de sacarosa a una concentración de 300 mM, se termostataba a 25 °C, colocando la celda en una placa térmica, y se introducían en ella los electrodos recubiertos por lípido, quedando la celda cerrada por el tapón de teflón. Después, se conectaba el extremo exterior de los electrodos a la fuente de alimentación seleccionando una función de onda senoidal y se aplicaba una corriente de 1.5 V a 10 Hz durante 120 min, destinada a facilitar la formación de GUVs sobre la superficie de los electrodos. Por último se disminuía la frecuencia a 2 Hz durante un máximo de 15 min para permitir que los GUVs formados se separen de los electrodos. La suspensión de GUVs se guardaba a 4 °C para su uso el mismo día de su preparación.

2.2 Preparación de los péptidos

Los péptidos fueron en algunos casos sintetizados y purificados en nuestro propio laboratorio, como alguna de las preparaciones de Bax- α 5 *wild-type* (Bax- α 5^{wt}) y varias versiones mutantes de este péptido, o bien fueron adquiridos de la empresa GenScript, como alguna de las preparaciones de Bax- α 5^{wt} y varios de sus mutantes, todos los péptidos Bax- α 56^{wt} y sus mutantes, así como *melitina* y *magainina*. La relación completa de péptidos utilizados para esta Tesis se muestra en la **Tabla 2.1**, en la que se detallan sus secuencias de residuos de aminoácido y alguna de sus propiedades básicas.

2.2.1 Síntesis semiautomática en fase sólida de Bax α 5

Reactivos. Se utilizó una resina del tipo RinkAmide ChemMatrix, de Iris Biotech. La piperidina y los reactivos N,N-Diisopropil-etil-amina (DIEA), N,N,N,N-Tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il) uronium hexafluorofosfato (HBTU) y 1-Hidroxibenzotriazol hidrato (HOBT) fueron también de Iris Biotech. El disolvente diclorometano (DCM) y el *terbutil-etil-éter* fueron de VWR. Los reactivos anhídrido acético, ácido trifluoroacético (TFA), tioanisol, etanoditiol y fenol fueron de Sigma-Aldrich. El N-metil

2.2 Preparación de los péptidos

2-pirrolidona (NMP) fue de Scharlab. Por otro lado, se preparó in situ el reactivo K, que consistía en una mezcla TFA: tioanisol: etanoditiol: fenol: H₂O en proporciones 85.5:5:2.5:5:5.

Equipamiento. Para las síntesis peptídicas llevadas a cabo en nuestro laboratorio se utilizó un sintetizador automático de péptidos ABI 4330 (Applied Biosystems). Los péptidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un módulo de separación Alliance 2695 con columna para fase reversa X Bridge 10x250 mm BEH300 C18 5µm (de Waters).

Tab. 2.1: Péptidos utilizados en esta Tesis. Se incluyen sus secuencias, el organismo del cual proceden, el tipo de variante, ya sea por mutación o por marcaje fluorescente, y alguna de sus propiedades físico-químicas. Las mutaciones con respecto a la secuencia salvaje se indican con color *azul*. En los péptidos que fueron modificados con marcaje fluorescente el grupo fluoróforo introducido se indica con un superíndice en color *rojo*. En los casos en los que existe similitud entre las secuencias, éstas se han alineado para facilitar su comparación.

Nombre ^a	Secuencia	Nº de Residuos	Carga ^b	μH^c	Origen ^d	Fracción no polar
Bax- $\alpha 5^{wt}$	Ac-WGRVVALFYFAS KLVLKALC TK-NH ₂					
Bax- $\alpha 5^{py}$	Ac-WGRVVALFYFAS KLVLKALC ^{py} TK-NH ₂	22	+4	0.288	humano	0.682
Bax- $\alpha 5^{A/R}$	Ac-WGRVVALFYFAS KLVLKALC ^{A/R} TK-NH ₂					
Bax- $\alpha 5^{C^{py}S}$	Ac-WGRVVALFYFAC ^{py} KLVLKALS TK-NH ₂					
Bax- $\alpha 56^{wt}$	Ac-KLVLKALC TKVPELIRTIMGWTLDFLR-NH ₂					
Bax- $\alpha 56^{py}$	Ac-KLVLKALC ^{py} TKVPELIRTIMGWTLDFLR-NH ₂	27	+3	0.455	humano	0.593
Bax- $\alpha 56^{A/R}$	Ac-KLVLKALC ^{A/R} TKVPELIRTIMGWTLDFLR-NH ₂					
Bak- $\alpha 56^{wt}$	Ac-RLALHVVYQ HGLTGFLGQVTRFVDFMLHH-NH ₂	29	+5	0.261	humano	0.517

^a wt= wild-type, py = pireno, A/R = Alexa488 maleimida o rodamina maleimida, C^{py}S= mutante S¹¹⁸ → C, C¹²⁶ → S (con numeración correspondiente a la secuencia de la proteína Bax) donde el residuo mutado C¹¹⁸ se utiliza para marcaje con pireno.

^b Carga neta teórica a pH 7.0. En el caso de Bak- $\alpha 56^{wt}$, los cuatro residuos de H de su secuencia se consideran protonados.

^c Momento hidrofóbico teórico, determinado utilizando HELIQUEST [149] (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

^d Origen referido a la secuencia de la variante salvaje (todos los péptidos se obtuvieron mediante síntesis peptídica).

Procedimiento. La síntesis de Bax- α 5 se llevó a cabo de forma semiautomatizada en un sintetizador de péptidos ABI 4330. El procedimiento químico responde a la metodología FastMoc, tal como se implementa en el archivo FastMoc0.1 Ω MonPrevPk estándar, incluido en el paquete del programa SynthAssist del software de Applied Biosystems, con las siguientes modificaciones:

1. Los tiempos de acoplamiento se prolongaron hasta 35 min.
2. Por defecto, se realizaron acoplamientos dobles para cada residuo a incorporar. Para residuos difíciles (aminoácidos -ramificados, como Ile y Thr) se aplicaron acoplamientos triples.
3. Después de cada acoplamiento, se añadió una etapa de bloqueo, usando anhídrido acético.

En la fase preparatoria se pesó la cantidad apropiada de resina sólida (Rink Amide ChemMatrix) con rango de carga de $\sim 0,5$ mmol/g y se colocó en el interior del vaso de reacción. De igual forma, se pesó la cantidad apropiada de cada uno de los aminoácidos necesarios, según la secuencia del péptido, protegidos con grupos Fmoc y se colocó en los cartuchos correspondientes. Las cantidades pesadas se ajustaron de acuerdo con la escala de síntesis, con un exceso molar de $10\times$ sobre el número teórico de sitios de acoplamiento existentes en la resina. Después de completarse la síntesis, la resina con el péptido unido se transfería a una columna de filtración vacía para rápidamente eliminar la mezcla de disolventes, bajo flujo de N_2 o a vacío. Una vez seca, se pesaba para calcular la cantidad de péptido unido a la resina.

El siguiente paso era cortar el péptido de la resina, para lo cual se utilizaba el reactivo K (ver arriba) durante 4 h en oscuridad, bajo corriente de Ar, a temperatura ambiente y en agitación. Después, el péptido liberado de la resina se dejaba fluir por elución libre a través de la columna sobre ~ 50 ml de éter-terc-butil-metílico frío (-20 °C), provocando así su precipitación. El péptido precipitado se mantenía en éter durante una noche a -20 °C. Al día siguiente se sedimentaba el por centrifugación a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C, para después resuspenderlo de nuevo en éterterc-butil-metílico frío. Este último paso se repetía 4 veces con el objetivo de eliminar la mayor cantidad posible de impurezas. Finalmente, el péptido se liofilizaba y almacenaba a -22 °C para posteriores usos. La purificación del péptido crudo obtenido se llevaba a cabo por HPLC en fase reversa, usando una columna semi-preparativa C18. La pureza se determinaba integrando los picos de elución y fue típicamente 90%. Por último, la masa molecular del péptido se confirmaba mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

2.2.2 Tratamiento pos-síntesis: Solubilización y cuantificación de los péptidos

Reactivos. Péptidos (Tabla 2.1), preparados como se indica en el apartado anterior. Disolvente 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP), soluciones tampón PBS o áci-

2 Materiales y Métodos

do 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico (HEPES) y Tris[2-carboxi-etil] fosfina clorhidrato (TCEP), todos ellos adquiridos de Sigma-Aldrich.

Equipamiento. Agitador vórtex, baño de ultrasonidos, centrífuga para tubos eppendorf, espectrofotómetro mod. 9648 de Agilent Technologies, cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico comercializadas por Hellma.

Procedimiento. Los péptidos utilizados en esta investigación son en la mayoría de los casos muy hidrofóbicos por lo que en medio acuoso son poco solubles y de difícil manejo. Por ello, fue necesario tomar precauciones especiales y diseñar un protocolo de solubilización y manipulación específico. Dicho protocolo se extendió también al uso de aquellos péptidos más polares y por lo tanto más solubles en agua, como *melitina* y *magainina*, con intención de utilizar procesos experimentales homogéneos y poder así comparar adecuadamente todos los casos. Los liofilizados peptídicos, tanto aquellos sintetizados en nuestro laboratorio como los adquiridos comercialmente, fueron alicuotados en pequeñas cantidades y almacenados a -22 °C. Antes de utilizar estos péptidos para llevar a cabo cualquier experimento se seguía la metodología de solubilización que se describe a continuación.

Se colocaba una pequeña cantidad del liofilizado en un vial de vidrio de 1 ó 2 ml y se re-suspendía en 150 μ L de HFIP bajo agitación vigorosa. Posteriormente se sometía a ultrasonificación en baño por 5 min, con el objetivo de disociar completamente los agregados o partículas de liofilizado no disueltas. A continuación se evaporaba el disolvente bajo flujo de N₂ en una cabina de gases, generando una fina película de péptido en la pared del vial de vidrio. Luego, esta película peptídica se hidrataba bajo agitación vigorosa durante 1 min con el tampón acuoso elegido (PBS o HEPES) en función del experimento a realizar, teniendo en cuenta que en el caso de tratarse de péptidos con Cys en su secuencia el tampón debía contener el agente reductor TCEP (en concentración 1 mM) con el fin de evitar la formación de enlaces disulfuro. Luego, la solución acuosa del péptido se sometía a 2 min de ultrasonificación, se trasvasa a un eppendorf de 1.5 ml y se centrifuga a 13400 rpm durante 3 ó 4 min para eliminar posibles agregados. Después se tomaba el sobrenadante y se cuantifica espectrofotométricamente para obtener el valor final de la concentración del péptido. Para ello, en los casos en que el péptido contenía Trp y Tyr en su secuencia se utilizaron medidas de absorbancia ultravioleta a 280 nm, procediendo como sigue.

Cantidades determinadas de péptido, se tomaban de la muestra liofilizada y se disolvían en HFIP. Después, estas muestras (o diluciones de ellas) se transferían a cubetas de cuarzo y se registraban espectros en la región UV-Vis. La concentración se calculaba a partir de los valores de absorbancia a 280 nm, aplicando directamente la ley de BEER-LAMBERT

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} C l \quad (2.1)$$

donde C es la concentración molar del péptido, A_{λ} es la absorbancia de la muestra

a la longitud de onda elegida (280 nm), ε_λ es el coeficiente de extinción molar del péptido (en unidades $M^{-1}cm^{-1}$) para esa misma longitud de onda y l es la anchura de la cubeta utilizada para la medida (1 cm). Los coeficientes de extinción empleados se recogen en la **Tabla 2.2**. Dichos valores fueron calculados utilizando ProtParam [150], de ExPASy, accesible a través de internet,⁴ excepto en el caso de magainina, ya que no contiene residuos de Trp en su secuencia por lo que fue cuantificada utilizando el método de BRADFORD [151].

Tab. 2.2: Datos espectroscópicos de péptidos y sondas de marcaje. Coeficientes de extinción molar de los péptidos sin marcar y de las sondas utilizadas para su marcaje. También se da la longitud de onda característica del espectro de absorbancia de las sondas, a la cual se refiere el coeficiente de extinción.

Péptido	ε_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)	Sonda de marcaje	λ_{max}	$\varepsilon_{\lambda_{max}}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Bax- α 5	6990	N-(1-Pirenil) maleimida		40000 ^a
Bax- α 56	5500	Alexa fluor 488 C5 maleimida		71000 ^b
melitina	5500	Alexafluor 555 C2 maleimida		150000 ^c

^a Tomado de [152].

^b Tomado de [153].

^c Tomado de <https://www.thermofisher.com/>.

2.2.3 Marcaje fluorescente de los péptidos

La reacción de acoplamiento de los marcadores fluorescentes a los péptidos se llevó a cabo a través de un único residuo de Cys contenido en su secuencia (**Tabla 2.1**). El procedimiento seguido guardó siempre estrecha relación con los protocolos de marcaje que aparecen en la literatura [153] aunque se introdujeron algunas variaciones, sobre todo debido a la hidrofobicidad de nuestras moléculas. Por otro lado, el protocolo de marcaje fue también muy similar con independencia del fluoróforo utilizado, por lo que aquí se describe con detalle solo el procedimiento seguido para la conjugación de N-(1-Pirenil)-maleimida (pireno), haciendo alusión a alguna particularidad o diferencia importante con respecto al marcaje con Alexa fluor maleimida.

Reactivos. El marcador fluorescente pireno fue obtenido de Sigma-Aldrich, por su parte Alexa fluor 488 C5 maleimida (Alexa488) y Alexa fluor 555 C2 maleimida (Alexa555) fueron de Molecular Probes. El disolvente para las sondas fluores-

⁴ ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) es una herramienta de ExPASy, the SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://web.expasy.org/>). Permite el cálculo de parámetros físicos y químicos de proteínas y péptidos a través de su secuencia, extraída de una base de datos o introducida por el usuario.

2 Materiales y Métodos

centes, con excepción de Alexa555, para la cual se utilizó H₂O miliQ, fue N,N-Dimetilformamida (DMF), de Sigma-Aldrich. Los péptidos para el marcaje fueron obtenidos como se describe en la **Sec. 2.2**. El tampón de reacción utilizado fue HEPES 20 mM a pH 7.4 y el agente reductor fue TCEP, de Invitrogen. Las mini-columnas cromatográficas de centrifugación de fase reversa-C18 eran de Thermo Fisher Scientific.

Procedimiento. Para estudiar su grado de asociación en sistemas de membranas modelo, los péptidos Bax- α 5 y Bax- α 56 fueron modificados químicamente con **pireno** mediante unión covalente a un residuo específico de Cys [154–156]. Primero se preparó una disolución de **pireno** a una concentración de 20 mM en DMF. Por otro lado, el péptido se disolvió en HEPES 20 mM, en presencia de TCEP a una concentración final de 0.5 mM para evitar la formación de puentes disulfuro. La concentración final del péptido en dicho tampón fue de 100 μ M. Tras incubar durante 30 min bajo agitación moderada, la solución peptídica fue sometida a la reacción de acoplamiento, adicionando cada 15 min 1 μ L de la disolución de **pireno** bajo agitación vigorosa, hasta alcanzar una relación molar péptido/sonda de 1/5. Al finalizar se mantuvo el medio de reacción bajo agitación moderada durante toda la noche. A continuación, la reacción se detuvo por adición de -mercaptoetanol. El proceso de purificación se realizó mediante cromatografía en fase reversa, utilizando mini-columnas de resina porosa C18 que eluyen por centrifugación. El marcaje del péptido fue confirmado por espectrometría de masas. El grado de marcaje (DOL) se calculó en base a las siguientes ecuaciones:

$$DOL = \frac{\text{moles de sonda}}{\text{moles de péptido}} = \frac{A_{\lambda_s}^s / \epsilon_{\lambda_s}^s}{A_{\lambda_p}^p / \epsilon_{\lambda_p}^p} = \frac{A_{\lambda_s}^s \epsilon_{\lambda_p}^p}{A_{\lambda_p}^p \epsilon_{\lambda_s}^s} \quad (2.2)$$

donde $A_{\lambda_s}^s$ es la absorbancia del fluoróforo utilizado para el marcaje a la longitud de onda de su máxima absorción ($\lambda_s = 338$ nm, en el caso del **pireno**, **Tabla 2.2**), $\epsilon_{\lambda_s}^s$ es el coeficiente de extinción del fluoróforo al valor de longitud de onda λ_s (**Tabla 2.2**), $\epsilon_{\lambda_p}^p$ es el coeficiente de extinción molar del péptido a la longitud de onda máxima de su espectro característico ($\lambda_p = 280$ nm) y $A_{\lambda_p}^p$ es la absorbancia que corresponde al péptido a la anterior longitud de onda λ_p . Dado que la sonda también presenta absorbancia a la longitud de onda λ_p , el valor de $A_{\lambda_p}^p$ se calcula después de aplicar una corrección sobre la absorbancia de la muestra marcada a la longitud de onda λ_p (A_{λ_p}), restando la parte que corresponde a la absorbancia de la sonda a esa misma longitud de onda ($A_{\lambda_p}^s$):

$$A_{\lambda_p}^p = A_{\lambda_p} - A_{\lambda_p}^s \quad (2.3)$$

A su vez, $A_{\lambda_p}^s$ se calcula asumiendo que la razón entre las absorbancias de la sonda a las longitudes de onda λ_p y λ_s es la misma en estado libre que en el estado unido al péptido:

$$A_{\lambda_p}^s = \frac{A_{\lambda_p}^{s\text{ libre}}}{A_{\lambda_s}^{s\text{ libre}}} A_{\lambda_s}^s \quad (2.4)$$

donde $A_{\lambda_p}^{s_{libre}}$ y $A_{\lambda_s}^{s_{libre}}$ son las absorbancias de la sonda en estado libre a longitudes de onda λ_p y λ_s , respectivamente.

2.3 Espectroscopia de fluorescencia

2.3.1 Fundamentos teóricos de fluorescencia

La fluorescencia es una propiedad que tienen algunas moléculas (principalmente compuestos aromáticos) de emitir luz al relajarse desde un estado vibracional electrónico excitado S_1 (**Fig. 2.3**) adquirido como consecuencia de la absorción de una determinada radiación. La utilización de fluorescencia en medidas espectroscópicas, nos ofrece una valiosísima información, tanto del entorno químico cercano a un fluoróforo como de los procesos que afectan al fenómeno fluorescente, que pueden tener lugar en la molécula que emite o en el medio que la rodea. Algunos ejemplos de la utilidad de medidas de fluorescencia son el estudio de cambios conformacionales o de la interacción entre biomoléculas (mediante RET, *Resonance energy transfer*), el seguimiento de procesos con fluctuaciones temporales en un pequeño volumen de observación (FCS, *Fluorescence correlation spectroscopy*) o el estudio de la co-localización de procesos o marcadores moleculares (FRAP, *Fluorescence recovery after photobleaching*). Las medidas de fluorescencia pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: estado estacionario y resueltas en el tiempo. En el primero de ellos, la excitación de la muestra se realiza mediante un haz de iluminación constante, a diferencia de las medidas con resolución temporal, donde se utilizan pulsos de luz para excitar [157].

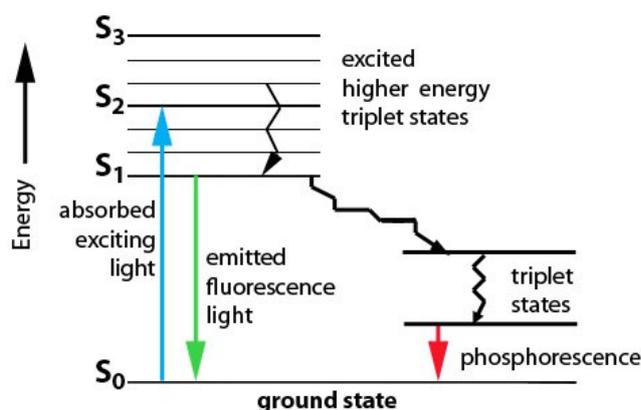


Fig. 2.3: Diagrama de Jablonski simplificado. Se representa la estructura de los estados vibracionales excitados y las principales transiciones energéticas de una molécula fluorófora. Tomado de [158] y de <https://www.thermofisher.com/>.

En esta Tesis, se han llevado a cabo medidas de fluorescencia en estado estacionario para detectar la formación de dímeros, tanto en ambiente micelar como en vesículas lipídicas (**Sec. 2.3.2**). Por otro lado se utilizó la microscopia de fluorescencia para el

estudio de la unión de péptidos a las vesículas, de los cambios morfológicos debidos a dicha interacción o de las cinéticas de liberación de contenidos en vesículas individuales (Sec. 2.5).

2.3.2 Detección de dimerización en membranas mediante la formación de excímeros de pireno

Formación de excímeros de pireno

El pireno (Fig. 2.4 A) es una molécula con propiedades físico-químicas muy peculiares. Puede ser considerado como una sonda espectroscópica molecular [159], dada su capacidad de formar dímeros excitados (excímeros)⁵ cuando dos moléculas de pireno se encuentran a una distancia ≤ 10 Å. El espectro de emisión fluorescente del pireno se caracteriza por poseer 5 bandas vibracionales, identificadas como: I, II, III, IV y V, con máximos a las longitudes de onda de ~ 375 , 379 , 385 , 395 y 410 nm, respectivamente, las cuales conforman el espectro del monómero (Fig. 2.4 B). Además del estado monomérico, cuando dos moléculas de pireno, una en estado excitado y otra en estado fundamental, se encuentran dentro de un radio de hasta ~ 10 Å de distancia se produce una banda algo desestructurada con un máximo alrededor de 470 nm, la cual representa el estado de excímero (Fig. 2.4 C,D).

El espectro monomérico del pireno es sensible a entorno. La relación entre las intensidades de las bandas I y III, puede ser tomada como un indicador de la polaridad del entorno circundante a la molécula, lo cual ofrece una información útil en los casos en los que se estudian cambios conformacionales de proteínas marcadas con esta sonda [160]. La razón (r) entre la intensidad de la banda correspondiente al monómero (m), con respecto a la del excímero (e), $r = m/e$, es una herramienta de gran valía en la detección de interacciones intermoleculares y cambios conformacionales. Los valores de m y e pueden determinarse a partir de las áreas A_m y A_{ex} de las bandas correspondientes, o bien mediante las intensidades de sus máximos (I_m e I_{ex}).

De manera general, la emisión del excímero es un indicador espectroscópico de proximidad, pero hay que hacer notar que no siempre que exista presencia de excímeros habrá emisión. Como se puede observar en el esquema de la Fig. 2.4 C, la formación de excímeros pasa por la excitación de una molécula monomérica en estado fundamental (Py) dando lugar a un monómero en estado excitado (Py^*), el cual puede sufrir desintegración, observándose un espectro típico de emisión de monómero. Sin embargo, cuando Py^* se encuentra con otra molécula Py (en estado fundamental) a la distancia adecuada y en una correcta orientación espacial, se obtiene un excímero (E^*) y se observa una banda con su máximo a ~ 470 nm, dependiendo del entorno que rodea a la sonda. Pero si las moléculas de pireno ($Py^* - Py$) no se encuentran en una orientación favorable, o si son afectadas por el microambiente cercano, se obtiene un complejo no fluorescente [155, 160, 161]. A pesar de las limitaciones que se derivan de lo anteriormente expuesto, en condiciones adecuadas la determinación de excímeros de pireno es una buena

⁵ Homo- o heterodímero molecular donde uno de sus componentes se encuentra en un estado excitado.

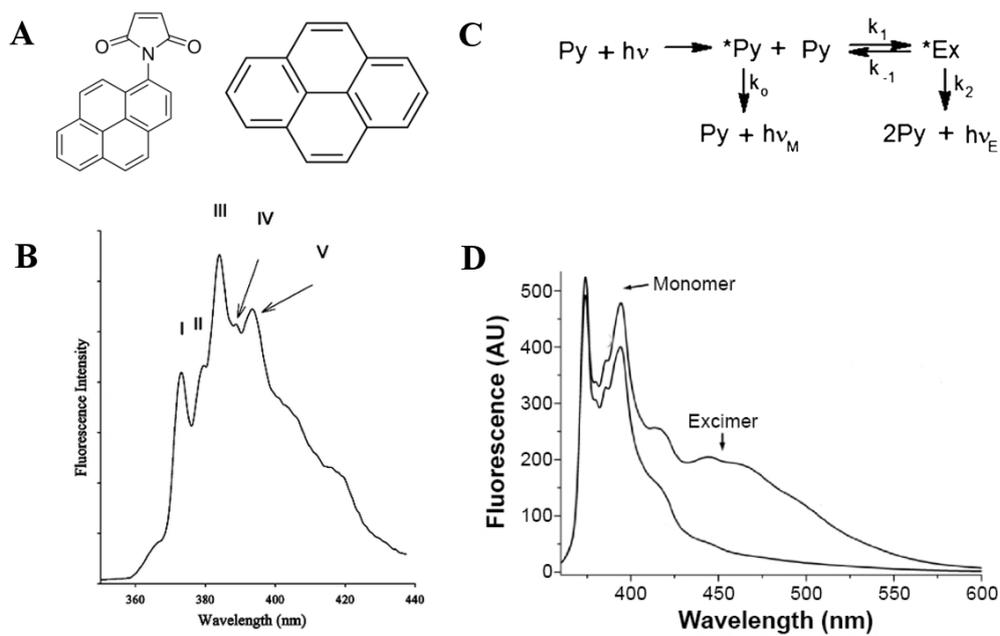


Fig. 2.4: Pireno. (A) Estructuras de N-(1-Pyrenyl) maleimida (izquierda) y del pireno (derecha), tomadas de la página web de Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/>). (B) Representación del espectro del monómero de pireno en n-hexano con sus cinco bandas vibrónicas I-V. (C) Reacción de formación de excímeros. (D) Espectro de excímero de pireno.

2 Materiales y Métodos

estrategia para el estudio de las interacciones entre biomoléculas.

Reactivos. LUVs de ~ 100 nm de diámetro compuestas por POPC puro, POPC:POPG (80:20) y POPC:CL (80:20), preparadas según se explica en la **Sec. 2.1.1**. Péptidos (Bax- $\alpha 5^{\text{wt}}$, Bax- $\alpha 56^{\text{wt}}$ y melitina) marcados con pireno (**Tabla 2.2**), preparados según se describe la **Sec. 2.2.3**.

Equipamiento. Se utilizó un espectrofluorímetro master serial de Photon Technology International (PTI) provisto de agitación magnética en la cámara de muestras y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico para muestras (Hellma), adecuadas para agitación con varilla.

Procedimiento. Los péptidos marcados con pireno fueron ensayados en liposomas de tres composiciones lipídicas diferentes: POPC, POPC:POPG (80:20) y POPC:CL (80:20). Los espectros de fluorescencia para cada composición se tomaron a diferentes relaciones molares péptido/lípido (P/L) (1/20 y 1/80), utilizando en todas ellas la misma concentración total de péptido. Las rendijas de excitación y emisión se ajustaron a 2 nm y 5 nm, respectivamente. La longitud de onda de excitación se situó a 342 nm y la emisión se recogió entre 360 y 550 nm. A cada muestra se le restó el espectro obtenido con liposomas que contenían péptidos no marcados fluorescentemente (a las mismas concentraciones que las de la muestra que contenía péptidos marcados). En primer lugar se registraron espectros de las disoluciones de péptidos sin vesículas, para comprobar que el péptido no se encontraba agregado en ausencia de liposomas. A continuación se añadía sobre las mismas muestras la cantidad de vesículas necesaria para conseguir la relación P/L deseada.

Registro de datos cinéticos

Para observar posibles variaciones en el patrón de oligomerización con el tiempo se llevaron a cabo medidas a distintos tiempos, utilizando los mismos parámetros experimentales básicos que en el apartado anterior, a excepción de la longitud de onda de emisión, que se situó a 475 nm para seguir la formación de excímeros específicamente. Se registró la línea de base de emisión de la solución de vesículas sin péptido y se pausó la lectura para, seguidamente, adicionar la cantidad de péptido necesaria para lograr la relación P/L deseada. Inmediatamente después se continuó el registro de emisión a 470 nm. Este paso debe realizarse lo más rápidamente posible, ya que la formación de excímeros ocurre en segundos. No obstante, el seguimiento de las muestras se llevó a cabo por tiempos largos (al menos de 500 s). Es importante señalar que durante todo el procedimiento la muestra en la cubeta se mantuvo bajo condiciones de agitación suave.

2.4 Espectroscopia de dicroísmo circular

2.4.1 Fundamentos de dicroísmo circular

La espectroscopia de dicroísmo circular proporciona información estructural y permite el seguimiento de cambios conformacionales en biomoléculas como proteínas y ácidos

nucleicos. A pesar de ser una técnica de baja resolución, en comparación con otras metodologías como la resonancia magnética nuclear (RMN) o la difracción de rayos X, su rapidez y el bajo consumo de muestra la convierten en un método muy utilizado y un excelente complemento de otros métodos. El fenómeno de dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés) puede ser entendido como la diferencia de absorción entre dos componentes de luz circularmente polarizada con rotación opuesta, por parte de un compuesto ópticamente activo (quiral) [162]. La señal de dicroísmo circular corresponde a:

$$\Delta\varepsilon(\lambda) = \varepsilon_L(\lambda) - \varepsilon_R(\lambda) \quad (2.5)$$

Donde, $\varepsilon_L(\lambda)$ y $\varepsilon_R(\lambda)$ son los coeficientes de absorción molar de la luz circularmente polarizada a izquierda y a derecha, respectivamente.

Los grupos cromóforos en las proteínas son de tres tipos: grupos de cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp), que absorbe entre 260-320 nm, enlaces disulfuro, que presentan una amplia banda de absorción centrada cerca de 260 nm y los enlaces peptídicos (amida), los cuales absorben por debajo de 240 nm [163, 164]. Este último cromóforo es el que ofrece una información estructural más valiosa. Cuando los grupos amida de un polipéptido toman un arreglo determinado, sus transiciones ópticas se dividen o sufren desplazamientos. Como consecuencia de ello, las diferentes estructuras secundarias se corresponden con espectros CD característicos (Fig. 2.5). Las proteínas varían en la extensión de sus estructuras secundarias y en combinaciones de las mismas. Las conformaciones α -helicoidales se caracterizan por tener dos bandas negativas bien definidas a ~ 222 y ~ 208 nm y una banda positiva intensa a ~ 193 nm. Las proteínas que asumen una conformación de láminas β -plegadas antiparalelas tienen una banda negativa a ~ 218 nm y otra banda positiva a ~ 195 nm. Por su parte, las proteínas que se encuentran en un estado desordenado tienen una elipticidad muy baja por encima de 210 nm y una banda negativa cerca de los 195 nm [164, 165].

Un espectro de dicroísmo circular se obtiene cuando se registra la señal de absorbancia, generalmente en miliunidades de absorbancia (mA), en función de la longitud de onda (λ). Normalmente estos valores se manejan como elipticidad (θ , en miligrados; $\theta = 32.98$ mA). Además, se suelen normalizar como elipticidad molar ($[\theta]$, $^{\circ} \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), teniendo en cuenta la concentración del cromóforo. Por otro lado, para el caso de proteínas y péptidos se utiliza la elipticidad media por residuo, $MRE[\theta]$, en unidades de $^{\circ} \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{residuo}^{-1}$.

Existe una amplia variedad de métodos para analizar los espectros de CD y obtener a partir de ellos información estructural aproximada. Todos ellos asumen que un espectro de una proteína puede ser representado como la combinación lineal de los espectros de sus componentes de estructura secundaria, más el error asociado a la presencia de otros grupos cromóforos [165]. La mayoría de estos programas basan su análisis en información independiente, correspondiente a conjuntos de proteínas cuya estructura se conoce con resolución atómica a través de difracción de rayos X o RMN.

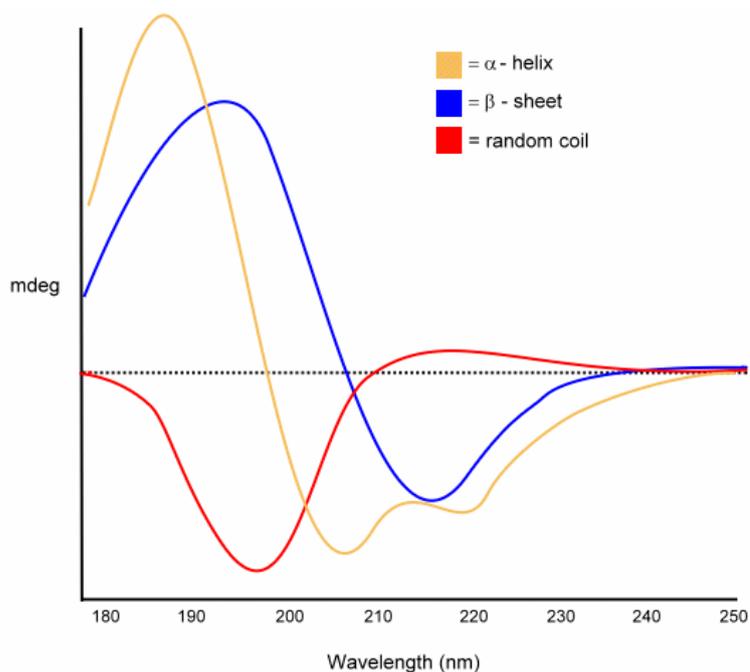


Fig. 2.5: Espectros de CD característicos de las diferentes estructuras secundarias observadas en proteínas.

2.4.2 Caracterización estructural de péptidos mediante dicroísmo circular

Reactivos. Se utilizó HFIP de Acros Organic y PB o PBS, de Sigma-Aldrich. Los liposomas contenían en sus membranas los lípidos POPC, POPG o CL (de Avanti Polar Lipids) y fueron preparados mediante extrusión a través de filtros con poros de 50 nm (Sec. 2.1.1). Los péptidos utilizados fueron Bax- $\alpha 5^{wt}$, Bax- $\alpha 56^{wt}$, melitina y magainina.

Equipamiento. Las medidas se llevaron a cabo mediante un espectropolarímetro Jasco J810 utilizando cubetas de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico y capacidad para 200 μL , de Hellma.

Procedimiento. Se utilizaron vesículas lipídicas de tipo SUVs, ~ 50 nm de radio hidrodinámico, siendo siempre la concentración lipídica < 4 mM para evitar artefactos debidos a la alta dispersión de la luz a bajas longitudes de onda. Los espectros se registraron en modo continuo a través de 5 acumulaciones, con una sensibilidad de 100 mdeg, un intervalo de longitudes de onda de 190 nm a 250 nm, un tiempo de respuesta de 0.5 s y un ancho de banda de 1 nm. En todos los experimentos donde la concentración de péptido se mantuvo constante, esta fue de 30 μM . Cada espectro obtenido fue procesado con ayuda del propio programa de Jasco para sustraer el “blanco” (espectro de vesículas sin péptido, en las mismas condiciones), corregir la línea de base y transformar los valores de elipticidad, θ en elipticidad molar

por residuo, $[\theta]^{MR}$. El análisis de los datos para obtener porcentajes de distintos componentes de estructura secundaria se hizo a través del servicio DichroWeb [166, 167],⁶ utilizando los algoritmos SELCON3 y CONTINLL, con diversos *sets* de datos [163, 165, 168, 169].

2.5 Experimentos en vesículas lipídicas individuales

2.5.1 Microscopía confocal láser de barrido (LSCM)

La óptica confocal ha emergido como una solución a la degradación de la calidad de imagen provocada tanto por la contaminación lumínica (luz procedente de fuera del foco de visión) como por la pérdida de luz emitida desde el propio foco de visión. El principio de microscopía confocal tiene más de medio siglo de antigüedad, ya que fue desarrollado por MARVIN MINSKY en el año 1957 [170]. Su esencia radica en que el paso de luz de excitación y el de detección comparten un plano focal común, lo cual se logra mediante dos agujeros (*pinholes*) equidistantes con respecto al objeto de observación (Fig. 2.6). Como consecuencia, la luz que llega al detector proviene predominantemente de un plano focal muy estrecho: Metafóricamente, es como si se realizara un “corte óptico” de la muestra.

Otro aspecto importante en lo referente a la microscopía confocal es que la iluminación es puntual, de manera que para conformar imágenes completas es necesario realizar un barrido (*escaneo*) del plano focal. Esta característica, unida a la presencia del “pinhole” en frente del fotomultiplicador, mejoran la resolución significativamente en comparación con la microscopía convencional. Mediante este tipo de microscopía es posible también realizar reconstrucciones en tres dimensiones, a través de la captura de imágenes secuenciales en la dimensión *z*.

En nuestra investigación, hemos empleado esta metodología con dos objetivos principales: En primer lugar, para visualizar el tránsito hacia el interior vesicular de marcadores fluorescentes, como medida indirecta de la acción del péptido sobre la membrana y con el propósito añadido de obtener cinéticas que nos permitan cuantificar su actividad (Fig. 2.7). En segundo lugar, para estudiar los cambios morfológicos que ocurren en la membrana debido a la acción de los péptidos. En ambos casos, es indispensable una buena calidad de imagen que nos permita discernir entre pequeñas variaciones de intensidad de luz de emisión y que a su vez permita la observación de las estructuras presentes con la mayor resolución espacial posible.

2.5.2 Difusión de marcadores a través de la membrana

Reactivos. Las sondas fluorescentes utilizadas en experimentos de intercambio de contenidos a través de la membrana fueron Alexa488, Alexa555 y Alexa647, (todas de Molecular Probes), así como dextranos conjugados con fluoresceína o rodamina

⁶ DichroWeb: *On-line analysis for protein Circular Dichroism spectra* (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>).

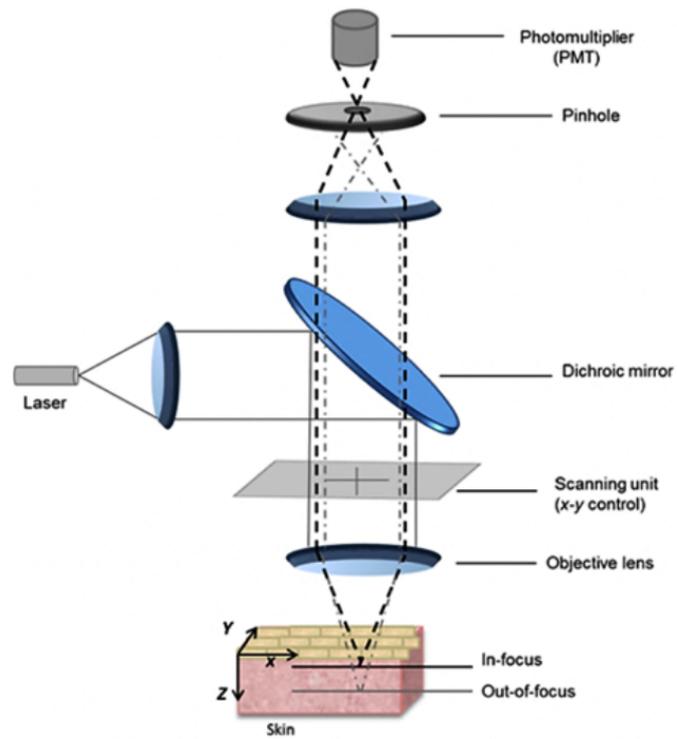


Fig. 2.6: Principio de microscopia confocal de fluorescencia (imagen tomada de https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_8.htm)..

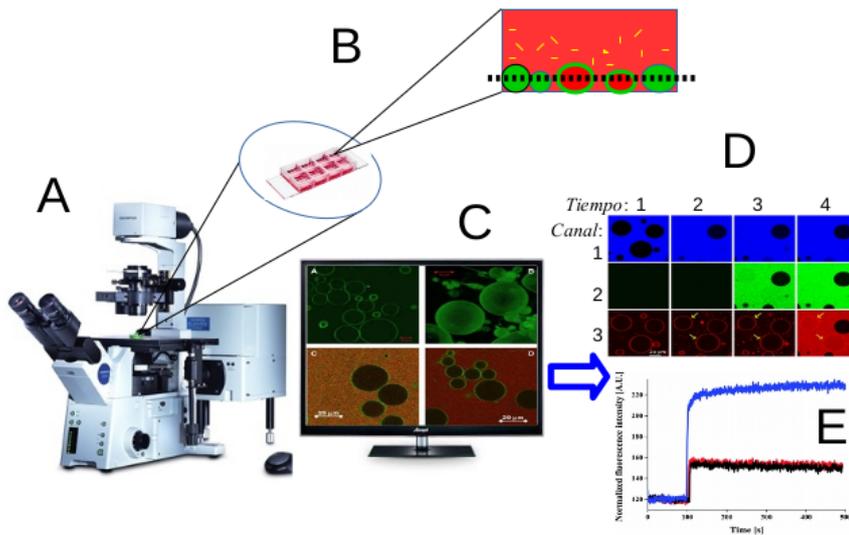


Fig. 2.7: Representación esquemática del método de estudio de la permeabilización de GUVs individuales mediante microscopia confocal de fluorescencia. En un microscopio de fluorescencia invertido (A) se colocan las muestras en cámaras de observación con fondo transparente, en las que las GUVs han sedimentado depositándose en el fondo (B). Las imágenes de GUVs sedimentadas se registran en formato digital utilizando distintos canales de excitación/emisión (C) y se analizan posteriormente con ayuda de programa de un programa informático (D). Normalmente se registran videos con imágenes en intervalos de tiempo de 6.5-10 s, de los cuales pueden extraerse fácilmente cinéticas de la variación temporal de la intensidad de emisión fluorescente en cada canal, medidas sobre un área delimitada del plano focal (E).

2 Materiales y Métodos

B de 10, 20 o 40 KDa (FD10, FD20 o FD40, respectivamente), de Molecular probes. Se llevó a cabo el ensayo de los péptidos Bax- $\alpha 5^{wt}$ y Bax- $\alpha 56^{wt}$ no marcados, así como versiones de estos péptidos marcados con sondas fluorescentes: Bax- $\alpha 5^{A1488}$, Bax- $\alpha 5^{A1555}$, Bax- $\alpha 56^{A1488}$, Bax- $\alpha 56^{A1555}$. Las vesículas lipídicas fueron GUVs, preparadas como se explica en el apartado en la **Sec. 2.1.2**, de dos composiciones lipídicas distintas: POPC puro y POPC:CL (80:20). Dichas GUVs contenían también en sus membranas un 0,05% (relación molar con respecto al total de lípidos) de marcador fluorescente lipofílico DiI, DiO, DiD, o NBD-PE (**Sec. 2.1.2**). La BSA, empleada para pasivar la cámara de observación, era de Sigma-Aldrich.

Equipamiento. Los experimentos se llevan a cabo mediante microscopia de fluorescencia. Se empleó una microcámara de observación de 8 pocillos de Ibidi y un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV1000, montado sobre un estativo IX81 invertido motorizado. Las líneas de excitación utilizadas en este equipo fueron láseres de 488 nm (Ar ion), 559 nm (He-Ne) y 635 nm (diodo). En los experimentos se empleó un objetivo de inmersión en aceite de 40 \times de 1.3 NA. Las imágenes fueron grabadas en modo multicanal. Típicamente, el primer canal correspondía a excitación a 488 nm, en el segundo canal se excitó con luz láser de 559 nm y la luz de emisión se filtró a través de un paso de banda de 560-615 nm. El tercer canal se utilizaba para excitar a 635 nm. Las imágenes se recogían con una cámara CCD en escala de grises a intervalos de tiempo de 6.8-7.5 s. Para su representación en algunos casos las imágenes se pseudo-colorearon en rojo (*canal 1*), verde (*canal 2*) o azul (*canal 3*).

Procedimiento. Para evitar la adsorción inespecífica de los péptidos a las paredes de la cámara de observación, ésta se incubó con 400 μ l de BSA a 2 mg/ml en PBS durante 30 min y a continuación se lavó con agua miliQ para eliminar la BSA no unida. Después se montaba la cámara de observación en el microscopio y se agregaban los siguientes componentes, de manera secuencial: 450 μ l de PBS, 2 marcadores fluorescentes (cuya difusión hacia el interior de las GUVs, a través de la membrana, deseamos registrar) a una concentración final de 1 μ M y la cantidad apropiada de péptido (marcado o no, según cada caso) para obtener la relación P/L molar teórica aproximada de 1/80. La disolución obtenida se homogeneizaba y se adicionaban 50 μ L de la suspensión de GUVs. A partir del momento de adición de las vesículas se comenzaba la observación microscópica, a la vez que se esperaba hasta que las GUVs sedimentaban en el fondo de la cámara de observación, lo cual contribuye a su fijación y facilita la selección del plano de enfoque [64, 171]. Una vez sedimentadas las GUVs, se localizaba y enfocaba un campo de visión con un número suficiente de vesículas, en el que éstas se encontraban bien dispersas, y se inicia la grabación de un video de ~ 2 h de duración con intervalos fijos entre 6.8 a 7.5 s entre imágenes (dependiendo de cada caso), con el objetivo de registrar simultáneamente en canales distintos las cinéticas de entrada al interior de las GUVs de los marcadores fluorescentes presentes en la cámara de observación (normalmente **dextrano** con marcaje fluorescente y una sonda de tipo **Alexa**). En los casos en que el péptido

estaba marcado fluorescentemente, se procuró también registrar la cinética de su unión a la membrana.

Para estudiar la estabilidad temporal de los poros se registraron cinéticas de nueva entrada de marcadores en vesículas donde había ocurrido una primera entrada. Para ello, se realizó un fotoblanqueo sitio-específico sobre el interior de GUVs seleccionadas, que contenían marcador fluorescente en su interior, y se registró luego la cinética de recuperación de la fluorescencia. Todas las imágenes fueron analizadas con ayuda del programa ImageJ⁷, utilizando el “*plug-in*” Time Series Analyzer. La metodología para el análisis y el estudio de las cinéticas se exponen a continuación.

2.5.3 Remodelado de membranas de GUVs

Los estudios de cambio dinámico de la morfología de vesículas se llevaron a cabo también mediante microscopia confocal de fluorescencia. Los reactivos y forma de preparar las GUVs fueron los mismos que los utilizados en estudios de permeabilidad (Sec. 2.1.2). Igualmente, utilizamos también el mismo equipamiento de microscopia (Sec. 2.5.2). En cuanto al procedimiento experimental, la preparación de muestras en la cámara de observación y las condiciones de microscopia fueron las ya descritas (Sec. 2.1.2), exceptuando la utilización en algunos casos de un *cuatro* canal dedicado a obtener imágenes por contraste de fases así como el registro de imágenes tridimensionales de las GUVs a través de variaciones de la dimensión z .

2.6 Análisis de las cinéticas

2.6.1 Fundamentos del fenómeno de difusión

Ley de Fick

El flujo *difusivo* de moléculas en disolución (J_s) se define como un transporte *neto* pasivo, por unidad de tiempo, a través de una unidad de área de una barrera imaginaria (masa o número de moléculas que atraviesan dicha barrera) que separa dos puntos de la disolución entre los cuales existe distinta concentración [172]. Tiene por lo tanto dimensiones de $\text{cantidad} \times \text{tiempo}^{-1} \times \text{area}^{-1}$, donde *cantidad* se refiere al número de partículas, moles o masa de la molécula considerada ($\text{flujo} \equiv \text{mol}/\text{s m}^2$). La difusión de moléculas en disolución ocurre *individualmente* de manera *aleatoria* (movimiento browniano [173, 174]). Para un *conjunto* de moléculas, si existe en la disolución (considerada ideal) un *gradiente de concentración*, éste actúa como una fuerza impulsora, cuyo origen es entrópico, y origina un *transporte neto* de moléculas desde puntos de mayor concentración hacia puntos vecinos de menor concentración. Las teorías principales para entender y analizar el fenómeno de difusión son las leyes de FICK y la ecuación de

⁷ ImageJ, *Image Processing and Analysis in Java* (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

STOKES-EINSTEIN.⁸

La *primera ley de FICK* (1855 [175, 176]) es una *postulado fenomenológico* cuantitativo que explica la difusión de moléculas en disolución [177]. Se basa en trabajo previo de THOMAS GRAHAM, a cerca de la difusión de sales en agua [178] y en la analogía apreciada por FICK entre dicha difusión y las conducciones de calor o electricidad. De hecho FICK usará para su ley una formulación matemática análoga a la ley desarrollada por FOURIER para la conducción de calor (1822), de manera que postula que el flujo de de un determinado soluto, J_s es proporcional al gradiente de su concentración:

$$J_s = -D_s \frac{dC_s}{dx} \quad (2.6)$$

La constante de proporcionalidad resulta ser el *coeficiente de difusión* (o difusividad, D_s , en $m^2 \times s^{-1}$). La ley de FICK considera D_s como una constante, lo que implica asumir un medio homogéneo isotrópico.

En su expresión clásica se trata de un tratamiento *monodimensional*, en el que la coordenada- x corresponde a la dirección del flujo y del gradiente de concentración (ambos vectoriales), perpendicular al plano de la barrera (imaginaria o no) que separa dos puntos entre los cuales ocurre la difusión. La ley de FICK puede deducirse a partir de la ecuación de TEORELL [179, 180], según la cual el flujo de un soluto es el producto de su *movilidad* por su *concentración* y por *la fuerza motriz* [172]. Para disoluciones ideales de solutos no iónicos, la fuerza motriz puede expresarse en función del gradiente de concentración. Por su parte, la movilidad del soluto se relaciona con D_s a través de la relación de EINSTEIN (1905 [181, 182]).

Ecuación de Stokes-Einstein

Para el estudio de la difusión puede utilizarse también una *aproximación atomística*, partiendo del movimiento aleatorio de partículas en suspensión. Dicho movimiento fue observado mediante microscopía por BROWN en 1827 (movimiento *Browniano* [173]) y explicado después por EINSTEIN [174, 181–183], quien supo entender que el desplazamiento que sufren partículas o moléculas en disolución se debe a impactos con moléculas del solvente, los cuales producen fuerzas fluctuantes cuya resultante es un desplazamiento (*paseo*) aleatorio. EINSTEIN relacionó el desplazamiento cuadrático medio debido al movimiento Browniano con el coeficiente de difusión de la partícula. Anteriormente [182, 183], tomando como base la ecuación de STOKES, y coincidiendo con un desarrollo análogo de SUTHERLAND [184], había encontrado una expresión del coeficiente de difusión en función de la densidad, η de la disolución y del tamaño de la partícula (así como de la forma de esta, ya que se asume como esférica), conocida como la ecuación de

⁸ Adicionalmente, los movimientos de masa en un líquido pueden ocurrir por convección, que es en realidad una transferencia de calor en el medio líquido (o gaseoso) entre zonas de distinta temperatura. Cuando se llevan a cabo medidas de difusión es necesario cuidar de que no existen en la muestra gradientes de temperatura.

STOKES-EINSTEIN:⁹

$$D = \frac{R}{N_a} \frac{T}{6\pi\eta r_h} = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (2.7)$$

donde R es la constante de los gases, N_a el número de AVOGADRO, k_B la constante de BOLTZMANN, T la temperatura en grados Kelvin y r_h el radio *hidrodinámico*¹⁰ de la partícula o molécula, considerada esférica.

La *ecu. 2.7* es válida para el caso de moléculas cuyo tamaño es grande comparado con las moléculas del solvente. Utilizando esta ecuación puede determinarse fácilmente el radio hidrodinámico de un soluto si se conoce su coeficiente de difusión a una temperatura dada y la viscosidad de la disolución a la misma temperatura. Igualmente, conocidos los valores de r_h y η a una temperatura dada puede determinarse el coeficiente de difusión.

Durante el desarrollo de esta Tesis hemos utilizado valores de r_h y D correspondientes a distintas sondas fluorescente, generalmente extraídos de la literatura o calculados como se ha explicado, utilizando la *ecu. 2.7*. Dado que los datos publicados no siempre corresponden a la temperatura de interés, puede utilizarse la siguiente ecuación empírica para calcular η (en $Pa \times s$) para cualquier temperatura T expresada en Kelvin:

$$\eta(T) = 2.414 \times 10^{-5} \times 10^{247.8/(T-140)} \quad (2.8)$$

Así mismo, con el valor de $\eta(T)$ obtenido, se puede llevar a cabo la conversión de un valor de D a una temperatura dada, $D(T_0)$, al valor correspondiente a la temperatura de interés (en Kelvin) utilizando la siguiente función empírica:

$$D(T) = D(T_0) \frac{T}{T_0} \frac{\eta(T_0)}{\eta(T)} \quad (2.9)$$

2.6.2 Flujo a través de una membrana

Para aplicar la ley de FICK al estudio del flujo a través de una membrana de espesor m es necesario integrar la *ecu. 2.6* con respecto a la variable espacial x entre dos puntos correspondientes a ambos lados de la membrana: $x = 0$, donde la concentración es C_s^I y

⁹ El desarrollo de WILLIAM SUTHERLAND fue coincidente en tiempo y forma con el de EINSTEIN, y de hecho la ecuación final también se conoce como ecuación de STOKES-EINSTEIN-SUTHERLAND. La importancia de esta relación es enorme. Por un lado tiene un gran valor práctico, ya que permite caracterizar el tamaño de partículas y moléculas en disolución o en suspensión. Pero su mayor valía se debe a que dio el espaldarazo definitivo a la teoría atómica, al permitir determinaciones independientes del número de AVOGADRO (lo que en la práctica equivale a poder “contar” átomos).

¹⁰ El concepto de radio hidrodinámico, conocido también como *radio de STOKES*, se utiliza generalmente en el caso de polímeros, refiriéndose a su radio efectivo en una disolución determinada, teniendo en cuenta la dinámica de la cadena y las moléculas del solvente e iones asociados a ella. Literalmente, corresponde al radio de una esfera que difundiría en la disolución con arreglo al mismo valor de D que la molécula considerada. En la mayoría de los casos es una magnitud empírica, determinada normalmente mediante cromatografía de exclusión molecular. Puede determinarse también mediante un análisis teórico de la dinámica del polímero en disolución y es similar en magnitud al *radio de giro*.

2 Materiales y Métodos

$x = m$, donde la concentración es C_s^{II} . Para $C_s^I > C_s^{II}$ el resultado de dicha integración es:¹¹

$$J_s = \frac{D_s}{m} (C_s^I - C_s^{II}) \quad (2.10)$$

donde la fracción $\frac{D_s}{m} = p_s$ es la *permeabilidad* del soluto a través de una unidad de área de la membrana, definida como el flujo por unidad de diferencia de concentración entre ambos lados de la misma.¹² Esta expresión es comúnmente utilizada para estudios de permeabilidad a través de membranas biológicas. Supone que ocurre *difusión libre* e implícitamente asume que tanto J_s como D_s son independientes de x , así como que el flujo es igual a través de cualquier unidad de área de la membrana [172].¹³

Velocidad de flujo

En estudios de difusión a través de membranas se utiliza con frecuencia la asunción de *estado estacionario*, que implica que las concentraciones entre dos puntos considerados (a ambos lados de la membrana) no cambian con el tiempo. Dicha aproximación es válida si los volúmenes de los dos espacios que separa la membrana son muy grandes. Sin embargo, en este trabajo estudiaremos el proceso de transporte hacia o desde el interior de un compartimento cerrado (vesículas lipídicas) cuyo volumen interior es definido y relativamente pequeño. Asumiremos, eso sí, que todas las partes del volumen interior son en todo momento equivalentes, lo que equivale a su mezcla instantánea durante el proceso de transporte.

Comenzamos considerando vesículas formadas por una membrana lipídica permeable, homogéneamente en toda su extensión, a un determinado soluto (**Fig. 2.8 A**). Si existe una diferencia de concentración entre el exterior y el interior de la vesícula existirá un flujo J_s en la dirección del gradiente de concentración (*ecu. 2.6*). Dado que el volumen interior de cada vesícula es finito y pequeño, la cantidad de soluto en el interior variará en virtud del flujo. Sin embargo, en el exterior de la vesícula, cuyo volumen es mucho mayor, la cantidad de soluto puede considerarse constante. La velocidad de cambio del número de moles del soluto en el interior de la vesícula (velocidad de difusión) es:

¹¹ Una expresión análoga a la *ecu. 2.10* puede deducirse de una forma sencilla e independiente de la ley de FICK, utilizando un razonamiento basado en la ley de acción de masas, de la forma siguiente: El flujo de una determinada molécula desde un punto en el que se encuentra a concentración c^I es proporcional a dicha concentración ($J^I = \Lambda c^I$). Igualmente, el flujo desde otro punto donde la concentración sea c^{II} es $J^{II} = \Lambda c^{II}$. Siendo $c^I > c^{II}$, el flujo neto entre los dos puntos será $J = J^I - J^{II} = \Lambda(c^I - c^{II})$. Λ es una constante de velocidad que corresponde a lo que arriba hemos definido como permeabilidad.

¹² $p_s = \frac{J_s}{C_s^{out} - C_s^{in}}$, con unidades $\frac{mol\ s^{-1}\ m^{-2}}{mol\ m^{-3}} = \frac{m}{s}$ (normalmente $cm\ s^{-1}$).

¹³ La permeabilidad a través de toda la vesícula, con área A , es $P_s = p_s A$, en $m^3\ s^{-1}$. En principio, y en el sentido más general, se considera una membrana homogénea que el soluto puede atravesar por igual a través de cualquier punto de su superficie, y a dicha permeabilidad se refieren tanto P_s como D_s . Sin embargo, si en la membrana hay poros o intersticios, atravesados por la disolución acuosa que ocupan una fracción f^p del área total de la membrana, la difusión ocurre a través de dichos poros con una permeabilidad $P_s^p = f^p P_s$ y un coeficiente de difusión que se asemeja al de la disolución libre, $D_s^p \equiv D_s^l$ [172].

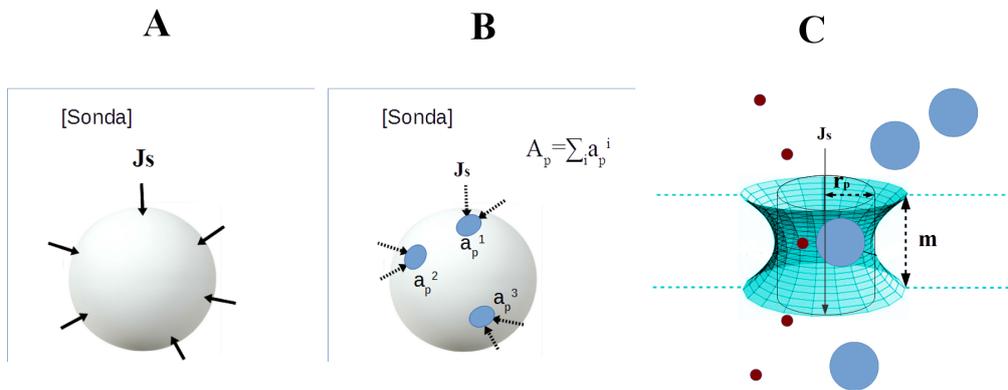


Fig. 2.8: Esquema general del estudio de la difusión a través de la membrana de una vesícula lipídica. (A) La vesícula es un compartimento cerrado, con un volumen finito (V) y relativamente pequeño comparado con el volumen exterior de la disolución circundante. Un soluto con cierta capacidad para atravesar la bicapa lipídica, en este caso presente a tiempo cero solo en el exterior, será transportado al interior de la vesícula con un flujo J_s que viene dado por la primera ley de Fick (*ecu. 2.6*). El flujo neto se mantendrá hasta que se alcance el equilibrio (cuando las concentraciones exterior e interior se igualen). En el proceso cinético de equilibrado la concentración exterior puede considerarse como constante. Sin embargo, la concentración interior varía de forma exponencial (*ecu. 2.13*), con una constante de velocidad k_s que depende de la relación A/V (*área/volumen* = $3 \times \text{radio}$, de la vesícula) y del coeficiente de difusión a través de la membrana. (B) Si en la vesícula existen poros acuosos, la difusión ocurre preferentemente a través de ellos. En este caso la constante de velocidad de reequibrado del interior de la vesícula depende del área total ocupada por los poros, A^p , igual a la suma del área de los poros individuales, y de el coeficiente de difusión a través de los poros. (C) Geometría de los poros considerados en este trabajo. Se trata de poros lipídicos de geometría toroidal, aunque se aproximan como cilíndricos, con un radio efectivo r_p y una longitud (m) igual a la anchura de la membrana. La difusión a través de los poros corresponde a regímenes distintos según sea la relación entre el radio hidrodinámico de la molécula que difunde y el radio del poro ($r_{s,h}/r_p$, ver *Sec. 2.6.3*).

$$\frac{dn_s^{in}}{dt} = J_s A \quad (2.11)$$

donde A es la superficie de la vesícula. Si el volumen de la vesícula es V , la concentración del soluto en el interior es $C_s^{in} = n_s^{in}/V$, y teniendo en cuenta la [ecu. 2.10](#) reescribimos la [ecu. 2.11](#) como:

$$V \frac{dC_s^{in}}{dt} = \frac{D_s}{m} (C_s^{out} - C_s^{in}) A \quad (2.12)$$

Admitiendo que C_s^{out} es constante, como hemos justificado arriba, para el caso en que la concentración inicial del soluto en el interior de la vesícula sea nula ($C_s^{in}(0) = 0$) ésta aumentará con el tiempo hasta equilibrarse finalmente con la concentración exterior ($C_s^{in}(\infty) = C_s^{out}$). Por lo tanto, de la integración entre $t = 0$ y $t = \infty$ de la [ecu. 2.12](#) resulta una función exponencial:

$$C_s^{in}(t) = C_s^{out} (1 - e^{-k_s t}) \quad (2.13)$$

en la cual, la constante de velocidad k_s (s^{-1}) del proceso de equilibrado del interior de la vesícula viene dada por:

$$k_s = \frac{A D_s}{V m} \quad (2.14)$$

Como puede apreciarse, el valor de k_s depende de la relación $\frac{\text{Superficie}}{\text{Volumen}}$ de la vesícula (A/V). Si la membrana es igualmente permeable en toda su extensión, la superficie de interés corresponde al área total de la vesícula; es decir, $k_s = \frac{3}{R} \frac{D_s}{m}$, donde R es el radio de la vesícula. Sin embargo, en nuestro caso la difusión ocurre a través de *poros* que ocupan una cierta fracción de la superficie de la membrana ([Fig. 2.8 B](#), ver también [nota3 en la página 62](#)):

$$f^p = \frac{A^p}{A} \quad (2.15)$$

donde A^p es la suma del área individual de todos los poros de la vesícula. Teniendo esto en cuenta, la velocidad de variación de la concentración de soluto en el interior de la vesícula, debido al paso a través de los poros es:

$$k_s^p = \frac{A^p D_s^p}{V m} \quad (2.16)$$

siendo D_s^p el coeficiente de difusión a través de los poros. Aunque, como veremos, los poros estudiados aquí son de tipo *lipídico*, y por tanto con una geometría *toroidal* [[87](#), [185](#)], serán aproximados a una geometría ideal cilíndrica, cuyas dimensiones se caracterizan por un radio r^p , una sección $a^p = \pi r_p^2$ y una longitud m , asumida igual a la anchura de la membrana ([Fig. 2.8 C](#)).

Los poros son *acuosos* y asumiremos que en su interior las propiedades de la disolución son idénticas a las de la disolución libre. Ello implica, por ejemplo, que la solubilidad

del soluto en el interior de los poros no difiere de su solubilidad en el medio libre de la disolución. Además, siempre que el tamaño del soluto pueda considerarse pequeño en relación al tamaño de los poros (**Sec. 2.6.3**), se asumirá que no existen interacciones entre el soluto y las paredes de éstos y que la difusión se aproxima a su difusión libre ($D_s^p \equiv D_s^{libre}$). También ha de tenerse en cuenta la complejidad de la organización del solvente en la proximidad de ambos lados de la membrana, en concreto la existencia de la llamada *capa de difusión*. En cuanto a esto, asumimos que las concentraciones en la capa de difusión se aproximan a las correspondientes concentraciones libres [172].

Velocidades de flujo en vesículas lipídicas individuales

Como hemos descrito (**Sec. 2.5.2**), para estudiar la permeabilidad de vesículas lipídicas individuales estudiamos mediante microscopia la variación de la concentración de marcadores en el interior de GUVs. Dado que la concentración del marcador es proporcional a su emisión de fluorescencia, la **ecu. 2.13** puede ser utilizada para analizar cinéticas directamente a partir de valores de fluorescencia medidos en un microscopio. Para mayor claridad empleamos valores normalizados de la fluorescencia, $F_{in}^N(t)$:

$$F_{in}^N(t) = (1 - e^{-kt}) \quad (2.17)$$

Para el caso de permeabilización de membranas inducida por péptidos, se observa con frecuencia [64, 171] que al comienzo de cada cinética la velocidad de variación de la concentración del marcador es mayor que hacia el final de la cinética. Es decir, k es función del tiempo y puede expresarse a través de un decaimiento exponencial desde un valor grande inicial (k_0) hasta un valor final más pequeño (k_∞), con tiempo de relajación τ_{rel} :

$$k(t) = k_\infty + (k_0 - k_\infty) e^{-t/\tau_{rel}} \quad (2.18)$$

Teniendo esto en cuenta, e integrando de nuevo la **ecu. 2.12** se obtiene la siguiente exponencial:

$$F_{in}^N(t) = (1 - e^{-t k'(t)}) \quad (2.19)$$

donde $k'(t)$ viene dada por:

$$k'(t) = k_\infty + (k_0 - k_\infty) \frac{1}{\tau_{rel}} (1 - e^{-t/\tau_{rel}}) \quad (2.20)$$

2.6.3 Difusión restringida: Estimación del tamaño de los poros

El paso de un soluto determinado a través de poros discretos puede ocurrir en regímenes diferentes dependiendo de su radio en relación con el radio de los poros, $r_{s,h}/r_p$ [172] (**Fig. 2.8**). Cuando $r_{s,h} \ll r_p$ (en general para $r_{s,h}/r_p < 0.05$), puede asumirse *difusión libre* a través del poro y es aplicable lo descrito en la sección anterior. Sin embargo, para $0.05 < r_{s,h}/r_p < 0.5$ se considera *difusión restringida* debido a efectos estéricos y de resistencia

2 Materiales y Métodos

viscosa ejercidos por las paredes del poro. Por último, para $0.5 < r_{s,h}/r_p$ la restricción a la difusión es mucho mayor ya que las moléculas de soluto deberán difundir ordenadas en *hileras* e interaccionando con las paredes del poro.

Para el régimen de difusión restringida se han propuesto modelos que tienen en cuenta efectos estéricos y de viscosidad ejercidos por las paredes del poro y que pueden utilizarse para llevar a cabo una estimación del tamaño de los poros [186–190], o bien su densidad en la membrana [191]. El efecto estérico actúa limitando el área de difusión de un determinado soluto a través del poro [172], de manera que su valor efectivo $a_{s,r}^p$ es menor que el área libre del poro (a^p) de acuerdo con la ecuación¹⁴:

$$\frac{a_{s,r}^p}{a^p} = \left(1 - \frac{r_{s,h}}{r_p}\right)^2 \quad (2.21)$$

Por su parte, los efectos de viscosidad puede considerarse que actúan reduciendo el coeficiente de difusión del soluto ($D_{s,r}^p$) con respecto al que correspondería al paso por los mismos poros sin restricción (D_s^p), de acuerdo con el siguiente polinomio empírico [172]:

$$\frac{D_{s,r}^p}{D_s^p} = 1 - 2.104 \left(\frac{r_{s,h}}{r_p}\right) + 2.09 \left(\frac{r_{s,h}}{r_p}\right)^3 - 0.95 \left(\frac{r_{s,h}}{r_p}\right)^5 \quad (2.22)$$

Si se tienen en cuenta ambos efectos, la velocidad en régimen de difusión restringida ($k_{s,r}^p$) con respecto a valores teóricos de difusión libre (en poros del mismo tamaño, k_s^p) sería:

$$\frac{k_{s,r}^p}{k_s^p} = \frac{a_{s,r}^p D_{s,r}^p}{a^p D_s^p} = \left(1 - \frac{r_{s,h}}{r_p}\right)^2 \times \left[1 - 2.104 \left(\frac{r_{s,h}}{r_p}\right) + 2.09 \left(\frac{r_{s,h}}{r_p}\right)^3 - 0.95 \left(\frac{r_{s,h}}{r_p}\right)^5\right] \quad (2.23)$$

Las consecuencias esperables para los límites correspondientes a difusión restringida ($0.05 < r_{s,h}/r_p < 0.5$) se resumen en la **Tabla 2.3**. Estas estimaciones *clásicas* son muy aproximadas y probablemente sobrestiman el efecto restrictivo ejercido por los poros sobre la difusión de la sonda [190, 192], por lo que su utilización para determinar el radio de los poros es arriesgada.¹⁵ Sin embargo, son útiles para llevar a cabo estimaciones sobre el tipo de régimen de difusión aplicable en nuestro caso.

¹⁴ El subíndice r indica que se trata de difusión restringida, cuyo efecto depende del tipo de soluto, lo que se indica con el subíndice s . Nótese que para el valor de área libre del poro (independiente del soluto) no se usa ningún subíndice.

¹⁵ Hay de tener en cuenta que la parametrización de estas expresiones corresponde a poros en membranas de celulosa [186, 187] los cuales son relativamente rígidos. El modelo se ha usado para estudiar la difusión de solutos relativamente pequeños a través de canales proteicos [189, 191], como α -hemolisina (con un radio de poro de ~ 0.7 nm), que por su naturaleza (composición y estructura) tamaño y dinámica en principio no son comparables con los poros estudiados aquí.

Tab. 2.3: Efecto teórico esperado en régimen de difusión restringida para valores límite del radio hidrodinámico del soluto, con respecto al radio de los poros del 5% y el 50%.

r_h/r_p	$\frac{a_{ster}^p}{a^p}$	$\frac{D_{s,visc}^p}{D_s^p}$	$\frac{k_{s,res}^p}{k_s^p}$
0.05	0.90	0.89	0.80
0.5	0.25	0.18	0.04

3 Estructura e interacciones de Bax- α 5 y Bax- α 56 en la membrana

En péptidos membrano-activos, la funcionalidad está íntimamente relacionada con su plasticidad estructural y su capacidad de interacción, tanto con la membrana, como entre moléculas péptidicas. En general, el resultado de la asociación de oligopéptidos con membranas es la inducción en los primeros de estructura secundaria [193]. Las membranas, por su parte, son receptáculos con una alta capacidad de cambio, donde la composición lipídica juega un rol determinante en su dinámica [194, 195]. Como resultado de su interacción, ambos son modificados mutuamente bajo la influencia de leyes físico-químicas, tales como el efecto hidrofóbico o el ajuste (*matching*) hidrofóbico. Teniendo en cuenta todos estos aspectos, es evidente que los estudios tanto de la estructura peptídica como de la interacción péptido-membrana, son de vital importancia para entender los mecanismos de acción mediante los cuales estos sistemas llevan a cabo su actividad.

En este capítulo caracterizaremos de forma semicuantitativa la asociación de los fragmentos Bax- α 5 y Bax- α 56 (derivados de la proteína pro-apoptótica Bax) con membranas lipídicas y los cambios conformacionales que ocurren como consecuencia de dicha interacción. En primer lugar se investigan las transiciones conformacionales de los péptidos en distintos entornos. A continuación se analiza su asociación con membranas, haciendo énfasis de forma paralela en la influencia de la composición lipídica. Para lograr tales metas nos apoyamos en métodos clásicos, como la espectroscopía de dicroísmo circular y la espectroscopía de fluorescencia. En cuanto a esta última, hemos explotado el uso de fluoróforos tanto intrínsecos, o residuos de Trp presentes en la secuencia natural, como extrínsecos, en concreto 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD) o pireno. Otro de los temas que entra en discusión en este capítulo es la remodelación lipídica a que se ve sometida la membrana por parte de los péptidos, estudiada después con detalle en el **Cap. 5**. Finalmente, haremos una breve discusión general donde se integran todas estas cuestiones.

3.1 Péptidos objeto de estudio. Propiedades físico-químicas

Bax- α 5 y Bax- α 56 fueron obtenidos mediante síntesis química semiautomática (descrita para el primero de ellos en la **Sec. 2.2.1**). En un contexto biológico, ambos forman parte de la zona donde se concentra la actividad de membrana en la proteína de la cual proceden (hélices α 5 y α 6 de Bax), y de hecho los fragmentos correspondientes cuando son separados del resto de la proteína interactúan fuertemente con membranas [197].

Bax- α 5 (residuos 107 a 128 de la secuencia proteica, **Tabla 3.1**) puede ser considerado como un polímero lineal anfipático policatiónico (**Fig. 3.1 A**). Es sin duda el péptido más

3.1 Péptidos objeto de estudio. Propiedades físico-químicas

estudiado y mejor conocido por nuestro grupo, que anteriormente ha demostrado que dicho fragmento es capaz de reproducir la actividad formadora de poros de la proteína completa [1, 171], así como que presenta actividad antiapoptótica y anticancerígena [3]. Sus principales propiedades físico-químicas se resumen en la **Tabla 3.1**. La estructura de Bax- $\alpha 5$ ha sido investigada anteriormente mediante CD [64], donde se pudo observar un plegamiento preferencial en hélice α adoptado en medio lipídico (vesículas de POPC y POPC:CL (80:20) y lípido-mimético (TFE y HFIP) a baja fuerza iónica (~ 10 mM), alcanzando alrededor de un 68% de componente α -helicoidal. Es también interesante que para este fragmento se ha propuesto un posible motivo estructural de dimerización del tipo *small-XXX-small* (*G-RVV-A*) cerca de su extremo N-terminal [64].

Bax- $\alpha 56$ (residuos 118 a 146 de la secuencia de Bax) incluye parte de las dos hélices y el giro que conecta ambas en la horquilla $\alpha 5$ - $\alpha 6$ de la proteína. Si llevamos a cabo una predicción de su estructura mediante modelado por homología [200, 201], observamos un acodamiento que separa las partes que corresponden a los fragmentos $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (**Fig. 3.1 B**); es decir, coincidiendo con el giro entre las dos hélices tanto en la estructura de Bax en disolución [202] como en la estructura dimérica de la proteína en membranas [119]. Esto no es extraño, ya que la zona inter-hélice cuenta con Pro junto a otros residuos estabilizadores de giros [197] y guarda cierta similitud con el acodamiento estructural de melitina [203].¹ Por otro lado, versiones anteriores de fragmentos activos de Bax utilizadas en nuestro grupo, aunque denominadas “ $\alpha 5$ ” incluían parte de la hélice $\alpha 6$ y en cierto modo se asemejan al péptido Bax- $\alpha 56$ estudiado aquí [1, 34, 207, 208].² Para estas versiones se han medido también espectros de CD en medios lípidomiméticos [34, 207] y ATR-FTIR en membranas soportadas sobre cristal de germanio, encontrándose en este último caso dos fragmentos α -helicoidales con distinta orientación que fueron atribuidos a distintos modos de interacción con la membrana de las hélice $\alpha 5$ y $\alpha 6$ [1, 208].

Desde el punto de vista físico-químico, la propiedad más significativa de Bax- $\alpha 5$ y Bax- $\alpha 56$ es su marcado carácter anfipático, visible tanto en la disposición espacial de los residuos (**Fig. 3.1**) como en valores calculados del momento hidrofóbico (**Tabla 3.1**), en ambos casos asumiendo una estructura helicoidal hipotética a lo largo de toda la molécula. En representaciones de rueda helicoidal de EDMUNDSON [198] se distinguen dos caras (*polar / hidrofóbica*) claramente diferenciadas. Sin embargo, las características de dichas caras son distintas entre los dos péptidos, ya que Bax- $\alpha 56$ presenta una sección hidrofóbica particularmente rica en Leu, que no aparece en Bax- $\alpha 5$, lo que incluso podría sugerir la presencia en el primero de una cremallera de leucinas [209, 210].

¹ El paralelismo entre la melitina y fragmentos activos de Bax se extiende también al terreno funcional. Así, Bax- $\alpha 5$ y melitina forman poros muy similares [204, 205]. De melitina también se ha descrito que presenta actividad apoptótica en células gástricas cancerosas humanas inducida por vía mitocondrial [206].

² Las secuencias de aquellas versiones del péptido eran: Ac-DGNFNWGRVVALFYFASKLVLKALSTKVPELIRT-NH₂ [34, 207] o Ac-KGRVVALFYFASKLVLKALSTKVPELIRTK-NH₂ (donde los residuos de K en e los extremos N-terminal y C-terminal no corresponden a la secuencia salvaje) [1, 208]. En estas secuencias se señala con un subrayado ondulado la zona coincidente con los dos péptidos de Bax utilizados en esta Tesis (**Tabla 3.1**), el subrayado simple corresponde a la zona coincidente solo con Bax- $\alpha 5$ y el subrayado doble corresponde a la zona coincidente solo con Bax- $\alpha 56$.

3.2 Análisis estructural mediante dicroísmo circular

La estructura secundaria de Bax- α 5 y Bax- α 56 fue determinada por dicroísmo circular en tres ambientes distintos: medio polar acuoso (tampón HEPES o PB, según los casos), medio lípido-mimético (detergente dodecil-sulfato sódico, SDS) y membranas lipídicas (SUVs), con la peculiaridad de que en medio lipídico el tampón contenía NaCl (50 mM) lo que imprime a la solución una fuerza iónica moderada. Hemos preferido registrar los espectros en estas condiciones de salinidad para acercarnos más a un escenario biológico y a las condiciones del resto de ensayos descritos en esta Tesis, aunque ello plantea problemas, ya que los iones cloruro poseen una fuerte absorbancia en la región ultravioleta (~ 200 nm) [211], lo que afecta a la calidad de los espectros, sobre todo en casos donde la definición de la banda de 190 nm es importante (estructura en hélice α). Esta limitación es más crítica si cabe para las medidas realizadas en presencia de SUVs, que a su vez dan lugar a dispersión de la luz en la región ultravioleta.

Como hemos comentado antes, aunque en investigaciones anteriores se había caracterizó mediante CD la estructura de distintos fragmentos derivados de la horquilla α 56 de Bax [1, 34, 64, 208], éstos correspondían a distintas condiciones de disolución y/o distintas versiones de los péptidos, lo que aconsejó llevar a cabo el estudio que aquí se describe.

Los péptidos Bax- α 5 y Bax- α 56 se ensayaron en diferentes entornos para obtener información estructural y acerca de su estado de oligomerización. Los espectros de CD (Sec. 2.4) fueron registrados a temperatura ambiente en medio lípido-mimético (SDS 100 mM en H₂O) con tampón HEPES 10 mM, pH=7.5, o en presencia de vesículas lipídicas aniónicas (POPC:CL, 80:20) o zwitteriónicas (POPC), en tampón fosfato 10 mM (PB), 50 mM NaCl, pH=7.4. Los resultados se muestran en las Fig. 3.2 y 3.3. El análisis de los espectros se realizó mediante distintos algoritmos de determinación de estructura secundaria, utilizando el servicio *online* DicroWeb [166, 167] (*nota 6 en la página 55*). Entre los métodos disponibles, CONTILL y SELCON3 [163, 165, 168, 169] emplean una información más completa del espectro de CD (190 – 240 nm), por lo que consideramos su resultado como más fiable, a diferencia de K2D2 que utiliza solo la región situada entre 200 y 240 nm. En todos los casos se observó la coexistencia de varios confórmeros (Tabla 3.2 y 3.3), lo que demuestra la plasticidad estructural de estos fragmentos peptídicos.

3.2.1 Estructura en ambiente micelar

Los espectros en ambiente micelar se registraron con el fin de confirmar la tendencia estructural de los péptidos en un entorno anfipático de tipo lípido-mimético. Para ello se eligió el detergente aniónico SDS, ya que presenta un buen comportamiento en espectroscopia CD. Bax- α 5 ya ha sido caracterizado anteriormente en este medio, encontrándose una inducción de estructura α -helicoidal hasta valores cercanos al 60% [1].

En la Fig. 3.2 se muestran los espectros de CD de Bax- α 56 en disolución acuosa (HEPES 10 mM, pH 7.5) y en SDS 100 μ M. Como era de esperar, en medio acuoso tamponado el péptido presenta baja elipticidad en todo el espectro, con mínimos levemente visibles a ~ 205 y ~ 220 nm, así como una banda positiva también débil cercana a 190 nm. Un

3.2 Análisis estructural mediante dicroísmo circular

análisis de este espectro muestra una estructura mayoritariamente desordenada con solo un ~13% de estructura en α -hélice. En presencia de SDS, sin embargo, la elipticidad aumenta en todo el espectro, definiéndose con gran claridad el patrón correspondiente a estructura helicoidal, hasta el punto de que el análisis de este espectro arroja un valor de estructura en hélice α del ~90%.

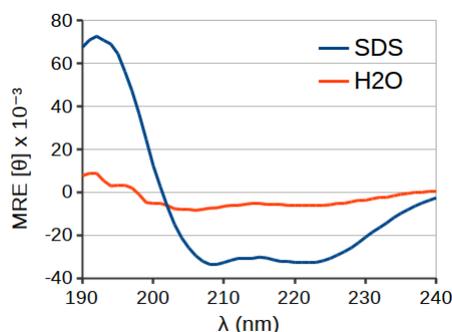


Fig. 3.2: Espectros de CD de Bax- α 56 en disolución acuosa y en ambiente micelar. En ambos casos la disolución se encuentra tamponada con HEPES 10 mM, pH 7.5, y la concentración de los péptidos era 40 μ M. El ambiente micelar corresponde al detergente SDS, en concentración 100 μ M.

3.2.2 Estructura en vesículas lipídicas

Se tituló una concentración fija de péptido (Bax- α 5 o Bax- α 56, de manera independiente) en tampón fosfato (10 mM, NaCl 50 mM, pH 7.4) con SUVs compuestas por POPC o POPC:CL (80:20), a valores de P/L 1/20, 1/40 y 1/80. Los espectros obtenidos se muestran en la **Fig. 3.3**. Como puede verse, la calidad de los espectros es afectada por la presencia de NaCl en la disolución. No obstante, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de los mismos mediante CONTILL, SELCON3 y K2D2 [163, 165, 168, 169].

En las **Tablas 3.2** y **3.3** se muestran los porcentajes de los distintos tipos de estructura que adoptan los péptidos a cada valor de P/L ensayado. Como era de esperar teniendo en cuenta los resultados en micelas de SDS, en medio lipídico la estructura es principalmente helicoidal, aunque en mayor medida para el caso de Bax- α 56 y en membranas con CL.

Efectos de la densidad del péptido en la membrana y de la composición lipídica

Dado que los péptidos apenas se pliegan en disolución acuosa (**Fig. 3.2**), para cualquiera de ellos el porcentaje de estructura helicoidal debe aumentar a lo largo de su titulación con membranas (a medida que P/L disminuye). Es decir, el aumento de estructura secundaria a medida que aumenta la cantidad de vesículas en la suspensión puede ser interpretado como una medida indirecta de la incorporación del péptido a la membrana. Eso es lo que ocurre en presencia de SUVs de POPC al pasar de P/L 1/20 a 1/40 (**Tablas 3.2** y **3.3**). Sin embargo, al aumentar aún más la concentración de estas mismas vesículas, hasta P/L=1/80, el porcentaje de hélice α disminuye, como se observa

3 Estructura e interacciones de Bax- α 5 y Bax- α 56 en la membrana

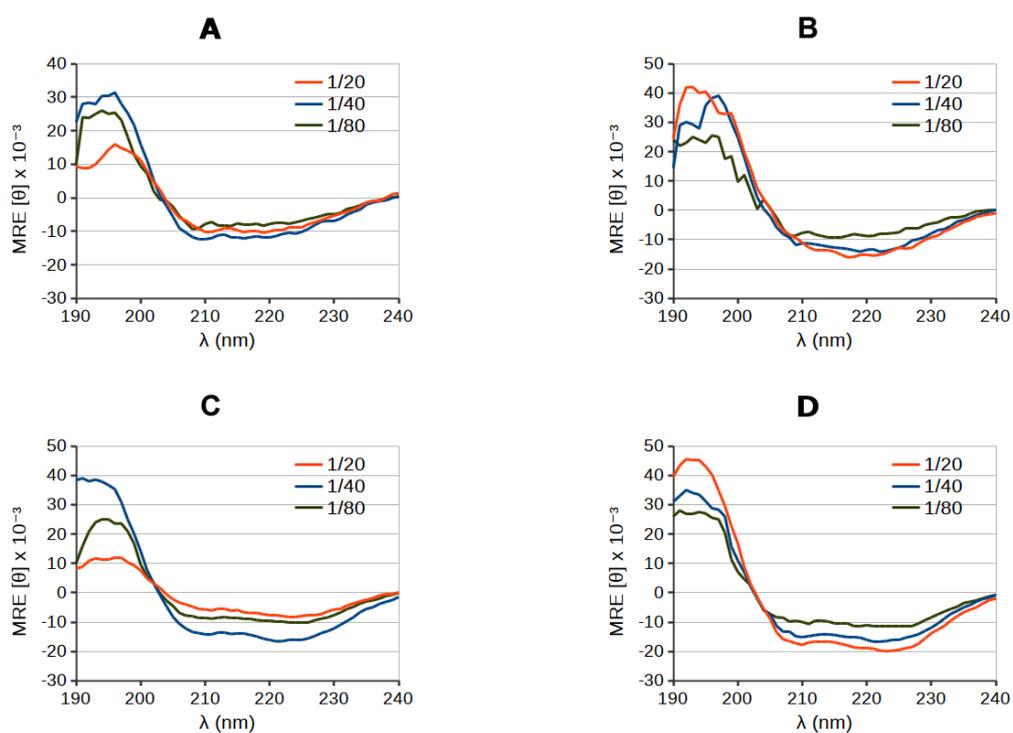


Fig. 3.3: Espectros de CD de Bax- α 5 y Bax- α 56 en membranas. (A,B) Espectros de Bax- α 5. (C,D) Espectros de Bax- α 56. Las medidas se llevaron a cabo en presencia de SUVs compuestas de POPC (A,C) o POPC:CL (B,D). En todos los casos se registraron espectros para concentraciones del péptido de 20 μ M a tres relaciones molares P/L distintas: 1/20 (*azul*), 1/40 (*rojo*) y 1/80 (*negro*), en tampón PB (10 mM) con NaCl 50 mM.

Tab. 3.2: Estructura secundaria de Bax- α 5 a partir del análisis de espectros de CD. Se muestran los valores porcentuales de cada tipo de estructura obtenidos en suspensiones de LUVs de POPC o POPC:CL para distintos valores de P/L, según se indica en cada caso.

Algoritmo ^a	Estructura ^b	POPC			POPC:CL		
		1/20	1/40	1/80	1/20	1/40	1/80
CONTINLL	hélice α	31.9	45.0	^c	53.9	^c	^c
	cadena β	24.5	14.5	^c	19.8	^c	^c
	giro	10.6	14.0		08.0		
	desordenada	33.0	26.0	^c	18.3	^c	^c
SELCON3	hélice α	30.3	46.9	^c	57.8	50.7	^c
	cadena β	22.5	16.5	^c	14.7	15.7	^c
	giro	19.4	09.2		16.1	12.4	
	desordenada	28.7	27.4	^c	0.9	21.4	^c
K2D2	hélice α	37.0	49.0	36.0	9.0	23.0	37.0
	cadena β	14.0	22.0	16.0	83.0	54.0	15.0
	aleatoria	49.0	29.0	48.0	8.0	23.0	49.0

^a A través del servidor *online* DichroWeb [163, 165–169] (*nota 6 en la página 55*).

^b hélice α corresponde a la suma de porcentajes de dos tipos de hélice, y cadena β corresponde a la suma de valores de dos tipos de cadena extendida.

^c El error en el ajuste en estos casos era grande, por lo que los resultados no eran significativos.

Tab. 3.3: Estructura secundaria de Bax- α 56 a partir del análisis de espectros de CD. Se muestran los valores porcentuales de cada tipo de estructura obtenidos en suspensiones de LUVs de POPC o POPC:CL para distintos valores de P/L, según se indica en cada caso.

Algoritmo ^a	Estructura ^b	POPC			POPC:CL		
		1/20	1/40	1/80	1/20	1/40	1/80
CONTINLL	hélice α	27.7	58.7	55.4	67.2	51.8	^c
	cadena β	22.7	09.8	06.9	04.0	09.1	^c
	giro	16.1	09.8	05.4	10.6	11.1	
	desordenada	33.5	21.7	32.3	18.2	27.9	^c
SELCON3	hélice α	22.9	58.5	40.0	64.9	51.8	^c
	cadena β	23.7	08.8	15.0	06.2	10.4	^c
	giro	21.9	11.3	18.7	11.1	12.3	
	desordenada	30.0	22.1	24.2	18.2	25.8	^c
K2D2	hélice α	28.0	60.0	38.0	66.0	60.0	39.0
	cadena β	22.0	06.0	04.0	05.0	07.0	01.0
	aleatoria	49.0	33.0	57.0	29.0	33.0	59.0

^a A través del servidor *online* DichroWeb [163, 165–169] (*nota 6 en la página 55*).

^b hélice α corresponde a la suma de porcentajes de dos tipos de hélice, y cadena β corresponde a la suma de valores de dos tipos de cadena extendida.

^c El error en el ajuste en estos casos era grande, por lo que los resultados no eran significativos.

para Bax- α 5 en el análisis de los espectros con K2D2 (**Tabla 3.2**)³ y para Bax- α 56 en el análisis efectuado con los tres algoritmos (**Tabla 3.3**).

Por otro lado, cuando las membranas presentan CL, los valores porcentuales de hélice α fueron máximos a P/L=1/20, disminuyendo al aumentar la concentración de vesículas hasta P/L =1/40. La misma tendencia parece confirmarse al pasar a P/L=1/80, aunque en estas condiciones los espectros fueron de baja calidad y no pudieron analizarse en la mayoría de los casos (**Tablas 3.2 y 3.3**).

Todo ello indica que en membranas con CL la unión del péptido es mucho más alta que en membranas con solo POPC. De hecho, en casi todos los casos se obtiene un mayor porcentaje de estructura helicoidal en presencia de CL en las membranas,⁴ de manera que a P/L=1/20 a penas quedaría péptido libre en disolución. Por el contrario, para encontrar una situación similar en SUVs de POPC es necesaria una mayor cantidad de vesículas (P/L=1/40). Partiendo de ese punto en ambos casos, un aumento de la concentración de vesículas daría lugar a la dilución del péptido en la superficie de la membrana. El hecho de que una mayor densidad del péptido en la membrana (mayor valor de P/L) traiga consigo, a su vez, un mayor porcentaje de hélice α , sugiere que bien aumenta su inserción en zonas más hidrofóbicas de la bicapa, o bien induce su asociación oligomérica.

Estado de oligomerización de los péptidos

En el caso de Bax- α 56, si comparamos los espectros obtenidos en membranas (**Fig. 3.3 B**) con espectros registrados en SDS (**Fig. 3.2**) observamos que las bandas de elipticidad negativa medidas en ambos medios son distintas. En concreto, en los espectros de Bax- α 56 en medio lipídico el mínimo a ~ 222 nm es más pronunciado que el mínimo localizado a ~ 208 nm. Tal patrón de bandas se ha relacionado con la presencia de un motivo estructural supersecundario denominado *coiled-coil* [212–215] que corresponde a la oligomerización de hélices α . Los *coiled-coil* implican la presencia de motivos de interacción proteína–proteína del mismo nombre, los cuales han sido ampliamente estudiados. Consisten en un ensamblaje súper-helicoidal en sentido de derecha a izquierda de dos o más hélices y se han relacionado con la oligomerización específica de proteínas de membrana [212, 216]. Son el resultado de un empaquetamiento entre residuos hidrofóbicos y la interfase hélice–hélice corresponde a uno de los motivos clásicos de interacción en proteínas, conocido como “*knobs packed into holes*”⁵ [217, 218].

Podría ocurrir también que la interacción fuese a través de una *cremallera de leucinas*. De hecho en un modelo helicoidal ideal del tipo rueda de EDMUNDSON la hélice de Bax- α 56 muestra una cara hidrofóbica con características de cremallera de leucinas, que

³ Este resultado debe tomarse con precaución, ya que para este péptido y en las condiciones señaladas los espectros registrados a P/L=180 no pueden analizarse con garantía utilizando CONTILL y SELCON3 debido a la baja calidad de la banda a ~ 190 nm.

⁴ A excepción de algunos valores obtenidos en el análisis con K2D2 de muestras con Bax- α 5 (**Tabla 3.2**). Sin embargo, como hemos comentado, este algoritmo utiliza una región reducida del espectro y sus resultados no son siempre fiables.

⁵ La denominación es muy gráfica, y puede traducirse como “protuberancias en contacto con cavidades”.

podría corresponder a la superficie de interacción (Fig. 3.1 B). En la Sec. 6.2 se amplia la discusión sobre este punto, incluyendo posibles modelos de dímeros *coiled-coil*.

3.3 Interacción Péptido-membrana

Para abordar la interacción de los péptidos con bicapas lipídicas haremos uso de grupos fluoróforos que nos servirán como sonda, reportando las características de su entorno y posibles cambios de estas que puedan ser asociados a la unión de los péptidos a la membrana. Por parte de la membrana utilizaremos el derivado lipídico N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, NBD-PE (Fig. 3.4). El NBD puede considerarse como un “sensor”, capaz de detectar cambios muy pequeños en las propiedades del entorno circundante. Debido a ello ha sido ampliamente utilizado en una variedad de estudios relacionados con las membranas, incluyendo aspectos relacionados con la difusión, la dinámica y la organización molecular de lípidos y proteínas. También ha tenido aplicación en el estudio de transiciones de fase, tanto en vesículas sintéticas como a nivel celular y en la investigación de mecanismos de tráfico intracelular de lípidos [219]. Por otro lado, el espectro de fluorescencia del triptófano ha sido ampliamente explotado en el estudio de procesos relacionados con la dinámica conformacional de proteínas [220], y al igual que el NBD, para explorar el entorno cercano de proteínas o péptidos [221, 222] y extraer información acerca del mecanismo de acción o de su estado oligomérico.

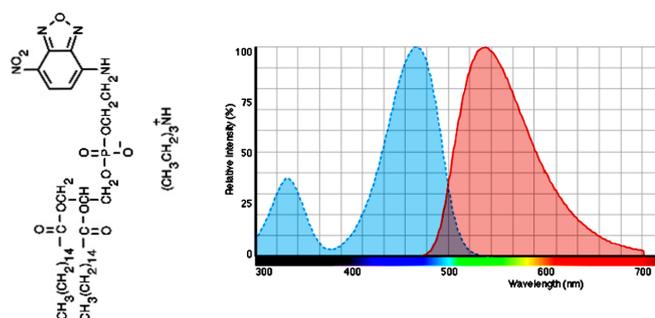


Fig. 3.4: Estructura y propiedades espectroscópicas de la sonda lipídica NBD-PE. La estructura se muestra a la izquierda. A la derecha se representan los espectros de excitación (λ_{max} ~463 nm, azul) y emisión (λ_{max} ~536 nm, rojo) de fluorescencia de esta sonda. Tomado de <https://www.thermofisher.com/>.

3.3.1 Reordenamiento lipídico por Bax- α 5 y Bax- α 56

La unión de péptidos membranoactivos a bicapas lipídicas puede facilitar la segregación de fases o propiciar una reorganización de las mismas. A continuación describimos el estudio de la capacidad de reordenamiento lipídico por Bax- α 5 y Bax- α 56 a través de las propiedades fluorescentes del NBD-PE (Fig. 3.4). En vesículas que contienen esta son-

da, el grupo fluoróforo NBD se encuentra situado al nivel de la región polar de la bicapa, aproximadamente a 20.3 \AA del centro de la membrana [223]. Su intensidad de fluorescencia en membranas lipídicas es modulada en general por dos mecanismos: (i) El efecto del entorno sobre la fluorescencia del NBD (composición de la membrana, su estructura y su estado de fase) y (ii) el fenómeno de auto-desactivación de la fluorescencia, producto del confinamiento espacial de sus moléculas [224], y por tanto relacionado con la concentración del fluoróforo. La auto-desactivación de fluorescencia es de lejos el mecanismo que más afecta el rendimiento cuántico del NBD-PE [225], por lo que lo utilizaremos para llevar a cabo un seguimiento de los cambios que ocurren en la membrana.

Nuestro experimento consistió en titular una suspensión de vesículas de POPC:CL:NBD-PE (78:20:2) 1 mM con Bax- $\alpha 5$ o Bax- $\alpha 56$ en distintas cantidades para alcanzar valores de P/L entre $1/200$ y $1/3$. Después de esperar 5 min , tras la adición de péptido, se recogió la emisión de fluorescencia (5 series) entre 500 y 550 nm . Los espectros muestran que la señal de fluorescencia de la sonda lipídica se atenúa al añadir los péptidos (tanto con Bax- $\alpha 5$ como con Bax- $\alpha 56$, Fig. 3.5). Los dos fragmentos de Bax causan efectos muy similares en la fluorescencia del NBD-PE, aunque para los mismos valores de P/L la reducción de la fluorescencia es mayor en presencia de Bax- $\alpha 56$, lo que podría estar relacionado con la mayor unión de este péptido a la membrana, como se pudo constatar a través de los experimentos de CD (Sec. 3.2).

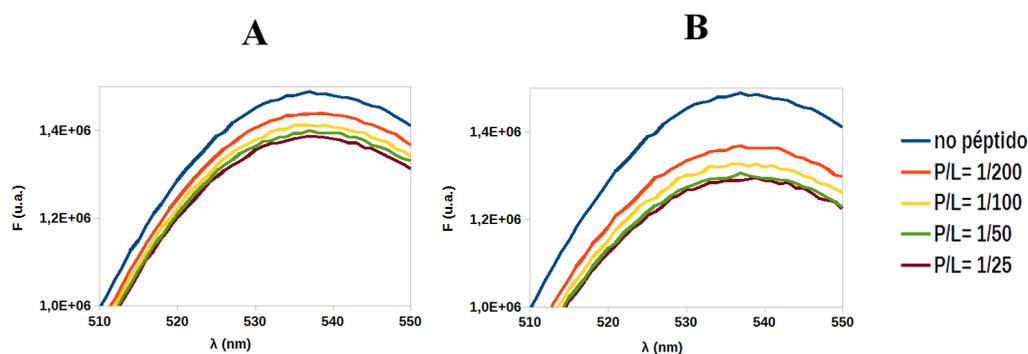


Fig. 3.5: Auto-desactivación de la fluorescencia de NBD-PE en presencia Bax- $\alpha 5$ o Bax- $\alpha 56$. (A) Titulación de LUVs de POPC:CL:NBD-PE (78:20:2, 1 mM de lípido) con Bax- $\alpha 5$, a valores de P/L entre $1/200$ y $1/25$, según lo indicado en la figura. (B) Titulación de LUVs de la misma composición que en A con Bax- $\alpha 56$, a valores de P/L entre $1/200$ y $1/3$, según lo indicado en la figura. La muestra se encontraba tamponada con PBS (PB= 10 mM , NaCl= 137 mM , pH= 7.4). Los espectros corresponden a la emisión fluorescente de NBD-PE, por excitación a 460 nm .

La disminución de la emisión fluorescente del NBD-PE a medida que los péptidos se unen a las membranas puede explicarse a través de un incremento de la concentración local de la sonda en ciertas zonas que sería inducida por los péptidos, probablemente a través de separación de fases [226, 227]. Fenómenos similares de segregación de fases han sido estudiados con anterioridad en vesículas que contenían PE y se han relacionado con la tendencia de este lípido a formar fases de tipo Ld en presencia de iones Ca^{2+} [228]. El mecanismo propuesto en esos casos para explicar la reducción de la fluorescencia de

la sonda es la coalescencia de pequeños dominios, dando lugar a zonas Ld de mayor área, y la incorporación a estas zonas de moléculas de la sonda que inicialmente se encontraban distribuidas en otras regiones de la bicapa. En nuestro caso, ocurre algo parecido. Una buena parte de la sonda fluorescente inicialmente estaría localizada en zonas Lo de la membrana. Nuestros péptidos se unen principalmente a los dominios de CL, que actúan como centros de reclutamiento dirigido por fuerzas electrostáticas. En experimentos anteriores se ha observado que otros péptidos derivados de Bax son capaces de disminuir la tensión lineal en la interfase entre dominios, provocando su coalescencia y aumento de tamaño. Esto origina un agrupamiento del NBD-PE en las zonas Lo, donde finalmente se acumula dando lugar a una disminución de su fluorescencia.

3.3.2 Interacción péptido-membrana a través de la fluorescencia intrínseca del Trp

El efecto de la hidrofobicidad de la membrana sobre la fluorescencia del triptófano permite detectar la interacción de péptidos o proteínas con distintas zonas de la bicapa en función de su grado de polaridad. La principal ventaja de la fluorescencia del Trp (cuando existe este residuo en la secuencia) es que se trata de una sonda intrínseca, por lo que su uso no precisa marcaje ni trae consigo modificaciones de la estructura, propiedades o comportamiento de la molécula investigada. Aquí, hemos empleado esta herramienta para estudiar la asociación de los péptidos Bax- α 5 y Bax- α 56 con membranas de LUVs. El desplazamiento hacia longitudes de onda más bajas de la banda de emisión de fluorescencia y el aumento del rendimiento cuántico son las dos características principales observadas cuando el Trp se mueve de un entorno polar a otro hidrofóbico como es la bicapa [229–231]. Al igual que ocurre con la molécula de NBD, la fluorescencia del Trp también puede sufrir auto-desactivación por aumento de su concentración local.

Los espectros registrados para Bax- α 5 y Bax- α 56 en ausencia y presencia de vesículas de POPC:CL:NBD-PE se muestran en la **Fig. 3.6** A y B, respectivamente. El espectro de emisión de Bax- α 5 en disolución tampón y ausencia de membranas muestra una banda con $\lambda_{max} = 351$ nm (**Fig. 3.6** A). En el mismo tipo de disolución, el espectro de emisión del Trp de Bax- α 56 aparece desplazado hacia el azul ($\lambda_{max} = 342$ nm, **Fig. 3.6** B). Esto indica que la accesibilidad del Trp al solvente no es igual en los dos casos, de manera que se encuentra expuesto en Bax- α 5 pero no es completamente accesible en Bax- α 56, seguramente como consecuencia de la estructura del propio péptido. Este resultado es lógico, si se tiene en cuenta que Trp es el primer residuo de Bax- α 5, pero se encuentra en una posición central restringida y con el anillo enfrente a un residuo de Ile en Bax- α 56 (**Tabla 3.1**).

Tras una primera adición de vesículas, hasta una relación molar P/L de 1/0.1 (**Fig. 3.6**, espectro *rojo* claro) se observa una respuesta diferente en cada péptido, de manera que para Bax- α 5 se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia, mientras que para Bax- α 56 la emisión aumenta de intensidad con desplazamiento hacia el azul (**Fig. 3.6** A y B, respectivamente). En el caso de Bax- α 5 la disminución de la intensidad de la banda puede estar influenciada por cualquiera de los fenómenos siguientes: Auto-desactivación de la emisión de fluorescencia, debida al acercamiento entre moléculas de

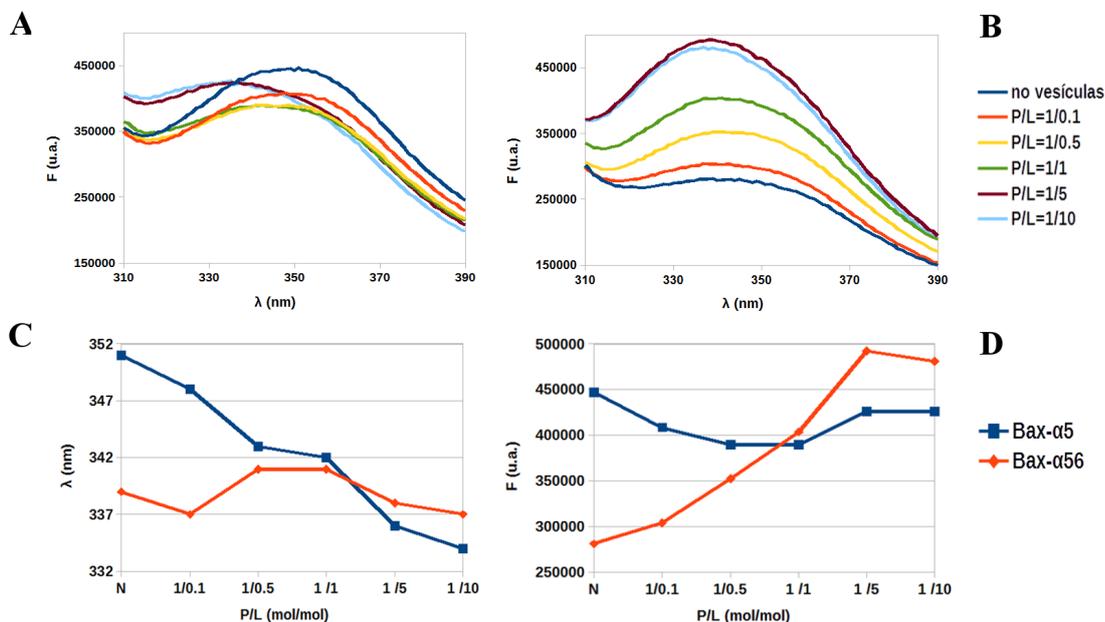


Fig. 3.6: Observación de la unión de los péptidos a membranas a través de la fluorescencia intrínseca del Trp. (A) Espectros de fluorescencia intrínseca de Bax- α 5. (B) Espectros de fluorescencia intrínseca de Bax- α 56. (C) Desplazamiento del máximo de emisión de los espectros de fluorescencia de Bax- α 5 (*azul*) y Bax- α 56 (*rojo*) en función de los valores de P/L. (D) Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia de Bax- α 5 (*azul*) y Bax- α 56 (*rojo*) en función de los valores de P/L. Los espectros muestran la fluorescencia del Trp (natural en la secuencia de los péptidos, aunque en posiciones diferentes en cada caso). Las membranas son LUVs de POPC:CL:NBD-PE (78:20:2). En presencia de cantidades crecientes de LUVs (indicadas en la figura como relaciones molares), se observan distintos cambios del espectro de emisión del Trp en varias fases (A, B), que implican desplazamientos del máximo de emisión hacia longitudes de ondas más bajas (C) y variaciones de la intensidad de emisión fluorescente (D). Las posibles causas de la auto-desactivación de la emisión fluorescente se comentan en el texto. Los espectros se tomaron a 25 °C en soluciones tamponadas (PB 10 mM, NaCl 137 mM, pH=7.4).

péptido en las LUVs, o como resultado de un proceso de transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET) entre el Trp (dador) y el NBD (aceptor), o puede incluso ser el resultado de ambos procesos simultáneamente [232]. Es complicado discriminar entre ambas opciones tan solo con los experimento que hemos llevado a cabo, por lo que nos limitaremos a explicar nuestras observaciones de una forma coherente. Como hemos visto para la fluorescencia del NBD (Sec. 3.3.1), la auto-desactivación u *homo*-FRET ocurre cuando fluoróforos excitados del mismo tipo absorben parte de su propia energía de emisión, disminuyendo la población de fotones totales emitidos [233]. Este fenómeno puede detectarse y confirmarse mediante anisotropía de fluorescencia [157, 234]. La distancia crítica para que ocurra *homo*-transferencia Trp-Trp se sitúa en el rango de 6-12 Å, mientras que para la *hetero*-transferencia Trp-NBD es de ~ 22 Å [235].

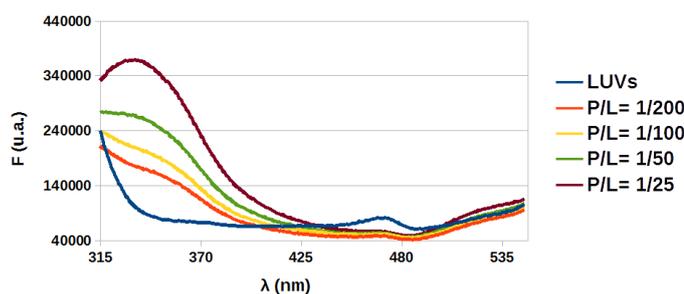


Fig. 3.7: Transferencia de energía fluorescente en el par Trp-NBD para el caso de de Bax- α 5. Las membranas son LUVs de POPC:CL:NBD-PE (78:20:2) y se titulan con cantidades crecientes de Bax- α 5 (indicadas en la figura como relaciones molares). La muestra se encontraba tamponada con PB = 10 mM, NaCl = 137 mM, pH 7.4 y fue excitada a 287 nm.

Con el objetivo de separar los posibles procesos implicados en el comportamiento fluorescente de Bax- α 5, llevamos a cabo el experimento de manera inversa, es decir, titulando una solución de LUVs (POPC:CL:NBD-PE 78:20:2) con adiciones crecientes del péptido. De esta forma, se minimiza el efecto de desactivación de la fluorescencia del Trp puesto que inicialmente habrá muy poca cantidad de péptido que, en principio, se repartirá a baja densidad sobre un alto número de vesículas. Los resultados se muestran en la Fig. 3.7. Al excitar a 287 nm en presencia de cantidades crecientes de péptido se observan bandas de emisión correspondientes al Trp y al NBD, en este último caso debido a efecto FRET Trp-NBD. Aunque la *hetero*-transferencia es débil, sugiere que en la unión del péptido a las membranas, éste sitúa al menos la cadena lateral del Trp en la zona interfacial. Tal posicionamiento parece mantenerse al aumentar la cantidad de péptido (Fig. 3.7). En cuanto a la emisión del Trp, aumenta como corresponde a su aumento de concentración, pero su pequeño cambio en las primeras adiciones (líneas roja y amarilla) sugiere un efecto de desactivación por parte del NBD. De cualquier forma, a pesar de que existe transferencia de energía entre el Trp y el NBD-PE, por su bajo nivel esta no parece ser la única y principal causa de la disminución de la fluorescencia mostrada en la Fig. 3.6 A, por lo que concluimos que existe auto-desactivación del Trp en Bax- α 5 unido a

3.4 Interacción péptido-péptido mediante excímeros de pireno

membranas. Para $P/L = 1/5$ o inferior, el espectro de **Bax- α 5** aumenta de intensidad (**Fig. 3.6 A, D**), indicando que a medida que aumenta la cantidad de vesículas disponibles la aglomeración del péptido en la superficie de las membranas disminuye. Paralelamente, el espectro sufre un desplazamiento brusco hacia el azul (**Fig. 3.6 A, C**), indicando un cambio hacia una mayor hidrofobicidad del entorno del **Trp**, lo cual es debido a que tras cada adición, hay menos péptido libre en solución y consecuentemente más unido a la membrana lipídica.

En contraste, en el caso **Bax- α 56** los cambios del espectro de emisión a lo largo de la valoración con LUVs son más homogéneos (**Fig. 3.6 B,C,D**), de forma que la fluorescencia del **Trp** crece a lo largo de la titulación con LUVs, con poco cambio de la posición de la banda, hasta estabilizarse a partir de $P/L = 1/5$. Llegado ese punto, la banda se sitúa a 335 nm (**Fig. 3.6 B** curvas *roja oscura* y *cian*) y el espectro de emisión de **Bax- α 56** se asemeja mucho al de **Bax- α 5**, lo que indica que los **Trp** de ambos péptidos ocuparían posiciones equivalentes (en cuanto a las características de su entorno) en la interfase de las bicapas. Estos datos también indican que **Bax- α 56** sufre un apantallamiento menos efectivo por parte del NBD. Además, la ausencia de decaimiento de la fluorescencia del **Trp** de **Bax- α 56** a densidades altas del péptido en la membrana indica ausencia de auto-desactivación en este último caso y sugiere que en condiciones de alta concentración no sufre una mera aglomeración en la membrana, sino que probablemente existen asociaciones macromoleculares específicas, en consonancia con los resultados obtenidos mediante CD (**Sec. 3.2.2**). La agregación es el principal motivo de desactivación. Si el péptido se encuentra en una alta concentración pero ordenado de manera específica los fotones emitidos por el **Trp** no quedan secuestrados en el complejo sino que son transferidos entre los **Trp** del oligómero y finalmente terminan siendo emitidos.

3.4 Interacción péptido-péptido mediante excímeros de pireno

Se ha descrito que la proteína **Bax** oligomeriza en membranas, dando lugar a distintas formas de agrupamiento que se creen relacionadas con la estructura de los poros [236, 237]. Por otro lado, se ha propuesto que el fragmento **Bax- α 5** tiende a asociarse formando especies de orden superior al alcanzar la membrana [64], aunque los supuestos estados de oligomerización no han sido aún demostrados ni caracterizados. Por tal motivo, hemos decidido investigar con detalle la capacidad de **Bax- α 5** para formar oligómeros. Así mismo, también hemos estudiado la posibilidad de oligomerización en **Bax- α 56**, puesto que como acabamos de ver, y como se discutió en la **Sec. 3.2.2**, tanto el comportamiento de la fluorescencia intrínseca del **Trp** como las características del espectro de CD sugieren la existencia de interacciones péptido-péptido a corta escala.

Para llevar a cabo este propósito hemos elegido la detección de *excímeros* de **pireno** (**Sec. 2.3.2 en la página 50**). El **pireno** (**Fig. 2.4**) es uno de los compuestos químicos pioneros en el estudio de la dinámica de membranas. La presencia de una banda desestructurada cercana a 460 nm es indicativa de proximidad espacial entre grupos **pireno** en un rango de 10 \AA [238]. La interacción entre anillos de **pireno** da lugar a la formación de excímeros de gran estabilidad, aunque además de la cercanía física de los anillos, se

requiere que presenten una orientación espacial adecuada [239, 240]. Esta interacción se considera como uno de los indicadores de proximidad más eficientes a nivel molecular. Además, la formación de excímeros de pireno constituye una vía directa para monitorizar cambios conformacionales o asociaciones moleculares a una menor escala espacial en comparación con otros métodos como FRET [241].

Para utilizar la fluorescencia del pireno como estrategia de investigación de la capacidad oligomerización de nuestros péptidos en membranas lipídicas, llevamos a cabo un marcaje fluorescentemente de los mismos (**Sec. 2.2.3**) por unión covalente de N-pirenilmaleimida a residuos de Cys. En el caso de Bax- α 56 utilizamos la Cys natural de su secuencia salvaje (C¹²⁶), para dar lugar a la versión marcada Bax- α 56^{py} (**Tabla 2.1 en la página 44**). Sin embargo, en Bax- α 5 ese mismo residuo se encuentra cercano al extremo C-terminal, por lo que en su lugar marcamos la aposición 118 partiendo de una mutación doble: C126S, S118C (Bax- α 5^{CS}, **Tabla 2.1**).

En los péptidos marcados, la cadena polipeptídica y las cadenas laterales de residuos cercanos disminuyen la movilidad del pireno, afectando a sus propiedades espectroscópicas, por lo que en comparación con el espectro de pireno libre (**Fig. 2.4**), en el espectro en disolución acuosa de los péptidos marcados Bax- α 5^{C^{py}S} y Bax- α 56^{py} se resuelven con claridad solo dos picos mayores, a 374 nm y 394 nm (**Fig. 3.8, azul**). Por otro lado, las intensidades relativas de los máximos del espectro del monómero parecen no verse afectadas por el entorno dieléctrico [242]. Por ello, la información que podemos extraer a cerca de las características del ambiente circundante de especies monoméricas de los péptidos procede de la intensidad de todo el espectro (no de valores relativos de sus bandas). En cuanto a la disposición espacial de moléculas de péptido cercanas entre sí puede ser evaluada a través de la existencia de bandas correspondientes a excímero.

3.4.1 Interacción péptido-péptido en ambiente micelar

Ambos péptidos fueron testados frente a diferentes concentraciones de SDS (**Fig. 3.8**). En presencia del detergente el máximo de emisión a 375 nm aumenta en intensidad hasta saturarse a valores superiores a la concentración micelar crítica (*cmc*).⁶ Por otro lado, a concentraciones de SDS por debajo de la *cmc* tanto para Bax- α 5^{C^{py}S} como para Bax- α 56^{py} aparece una banda débil a ~470 nm (**Fig. 3.8, ampliación, rojo**), correspondiente a excímero de pireno y por lo tanto indicativa de asociación entre los péptidos. Sin embargo, la intensidad en esta región del espectro disminuye de nuevo a medida que nos acercamos a la *cmc*, a la vez que aumenta ligeramente la intensidad de las bandas del monómero (**Fig. 3.8, ampliación amarillo y verde**).

Una explicación a estas observaciones es que la disolución de SDS no micelar favorece la interacción entre los péptidos, pero en presencia de micelas los péptidos tienden a disociarse. Tal disociación podría explicarse por un reparto de los péptidos en las micelas preferentemente en estado monomérico, que podría deberse a que la estructura del péptido en la micela no es favorable al dímero (u oligómero), o bien a que el tamaño o la

⁶ En nuestras condiciones experimentales la *cmc* es ~2 mM, de acuerdo con [243].

3.4 Interacción péptido-péptido mediante excímeros de pireno

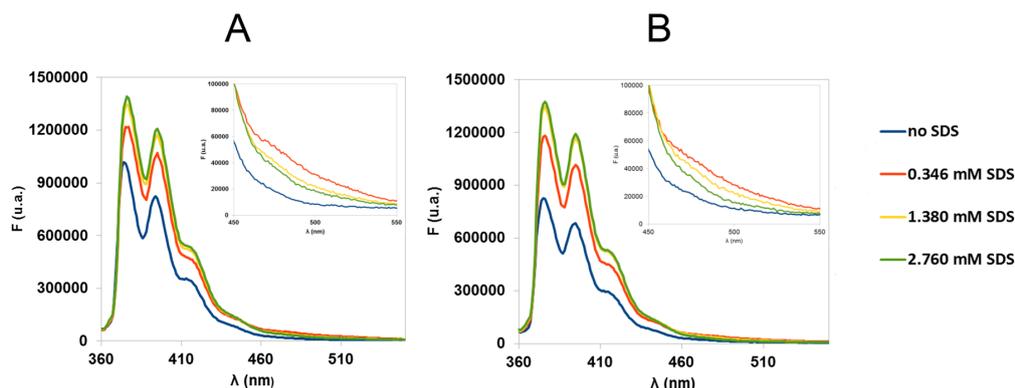


Fig. 3.8: Péptidos marcados con pireno en ambiente micelar. (A) Bax- $\alpha 5^{C^{py}S}$. (B) Bax- $\alpha 56^{py}$. Se representan los espectros de emisión de fluorescencia de los péptidos marcados para distintas concentraciones de SDS, por debajo y por encima de la *cmc* (~ 2 mM, [243]). Las medidas se llevaron a cabo en un medio tamponado (PB 10 mM, NaCl 50 mM, pH = 7.4) con una concentración de péptido fija de 2 μ M. En la parte superior derecha de cada panel se destaca una ampliación de la zona del espectro correspondiente a la señal de excímero. A 0.346 mM de SDS (rojo) se observa intensidad de emisión fluorescente a ~ 470 nm (excímero). En presencia de concentraciones mayores de SDS (amarillo) la emisión de la banda de excímero disminuye, hasta casi desaparecer al superar la *cmc* (verde).

curvatura de la micela no son adecuados para estabilidad de los dímeros. Es decir, la baja concentración del detergente al parecer favorece la estructura cuaternaria (agregación entre péptidos), seguramente a través de la estabilización de la estructura secundaria. Sin embargo, las micelas de SDS tendrían un efecto disgregador de la estructura cuaternaria, similar al efecto desnaturante de este detergente sobre proteínas globulares hidrosolubles. Un comportamiento similar se ha descrito para el caso de otros péptidos membrano activos [244, 245]. Por otro lado, la complejidad del comportamiento en presencia de SDS puede dar lugar a patrones de migración en electroforesis incoherentes o difíciles de interpretar, algo que se complica además por la utilización de fuerzas iónicas elevadas en ese tipo de experimento. Por ello aunque también llevamos a cabo múltiples ensayos utilizando esa metodología, no han sido incluidos finalmente en la Tesis.

3.4.2 Interacción péptido-péptido en membranas zwitteriónicas (POPC)

La capacidad de asociación de los péptidos en membranas fue puesta a prueba en primer lugar en presencia de vesículas formadas por lípidos neutros. Para ello, decidimos registrar espectros a distintos tiempos (en intervalos de 5 min), después de añadir una suspensión de LUVs de POPC sobre una solución de Bax- $\alpha 5^{C^{py}S}$ (Fig. 3.9 A) o de Bax- $\alpha 56^{py}$ (Fig. 3.9 B). En Bax- $\alpha 5^{C^{py}S}$, una vez en contacto con las membranas se observan pequeños cambios en el espectro durante al menos 20 min. En las bandas características del monómero, tras una leve caída inicial, la emisión se recupera y se mantiene prácticamente invariable. Sin embargo, en la zona correspondiente al excímero (Fig. 3.9, gráfica ampliada) se produce inicialmente una disminución en los primeros 5

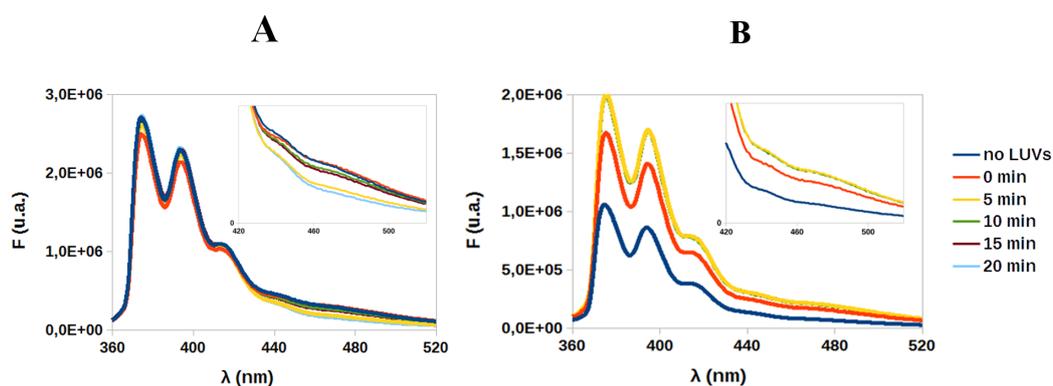


Fig. 3.9: Monitorización temporal de la formación de excímeros de pireno de Bax- $\alpha 5^{CpyS}$ y Bax- $\alpha 56^{py}$ en ambiente lipídico. (A) Bax- $\alpha 5^{CpyS}$. (B) Bax- $\alpha 56^{py}$. Se registraron espectros de fluorescencia a concentración $2 \mu M$ de los péptidos en presencia de LUVs de POPC (P/L = 1/45), en medio tamponado (PB 10 mM, NaCl 50 mM, pH= 7.4), a los tiempos indicados en la figura. En la esquina superior derecha de la gráfica se muestra una ampliación de los espectros en la región correspondiente a la banda de excímero de pireno.

min (amarillo), que después se recupera (10-15 *min*, verde y rojo oscuro) para finalmente volver a caer hasta niveles muy bajos (20 *min*, cian). Todo ello indica que por un lado el entorno del pireno no varía apreciablemente por unión a las membranas, y por otro que dicha unión cambia la disposición y/o la distancia entre anillos de pireno a través de diversas estructuras a lo largo del tiempo. En el estado final unido a la membrana, puede interpretarse que, o bien simplemente no existen interacciones péptido-péptido, o bien que aún existiendo tales interacciones, en la membrana la distancia entre **pirenos** es $> 10 \text{ \AA}$, o su orientación espacial no es favorable y no da lugar a la señal de excímero.

Bax- $\alpha 56^{py}$, por su parte, muestra un comportamiento diferente. Después de entrar en contacto con las LUVs de POPC se aprecia un aumento con el tiempo de la intensidad de fluorescencia en todo el espectro que parece estabilizarse en los primeros 5 *min* (Fig. 3.9 B). Aunque en estos espectros hay una pequeña intensidad de emisión en la zona del espectro correspondiente al excímero, no se aprecian variaciones significativas en esa zona con respecto a las bandas del monómero.

3.4.3 Interacción péptido-péptido en membranas con CL

El ensayo fue repetido bajo las mismas condiciones experimentales descritas en la sección anterior, pero en presencia LUVs compuestas por POPC:CL (80:20). Los espectros registrados para ambos péptidos se muestran en la Fig. 3.10. Cuando se adicionaron las LUVs a la solución con Bax- $\alpha 5^{CpyS}$ se observó un comportamiento con el tiempo similar al descrito en presencia de vesículas de POPC, con una señal inicial de excímero muy débil que incluso tiende a disminuir con el tiempo (Fig. 3.10, zona ampliada del espectro). Por su parte, el pico del monómero sufre tan solo una pequeña variación de intensidad

que puede atribuirse al cambio de entorno de la sonda.

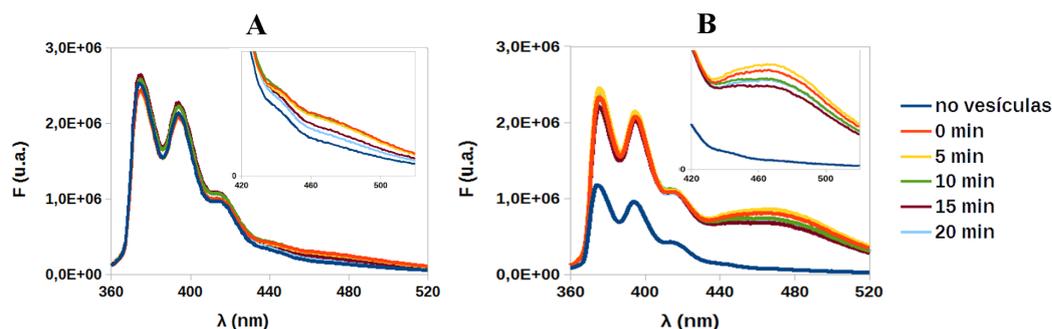


Fig. 3.10: Monitorización temporal de la formación de excímeros de pireno de Bax- $\alpha 5^{CpyS}$ y Bax- $\alpha 56^{py}$ en membranas con CL. (A) Bax- $\alpha 5^{CpyS}$. (B) Bax- $\alpha 56^{py}$. Se representan los espectros de emisión de fluorescencia de los péptidos marcados para distintos tiempos desde su entrada en contacto con LUVs de POPC:CL (80:20). Las medidas se llevaron a cabo en un medio tamponado (PB 10 mM, NaCl 50 mM, pH = 7.4) con una concentración de péptido fija de 2 μ M a P/L= 1/45. En la parte superior derecha de cada panel se destaca una ampliación de la zona del espectro correspondiente a la señal de excímero de pireno.

En cuanto a Bax- $\alpha 56^{py}$, en presencia de LUVs con CL, al igual que en LUVs de solo POPC se observa un gran aumento de la intensidad de fluorescencia de todo el espectro (Fig. 3.10, B). Sin embargo en las LUVs con CL tal aumento ocurre de manera inmediata, y no a lo largo de al menos 1 hora, como ocurría en POPC solo (Fig. 3.9). Esto puede ser consecuencia de una mayor atracción electrostática en presencia de CL. Además, en LUVs con CL los espectros de Bax- $\alpha 56^{py}$ presentan una señal de emisión a 470 nm (excímero) considerablemente mayor que en POPC y que en el caso de Bax- $\alpha 5^{CpyS}$, lo que indica que la CL juega un papel importante en propiciar la interacción entre fragmentos Bax- $\alpha 56$, lo que ocurriría además de una forma más empaquetada (con mayor cercanía entre los anillos de pireno) que en la estructura adopta en vesículas de POPC. Por otro lado, aunque la banda de excímero se debilita con el tiempo, la caída es pequeña lo que parece indicar que las interacciones responsables del excímero son específicas y no se debe a una mera acumulación de péptido en membrana.

Esta tendencia a la asociación estable hace pensar en la posibilidad de que Bax- $\alpha 56^{py}$ tiene la capacidad de establecer interacciones de tipo *coiled-coil*, como sugerían los resultados obtenidos mediante CD en SUVs (Sec. 3.2.2), así como los resultados de fluorescencia del Trp (Sec. 3.3.2).

3.4.4 Dinámica de los excímeros en el estado unido a la membrana

Una característica de Bax- $\alpha 5^{CpyS}$ es que su estado oligomérico en membranas parece ser reversible, ya que rápidamente se observa una decaimiento progresivo de la intensidad de fluorescencia con el tiempo hasta niveles prácticamente basales en torno al máximo de emisión del excímero (470 nm), independientemente del medio lipídico en que nos encontremos. Es difícil explicar este hecho solamente a partir la información que hemos

descrito, pero en todo caso parece ser que las moléculas se unen a la superficie de la membrana, se asocian (excímerización) y a partir de ahí pueden ocurrir varios sucesos. Primero, podría tener lugar una desorción del péptido, aunque dada la cantidad de vesículas presentes en disolución (a $P/L=1/80$) y la afinidad por la membrana demostrada por este péptido en estos y otros experimentos, parece lógico pensar que en su mayoría estará unido a las LUVs. Segundo, que ocurra una redistribución del péptido en la superficie de las LUV, disminuyendo la población de dímeros, algo que resulta fácil de aceptar. Tercero, que exista intercambio de péptidos entre vesículas debido a eventos de fusión, lo cual es frecuente en presencia de péptidos catiónicos anfipáticos como los nuestros (**Cap. 5**), dando lugar al decaimiento observado. Cuarto, que después de la interacción inicial de especies de péptido diméricas (u oligoméricas) con la membrana, ocurra un cambio conformacional provocando un alejamiento de los anillos de **pireno**, con la consiguiente pérdida de la señal de excímero. Quinto y último, que el marcaje fluorescente con **pireno** desestabilice la interacción péptido-péptido en Bax- α 5^{C^{py}S}, lo que indicaría entonces que el residuo C¹¹⁸ estaría formando parte de una supuesta superficie de interacción, pero no tenemos evidencia de que esto sea realmente así. En cualquier caso, como se explicó antes, se ha propuesto que Bax- α 5 dimeriza en membranas y en micelas de SDS, en base a experimentos de electroforesis (en SDS) y experimentos FRET en membranas [64]. Los resultados que acabamos de describir, basados en la observación de excímeros de **pireno**, no apoyan esa propuesta. Aunque tampoco sirven para descartarla, sí sugieren que de existir dichos dímeros de Bax- α 5 en membranas se trataría de uniones débiles y poco específicas. .

En Bax- α 56, por su parte, la tendencia a formar dímeros es claramente mayor. La presencia de excímeros de **pireno** demuestra la existencia de especies oligoméricas el menos en membranas con **CL**, apoyada por los datos de CD y fluorescencia de Trp. mientras que en membranas de solo **POPC** la dimerización. Las diferencias encontradas entre ambos fragmentos peptídicos parecen coherentes con la diferente posición que las hélices α 5 y α 6 de la proteína completa Bax asumen en la membrana [119]. Esto hace pensar que aunque ambos fragmentos son responsables de la actividad de la proteína, sus papeles son distintos a la hora de llevarla a cabo.

4 Poros mediados por Bax- α 5 en membranas modelo

El estudio de la formación de poros en membranas lipídicas, mediada por péptidos, constituye una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo. En el pasado, el grupo ha investigado la liberación de contenidos inducida por distintos péptidos a partir de vesículas lipídicas sintéticas [1, 34, 88, 171], la estructura de péptidos activos unidos a membranas [1] y el mecanismo de formación de los poros [1, 34, 88, 171, 207]. En el caso particular de péptidos diseñados a partir de fragmentos de proteínas de la familia Bcl-2, también ha estudiado su capacidad para permeabilizar mitocondrias [2] e inducir apoptosis en células en cultivo, e incluso su efecto antitumoral [2, 3]. Con tal fin, se emplearon métodos espectroscópicos (de infrarrojos, dicroísmo circular y espectroscopia de fluorescencia), así como microscopia de diversas escalas; en concreto AFM [88] y microscopia confocal de fluorescencia [64, 171]. En la presente Tesis doctoral haremos un uso intenso de esta última técnica, a partir de cuyos resultados desarrollaremos y utilizaremos un método teórico de cuantificación de datos cinéticos que nos permitirá conocer propiedades de los poros, como su tamaño y su densidad por unidad de área de la membrana. Nos permitirá también llevar a cabo un seguimiento de la evolución temporal de estos parámetros, a partir del cual podremos deducir un mecanismo de formación de los poros y estudiar su estabilidad.

4.1 Objeto y estrategia de estudio

4.1.1 Sistema molecular elegido

Los resultados que se describen en este capítulo corresponden a la caracterización de la actividad permeabilizante del péptido Bax- α 5, derivados de la proteína Bax, mediante microscopia de fluorescencia confocal (**Sec. 2.5.1 en la página 55**). La secuencia del péptido se muestra en la **Tabla 2.1 en la página 44**. Como puede observarse, se trata de una molécula anfipática, con carácter dual hidrofóbico/catiónico, debido a la presencia en su secuencia de residuos alifáticos y aromáticos junto a residuos de Lys y Arg. Por sus características físico-químicas, este péptido puede clasificarse como membranoactivo y de hecho presenta propiedades similares a las de los péptidos membranolíticos clásicos de naturaleza cationica, como melitina. En cuanto al sistema lipídico, utilizaremos membranas sintéticas de POPC:CL (80:20) en vesículas denominadas unilamelares gigantes (GUVs, ver **Sec. 2.1.2 en la página 41**). La elección de cardiolipina, CL se debe principalmente a que se trata de un lípido propio de la membrana mitocondrial, y es en este orgánulo celular donde reside la actividad fisiológica de la proteína Bax. Por otro

lado, como veremos a lo largo de la Tesis, la composición lipídica (y muy en concreto la presencia de CL) es un factor determinante a la hora de entender la actividad de los péptidos.

Para el trabajo descrito en este capítulo hemos utilizado varios tipos de sonda fluorescente. Estos marcadores se encuentran presentes inicialmente en el medio exterior a las vesículas, lo cual nos permite estudiar con detalle sus cinéticas de entrada a través de la membrana. Como se verá, el uso simultáneo de marcadores con distinto tamaño es un ingrediente importante de nuestra estrategia de análisis de los datos (**Sec. 2.6**). Por otro lado, la elección de dextranos marcados fluorescentemente con masa molecular de al menos ~ 10 KDa se debe a que de su tamaño es comparable con el de proteínas de interés fisiológico. Por ejemplo, el citocromo *c* es un de los factores pro-apoptóticos principales liberado desde el interior de la mitocondrial durante el proceso de activación de la apoptosis [118]. Dado que esta última proteína presenta un radio hidrodinámico de ~ 1.7 nm [246] podemos asumir que difundiría sin problema a través de los mismos poros que la sonda FD10, cuyo radio hidrodinámico es ~ 2.3 nm [247, 248].

4.1.2 Estrategia experimental y de análisis

Como se ha comentado arriba, los resultados descritos aquí tienen su base en una utilización intensiva de la microscopía confocal de fluorescencia. Nuestra apuesta por esta técnica se debe a su capacidad para el estudio de vesículas individuales con tamaño en la escala del micrómetro (GUVs, **Sec. 2.1.2**) [81, 171, 249, 250], lo cual permite llevar a cabo experimentos basados en visualizaciones directas y en condiciones bien definidas. En una preparación típica, podemos monitorizar múltiples vesículas de idéntica composición lipídica, bajo idénticas condiciones, estudiando sin embargo cada vesícula de manera individualizada. En presencia de péptido, tenemos acceso al registro de cinéticas de permeabilización *vesícula a vesícula*, con información sobre el tiempo de apertura de los poros [171]. Una vez registradas, las cinéticas son analizadas cuantitativamente, utilizando como base una de las leyes más robustas de la física (la *primera ley* de FICK [172, 175, 176]), que nos da acceso a la determinación de la velocidad de flujo. Ésta, a su vez, proporciona información sobre el tamaño de los poros y el número de poros por vesícula (**Sec. 2.6**).

La aplicación de dicha estrategia experimental-analítica sobre vesículas individuales ofrece más garantías que otros métodos comúnmente utilizados para la caracterización de la actividad formadora de poros, basados en el estudio espectroscópico de enormes poblaciones de vesículas. Ello se debe a que el comportamiento individual de cada vesícula, que como veremos puede ser muy variable (**Sec. 4.2.1**), influye en los valores medidos, correspondientes al conjunto. En investigaciones de vesículas individuales registramos por separado datos de casos particulares, de manera que podemos clasificarlos, elegir modelos de análisis adecuados según el tipo de comportamiento y conocer las características de las distribuciones de los parámetros, de las cuales se pueden extraer valores promedio. Sin embargo, en estudios llevados a cabo sobre muestras clásicas los comportamientos particulares no son conocidos, ya que no pueden ser observados, por lo que su influencia en los valores globales medidos no es cuantificable ni puede tenerse en cuenta

con precisión.

Como se describirá en el **Cap. 5**, en algunos casos la actividad de permeabilización coexiste con procesos dinámicos de fisión y/o fusión de membrana, también protagonizados por los péptidos. Aquellas vesículas que presentaban cinéticas *anómalas*,¹ ya sea debido al solapamiento con otros procesos (como los mencionados de fisión y fusión), o en casos de inestabilidad o evolución compleja de los poros, fueron apartadas del análisis, (**Sec. 4.2.2**).

Por otro lado, la mayoría de los datos cinéticos empleados en este estudio se refieren a la permeabilidad de vesículas en estado de *no equilibrio*, ya que se registraron a tiempos relativamente cortos a partir de la toma de contacto entre las moléculas de péptido y la membrana de las vesículas.² Este último aspecto podría también explicar la existencia de una pequeña proporción de casos en los que las cinéticas de entrada de marcadores que se alejan del comportamiento exponencial esperado (*nota 1*).

4.2 Poros de membrana formados o inducidos por Bax- α 5

4.2.1 Observación directa de la permeabilidad de GUVs individuales mediante microscopia de fluorescencia

En ausencia de Bax- α 5 o cualquier otro péptido las GUVs de POPC:CL (80:20) son en general muy poco permeables a marcadores de la serie Alexa, como demuestra la ausencia de brillo en su interior en la gran mayoría de los casos después de su incubación en un medio que contiene este tipo sondas fluorescentes. En solo una pequeña proporción de GUVs (<10%) encontramos difusión de las sondas fluorescentes externas, parcial o completa, hacia el interior (ver por un ejemplo en la **Fig. 5.1 B**, en la página 118). Dicha permeabilidad intrínseca puede deberse al estrés asociado al cambio de entorno de las GUVs debido a su dilución en la cámara de observación. De hecho, en las GUVs permeables en ausencia de péptido la entrada de las sondas ocurre prácticamente al inicio de la toma de las imágenes.³ Como se comenta con más detalle en la **Sec. 5.2.2**, página 119, la permeabilidad de vesículas en controles sin péptido se debe a la formación de poros lipídicos y se ve facilitada por razones de curvatura intrínseca en las membranas que contienen CL.

Sin embargo, en presencia de Bax- α 5 (**Fig. 4.1 A,B**), el brillo fluorescente empieza a aumentar en el interior de las GUVs desde unos pocos minutos después de su encuentro

¹ El análisis cinético cuantitativo (ver **Sec. 4.2.2** y también **Sec. 2.6 en la página 59**) se restringe a casos que responden a modelos mono o multiexponenciales, definidos por las *ecu. 2.19 y 2.18*. Consideraremos casos *anómalos*, aquellos que de manera clara se alejan del comportamiento exponencial, por lo que no fueron incluidos en el análisis.

² El instante de toma de contacto entre el péptido y la membrana se considerará como el momento en el que se añade la suspensión de vesículas sobre la disolución presente en la cámara de muestras, usada para la observación microscópica, que contiene el péptido a una concentración conocida. Dicho momento corresponde al *tiempo-cero*, utilizado como referencia en el registro de las cinéticas.

³ Otra razón que no debe obviarse al encontrar con un número infrecuente de vesículas permeables en experimentos control es la peroxidación lipídica durante el proceso de electroformación [251].

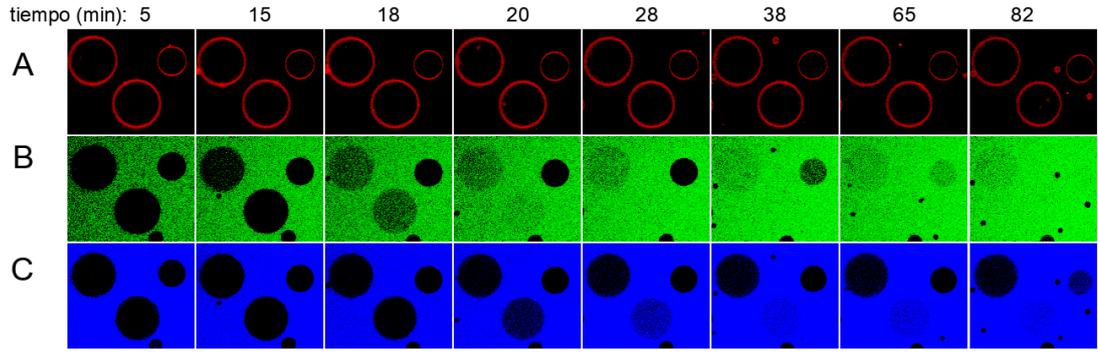


Fig. 4.1: Entrada simultánea de dos marcadores fluorescentes de distinto tamaño en GUVs, en presencia de Bax- α 5. Los tiempos correspondientes (en *min*) se indican en la parte superior de cada columna de imágenes. Estos valores están referidos al momento de adición de las GUVs a la cámara de observación (tiempo-0), que se asume también como el momento de toma de contacto de los péptidos con la membrana de las vesículas. Las tres series de imágenes se registraron simultáneamente; es decir, las imágenes mostradas en una misma columna corresponden a los mismos tiempos. (A) Imagen correspondiente a la fluorescencia de la sonda lipofílica DiD(3)C18. (B) Entrada de Alexa-555. (C) Entrada de FD20.

con el péptido, asumido como el momento de adición de la suspensión de GUVs a la cámara de observación, y llega a afectar a lo largo del experimento a la mayoría de las GUVs. Es interesante observar que la entrada Alexa555 llega a completarse en la mayoría de los casos (Fig. 4.1 A, verde), aunque hay siempre algunas vesículas que permanecen completamente impermeables al marcador (Fig. 4.1 A). Es decir la entrada de este marcador hacia el interior de las GUVs es del tipo *todo-o-nada*, lo que indica que los poros se mantienen abiertos, sin grandes variaciones en el régimen de difusión de la sonda, al menos durante el tiempo que dura el equilibrado entre las soluciones exterior e interior. Aunque también cabría pensar, partiendo de las mismas observaciones, que la entrada completa de la sonda puede deberse a la rotura de las vesículas, las imágenes correspondientes a la fluorescencia de la sonda lipofílica (DiD), registradas simultáneamente en otro canal (Fig. 4.1 C, rojo), prueban que las GUVs permanecen íntegras y sugieren que la permeabilidad se debe a la formación de poros en la membrana.

Otra característica importante, observada también en otros estudios de permeabilización de vesículas individuales [81, 250, 254], es que la permeabilización de las GUVs comienza de manera aparentemente aleatoria (Fig. 4.1). La distribución aleatoria de los tiempos de apertura de los poros, así como el ritmo de entrada de las sondas pueden observarse claramente al registrar la intensidad de emisión fluorescente en el interior de las GUVs, que se muestra de manera normalizada, $F_{in}^N(t)$, para algunos casos de dos experimentos distintos en la Fig. 4.2 A,B.

El comportamiento que acabamos de describir es muy similar al que se observa con otros marcadores de la serie Alexa, cuya masa molecular se sitúa entre 300 y 1300 Da (Tabla 4.1), y sugiere que el tamaño de todos ellos puede considerarse pequeño en comparación con el tamaño de los poros. En el caso particular de Alexa555, con una

Tab. 4.1: Sondas utilizadas en medidas de permeabilidad de GUVs, con su masa molecular, coeficiente de difusión y radio hidrodinámico. Los coeficientes de difusión mostrados corresponden en todos los casos a 22.5 °C. En la misma tabla se indica el origen de cada valor (referencia bibliográfica o método de cálculo, según cada caso).

Sonda	Mw (KDa)	D_s ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	r_h (nm)	origen
Alexa488	546 ^a	435.0	0.53	[190, 252]
Alexa555	1160 ^a	341.0	0.67	[252], ver <i>nota 4 en la página 95</i>
Alexa647	1300 ^a	308.8 ^c	0.74 ^c	D_s (25 °C) tomado de [253] y recalculado para 22.5 °C con la <i>ecu. 2.9</i> . r_h calculado utilizando la <i>ecu. 2.7</i>
FD10	10000 ^b	97.2 ^c	2.36	r_h tomado de Sigma-Aldrich. D_s calculado para 22.5 °C utilizando la <i>ecu. 2.7</i>
FD20	20000 ^b	69.5 ^c	3.30	r_h tomado de Sigma-Aldrich. D_s calculado para 22.5 °C utilizando la <i>ecu. 2.7</i>
FD40	40000 ^b	51.0 ^c	4.50	r_h tomado de Sigma-Aldrich. D_s calculado para 22.5 °C utilizando la <i>ecu. 2.7</i>

^aValores aproximados, sin tener en cuenta contraiones.

^bTamaños medios, según información proporcionada por el fabricante.

^cLa viscosidad del agua a 22.5 °C utilizada para el cálculo fue $\eta = 0.9436 \text{ mPa s}$.

4 Poros mediados por Bax- α 5 en membranas modelo

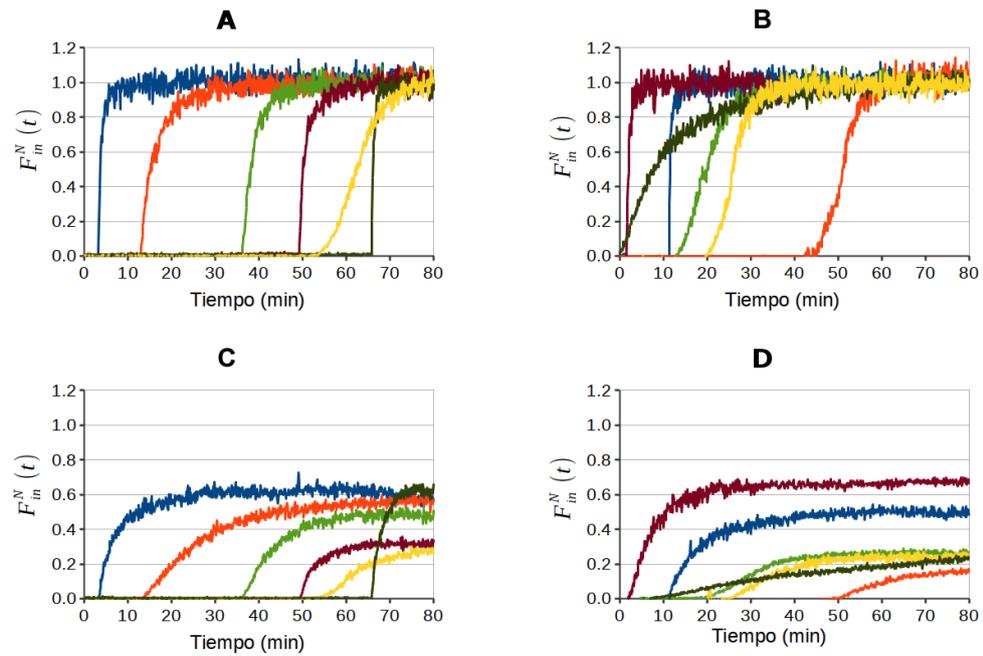


Fig. 4.2: Cinéticas de entrada simultánea de sondas fluorescentes de distinto tamaño a GUVs individuales en presencia de Bax- α 5. En cada columna de gráficas se muestran ejemplos de seis cinéticas diferentes correspondientes a entradas simultáneas de dos marcadores en un mismo experimento, donde un mismo color indica que se trata de cinéticas medidas en una misma GUV. (A, B) Entrada de Alexa555 a GUVs individuales. Las cinéticas recogidas en cada gráfica corresponden a GUVs observadas en un mismo experimento y campo de visión del microscopio. (C) Entrada de FD20 a las mismas GUVs que en A, identificables por el color de las gráficas. (D) Entrada de FD40 a las mismas GUVs que en B, identificables por el color de las gráficas.

masa molecular de ~ 1160 Da, sin tener en cuenta contraiones, el radio hidrodinámico (ver *nota* 0 en la página 61), r_h puede determinarse utilizando su coeficiente de difusión en disolución acuosa ($341 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)⁴ [252], aplicando la ecuación de STOKES-EINSTEIN (Sec. 2.6.1, ecu. 2.7), con lo que se obtiene un valor de 0.673 nm .⁵ En presencia de Bax- α 5 se registraron también cinéticas de permeabilización de GUVs utilizando las sondas Alexa647 y Alexa488, cuyos tamaños y coeficientes de difusión en agua (a $22.5 \text{ }^\circ\text{C}$) se muestran en la **Tabla 4.1**.

Para marcadores de mayor tamaño, como FD20, cuyo r_h es $\sim 3.3 \text{ nm}$, la entrada es claramente más lenta y en algunos casos parece no llegar a completarse (**Fig. 4.1 B**, azul y **4.2 C**). En principio, la menor difusión de FD20 está de acuerdo con su mayor tamaño, teniendo simplemente en cuenta la ecu. 2.14 y atendiendo al valor de D_s . Así, considerando de nuevo la ecuación de STOKES-EINSTEIN (ecu. 2.7) el coeficiente de difusión del dextrano esperable en disolución acuosa a $22.5 \text{ }^\circ\text{C}$ es $69.5 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (**Tabla 4.1**); es decir, 4.9 veces menor que en el caso de Alexa555. Como vamos a ver enseguida (Sec. 4.2.3 en la página 99), este valor (de difusión libre) puede compararse con la fracción entre las velocidades de entrada de ambas sondas, lo que nos da información sobre la posible existencia de una filtración molecular restrictiva a través de poros discretos. Ello se basa en el hecho de que, dependiendo de la relación entre los radios de la sonda y de los poros, las diferencias en la velocidad de difusión de sondas cuyo tamaño es muy distinto pueden amplificarse debido a efectos ejercidos por las paredes del poro (Sec. 2.6.3).

Los resultados descritos hasta ahora muestran claramente que el péptido Bax- α 5 es capaz de permeabilizar membranas, muy probablemente mediante la formación de poros discretos. Esta conclusión concuerda con la de una investigación previa sobre el mismo fragmento [171]. Así mismo, la proteína Bax completa presentan un comportamiento similar [107]. A continuación, se describe la caracterización de los poros formados por Bax- α 5 a partir de un análisis cuantitativo de cinéticas de entrada de marcadores en GUVs individuales.

4.2.2 Ajuste de las cinéticas de difusión

El paso de moléculas a través de la membrana de una vesícula tiene lugar en la dirección del gradiente de concentración y responde a una forma integrada de la ley de FICK (Sec. 2.6 en la página 59, ecu. 2.13). Esta función expresa la variación exponencial en función del tiempo de la concentración de la molécula en cuestión en el interior de la vesícula. La constante de velocidad de la exponencial (k_s , en s^{-1}) es el parámetro principal a la hora de caracterizar dicha difusión transmembrana. Para el caso en que existan poros discretos en la membrana, expresamos la velocidad como k_s^p (ecu. 2.16), la cual depende del volumen de la vesícula (V), la suma total del área de los poros en

⁴ El coeficiente de difusión utilizado corresponde en realidad a la sonda *Alexa546*, cuya masa molecular es prácticamente idéntica a la de *Alexa555*. Procede de medidas de espectroscopia de correlación de fluorescencia, llevadas a cabo a $22.5 \text{ }^\circ\text{C}$, que coincide con nuestra temperatura de trabajo [252].

⁵ Para ello ha de tenerse en cuenta el valor de la viscosidad del agua a $22.5 \text{ }^\circ\text{C}$, calculado utilizando la ecu. 2.8 en la página 61.

la vesícula (A^p), la longitud de los poros (m) y el coeficiente de difusión a través de los mismos (D_s^p).

Si utilizamos marcadores fluorescentes, podemos obtener valores de k_s^p a partir del ajuste de la ecuación exponencial de FICK a las cinéticas de la variación con el tiempo de la intensidad de fluorescencia en el interior de cada vesícula individual, $F_{in}^N(t)$ (ecu. 2.17). Por otro lado, hemos de tener en cuenta que los poros parecen reducir su tamaño con el tiempo [64, 171]. Este hecho no es siempre perceptible en cinéticas de sondas de la serie Alexa, cuya difusión es relativamente rápida y puede llegar a completarse antes de la relajación de los poros (Fig. 4.1 A y 4.2 A,B). Sin embargo, para sondas más grandes, como los dextrans marcados fluorescentemente, la relajación de los poros se manifiesta frecuentemente con claridad al observarse que el llenado de las GUVs no llega a completarse (Fig. 4.1 B y 4.2 C,D). Por ello, para el ajuste de las cinéticas hemos utilizado una modificación de la expresión monoexponencial que tiene en cuenta un valor de la velocidad de equilibrado de las GUVs dependiente del tiempo, $k(t)$, a través del posible decaimiento de un valor inicial, k_0 hacia un valor final, o de equilibrio, k_∞ (ecu. 2.19 y 2.20). Los valores de k_s^p que se discuten a continuación corresponden a k_0 (valores iniciales). Sobre los valores de equilibrio, ver Sec. 4.3 en la página 109.

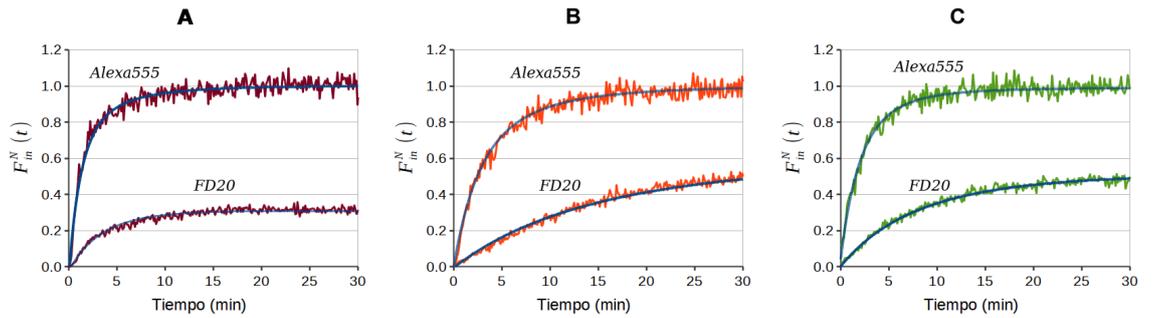


Fig. 4.3: Ajuste teórico de las cinéticas de entrada de marcador fluorescente en GUVs individuales en presencia de Bax- α 5. Se muestran ejemplos correspondientes a tres GUVs a los cuales entran simultáneamente las sondas Alexa555 y FD20, según se indica al lado de cada gráfica. La función teórica utilizada es la expresada por las ecu. 2.19 y ecu. 2.20. Las cinéticas elegidas corresponden a tres casos de entre los representados en la Fig. 4.2 A,B, que pueden identificarse por su color, aunque para mayor claridad en esta figura los tiempos de inicio se han desplazado a valor cero.

la Fig. 4.2 recoge ejemplos de cinéticas de entrada simultanea de los marcadores Alexa555 / FD20 (A,C) y Alexa555 / FD40 (B,D). El ajuste de la ecu. 2.19 a estos datos se ilustra con algunos casos correspondientes al experimento con Alexa555 y FD20 Fig. 4.3. Se llevaron a cabo ajustes similares a los mostrados para un total de 56 vesículas, 36 de ellas con entrada simultanea de dos marcadores (Alexa555 / FD20, Alexa555 / FD40 o Alexa488 / Alexa647) y 20 con entrada de un solo marcador (Alexa488), por lo que en total se analizaron 92 cinéticas distintas.

4.2.3 Análisis e interpretación de los resultados

Distribución de constantes de velocidad

De acuerdo con la, [ecu. 2.16](#), la velocidad de cambio de la concentración de un marcador en el interior de cualquier GUV es inversamente proporcional a su volumen. Por ello, si queremos comparar cinéticas de distintas GUVs es conveniente utilizar valores del producto $k_s^p V$:⁶

$$k_s^p V = A_s^p \frac{D_s^p}{m} \quad (4.1)$$

donde, como se explica en la [Sec. 2.6.2](#) tomamos A_s^p como área permeable, correspondiente a la fracción de área de la vesícula ocupada por poros, o suma del área de todos ellos, a través de los cuales difunde la sonda. Así mismo, D_s^p es el coeficiente de difusión de la sonda a través de los poros y m la longitud de paso a través de los poros ([Sec. 2.6 en la página 59](#)), que puede aproximarse como el espesor de la bicapa lipídica (~ 3.9 nm)⁷ [[255](#)].

Los valores $k_s^p V$ correspondientes a las entradas de Alexa488 se representan en la [Fig. 4.4 A](#) en orden creciente. En la misma gráfica se muestran también los valores de entrada simultánea registrados en algunas GUVs para la sonda Alexa647. Igualmente, en la [Fig. 4.4 C](#) se muestran los valores de $k_s^p V$ ordenados para la entrada de Alexa555, junto a los que corresponden a entradas simultáneas de FD20 (o FD40 en algunos casos). Como puede verse, los dos marcadores que entran simultáneamente en la misma GUV muestran perfiles crecientes similares (se aprecia mejor en la [Fig. 4.4 A](#) por razones de escala), aunque lógicamente la entrada del marcador de menor tamaño es siempre más rápida, como corresponde a las diferencias entre los coeficientes de difusión de ambas sondas ([Tabla 4.1](#)). Por otro lado, es destacable la existencia de escalones en varias zonas de estos perfiles, más apreciables por razones de escala en la [Fig. 4.4 C](#), curva azul, lo que sugiere que la distribución de $k_s^p V$ es discreta.

Las distribuciones en forma de histograma para las entradas de Alexa488 y Alexa555 en GUVs individuales se representan en las [Fig. 4.4 B,D](#). Entre ambas muestran una gran dispersión de valores y sugieren la presencia de múltiples modos (*picos*). Sin embargo, el número de casos es relativamente bajo y por lo tanto la posible existencia de varias distribuciones solapadas no es fácilmente deducible de manera directa.

⁶ Una forma alternativa de expresar la velocidad de reequilibrado del interior de las GUV con independencia de su tamaño es a través del producto $k_s^p R$, donde R es el radio de la GUV, teniendo en cuenta que $k_s^p \frac{V}{A} = f^p \frac{D_s^p}{m} = k_s^p \frac{R}{3}$. Sin embargo, en la mayoría de los casos utilizaremos el producto $k_s^p V$, ya que permite tratar de una manera directa el carácter individual de los poros.

⁷ La estimación de un buen valor de longitud del poro es problemática, tanto por el hecho de desconocer la estructura y geometría concreta de los poros como por la ausencia de datos experimentales adecuados sobre la anchura de membranas con nuestra composición lipídica. El valor que utilizamos (3.9 nm) corresponde a la distancia entre máximos del perfil de densidad electrónica medida en estudios de difracción de neutrones y difracción de rayos X, en combinación con simulaciones de dinámica molecular, llevados a cabo sobre bicapas de tetraoleil cardiolipina (TOCL). La anchura de estas membranas es ~ 0.2 nm mayor que la de bicapas de dioleil fosfatidilcolina (DOPC) [[255](#)].

4 Poros mediados por Bax- α 5 en membranas modelo

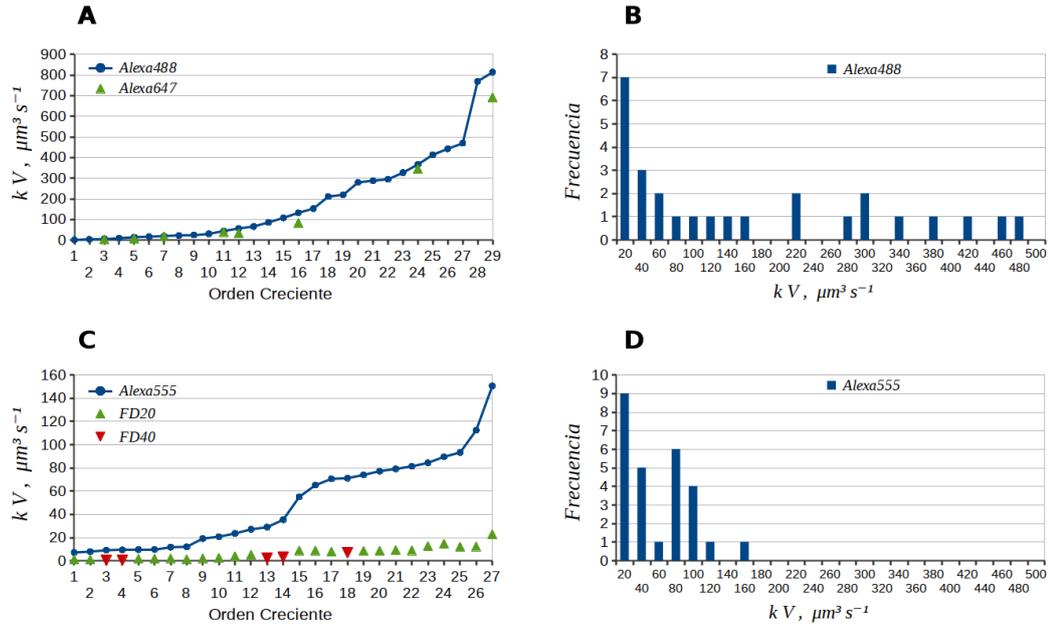


Fig. 4.4: Distribuciones de valores $k_s^p V$ para la entrada de distintas sondas en GUVs individuales en presencia de Bax- α 5. (A) Valores correspondientes a la entrada simultanea de Alexa488 (azul, orden creciente) y Alexa647 (triángulos verdes). (B) Histograma de $k_s^p V$ para la entrada de Alexa488 en las mismas vesículas que en A. (C) Valores correspondientes a la entrada simultanea de Alexa555 (azul, orden creciente) y FD20 (triángulos verdes) o FD40 (triángulos rojos invertidos). (D) Histograma de $k_s^p V$ para la entrada de Alexa555 en las mismas vesículas que en C.

En principio, de acuerdo con la [ecu. 4.1](#), las diferencias de $k_s^p V$ entre GUVs podrían deberse tanto a distintos valores de D_s^p como a distintos valores de A_s^p . Es razonable suponer que D_s^p es característico de cada tipo de sonda bajo unas condiciones dadas (de composición de la membranas y parámetros ambientales y de la disolución). Ello equivale a asumir que todos los poros individuales son equivalentes entre sí (tanto dentro de una determinada GUV como entre distintas GUVs), ya que diferencias entre los poros, por ejemplo en su tamaño, pueden traducirse en cambios en el valor de D_s^p , sobre todo si la difusión ocurre en régimen restringido (ver [Sec. 2.6.3 en la página 65](#)). No obstante, no parece posible justificar que la gran amplitud de la dispersión de $k_s^p V$ (en el rango al menos de $\sim 10 - 800 \mu m^3 s^{-1}$, [Fig. 4.4](#)) se deba a distintos valores de D_s^p .

En cuanto a A_s^p , se trata de la suma de las áreas de todos los poros que existen en una GUV determinada en el momento en el que se produce el paso de la sonda. Si para unas condiciones dadas, a_s^p es el área individual característica de los n poros de una GUV, bien por ser todos idénticos, o de una forma más realista, por ser a_s^p el área promedio de una distribución normal unimodal de áreas individuales de los poros, el área total de los poros de la GUV será:

$$A_s^p = n_s a_s^p \quad (4.2)$$

Entre distintas GUVs, n_s puede asumirse como variable y a_s^p podría también variar, sobre todo si se da el caso de que el péptido no se une por igual a todas las vesículas. Sin embargo, de nuevo, la gran dispersión de valores $k_s^p V$, así como el carácter aparentemente discreto de su distribución, parecen *a priori* sugerir que los cambios entre GUVs se dan principalmente en el número de poros, más que en el área de individual de los mismos. A continuación se añaden justificaciones más sólidas para esta conclusión.

Deducciones relacionadas con el análisis del régimen de difusión de las sondas.

Para obtener más información a partir de la distribución de $k_s^p V$ es necesario preguntarse en qué régimen ocurre la difusión de cada sonda (ver [Sec. 2.6.3 en la página 65](#)). Así mismo, en los estudios de entrada simultánea de dos sondas el comportamiento observado con respecto al esperado en el caso de que exista difusión restringida para alguna de ellas permite llevar a cabo deducciones interesantes. Para ello utilizaremos el modelo expresado por la [ecu. 2.23](#) [172, 187], ya que, a pesar de sus limitaciones (ver [nota15 en la página 66](#)), permite llevar a cabo valoraciones cualitativas importantes.

1. **Las diferencias en la permeabilidad entre GUVs se deben a variaciones del número de poros, no a cambios de su tamaño.** Supongamos en principio que la difusión de dos sondas a y b de distinto tamaño ocurre en régimen de difusión restringida. Si consideramos las [ecu. 4.1](#) y [4.2](#) para la entrada simultánea de las dos sondas en una determinada vesícula, asumiendo que entre ambas no se afectan en su difusión, la fracción $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$ (donde el subíndice r indica difusión restringida, ver [nota14 en la página 66](#)) correspondiente a cada GUV es:

$$\frac{k_{a,r}^p}{k_{b,r}^p} = \frac{n_{a,r} a_{a,r}^p D_{a,r}^p}{n_{b,r} a_{b,r}^p D_{b,r}^p} \quad (4.3)$$

4 Poros mediados por Bax- $\alpha 5$ en membranas modelo

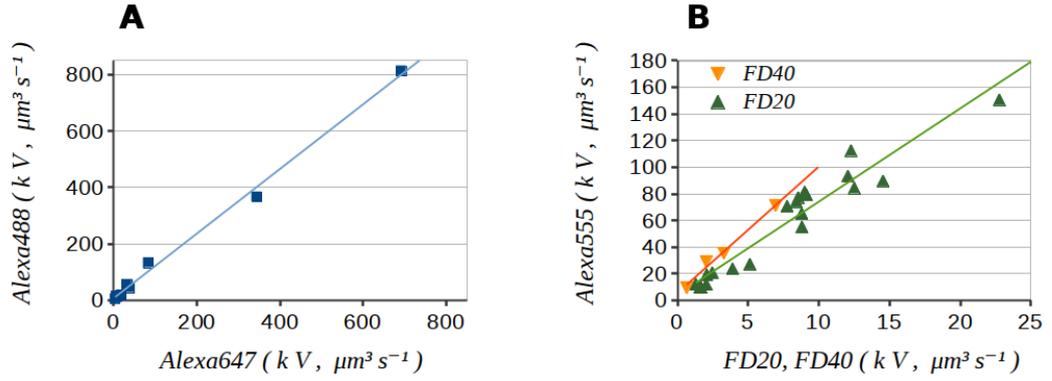


Fig. 4.5: Correlación de constantes de velocidad de entrada (valores $k_s^p V$) en presencia de Bax- $\alpha 5$ para sondas de distinto tamaño medidas simultáneamente en las mismas GUVs. (A) Valores correspondientes a la entrada simultánea de Alexa488 y Alexa647. (B) Valores correspondientes a la entrada simultánea de Alexa555 y FD20 (verde) o FD40 (naranja).

Como se ha mostrado, dentro de la población de GUVs analizadas existe una gran disparidad de velocidades de difusión (**Fig. 4.4**). En general, tal variabilidad puede atribuirse a cambios entre GUVs de $n_{s,r}$, $a_{s,r}^p$ o $D_{s,r}^p$. En cuanto al número de poros que intervienen en la difusión, puede fácilmente admitirse que para cada GUV éste es el mismo para las dos sondas ($n_{a,r} = n_{b,r}$; es decir, ambas sondas pasan por los mismos poros), por lo que no afectaría a la fracción $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$. Esta asunción debe de ser válida siempre que $r_{s,h}/r_p < 0.5$ (**Sec. 2.6.3**), lo cual se cumple en nuestro caso, como comprobaremos más adelante. Por otro lado, los valores de $a_{s,r}^p$ y de $D_{s,r}^p$ dependen de la relación $r_{s,h}/r_p$ (**ecu. 2.23**). Por ello, si existen cambios en el área individual de los poros entre distintas GUVs, éstos afectarán de forma diferente a cada una de las sondas, ya que sus $r_{s,h}$ no son iguales. Por ejemplo, es fácil ver (**ecu. 2.23**) que un incremento en el tamaño de los poros afectaría más a la sonda grande, por lo que si las distintas velocidades de difusión entre GUVs se deben a cambios en el tamaño de los poros, la fracción $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$ debería ser mayor para las GUVs en las que medimos valores más altos de difusión. Sin embargo, $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$ varía en general poco para el conjunto de las GUVs analizadas, como muestran las correlaciones entre los valores de $k_{a,r}^p V$ y $k_{b,r}^p V$ para distintos casos (**Fig. 4.5**). Además, no parece haber relación alguna entre las velocidades de re-equilibrado de las GUVs, normalizadas teniendo en cuenta su tamaño (es decir, considerando $k_s^p R$, ver **nota 6 en la página 97**) y las correspondientes fracciones $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$ de dos sondas que entran simultáneamente (**Fig. 4.6**). Por ello concluimos que en nuestras condiciones de ensayo el tipo y tamaño de los poros varían poco en la población de GUVs, y las distintas permeabilidades observadas entre GUVs se deben a la presencia de distintos números de poros.

2. Las sondas de la serie Alexa difunden libremente a través de los poros.

Las sondas Alexa488 y Alexa647 presentan tamaños significativamente distintos (**Tabla 4.1**), por lo tanto, teniendo en cuenta la **ecu. 4.3** para la entrada simultanea de ambas sondas, si existe difusión restringida para ambas, o al menos para la mayor de ellas, la fracción $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$ debe desviarse significativamente de la fracción de sus coeficientes de difusión libre. Como puede deducirse de las correlaciones representadas en la **Fig. 4.5 A**, para la entrada de Alexa488 y Alexa647, $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$ varía poco entre las GUVs analizadas, obteniéndose un valor promedio de 1.41 ± 0.3 . Este valor es prácticamente idéntico al de la fracción de coeficientes de difusión libre de las mismas sondas (**Tabla 4.1**), $\frac{435}{309} = 1.41$, por lo que deducimos que Alexa488, Alexa647, así como Alexa555 (ya que el tamaño de esta última se encuentra entre los de las anteriores) difunden libremente a través de los poros de las GUVs formados por Bax- α 5. Esta conclusión es importante, ya que nos permite utilizar los coeficientes de difusión conocidos para estas sondas a la hora de evaluar cuantitativamente su difusión a través de los poros.

3. **Los dextranos marcados fluorescentemente difunden de manera restringida a través de los poros.** Si tenemos ahora en cuenta la fracción $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$ (**ecu. 4.3**) para Alexa555 (sonda *a*) y FD20 (sonda *b*), así como la correlación de velocidades de entrada simultanea de ambas sondas (**Fig. 4.5**), observamos valores similares de $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$ entre distintas GUVs, con un promedio de 7.5 ± 1.4 . Este valor es claramente mayor que la fracción de los coeficientes de difusión libre de las mismas sondas (**Tabla 4.1**), $\frac{341}{69.5} = 4.91$, lo que demuestra que FD20 entra en las GUVs en condiciones de difusión restringida. Debido a ello, los coeficientes de difusión libre de sondas de este tamaño, o superior (como FD40) no pueden ser utilizados directamente en análisis cuantitativos.
4. **Primera estimación del radio de los poros.** En principio, de acuerdo con lo descrito en la **Sec. 2.6.3** podemos llevar a cabo una estimación aproximada del radio de los poros. Para ello necesitamos utilizar datos de entrada simultanea de una sonda del tipo Alexa (difusión libre) en experimentos distintos con dextranos de diferente tamaño. A parte del caso comentado en el párrafo anterior (Alexa555 / FD20) tenemos algunos datos correspondientes a la entrada simultánea de Alexa555 y FD40. Del primer caso sabemos que la velocidad de entrada de FD20 es un $\sim 65\%$ menor de lo que cabría esperar por difusión libre, por lo que teniendo en cuenta la **ecu. 2.23** se esperaría un poro cuyo radio sería ~ 10.25 veces mayor que el de esa sonda (**Tabla 4.1**) $r_p \approx 10.25 \times r_{FD20,h} \approx 33.8 \text{ nm}$. Teniendo en cuenta este valor, para FD40 correspondería: $r_p/r_{FD40,h} = 33.8/4.5 \approx 7.5$, y utilizando de nuevo la **ecu. 2.23**, estimaríamos una disminución de la velocidad de entrada del FD40, con respecto a su difusión libre de $\sim 54\%$. Este valor está de acuerdo con los datos de entrada simultanea de Alexa555 y FD40, de los cuales puede calcularse que en promedio el dextrano atraviesa la membrana a una velocidad $\sim 52\%$ menor de lo que cabría esperar por difusión libre. Partiendo de la presente estimación del radio de los poros, el valor mínimo de $k_s^p V$, correspondiente a un solo poro, para una sonda como Alexa555 sería (**ecu. 4.1**) $\pi \times 33.8^2 \times \frac{341 \times 10^6}{3.9} = 313.81 \times 10^9 \text{ nm}^3 \text{ s}^{-1}$

($400.32 \times 10^9 \text{ nm}^3 \text{ s}^{-1}$ en el caso de Alexa488). Sin embargo, como puede verse en los datos representados en la **Fig. 4.4**, la mayoría de las cinéticas analizadas muestran valores de $k_s^p V$ bastante más pequeños. Parece, por lo tanto, que la **ecu. 2.23** sobrestima en gran medida el efecto restrictivo de los poros presentes en nuestro sistema, seguramente debido a que su parametrización no es adecuada para nuestro caso (ver **nota 5** en la página 66).

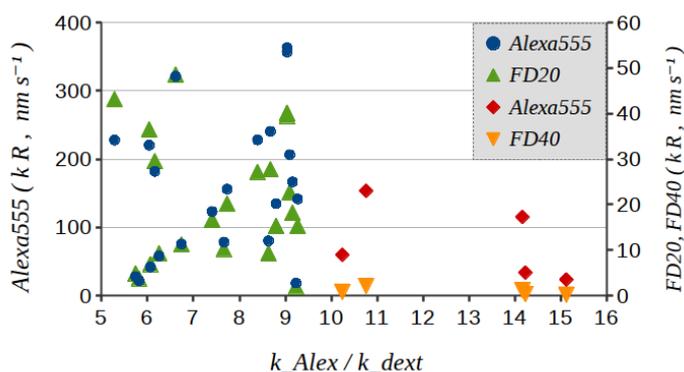


Fig. 4.6: Fracción de velocidades de dos sondas de distinto tamaño con entrada simultánea frente a la velocidad correspondiente a cualquiera de ellas. Se utilizan valores de velocidad normalizados teniendo en cuenta el tamaño de las GUVs ($k_s^p R$, ver **nota 6** en la página 97). Cada tipo de sonda se indica con un color y símbolo diferente, según se marca en la figura. k_{Alex} / k_{dext} se refiere a fracciones $k_a^p / k_{b,r}^p$, donde la sonda a es Alexa555 y la sonda b es FD20 o FD40.

4.2.4 Tamaño de los poros y número de poros por vesícula

Área individual de los poros

Acabamos de demostrar que para marcadores del tipo Alexa las cinéticas de difusión hacia el interior de las GUVs puede analizarse utilizando su coeficiente de difusión libre. Por lo tanto, teniendo en cuenta la **ecu. 4.1**, la distribución de $k_s^p V$ puede transformarse en una distribución de valores de área total permeable de cada GUV (A_s^p , **Fig. 4.7**). Como puede observarse en la representación en forma de histograma (**Fig. 4.7 A**) existe un amplio rango de valores de A_s^p y éstos parecen agruparse en conjuntos (*clusters*). Por otro lado, si representamos los valores en orden creciente (**Fig. 4.7 B**) se aprecian escalones, como ya habíamos visto en la gráfica análoga de $k_s^p V$ (**Fig. 4.4**). Todo ello de nuevo indica que se trata de distribuciones discretas, con distintos *picos* de densidad de probabilidad.

La **ecu. 4.2** nos dice que cada valor A_s^p puede descomponerse en un producto del número de poros por su área individual, $n_s a_s^p$, ya que, como hemos concluido arriba, es el número de poros, y no su área individual, lo que puede variar entre GUVs. Nótese además que en condiciones de difusión no restringida, como es el caso de marcadores

4.2 Poros de membrana formados o inducidos por Bax- α 5

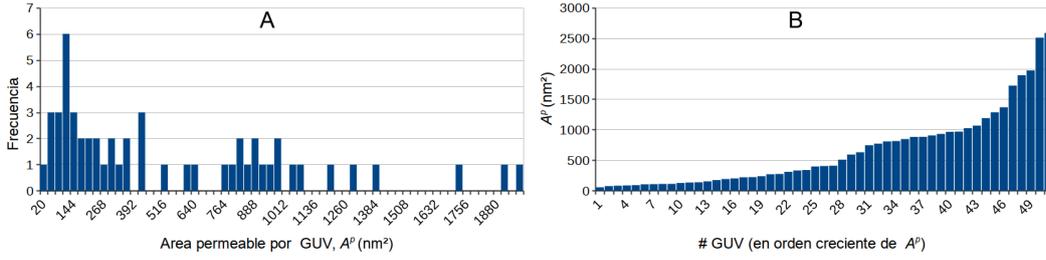


Fig. 4.7: Distribuciones del área total permeable en la población de GUVs estudiadas. (A) Distribución de frecuencia de A^p en forma de histograma. (B) Valores ordenados de A^p en sentido creciente. Las distribuciones corresponden al total de cinéticas analizadas para la entrada de marcadores del tipo Alexa (Alexa555, Alexa488 y Alexa647).

Alexa, tanto n_s como a_s^p (y por ende A_s^p) son independientes del tipo de sonda utilizada, por lo que seguidamente prescindimos del subíndice en su notación. En la práctica esto significa también que podemos acumular en una misma distribución todos los valores A^p obtenidos para un mismo sistema con independencia del tipo de sonda, como se ha hecho para el análisis que sigue.

Por lo tanto, cada uno de los *clusters* que compone la distribución de A^p (Fig. 4.7) debería poder asociarse a un determinado número entero n_i característico. Además, puesto que la variabilidad dentro de cada *cluster* se debe al valor de a^p (en principio idéntico en todos ellos), internamente cada uno debería aproximarse a una distribución normal cuya media (μ_i) sea el producto de n_i por la media del *cluster unidad* y siendo las desviaciones estándar (SD_i) de todos los *clusters* muy similares entre ellas. Teniendo esto en cuenta, es fácil encontrar que el conjunto de los 14 valores más pequeños de A^p obtenidos con sondas del tipo Alexa (que suman hasta 21 si se incluyen los valores correspondientes a entradas de dextranos⁸) se ajustan bien a una distribución normal con los siguientes valores (*cluster 1*): $\mu_1 = 97.15 \text{ nm}^2$ y $SD_1 = 30.5 \text{ nm}^2$. Igualmente, encontramos también con facilidad tres *clusters* más (Fig. 4.8 A): *cluster 2* con $\mu_2 = 196.73 \text{ nm}^2$ y $SD_2 = 26.35 \text{ nm}^2$, *cluster 3* con $\mu_3 = 296.95 \text{ nm}^2$ y $SD_3 = 28.92 \text{ nm}^2$ y *cluster 4* con $\mu_4 = 771.96 \text{ nm}^2$ y $SD_4 = 28.22 \text{ nm}^2$.

Como puede comprobarse, los cuatro *clusters* presentan valores de SD muy similares. Además, todos ellos parecen ser múltiplos de un número que se aproxima al valor del *cluster* de menor tamaño: $\mu_1 = 1 \times 97.15$, $\mu_2 = 2 \times 98.36$, $\mu_3 = 3 \times 98.98$ y $\mu_4 = 8 \times 96.5$. Es decir, se trata en realidad de sub-distribuciones de GUVs con $n_1 = 1$, $n_2 = 2$, $n_3 = 3$

⁸ Aunque tanto FD20 como FD40 difunden en régimen restringido, el análisis detallado en el apartado anterior permite obtener una buena estimación de $D_{s,r}^p$ correspondiente a la entrada de cada uno de ellos por los poros, teniendo en cuenta la fracción correspondiente de valores experimentales $k_{a,r}^p/k_{b,r}^p$, lo que en la práctica significa que podemos incluir también los valores A^p obtenidos de las medidas de difusión de estas sondas.

4 Poros mediados por Bax- $\alpha 5$ en membranas modelo

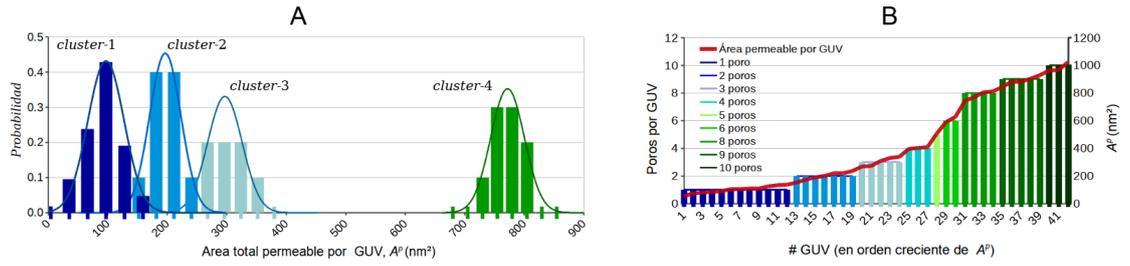


Fig. 4.8: Análisis de *clusters* en la distribución de A_p . (A) De entre el conjunto total de valores A^p se obtienen cuatro *clusters* con *SD* muy similares entre sí y siendo la media de los tres mayores un número entero n multiplicado por la media del primero. El número n representa el número de poros en las GUVs correspondientes. (B) Comparación de valores de A^p (en orden creciente) con los valores n (de número de poros) correspondientes.

y $n_4 = 4$ poros, cuya área unitaria debe aproximarse a:

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_1 + \frac{1}{n_2}\mu_2 + \frac{1}{n_3}\mu_3 + \frac{1}{n_4}\mu_4}{4} \quad (4.4)$$

que en este caso arroja un valor de $\sim 97.75 \text{ nm}^2$. Utilizando este último valor como divisor, puede estimarse el número de poros para el conjunto de las GUVs, incluidas aquellas para las cuales el número de casos es insuficiente para construir un *cluster* a parte de los 4 analizados (valores de la distribución de A^p entre ~ 400 y $\sim 700 \text{ nm}^2$ y mayores que $\sim 850 \text{ nm}^2$, Fig. 4.7 A y 4.9 A). Ello permite a su vez obtener una distribución de valores a^p que conforma la distribución del área individual de los poros en la población de GUVs analizadas (Fig. 4.9 A), a partir de la cual puede calcularse la distribución del radio de los poros (Fig. 4.9 B).

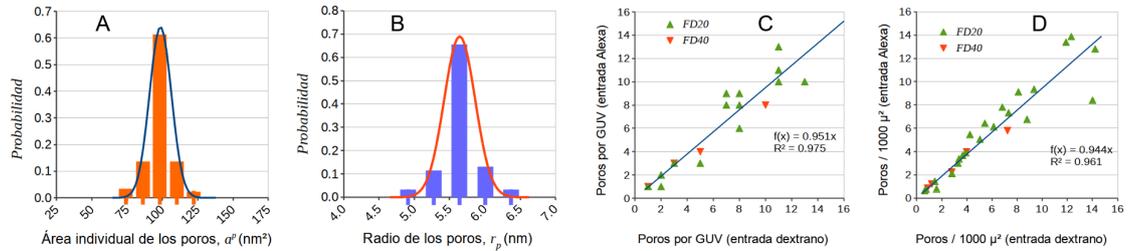


Fig. 4.9: Propiedades de poros individuales. (A) Distribución del área de poros individuales en el conjunto de las GUVs analizadas. (B) Distribución del radio de los poros. (C) Correlación de poros por GUV a partir de medidas de la entrada simultánea de sondas de distinto tamaño (Alexa / dextrano). (D) Correlación de densidades de poros en las membranas de las GUVs a partir de las mismas medidas de entrada simultánea de sondas de distinto tamaño que en C.

Los datos muestran una población de poros muy homogénea, de acuerdo con nuestra deducción previa (Sec. 4.2.3 en la página 99), con un radio medio de $5.64 \pm 0.21 \text{ nm}$. Este

valor está de acuerdo con estimaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo [34, 171] y es también cercano al radio de poros formados por melitina en monocapas soportadas, observados directamente mediante AFM [88]. Sin embargo, es considerablemente menor que el que se obtiene de manera aproximada teniendo en cuenta la razón de velocidades de difusión de sondas de distinto tamaño en condiciones de difusión restringida (ver [punto 4 en la página 101](#)). En cuanto a esta última divergencia, ya advertíamos que la teoría utilizada en aquel caso parece dar lugar a una sobre-estimación del tamaño de los poros [190, 192]. En principio, las desviaciones pueden deberse a la distinta naturaleza tanto de los poros como de los solutos utilizados para desarrollar y parametrizar la *ecu. 2.23*, comparadas con nuestro caso. En concreto (ver [nota 5 en la página 66](#)), se trataría de paredes capilares y poros en membranas de celulosa [186, 187], y el modelo parece ser válido para canales proteicos [189, 191] y conexiones intracelulares [188, 190] a través de los cuales se ha estudiado la difusión de distintos tipos de especies cuyo radio se sitúa en la escala sub-nanométrica.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la teoría utilizada para desarrollar ese modelo teórico considera para el soluto o sonda una aproximación de esfera rígida, con radio r_h . Así mismo, considera una aproximación de cilindro rígido para el poro, con radio r_p . Sin embargo, en el caso que nos ocupa tanto los poros como los dextranos marcados fluorescentemente, aún cuando en promedio se aproximen a las formas ideales de cilindro y esfera, pueden sufrir grandes deformaciones. Esta posibilidad permitiría que la sonda penetre en el volumen confinado de los poros incluso cuando $r_p < r_h$, algo que prohíben las aproximaciones de cuerpo rígido. Tal es el caso, por ejemplo, de la *difusión anómala* de poliisopropilamida de alto peso molecular a través de nanoporos en membranas de policarbonato [256], del paso de largas fibras de DNA a través de nanocanales [257] o el transporte pasivo de proteínas desnaturalizadas a través del canal transmembrana de α -hemolisina [258]. En los tres casos mencionados el soluto tiene cierta semejanza con las cadenas de dextrano, ya que se trata de una cadena polimérica flexible con estructura fibrilar no compacta y posibilidad de llevar a cabo múltiples interacciones débiles. El paso de estas cadenas a través de los poros se define a través de una termodinámica compleja, en la que intervienen efectos entrópicos, opuestos a la difusión y relacionados con la dinámica conformacional de la cadena y su confinamiento en un volumen reducido, que son contrarrestados por distintos tipos de fuerzas, entre las que pueden encontrarse desde la presión osmótica hasta interacciones entre la sonda y las paredes del poro [256].

Distribución del número de poros por GUV

El número de poros por vesícula es en sí un resultado interesante. Con los datos que acabamos de describir podemos transformar la distribución de A^p en una distribución del número de poros por GUV, la cual presenta un carácter netamente discreto ([Fig. 4.8 B](#)). Además, como cabía esperar, existe una buena correlación entre los números de poros que se determinan utilizando sondas de distinto tamaño en entrada simultánea ([Fig. 4.9 C,D](#)). Este último hecho refleja la coherencia del análisis llevado a cabo y sirve como soporte adicional de nuestros resultados.

Por otro lado, se observa un número bastante variable de poros por GUV (entre 1

4 Poros mediados por Bax- α 5 en membranas modelo

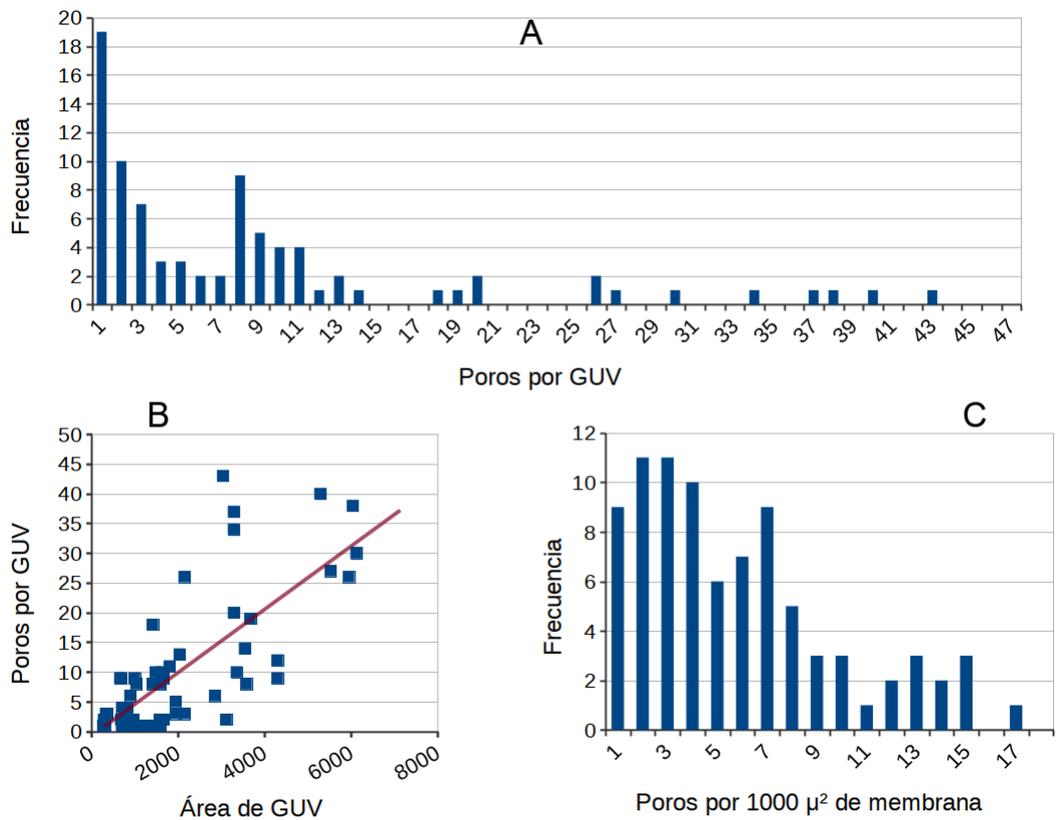


Fig. 4.10: Distribución del número de poros por GU y su correlación con el área de la membrana. (A) Distribución de frecuencia del número de poros en el conjunto de las GUVs analizadas. (B) Correlación entre el número de poros que se observa en cada GU y el área de su membrana. (C) Distribución de frecuencia de la densidad de poros en la membrana.

y 43), aunque predomina un número bajo de poros, encontrándose un primer conjunto mayoritario de GUVs con entre 1 y 3 poros y un segundo conjunto también relativamente abundante de entre 8 y 11 poros (**Fig. 4.10 A**). Dado que la superficie de las GUVs es también variable, cabe preguntarse si existe alguna relación entre el número de poros y el área de la membrana de cada GUV. Como se muestra en la **Fig. 4.10 B**, dicha correlación existe, pero es leve, ya que aunque en general las GUVs grandes tienden a tener un número alto de poros, hay una gran disparidad de casos, sobre todo en la escala intermedia. Por ejemplo, GUVs de $\sim 3500 \mu\text{m}^2$ pueden presentar entre 2 y 43 poros (**Fig. 4.10 B**).

Densidad de poros en las membranas

Para poder valorar la presencia de poros con independencia del tamaño de las vesículas, determinamos su número por unidad de área de membrana, o para mayor comodidad, por cada $1000 \mu\text{m}^2$ de superficie de las GUVs⁹ (**Fig. 4.10 C** y **Fig. 4.9 D**). Como puede verse, la densidad de poros varía entre 1 y 17 por $1000 \mu\text{m}^2$. Se trata, en cualquier caso, de números bajos, que indican que la gran mayoría de moléculas de péptido no participa en la formación de estructuras de poro.

La estimación de la densidad de poros en vesículas no es tarea fácil, por lo que existen pocos ejemplos publicados. Con frecuencia se trabaja en condiciones de alta concentración de proteína y se asume *saturación* de la membrana por poros. Nuestra concentración de péptido en el medio de ensayo, en relación a la concentración de lípido estimada no es baja (1/90, relación molar P/L)¹⁰. Por ello sorprende en primer lugar la existencia de pocos poros. Esta baja densidad de poros contrasta también con datos de otros sistemas estudiados. Por ejemplo, en distintos tipos de preparaciones de vesículas lipídicas conteniendo α -hemolisina a concentración que puede considerarse saturante llegan a observarse entre ~ 25 y ~ 145 poros por μm^2 [191]. En otro caso investigado recientemente por nuestro grupo [88], en el cual las muestras consisten en monocapas lipídicas en presencia de *melitina*, observamos por AFM de manera directa entre 16 y 41 poros por μm^2 , dependiendo del tipo de dominio lipídico y condiciones de preparación de la muestra. Sin embargo, en este último estudio es probable que la mayor densidad de poros este relacionada con el tipo de muestra (monocapas lipídicas, soportadas en láminas de vidrio y en condiciones de baja hidratación). Además, se utilizaron relaciones P/L relativamente (1/25 - 1/14) en comparación con el presente trabajo.

También es destacable la diversidad de densidades de poros observada en la población de GUVs, en un rango que abarca al menos un orden de magnitud (**Fig. 4.10 D**). La mayoría de las GUVs presentan entre 1 y 4 poros por $1000 \mu\text{m}^2$. En un segundo grupo también importante se observan entre 5 y 10 poros por $1000 \mu\text{m}^2$ y por último hay un tercer grupo con 11-17 poros por $1000 \mu\text{m}^2$. Esta distribución sugiere la existencia de

⁹ $1000 \mu\text{m}^2$ es aproximadamente la superficie de una esfera de $9 \mu\text{m}$ de radio, el cual es un tamaño común en nuestras preparaciones de GUVs.

¹⁰ Hay que tener en cuenta que se trata de un valor estimado, por necesidad, ya que no es posible determinar con precisión la concentración de lípido finalmente presente en la suspensión de vesículas después de su preparación.

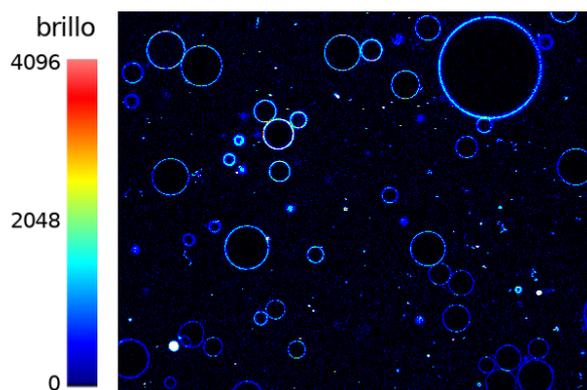


Fig. 4.11: GUVs en presencia de Bax- α 5 marcado fluorescentemente. La imagen corresponde a la fluorescencia de rodamina, utilizada para marcar el péptido a través del residuo Cys¹²⁶ de su secuencia (**Tabla 2.1**). Las membranas de las GUVs son de POPC:CL. Como puede observarse la intensidad del brillo fluorescente es variable entre las distintas GUVs.

tres categorías de vesículas en las muestras, que se diferenciarían en algún parámetro importante relacionado con el número de poros. Es muy probable que ese parámetro sea la cantidad de péptido unido a la membrana en una GUV determinada. A este respecto, lo primero que cabe preguntarse es si existe alguna conexión entre las distintas densidades de poros y las distintas muestras de GUVs utilizadas en el estudio, lo que podría indicar problemas de reproducibilidad en las preparaciones. Sin embargo, no existe tal relación, ya que las GUVs analizadas correspondieron a un total de 14 preparaciones diferentes y en muchas de ellas se observan valores de densidad de poros de muy distinto tipo.

Para comprobar si dentro de una misma preparación la unión del péptido es homogénea, se llevaron a cabo algunos experimentos en presencia de péptido marcado fluorescentemente; en concreto, péptido unido covalentemente al fluoróforo rodamina maleimida a través de un residuo de Cys (**Sec. 2.2.3**) presente en la secuencia de manera natural. Como puede observarse en la **Fig. 4.11**, la unión del péptido es bastante desigual entre las distintas vesículas de una misma muestra, a pesar de que su concentración en la disolución que acoge las GUVs, en el momento anterior a la observación, es homogénea. Se trata también de una unión rápida, de manera que típicamente se completa antes de la sedimentación de las GUVs, necesaria para comenzar las observaciones (**Sec. 2.5.1**), por lo que no pudimos registrar cinéticas de unión de péptido. Además, los valores de brillo fluorescente debido a la marca peptídica, asociados a la membrana de cada GUV permanecen prácticamente constantes con el tiempo (al menos durante las ~ 2 horas de duración típica de cada sesión). Todo ello indica una asociación fuerte con la membrana, virtualmente irreversible, lo que al parecer impide una redistribución de los péptidos entre las vesículas.

Aunque los valores de brillo fluorescente del péptido marcado no permiten determinar su concentración sin un calibrado previo, sí los podemos comparar internamente en cada experimento. En concreto, entre las vesículas mostradas en la **Fig. 4.11** los valores de brillo fluorescente del péptido marcado pueden distribuirse de forma aproximada en tres

grupos, lo que estaría cualitativamente de acuerdo con la distribución de densidades de poros. Por ello concluimos que la variabilidad de esta última es un reflejo de la variabilidad entre GUVs de la cantidad de péptido unida a la membrana.

4.3 Poros en equilibrio

4.3.1 Evolución temporal de los poros iniciales

Ideas previas sobre el mecanismo de formación de los poros y su estabilidad

El mecanismo de formación de poros en membranas lipídicas mediados por péptidos catiónicos es aún controvertido. Está ampliamente extendida la idea de que se trata de poros transitorios, y algunos estudios realizados con *melitina* sobre LUVs (vesículas lipídicas en el rango de ~100 nm de diámetro) apoyan la hipótesis de que su formación corresponde a un estado intermedio en el proceso de traslocación del péptido a través de la membrana [259]. Sin embargo, trabajos recientes llevados a cabo por nuestro grupo muestran en el caso de Bax- α 5 [64, 171] que los poros siguen existiendo en las mismas GUVs al menos dos horas después de su permeabilización inicial. Los mismos trabajos además defienden que estos poros permanentes, o poros de *equilibrio*, presentan un menor tamaño que los poros iniciales, algo que también ha sido propuesto para el caso de los poros formados por *magainina* [260]. Estos hechos están de acuerdo con la idea de que los poros son una respuesta termodinámica a defectos del empaquetamiento lipídico, amplificadas por la unión de los péptidos en la región interfacial [261]. Según esta teoría, en una bicapa lipídica pueden formarse poros incluso si ésta se compone solo de lípidos [87]. Los poros serían consecuencia de defectos, que aparecen esporádicamente de manera natural debido a fluctuaciones térmicas de los lípidos. En condiciones normales, la frecuencia intrínseca de aparición de estos *poros lipídicos* es muy baja, ya que la reorganización molecular necesaria para su formación está impedida por una barrera energética difícil de superar. Sin embargo, su frecuencia puede aumentar en presencia de factores externos que generen *tensión superficial* en la membrana. Una vez formados, los poros tienden a cerrarse rápidamente debido a la *tensión lineal* que aparece en su borde. En este contexto, los péptidos membranoactivos formadores de poros funcionan como *catalizadores*, disminuyendo la barrera energética del cambio estructural necesario para la apertura de la membrana a través de la inducción una *tensión superficial* “interna” [261] debida a su unión en las zonas de interfase de la bicapa lipídica. Además, se situarían en el borde lipídico de los poros, disminuyendo la tensión lineal y aumentando, por lo tanto, su estabilidad [87, 261].

De acuerdo con estas ideas, la permeabilización de GUVs que hemos descrito hasta hora corresponde a la respuesta de la membrana al efecto de perturbación creado por la unión de los péptidos, cuya consecuencia es la formación de poros. Estos poros *iniciales* o de *ataque* peptídico sufrirían desde el momento de su formación un proceso de relajación, transformándose en poros permanentes en estado de *equilibrio*. Se interpreta, como hemos dicho, que el equilibrado explica la disminución de la velocidad de entrada de las sondas con el tiempo, a través de una disminución del tamaño de los poros [64, 87, 171, 260]. Sin

embargo, esta conclusión no es definitiva ya que la disminución de la velocidad de entrada de las sondas con el tiempo también podría deberse a una disminución del número de poros.

Evidencias a favor de la evolución temporal de los poros y de la reducción de su tamaño a partir del análisis de las cinéticas iniciales

Los patrones observados aquí, a través del registro de la entrada simultánea de sondas de muy distinto tamaño **Fig. 4.2**, están de acuerdo con una reducción del tamaño de los poros a partir del momento de su formación. Ello se apoya en el hecho de que mientras la sonda pequeña (de tipo Alexa) completa su entrada en las GUVs, la sonda grande (dextranos marcados) inicia su entrada, pero ésta no llega nunca a completarse. Adicionalmente, para la entrada de FD20 y FD40 a GUVs individuales (**Fig. 4.2 C,D**) en la mayoría de los casos se observa que las cinéticas más rápidas (con mayor pendiente inicial) alcanzan niveles finales de fluorescencia interna mayores que las cinéticas más lentas, lo que confirma la existencia de una evolución temporal de los poros y además que ésta ocurre con arreglo a tiempos de relajación similares para distintas GUVs. Sin embargo, la reducción del tamaño de los poros podría ser *parcial* (permaneciendo los mismos después de la relajación) o *completa* (desapareciendo como consecuencia del proceso de relajación), por lo que es necesario discernir entre ambas posibilidades.

El modelo empleado para el ajuste de las cinéticas iniciales toma en consideración la posibilidad de una relajación de los poros a partir del momento de su formación, la cual es tenida en cuenta a través de un decaimiento exponencial de la velocidad de cambio inicial de la fluorescencia en las GUVs, k_0 , hacia un valor de equilibrio, k_∞ (*ecu. 2.20*). Los valores de k_s^p extraídos del ajuste, discutidos arriba, se refieren a la apertura inicial de los poros (k_0). Por ello, tanto A^p como a^p , determinados a partir del análisis de k_s^p , son valores de *área inicial* (A_0^p y a_0^p). En cuanto al número de poros, n , se refiere tanto a poros iniciales como a poros de equilibrio, siempre que no exista apertura y cierre de los mismos con el tiempo, o que en el caso de existir, ocurra como sustitución entre poros del mismo tipo.

En los mismos ajustes de las cinéticas iniciales se obtienen valores que corresponden a k_∞ y al tiempo de relajación de los poros (τ_{rel}). En principio k_∞ permitiría determinar el área de los poros después de su relajación (a_∞) y el número de estos ($n_\infty \equiv n$). Sin embargo, la fiabilidad de k_∞ y τ_{rel} es limitada por diversas razones:

1. **Aproximaciones inherentes al modelo de ajuste:** En primer lugar, deben de tenerse en cuenta las limitaciones del modelo, donde la aproximación principal es que la relajación de los poros entre áreas individuales inicial y final (a_0 y a_∞) corresponde a un decaimiento entre dos estados. Tal suposición podría no ajustarse a la realidad, ya que la relajación podría ocurrir como un proceso continuo, en el cual existan múltiples estados intermedios en el camino entre los estados inicial y final. Esta posibilidad afectaría especialmente a la difusión restrictiva de las sondas de tamaño grande, ya que a cada estado intermedio correspondería una fracción r_h/r_p diferente y por lo tanto a un efecto restrictivo distinto (**Sec. 2.6.3**).

2. **Dependencia entre los parámetros del ajuste:** En el modelo de ajuste (*ecu. 2.19* y *2.20*) existe una estrecha relación entre k_∞ y τ_{rel} , de manera que en muchos casos son posibles múltiples valores que dan lugar a ajustes de calidad similar.¹¹
3. **Las cinéticas de entrada de sondas grandes sólo proporcionan información sobre τ_{rel} .** Como puede deducirse de la observación de estas cinéticas (**Fig. 4.2** C,D), los valores del el parámetro k_∞ para la difusión de sondas grandes han de ser muy pequeños, lo que implica que dichos datos no permiten distinguir entre las opciones de cierre completo de los poros y reducción de su tamaño hasta valores altamente restrictivos.¹² Sin embargo, con independencia de cuál sea la opción válida, estos datos sí permitirían determinar el correspondiente tiempo de relajación. Los ajustes de las cinéticas de FD20 y FD40 muestra que τ_{rel} es bastante variable entre las distintas GUVs, obteniéndose valores entre ~ 300 y ~ 1200 s (~ 5 – ~ 20 min). Se observa además que existe una buena correlación entre la velocidad de relajación los poros y la velocidad de entrada de las sondas.
4. **Las cinéticas de entrada de sondas pequeñas son muy poco sensibles al proceso de relajación de los poros.** El valor de τ_{rel} que acabamos de describir es muy grande comparado con la constante de tiempo de las cinéticas de entrada de los marcadores de tipo Alexa en las mismas GUVs, $1/k_s^p$. Este tiempo es también muy variable, entre ~ 9 y ~ 400 s (~ 0.15 – ~ 7 min). Sin embargo, si tenemos en cuenta que los valores pequeños de τ_{rel} se asocian con valores pequeños del intervalo de $1/k_s^p$, es fácil comprender que la relajación de los poros en la mayoría de los casos tiene poca influencia en las cinéticas de las sondas de tamaño pequeño, cuya entrada se completa mucho antes de que el poro se relaje significativamente. Por ello, aún cuando utilicemos las *ecu. 2.19* y *2.20* para el ajuste de estas cinéticas, los valores de k_∞ y τ_{rel} obtenidos de los ajustes tienen un valor muy limitado.¹³

Por lo tanto, el ajuste de cinéticas iniciales solo proporciona información fiable en cuanto al proceso de relajación de los poros si dichas cinéticas correspondan a marcadores de tamaño grande (cuya entrada no llega a completarse). Además, esa información accesible consiste únicamente en el valor de τ_{rel} que se sitúa un intervalo amplio de ~ 300 y ~ 1200 s. Ya hemos mencionado que el valor de τ_{rel} parece estar relacionado con el tiempo de entrada de los marcadores ($1/k_s^p$). Existe otra relación temporal evidente, que de nuevo se aprecia a través de la observación de las cinéticas (**Fig. 4.2**), ya que, en general, las

¹¹ Afortunadamente esta ambigüedad de k_∞ y τ_{rel} no afecta al resto de parámetros extraídos del ajuste. Ver el *punto 4* y la *nota13*.

¹² Se entendería por valor altamente restrictivo, aquel tamaño de poro que aún siendo distinto de cero impediría que los dextranos (FD20 o FD40) continúen entrando de manera apreciable. De acuerdo con la teoría explicada en **Sec. 2.6.3 en la página 65**, correspondería a poros cuyo radio sea el doble o menor que el radio hidrodinámico del menor de los dextranos utilizados (FD20, $r_h = 3.3$ nm). Sin embargo, por las razones discutidas en en la *página 104* para nuestro sistema el radio límite del poro podría ser incluso menor que el propio r_h de FD20.

¹³ La contrapartida positiva de esta limitación es que la validez del ajuste en cuanto al resto de parámetros que se extraen del mismo no se ve comprometida por las limitaciones que afectan a k_∞ y τ_{rel} .

GUVs que primero se permeabilizan suelen exhibir cinéticas más rápidas. Estas GUVs de cinética rápida, a su vez, son las que presentan mayor densidad de poros. Dado que, de acuerdo con lo discutido en la en la página 108, la densidad de poros está relacionada con la cantidad de péptido unido a la membrana, concluimos que las velocidades de formación y relajación de los poros dependen de la cantidad de péptido presente en la membrana, y que la variabilidad de tiempos de formación y tiempos de relajación de los poros es reflejo y consecuencia de la variabilidad de la unión del péptido.

4.3.2 Cinéticas de los poros en estado de equilibrio

Una forma de estudiar los poros a tiempos alejados de su momento de formación consiste en eliminar la fluorescencia interior para permitir que se recupere de nuevo gracias a un reequilibrado con la sonda exterior. Para ello utilizamos la técnica de recuperación de la fluorescencia después de foto-blanqueo con láser (conocida como FRAP, por sus siglas en inglés). Brevemente, en una GUV cuyo contenido interior se encuentra en equilibrio con el exterior debido a la permeabilización inicial de su membrana, procedemos a eliminar la emisión fluorescente del interior mediante una irradiación fuerte y localizada con luz láser correspondiente a la longitud de onda de excitación de la sonda. Dado que el interior de la GUV es un medio confinado, su emisión fluorescente solo podrá recuperarse en el caso de que la membrana sea aún permeable. Esta estrategia permite observar de manera directa si la GUV es aún permeable después del tiempo transcurrido desde la primera formación de poros. En principio, si se lleva a cabo el análisis de cinéticas de segunda entrada, también puede servir para obtener información sobre posibles cambios en el número y tamaño de los poros. La principal limitación es que, a diferencia de las entradas iniciales, en las cuales pueden estudiarse simultáneamente todas las GUVs presentes en un campo de visión, mediante el método FRAP las GUVs solo pueden estudiarse de una en una. Además, puesto que aspiramos a caracterizar poros en estado de equilibrio, es necesario esperar tiempos largos después del contacto de las GUVs con los péptidos.

Para el sistema de GUVs de POPC:CL en presencia de Bax- α 5, llevamos a cabo experimentos FRAP sobre un total de 19 vesículas, en las cuales registramos cinéticas de recuperación de fluorescencia en canales correspondientes a las sondas Alexa555 y FD20 (10 GUVs) y FD40 (9 GUVs). En la Fig. 4.12 se muestra un ejemplo completo de este experimento para la entrada simultánea de Alexa555 y FD20 (A) así como tres ejemplos más de cinéticas de recuperación de fluorescencia de estas sondas medidas después de fotoblanqueo (B,C). En la misma figura se muestra también un experimento de entrada inicial, fotoblanqueo y recuperación de fluorescencia para Alexa555 / FD40, y ejemplos de tres cinéticas más de re-entrada de las sondas (Fig. 4.12 D-F). Dichas cinéticas fueron ajustadas utilizando la función exponencial sencilla correspondiente a la ecu. 2.17, obteniéndose valores de constantes de velocidad que en este caso se refieren a la permeabilidad a través de poros en estado de equilibrio, k_{∞}^p .

Dado que habíamos comenzado dejando abierta la pregunta sobre la permanencia o no de los poros después de una permeabilización inicial, lo primero que podemos concluir ahora es que el estado permeable es permanente en todos los casos investigados, puesto

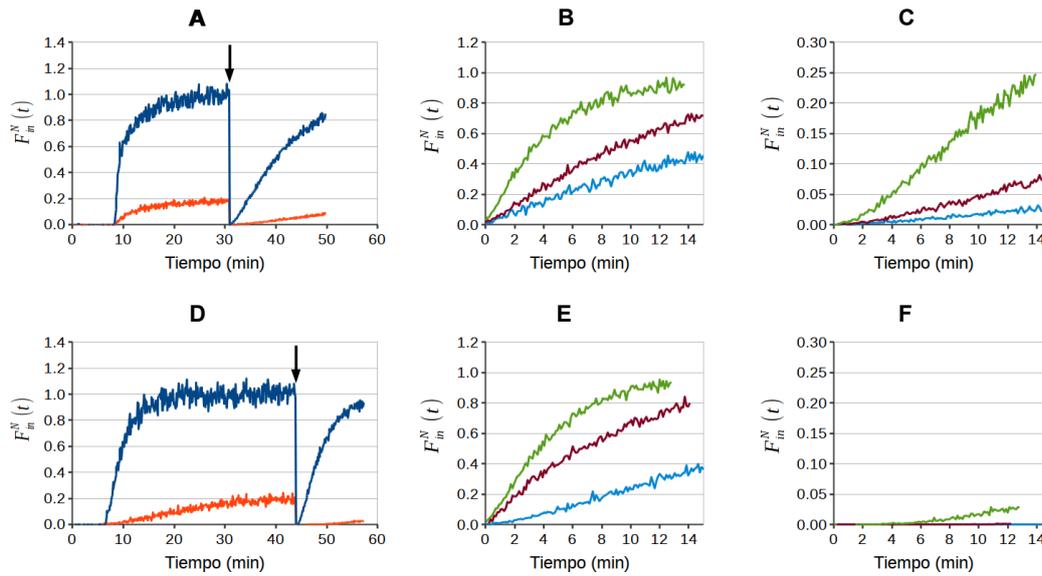


Fig. 4.12: Re-entrada de marcadores fluorescentes en GUVs que han sufrido una permeabilización previa en presencia de Bax- α 5. (A,D) Ejemplos de experimentos completos con registro simultáneo de la fluorescencia interna de los marcadores Alexa555, azul, y FD20 (A) o FD40 (D), rojo. La flecha indica el momento en el que la fluorescencia interna de la GUV es blanqueada completamente mediante irradiación láser con potencia alta. Si se reduce de nuevo la potencia del láser una vez completado el fotoblanqueo, se observa la recuperación de fluorescencia debido a la re-entrada de las sondas. (B,E) Algunos ejemplos de cinéticas de re-entrada después de fotoblanqueo de Alexa555 en GUVs inicialmente permeables a este marcador. (C) Cinéticas de re-entrada de FD20 después de fotoblanqueo a las mismas GUVs que en B. (F) Cinéticas de re-entrada de FD40 después de fotoblanqueo a las mismas GUVs que en E. Téngase en cuenta la ampliación de la escala en C y F con respecto al resto de las gráficas.

que en ellos se observa recuperación exponencial de la fluorescencia al menos para la sonda pequeña (Alexa555). En segundo lugar, vemos que en los experimentos de re-entrada las dos sondas presentes en el medio exterior entran más lentamente a las GUVs que en las cinéticas iniciales. Para las sondas grandes, sin embargo, esta menor velocidad es tan baja que en la mayoría de los casos la recuperación de fluorescencia a penas se aprecia, sobre todo en el caso de FD40 (obsérvese que en las cinéticas representadas en la Fig. 4.12 C,F ha sido necesario ampliar la escala para que los cambios sean visibles). La caída drástica de la difusión de los dextranos está de acuerdo con el hecho de que su entrada inicial no llegaba a completarse (Fig. 4.2 C,D y Fig. 4.12 A,D). Además, estos hechos en su conjunto confirman que como consecuencia de la relajación de los poros se ha reducido su tamaño, acentuándose así el efecto restrictivo sobre la difusión de FD20 y FD40.

Para poder determinar el área unitaria de poros en estado de equilibrio, y el correspondiente número de poros por GUV sería necesario un número mucho mayor de medidas, que permitan extraer distintos *clusters* a partir de la distribución de las áreas totales de los poros en un conjunto amplio de GUVs. Aunque no tenemos esos datos, sí podemos obtener resultados en primera aproximación. Es razonable pensar que los cuatro valores más pequeños de $k_{\infty}^p V$ en el canal de Alexa555 (entre 31.4 y $57.8 \mu\text{m}^3\text{s}^{-1}$) corresponden a un solo poro, cuya área promedio, teniendo en cuenta el coeficiente de difusión libre de esta sonda, sería $43.3 \pm 12.2 \text{ nm}^2$. Con estos mismos valores se puede calcular un radio medio del poro de $3.7 \pm 0.5 \text{ nm}$. Es decir, los poros en estado de equilibrio formados por Bax- α 5 en GUVs de POPC:CL 80:20 son un $\sim 44\%$ menores en área que los poros iniciales. Por otro lado, el radio de los poros en equilibrio es tan solo ligeramente mayor que el radio hidrodinámico de la sonda FD20 (3.3 nm , Tabla 4.1) y claramente menor que el radio hidrodinámico de FD40 (4.5 nm). A pesar de ello, ambas sondas son capaces de entrar a velocidad todavía apreciable en GUVs de volumen pequeño con una alta densidad de poros, como son los casos representados con color verde en las en la página anterior B,C,E,F, lo cual se desvía de los modelos clásicos de difusión restringida (Sec. 2.6.3). Esta discrepancia se debe a que se trata de moléculas fibrilares para las cuales no es válida la aproximación de esfera rígida, como ya hemos discutimos en en la página 105.

5 Remodelado de membranas por fragmentos de Bax y Bak

Los cambios dinámicos de la morfología de las membranas, conocidos en general como *remodelado* de membranas,¹ aparecen asociados a procesos celulares importantes tanto en eucariotas como en procariotas [262]. Tales procesos incluyen exo y endocitosis, citocinesis y tráfico intracelular de membranas, y están íntimamente relacionados con fenómenos de fusión y fisión. Por lo general, se asocian a la actividad de proteínas específicas, cuya función consiste en facilitar las deformaciones de la membrana a través de la estimulación de curvatura.

Entre los distintos procesos de remodelado de membranas celulares naturales, interesan especialmente en relación con esta Tesis los que afectan a las mitocondrias, en los cuales interviene la proteína específica Drp1 (**Sec. 1.5.1**). Sin embargo, se ha observado que los eventos relacionados con la fragmentación mitocondrial ocurren incluso en células deficientes en Drp1 [263], lo cual sugiere que este importante proceso celular implica la intervención de diversos tipos de proteínas. Entre ellas, las proteínas de la familia Bcl-2 se han descrito como reguladores de la morfología mitocondrial. Así, investigaciones recientes confieren a Bax y Bak algún tipo de participación en eventos de fusión y fisión de mitocondrias, donde ejercerían un papel más o menos directo, dependiendo del estado estructural en que se encuentren (forma activa o inactiva). Tanto Bax como Bak han sido consideradas como posibles activadoras de la maquinaria de fisión mitocondrial, siendo ésta una función independiente de la que llevan a cabo en relación con la activación de la apoptosis [148]. Durante los procesos de fisión/fusión estudiados en membranas miméticas,² la bicapa lipídica adopta estructuras similares a la que corresponde a la formación de poros *toroidales*. Por ello, no es de extrañar que péptidos o proteínas capaces de estabilizar este tipo de poros (como las mencionadas Bax y Bak) puedan desencadenar también fenómenos relacionados con la fusión o fisión de membranas [264–266]. En la última década se han intensificado los esfuerzos para comprender el funcionamiento de la compleja maquinaria de escisión de membranas a nivel subcelular. Sin embargo,

¹ Se conoce como remodelado a un conjunto amplio y diverso de deformaciones dinámicas (cambios morfológicos) que en determinadas condiciones pueden sufrir las membranas, tanto naturales como sintéticas. Entre tales cambios se incluyen la fusión de membranas y fenómenos relacionados con ella (endocitosis) la fisión y fenómenos relacionados (*budding*, **Sec. 1.5.1**) y otros cambios de forma con estructuras cercanas a especies intermediarias de los procesos antes citados (como estrechamientos y túbulos). Todos estos fenómenos implican formas fuertemente curvadas por lo que se relacionan con la curvatura intrínseca de los lípidos.

² Membranas de sistemas modelo cuya composición lipídica imita a la de sistemas naturales, que en el caso referido aquí corresponden a membranas mitocondriales.

estos fenómenos todavía se conocen poco en comparación, por ejemplo, con la fusión de membranas.

5.1 Objeto y método de estudio

Entre las razones que explican la falta de entendimiento de la fisión de membranas está el hecho de que existen muy pocas investigaciones dedicadas al estudio de este fenómeno en sistemas modelo [267]. Además, no se han identificado ni caracterizado aún péptidos capaces de inducir o llevar a cabo fisión de membranas.

A través de nuestros estudios de permeabilización de membranas en muchos casos observamos que la presencia del péptido provocaba cambios en la morfología de las vesículas. Sorprendentemente, muchos de esos cambios parecían similares a los inducidos por proteínas celulares complejas, implicadas en el remodelado de membranas celulares. Por ello, decidimos abordar un estudio de la actividad de remodelado de membranas modelo por fragmentos polipeptídicos diseñados a partir de secuencias naturales de Bax (Bax-5, Bax- α 56) y Bak (Bak- α 56). En cuanto al modelo lipídico de elección, fue el sistema binario POPC:CL (80:20), que se aproxima de una forma minimalista a la composición de la membrana mitocondrial.

La técnica empleada en este estudio fue esencialmente microscopía óptica confocal de fluorescencia (**Sec. 2.5.1 en la página 55**), que resulta adecuada para monitorizar con resolución espacial y de manera directa los cambios que puedan ocurrir en la muestra a través del tiempo. Además, mediante esta metodología llevamos a cabo un análisis en régimen de partícula individual, que permite la descripción de casos particulares sin que éstos queden oscurecidos por el comportamiento promediado de la muestra. Seguiremos con especial atención los papeles específicos que puedan tener los componentes lipídico y peptídico en los eventos estudiados.

5.2 Morfología dinámica intrínseca de membranas con CL

5.2.1 Propiedades inherentes a la presencia de CL

La composición lipídica elegida, con presencia de CL, no es de uso frecuente. Por otro lado, pese a ser un sistema con solo dos componentes, resulta muy complejo en su comportamiento. En nuestro caso, la CL utilizada (**Sec. 2.1.2**), procede de mitocondrias de corazón bovino, y se trata de una mezcla de variantes del lípido con distintas cadenas acílicas.³ Según estudios previos, las membranas de CL de fuentes naturales tienen una T_c muy baja, cercana a los -20 °C [269], como es de esperar debido a los pares de insaturaciones presentes en sus cuatro cadenas acílicas. En cuanto a POPC puro, también insaturado, presenta una T_c de -2 °C.⁴ En mezclas de varios lípidos, como en nuestras

³ En la CL natural se encuentran distintos tipos de cadenas acílicas en las siguientes proporciones aproximadas: 16:0 (1.0%), 16:1 (1.0%), 18:1 (5.5%), 18:2 (90.3%) y 18:3 (1.0%) [268].

⁴ <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps/>

membranas, cuya composición es POPC:CL 80:20, la T_c ha de encontrarse entre los valores de los distintos componentes.⁵ Según esto, a la temperatura de trabajo en nuestro caso (22.5 °C), las membranas deben encontrarse claramente en un estado fluido, en principio de tipo lamelar.

Aspectos como el empaquetamiento y la segregación lipídica en dominios han sido abordados en membranas que contienen CL, tanto naturales como sintéticas [269–271]. Sin embargo, todavía son poco conocidas las implicaciones estructurales y funcionales de la presencia de este lípido en las bicapas. Las membranas con CL son propensas a adoptar fases hexagonales invertidas (HII), cuando los grupos fosfato de este lípido, presentes en la superficie de las bicapas, pierden su carga negativa al ser protonados a pH bajo, o bien cuando su carga es apantallada en condiciones de alta fuerza iónica (I), o en presencia de cationes metálicos divalentes [272–275].⁶ Además, recientemente se ha descrito que membranas de POPC:POPE:TMCL (43:36:21), miméticas de la membrana externa mitocondrial, presentan una estructura compleja en la que los lípidos se encuentran en distintos tipos de microambiente, lo cual sugiere la existencia de microdominios de composición lipídica y de dinámica variables [270].

Es decir, existe una dificultad inherente a la hora de estudiar la acción sobre sistemas que contienen CL de otras biomoléculas, como péptidos o proteínas, ya que la sola presencia de CL propicia comportamientos complejos en las membranas, incluso en sistemas modelo de composición sencilla. Por ello, hemos querido establecer en primer lugar las pautas iniciales del comportamiento *basal* de nuestro sistema, en ausencia de péptidos, para poder abordar después el papel de estas últimas moléculas en el remodelado de las membranas.

5.2.2 Observaciones en GUVs sin péptidos

Como hemos comentado arriba, nuestras membranas modelo (POPC:CL, 80:20 con un 0.2 % de DiD(3)C18 , o alternativamente 0.2% de NBD-PE **Sec. 2.1.2**) se encuentran en fase fluida a las condiciones experimentales de trabajo ($T = 22,5$ °C, tampón PBS, libre de Ca^{2+} , pH ~ 7.4 , $I = 159.2$ mM).⁷ Inicialmente estudiamos con detalle mediante microscopia confocal de fluorescencia 24 GUVs en ausencia de péptido en tres experimentos de control distintos. En cada experimento se monitorizó la suspensión de GUVs por un período de una hora, encontrando las características que se detallan y discuten

⁵ Por ejemplo, para el caso de membranas de POPC:POPE:TMCL, 43:36:21 (TMCL es 1,2,-1,2-tetramiristoilcardiolipina), los valores de T_c en membranas de lípido puro son (fuente: *nota 4 en la página anterior*) -2 °C (POPC), 25 °C (POPE) y 47 °C (TMCL), y se ha determinado mediante experimentos de calorimetría y NMR que la transición de fase en membranas de la mencionada mezcla se expande a lo largo de un intervalo de ~ 15 °C con valor medio, $T_{1/2}$ de 20 °C [270].

⁶ Debido a esto último en nuestro estudio empleamos tampones libres de Ca^{2+} .

⁷ La fuerza iónica se calcula como:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (5.1)$$

a continuación:

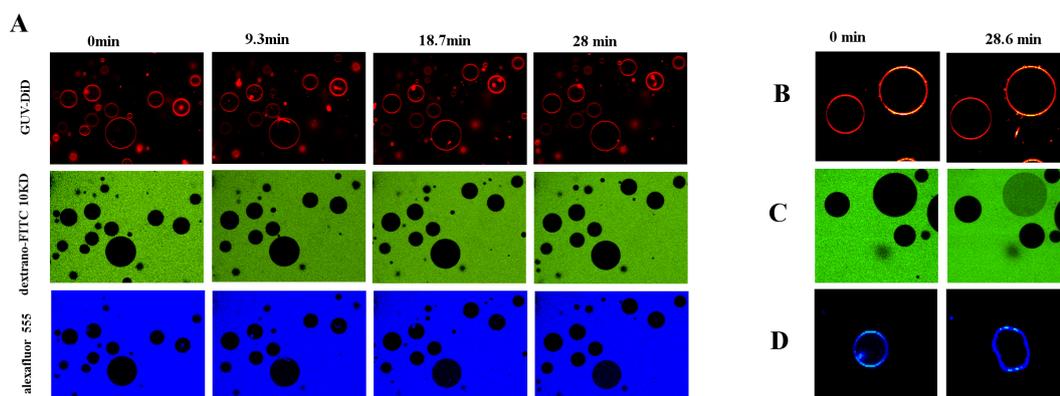


Fig. 5.1: Microscopia confocal de GUVs con CL en su membrana, en ausencia de péptidos. (A) *Arriba*: canal de observación de la membrana lipídica representado en color rojo la fluorescencia del marcador Di1(3)C18. *Centro*: canal correspondiente al marcador de difusión dextrano-FITC de 10 KDa (FD10, verde). *Abajo*: canal correspondiente al marcador de difusión Alexa555 (azul). Los paneles (B), (C) y (D) muestran ejemplos específicos de cambios morfológicos encontrados en ausencia de péptidos. (A) Túbulos. (B) Plano confocal de GUVs en experimentos de control donde se observan algunas vesículas permeables al marcador Alexa488 (verde). (C) Deformación de la membrana. En todos los casos las condiciones experimentales fueron $\text{pH}=7.4$, $I=159.2 \text{ mM}$ y $T=22.5 \text{ }^\circ\text{C}$, GUVs con membranas de POPC:CL, 80:20 y 0.05% Di1(3)C18.

Distribución lipídica en la membrana

La sonda lipofílica que utilizamos en estos experimentos (Di1(3)C18) es un marcador de la coexistencia de fases lipídicas en las membranas, ya que particiona con preferencia en dominios líquido-desordenados (Ld) frente a dominios líquido-ordenados (Lo) [276]. Sin embargo, durante la inspección visual de los controles a lo largo del tiempo no detectamos dominios definidos, resueltos espacialmente (Fig. 5.1 A). Tampoco observamos una distribución clara de dominios coloreando las imágenes con arreglo a los distintos niveles de intensidad de la fluorescencia de Di1(3)C18 (Fig. 5.1 B). Aunque este último tipo de representación muestra *pixels* con distintos colores, éstos están dispersos y

donde c_i y z_i son, respectivamente, la concentración molar y el número de carga de cada una de las especies iónicas presentes en la disolución. En este caso se trata de una disolución tampón PBS, definida en la Sec. 2.1.1. Los iones $\text{Cl}^- \text{Na}^+$ procedentes del NaCl se encuentran concentraciones de 137 mM. Con respecto al fosfato, teniendo en cuenta el pH de la disolución (7.4), así como un valor de $pK_a \approx 7.21$ para la reacción $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$, $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{H}_2\text{PO}_4^-]=1.6$, y dado que la concentración de fosfato es 10 mM, calculamos $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]=3.92 \text{ mM}$ y $[\text{HPO}_4^{2-}]=6.08 \text{ mM}$. Así mismo, a las especies aniónicas del fosfato se acompañan contra-cationes (ya sea Na^+ , K^+ o ambos, dependiendo de la preparación (ver Sec. 2.1.1) con concentración $3.92 + 2 \times 6.08 = 16.08 \text{ mM}$. Por todo ello, con la ecu. 5.1 se calcula $I = 159.2 \text{ mM}$.

cambian aleatoriamente con el tiempo, de forma que no definen zonas en la membrana que indiquen la presencia de dominios, sino que más bien muestran una distribución homogénea de la sonda en las GUVs dentro del límite de resolución espacial del método, que a su vez sugiere una distribución también homogénea de los lípidos.

Estudios previos de otros autores defienden la existencia de dominios, relacionados con efectos de curvatura, en membranas que contienen CL [277–281]. A estos trabajos hay que añadir una investigación reciente sobre vesículas que mimetizan la composición lipídica de la membrana externa mitocondrial [270], donde también se encuentran pruebas de la existencia de segregación de fases que en este caso estarían relacionadas con el hecho de que la temperatura de trabajo se encuentra dentro del intervalo de transición de fase (*nota 5 en la página 117*). Sin embargo, esos dominios parecen corresponder a una escala de tamaño nanométrico, por lo que aún existiendo también en nuestras muestras no serían detectables en experimentos de microscopía óptica de fluorescencia.

La oligomerización del péptido Bax- $\alpha 56^{PY}$ al interactuar con las LUVs de POPC:CL, pero no cuando se une a LUVs de POPC (como se describe en el **Cap. 3**), apoya también la presencia de dominios en membranas con CL, los cuales funcionarían como centros de reclutamiento para moléculas peptídicas. Sin embargo, este último efecto no implica necesariamente que los dominios de CL existan de manera previa a la presencia de los péptidos, ya que también puede ocurrir que sea el propio péptido quien contribuya al reagrupamiento de CL en su entorno, proporcionando así un mecanismo de unión cooperativa.

Presencia de poros lipídicos

Como ya se dijo al describir los controles en ausencia de péptido llevados a cabo para el estudio de la permeabilidad de GUVs (**Sec. 4.2.1**), una pequeña proporción de vesículas (<10%) muestra difusión de sondas fluorescentes externas hacia su interior (un ejemplo se muestra en la **Fig. 5.1 C**). La causa de dicha permeabilidad intrínseca es muy probablemente la formación en las membranas de poros lipídicos discretos, como sugiere el hecho de que las cinéticas de difusión de las sondas son de tipo exponencial, descartándose razones relacionadas con fenómenos de remodelado de la membrana, como fusión o fisión de vesículas, ya que éstos no se observan en las vesículas permeabilizadas.

Por otro lado, parece probable que la formación de poros lipídicos está relacionada con la presencia de lípidos con distinta curvatura intrínseca. En nuestro caso las membranas están formadas por POPC, con forma cilíndrica y curvatura nula, y por CL, con tendencia a adoptar forma cónica y curvatura negativa. Para este último lípido se ha sugerido que la curvatura y la capacidad de inducir poros lipídicos se deben a la dinámica de sus cadenas hidrocarbonadas insaturadas [282] y al hecho de que se trata de un lípido con cabeza polar aniónica [283, 284]. De cualquier forma, aunque en ausencia de péptidos tanto el remodelado de las membranas como la formación de poros lipídicos son poco frecuentes, su mera existencia en los controles permite afirmar que se trata de capacidades intrínsecas del sistema modelo elegido (GUVs compuestas por lípidos de diferente naturaleza) e indican una predisposición hacia estos fenómenos sobre la cual se superpone la actividad específica de los péptidos (o proteínas) que se unen a la membrana.

Pequeñas estructuras fibrilares y emisiones lipídicas

Aunque durante el tiempo de observación de los controles las vesículas mantuvieron su integridad y en general no manifestaron cambios morfológicos destacables, en algunos casos se detectaron pequeños cambios aislados (**Fig. 5.1 B**), como formas fibrilares asociadas a las GUVs (3 casos, entre las 24 GUVs estudiadas en los controles) y emisiones lipídicas (4 casos). Estas últimas son seguramente vesículas muy pequeñas que bajo el límite de resolución de la microscopia confocal se observan solo como puntos brillantes de mayor o menor tamaño que se desprenden de las vesículas grandes, aunque también puede tratarse de la expulsión de moléculas de sonda, acompañadas o no de otros lípidos, fuera de la membrana.

Se observan también deformaciones de la membranas de algunas GUVs (**Fig. 5.1 C**). Nuestra interpretación es que todos estos fenómenos pueden deberse al menos en parte a la presencia de un entorno acuoso asimétrico entre ambos lados de la bicapa [285]. De acuerdo con el diseño de nuestros experimentos (**Sec. 2.5.2**), las disoluciones de dentro y fuera de las GUVs en la cámara de observación son diferentes, de manera que aunque ambos medios son isotónicos, presentan distintas composiciones iónicas. En concreto, la fuerza iónica en la disolución externa es 159.2 mM y se debe a la presencia de iones H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , Cl^- y cationes monovalentes (Na^+ y en algunos casos también K^+ , procedentes del PBS, ver **Sec. 2.1.1** y *nota 7 en la página 118*). En el interior de las GUVs, sin embargo, inicialmente no hay electrolitos disueltos sino sacarosa 300 mM.

La mayor concentración iónica en la disolución exterior puede provocar la migración de las moléculas de CL hacia la monocapa externa, lo que generaría una diferencia de área entre ambas monocapas así como una asimetría de carga. Todo ello, a su vez, daría lugar a tensiones de curvatura que se mitigarían a través de la formación de estructuras tubulares, o protrusiones esféricas (*budding*) asociadas a la cara externa de las vesículas, que pueden llegar a desprenderse en forma de pequeñas vesículas si se completa la fisión de las membranas [286] (**Fig. 5.1 B**). Según esto, las protrusiones fibrilares que observamos en los controles corresponden a estructuras lipídicas tubulares, mientras que las emisiones lipídicas podrían ser vesículas muy pequeñas fisiónadas a partir de las GUVs. Ambos fenómenos tendrían su origen en puntos locales de elevada curvatura, relacionados con la presencia de CL en las membranas y que son inducidos por la asimetría de la composición iónica a ambos lados de la bicapa. Como apoyo a esta interpretación, observamos que las formas fibrilares (tubulaciones) asociadas a las GUVs no permeables en los controles ocurren preferentemente hacia el exterior de las vesículas.

5.3 Efectos de la unión de los péptidos sobre las membranas de las GUVs

Los péptidos empleados en este estudio poseen propiedades físico-químicas (carga neta positiva y anfipaticidad) que favorecen su interacción con membranas lipídicas aniónicas, frente a las cuales son *ligandos* de alta afinidad (ver secuencias en la **Tabla 2.1 en la página 44**). Por su parte los lípidos, como acabamos de ver, presentan también pro-

5.3 Efectos de la unión de los péptidos sobre las membranas de las GUVs

propiedades físico-químicas particulares de las cuales derivan las estructuras y la dinámica de las membranas que forman. En los complejos péptido-lípido, la tendencia a formar fases no lamelares [287] aparece como propiedad emergente, dependiente tanto de las características de ambos tipos de molécula como de las características de los complejos y cuya modulación puede permitir en control de la estabilidad de las membranas. Por ejemplo, existe evidencia experimental acerca de la capacidad que tienen las hélices transmembranales de disminuir las temperaturas de transición de fases L-HII y L-QII⁸ [288]. Además, cambiando las propiedades físicas de los distintos componentes de membranas complejas se puede alterar la funcionalidad de éstas, lo que constituye un recurso útil en sistemas biológicos.

Como acabamos de sugerir, en nuestros experimentos la asimetría de la composición (sobre todo en especies iónicas) de las disolución que se encuentran a ambos lados de la membrana es un factor importante capaz de desencadenar cambios morfológicos de diversa índole en la bicapa, incluso en ausencia de péptidos. Cuando los péptidos (o proteínas en otros casos) se encuentren presentes en la disolución exterior, actuarán en primer lugar como un factor más de la mencionada asimetría. A pesar de que la concentración peptídica normalmente se encuentra en el orden de micromolar, es de esperar que ejerza un efecto importante ya que se trata de polielectrolitos multicationicos. Es decir, en principio esperaríamos de los péptidos un efecto aumentado sobre la misma base que el efecto (descrito arriba) de la fuerza iónica o de la presencia de cationes divalentes, y por lo tanto con similares consecuencias en cuanto a la inducción de curvatura a través de la CL. Unido a ello, hemos de tener en cuenta además que los péptidos son capaces de llevar a cabo diversos tipos de interacciones en la interfase de las bicapas, y que al tratarse de moléculas anfipáticas (con un alto grado de hidrofobicidad, ver **Tabla 2.1**) pueden interaccionar también con la parte hidrofóbica de las membranas.

Las características de la interacción entre nuestros péptidos y vesículas modelo pueden inferirse de manera indirecta a partir del análisis de distintos tipos de actividad (ej: formación de poros lipo-peptídicos, *budding*, fisión, etc.) que se evidencian en las GUVs en presencia de los péptidos. Para algunos péptidos (**Bax- α 5**, **Bax- α 56** y **melitina**) hemos estudiado la interacción con membranas de manera directa, a través de marcaje fluorescente (con **Alexa488** maleimida o **rodamina** maleimida) sobre un residuo de **Cys** presente de forma natural en su secuencia (**Tabla 2.1**). Puesto que los péptidos en estudio, son anfipáticos y cationicos, cabe esperar en cualquier caso que ejerzan diversos tipos de efectos sobre las membranas. Entre esos efectos está el aumento de la permeabilidad a moléculas polares mediante la formación de poros, el cual ha sido estudiado con detalle en el **Cap. 4** para el caso de **Bax- α 5**. Además, la unión de los péptidos da lugar a modificaciones morfológicas en las vesículas que pueden describirse a partir de observaciones mediante microscopía de fluorescencia. De forma general, los efectos morfológicos principales consisten en fenómenos de *budding* (en más del 60% de las GUVs), acompañados o no de fisión de las membranas, y ocasionalmente segregación de fases Ld

⁸ L se refiere a fase lamelar, HII a fase hexagonal invertida y QII a fase cúbica bicontinua invertida (ver **Sec. 1.2.4 en la página 15**).

5 Remodelado de membranas por fragmentos de Bax y Bak

y Lo que aparecen como dominios microscópicos. Como enseguida veremos, el remodelado de membranas es mucho más marcado en presencia de Bax- α 56 y Bak- α 56 que para el resto de los péptidos.

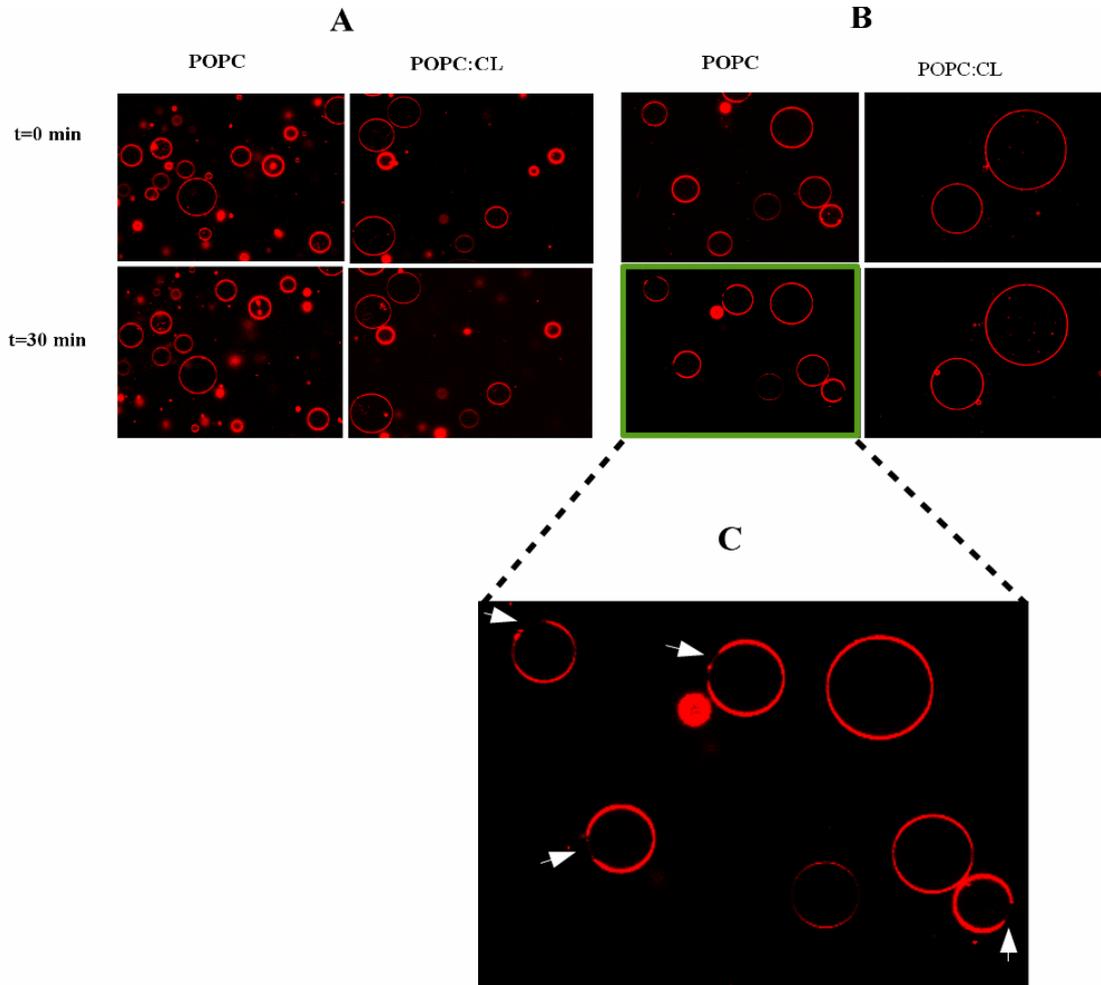


Fig. 5.2: Segregación de fases en la membranas por acción de fragmentos de Bax. (A) GUVs en presencia de Bax- α 5. (B) GUVs en presencia de Bax- α 56. Las composiciones lipídicas en cada caso se indican en la figura. La membrana se encuentra marcada con la sonda lipofílica DiI(3)C18, que particiona preferentemente a fases líquido desordenadas (Ld). Bax- α 56 en GUVs de POPC induce la aparición de zonas libres de sonda, que corresponden a fases líquido ordenadas (Lo), señaladas en la ampliación de la figura con puntas de flecha de color blanco.

5.3.1 Reorganización de la membrana por Bax- α 5 y Bax- α 56

Para observar posibles cambios en la organización lateral de los lípidos de la bicapa hemos utilizado el marcador fluorescente DiI(3)C18, que como ya se ha dicho ([Sec.](#)

5.2.2) muestra preferencia por zonas de mayor desorden (Ld) en las membranas [276]. Por lo tanto, entre los dominios observados las fases del tipo Ld son aquellas con mayor brillo fluorescente (mayor marcaje) en el canal correspondiente a la sonda lipofílica y las fases Lo son aquellas con un menor brillo, o ausencia de brillo, en ese mismo canal. Por otro lado, los dominios correspondientes a ambos tipos de fase exhiben cambios con el tiempo y su dinámica parece relacionada con otros fenómenos de remodelado de las membranas. Por ejemplo, en algunos casos se observa coalescencia de dominios, los cuales son inicialmente pequeños y después se asocian a la vez que surgen eventos de *budding*.

En la **Fig. 5.2** se muestran los efectos de Bax- α 5 y Bax- α 56 sobre GUVs con membranas de POPC:CL o POPC solo. Como puede observarse, en presencia de Bax- α 56 se aprecia con claridad la segregación de fases Lo/Ld en membranas que contienen solo POPC.⁹ En estas vesículas, a la temperatura de trabajo ($T=22.5$ °C), la membrana se encuentra en fase fluida desordenada y es lógico pensar que la inserción de las moléculas de péptido hasta penetrar en la región hidrofóbica de la bicapa, aumenta el orden de las cadenas acílicas de los lípidos y disminuye la fluidez de la membrana, dando lugar a la aparición y crecimiento de dominios Lo en coexistencia con zonas de fase Ld (**Fig. 5.2 C**). Este tipo de comportamiento ha sido sugerido para el caso de segmentos helicoidales transmembrana derivados de la proteína de fusión del virus de la influenza A [289]. También se ha descrito recientemente que la interacción de Bax con membranas de POPC:POPE:CL aumenta el orden de los lípidos [270].

Por otro lado, la presencia de Bax- α 56 da lugar a una serie amplia de cambios morfológicos en las membranas. Por ejemplo, en algunas GUVs aparecen dominios Ld muy pequeños y de brillo intenso, casi puntuados (**Fig. 5.3 B**), que acaban colapsando en algunos puntos para formar agregados lipídicos y que podrían corresponder a fases no lamelares HII o QII (*nota 8 en la página 121*). En otros casos se observan estructuras fibrilares que parecen ser túbulos lipídicos de bicapas altamente curvadas (**Fig. 5.3 C**). Estas y otras morfologías, incluyendo emisiones de pequeñas vesículas (*budding*) y fenómenos de fusión y fisión, serán descritas con más detalle más abajo (**Sec. 5.4, 5.5 y 5.6**).

Dado que la secuencia de Bax- α 56 solapa con la de Bax- α 5 (**Tabla 2.1**), resulta interesante analizar los efectos en la morfología de las membranas ocasionados por éste último péptido. A la relación molar estándar utilizada en este trabajo (P/L de 1/80), en membranas de POPC:CL, Bax- α 5 da lugar a segregación de fases o dominios Lo/Ld donde determinadas zonas pequeñas corresponden a una elevada fluidez (Ld), a juzgar por la gran concentración de la sonda, y coexisten con zonas más grandes de brillo moderado y con zonas oscuras Lo (**Fig. 5.4 A**). Con el tiempo, los dominios más fluidos se convierten en puntos de colapso similares a los comentados anteriormente para el caso de Bax- α 56 y que podrían ser fases no lamelares HII o QII. Sin embargo, a relación molar P/L = 1/20

⁹ Sin embargo, como se verá más adelante (**Sec. 5.4, 5.5 y 5.6**) sí tenemos evidencias de segregación de fases en membranas con CL en los casos en que se observan distintos tipos de remodelado de membranas y asociadas a morfologías características, como *buds* y túbulos.

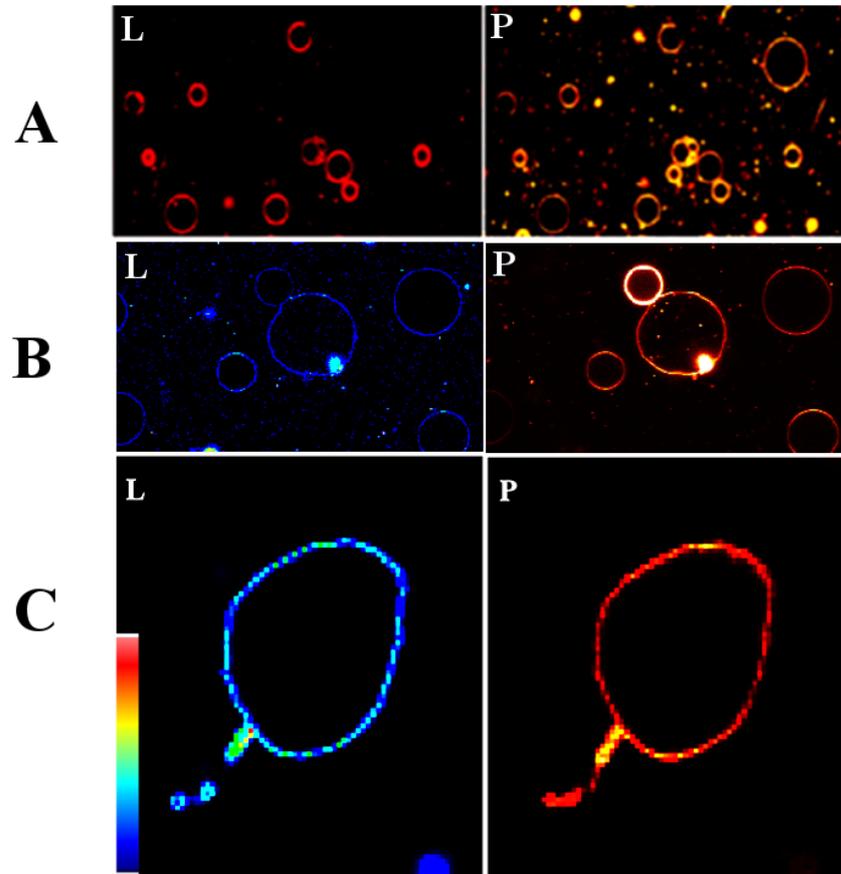


Fig. 5.3: Preferencia de Bax- α 56 por fases Ld. Se muestran imágenes del canal correspondiente a la fluorescencia de la sonda lipídica DiDC18 (**L**, izquierda) en GUVs con membranas de POPC:CL, y del mismo campo de visión observado a través del canal correspondiente a la fluorescencia de Bax- α 56^R (péptido marcado con rodamina, **P**, derecha). (A) Bax- α 56 induce segregación de fases que resulta visible en algunas GUVs a través de la discontinuidad de la fluorescencia de la sonda lipofílica (**L**). En la imagen de la derecha (**P**) se muestra la fluorescencia del péptido marcado, claramente situada en la membrana de las GUVs. Obsérvese que el patrón de discontinuidades de fluorescencia en el perímetro de algunas GUVs es el mismo que el de la sonda lipídica, lo que demuestra que el péptido prefiere fases Ld. (B) Ejemplos de casos de vesículas sobre las cuales se observan dominios Ld punteados y colapso de dominios, posiblemente en fase no lamelar de tipo HII o QII (*nota 8 en la página 121* y **Sec. 1.2.4**) donde se acumula un gran cantidad de péptido (**P**). De nuevo las imágenes son similares en los canales de fluorescencia lipídica y peptídica. (C) Vesícula deforme con segregación de fases de pequeño tamaño a partir de la cual se emerge una estructura tubular.

5.3 Efectos de la unión de los péptidos sobre las membranas de las GUVs

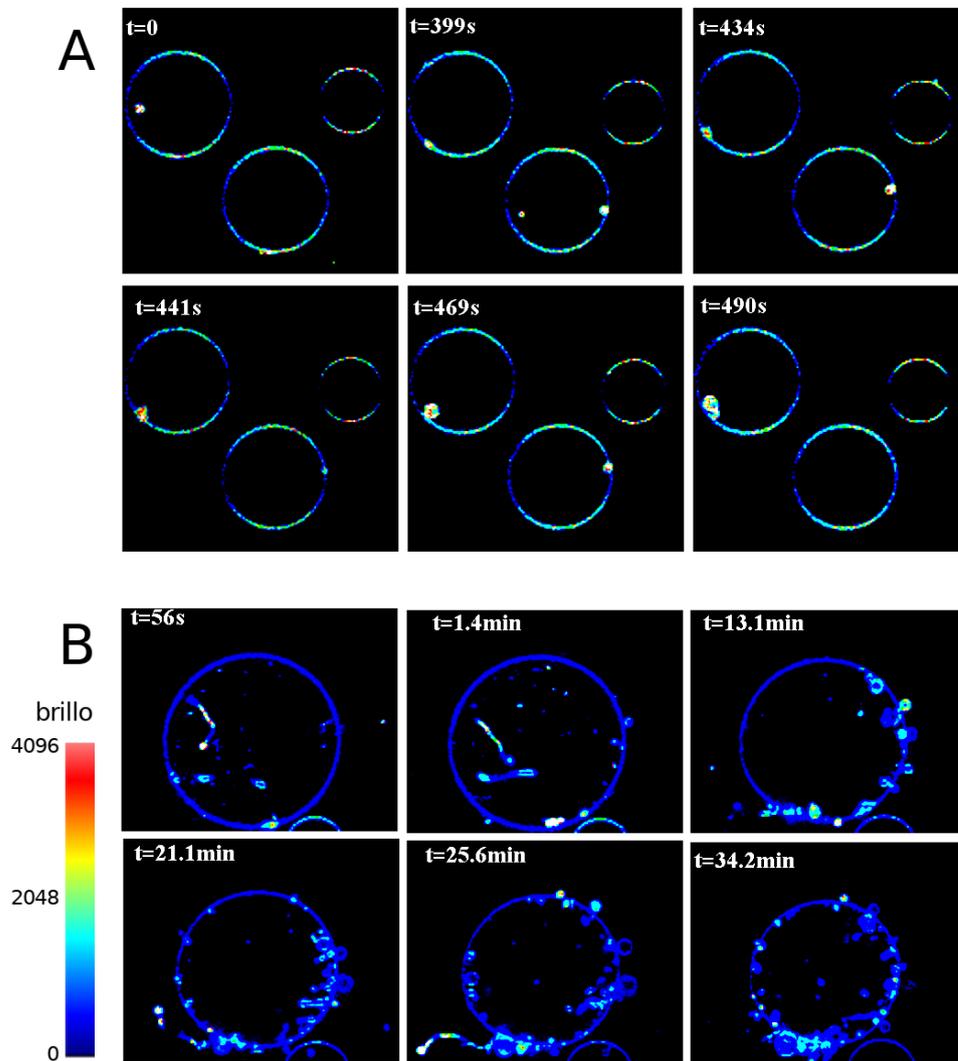


Fig. 5.4: Cambios en la morfología de las GUVs en presencia de Bax- α 5 a distintas concentraciones. (A) A relación molar P/L = 1/80, se observan dominios de distinta fluidez. Los dominios Ld, mayormente marcados por la sonda DiI(3)C18 (*rojo-blanco*), con el tiempo acaban colapsando en agregados lipídicos, posiblemente en fase no lamelar. (B) A relación molar P/L = 1/20 los dominios Ld ocupan zonas de tamaño muy reducido (puntos brillantes), a partir de las cuales surgen en ambas caras de la membrana pequeñas vesículas asociadas a ésta (*buds*) que acaban fisionándose. Aparecen también formas fibrilares que corresponden a túbulos de membrana.

(Fig. 5.4 A) las fases Ld se concentran en regiones muy pequeñas, (casi puntuadas), de las cuales, en ambas caras de la membrana, parecen surgir pequeñas vesículas (*buds*) que en algunos casos se fisianan por completo. Aparecen también a esta elevada concentración de péptido formas fibrilares brillantes que corresponden a túbulos lipídicos.

5.3.2 Preferencia de Bax- α 56 por dominios desordenados

Con el objetivo de averiguar si los péptidos presentan una interacción preferente por determinadas fases lipídicas, procedimos al marcaje fluorescente de Bax- α 56 con rodamina-maleimida en su residuo natural de Cys (Tabla 2.1). De esta forma pudimos comprobar que el péptido se une con mayor intensidad a las fases Ld de la membrana, identificables a su vez por una mayor fluorescencia de la sonda DiD(3)C18 (Fig. 5.3). Este hallazgo concuerda con la ubicación descrita para el caso de melitina (cuya secuencia y propiedades son similares a las de Bax- α 56, Tabla 2.1) en bicapas soportadas [290]. De una forma aún más notable, este resultado está de acuerdo con la distribución de la proteína completa Bax en membranas de GUVs que contienen CL y que muestran fenómenos de *budding* y fisión de membranas [143].

En la Fig. 5.3 se ilustra de manera general cómo es la unión del péptido Bax- α 56 a la membrana a partir de la toma de contacto de la suspensión de vesículas con la disolución peptídica. Se puede apreciar una acumulación de la emisión fluorescente del péptido a nivel de la membrana, de manera que a penas se observa fluorescencia libre, lo que permite afirmar que la interacción del péptido con las GUVs es fuerte. Por otro lado, la unión del péptido es rápida, y se completa antes del tiempo necesario para preparar la toma de imágenes a partir de la adición de las GUVs a la cámara de observación (Sec. 2.5.2). Por ello, no fue posible registrar cinéticas de unión.

Otro detalle importante es que la unión del péptido no es homogénea en la población de vesículas, ya que la intensidad del anillo peptídico en algunas GUVs es claramente más intenso que en otras (Fig. 5.3 A y B, P). Un comportamiento similar en cuanto a la variabilidad en la unión a las GUVs también ocurre en el caso de Bax- α 5 marcado con Alexa488 en interacción con vesículas de POPC:CL, como se mostró en el Cap. 4, donde lo hemos relacionado con la variabilidad observada en la densidad de poros presentes en las membranas (Sec. 4.2.4, página 104). En ambos casos sugiere que la composición de las membranas de las vesículas es variable, lo que podría ser una limitación del método de electroformación de GUVs, sobre todo cuando se utilizan mezclas con lípidos aniónicos.

Una explicación alternativa a la variabilidad en la unión de los péptidos a las GUVs es que sea consecuencia de una fuerte cooperatividad positiva en la formación de complejos, de forma que aquellas vesículas que entran primero en contacto con los péptidos unirían de manera rápida una gran cantidad de los mismos, quedando estos disponibles en menor concentración para su unión a otras vesículas. Esto puede ocurrir si además de existir cooperatividad positiva, las velocidades de disociación del complejo y de mezclado entre la disolución de péptido y la suspensión de GUVs son lentas en comparación con la

velocidad de unión del péptido a la membrana.¹⁰ La cooperatividad positiva ha sido propuesta para la interacción con membranas de otros péptidos catiónicos [92], entre ellos *melitina* [291], que es similar en secuencia y en otras propiedades a *Bax- α 5* y *Bax- α 56* (**Tabla 2.1**). En nuestro caso, además, la unión cooperativa de los péptidos podría encontrarse acoplada a la inducción de dominios de CL por parte de los propios péptidos y estaría relacionada con la formación de oligómeros, al menos en el caso de *Bax- α 56* (como se discutió en la página 119). Por otro lado, si observamos la suspensión de vesículas después de un tiempo largo (dos horas), no se aprecia una redistribución significativa del péptido marcado entre las GUVs, por lo que se puede concluir que la velocidad de retorno del péptido a la disolución es muy lenta y que unión a la membrana y/o la formación posterior de otras estructuras en el seno de la misma son procesos en la práctica irreversibles.

5.3.3 Interacción de *Bak- α 56* con GUVs

Bak es una proteína proapoptótica homóloga de *Bax* y ambas presentan estructuras y mecanismos de acción muy similares en el medio celular. Por ello, hemos investigado también la interacción con membranas del fragmento *Bak- α 56*. Este péptido fue diseñado a partir de la secuencia de la horquilla de hélices anfipáticas α 5- α 6, que presenta una posición central en la proteína *Bak* y a semejanza de *Bax- α 56* incluye el extremo C-terminal de la hélice 5, la práctica totalidad de la hélice 6 y el giro entre ambas hélices (**Tabla 2.1**). En el estudio de *Bak- α 56* no pudimos registrar su unión a la membrana de manera directa, puesto que no contiene Cys en su secuencia y por tanto no fue posible su marcaje fluorescente. Sin embargo, a juzgar por su actividad, este péptido se une bien a las membranas, y de hecho mostró mayor capacidad de remodelado lipídico que ningún otro de los péptidos ensayados.¹¹

Como puede verse en la **Fig. 5.5**, en membranas de POPC:CL (80:20) *Bak- α 56* no induce una segregación clara de dominios lipídicos, bien porque estos no se forman o bien porque su tamaño se encuentra por debajo de la escala micrométrica. Sin embargo, las GUVs presentan múltiples tipos morfológicos y una gran dinámica con patrones variables de cambios. De nuevo, esta variabilidad parece sugerir una distribución no homogénea del péptido entre las GUVs. Además, muchas de las vesículas experimentan una clara evolución a partir de tiempos cortos (decenas de segundos) desde su entrada en contacto con el péptido. Entre las distintas GUVs, algunas muestran inicialmente gran actividad de formación de vesículas hacia su interior, focalizada en zonas determinadas de la membrana, que parecen ser áreas de mayor fluidez y en principio corresponderían a dominios con mayor presencia de CL (**Fig. 5.5 A**). En el ejemplo mostrado, las vesículas nacientes son de tamaño entre pequeño y medio, pero la vesícula matriz cambia poco su

¹⁰ De hecho es posible que la mezcla sea lenta, teniendo en cuenta que la suspensión de GUVs es densa y se añade con ayuda de una micropipeta sobre la una disolución de péptido cuyo volumen es 10 veces mayor. Aunque se procura facilitar el mezclado mediante agitación, ésta ha de ser suave ya que de lo contrario se destruiría la integridad de las GUVs.

¹¹ Presenta también actividad de permeabilización de membranas, pero no la hemos estudiado con detalle.

tamaño, al parecer debido a la fusión desde el exterior de nuevas vesículas.

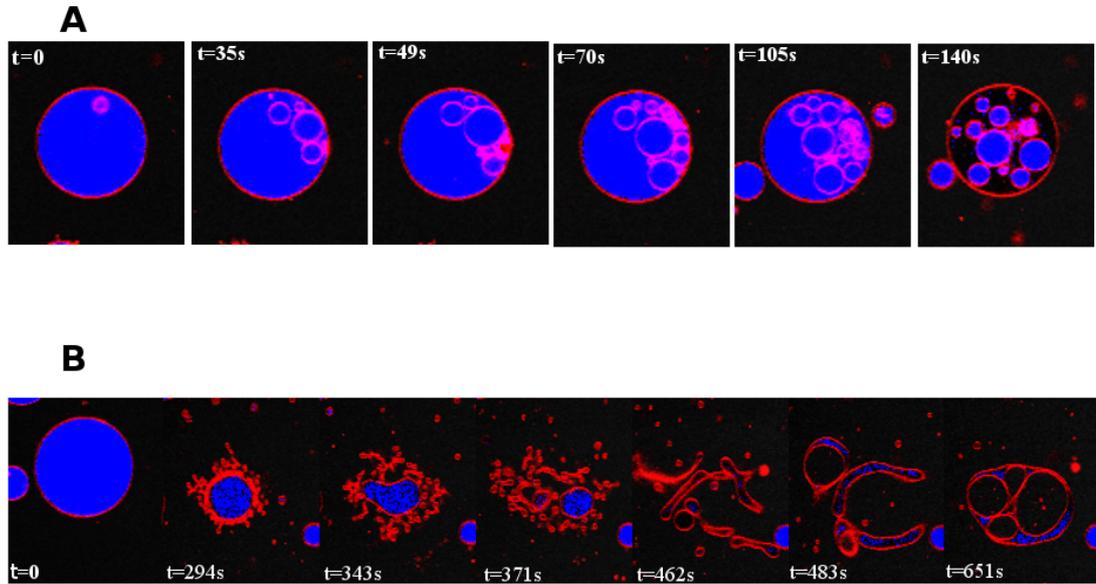


Fig. 5.5: Efectos de Bak- α 56 en vesículas de P0PC:CL. La membrana, marcada con DiI(3)C18, se representa en *rojo* y el color *azul* de del interior de las GUVs corresponde a la ausencia de marcador fluorescente de difusión (Alexa647), presente en el exterior (oscuro). (A) Secuencia temporal de fenómenos de vesiculación en el interior de una GUV. (B) Secuencia temporal de múltiples cambios morfológicos en una GUV a lo largo de ~ 10 min. En los primeros ~ 3 min se ha producido *budding* abundante en el exterior de la membrana, originando una reducción del tamaño de la vesícula. A partir de un determinado momento (~ 5 min) tienen lugar de manera acelerada continuos eventos de fisión/fusión que forman nuevas vesículas de distintos tamaños a expensas de la GUV original. Esta última se ha mantenido impermeable a la sonda fluorescente, que sin embargo ha penetrado en el interior de las nuevas vesículas, demostrando que el proceso trae también consigo permeabilidad de membrana, bien debida a la formación de poros por parte del péptido, o bien a través de las estructuras de fisión. Entre el grupo de pequeñas vesículas, algunas sufren una gran deformación, acompañada de fusiones entre ellas y nuevos eventos de fisión. Finalmente, el conjunto evoluciona hacia una gran vesícula que engulle a las demás, encerrando distintos espacios que se diferencian por su forma, tamaño y presencia o ausencia del marcador fluorescente.

En otros casos (**Fig. 5.5 B**) se observa una microvesiculación muy activa que origina un gran número de *buds* de pequeño tamaño en todo el perímetro externo de la vesícula ($t = 189$ s) y como consecuencia la vesícula progenitora reduce su tamaño. Después ($t \sim 290 - \sim 350$ s) las pequeñas vesículas nacientes se fisianan de manera continua y abundante entre ellas, a lo que siguen eventos de fusión que facilitan la aparición de vesículas de diversos tamaños, en algunos casos con formas alargadas y un alto grado de curvatura (**Fig. 5.5 B**, $t = 317-483$ s). La fusión continúa de hasta que finalmente aparece de nuevo una gran GUV que engulle a las demás.

Los efectos de curvatura generados por Bak- α 56 sobre la membrana de las GUVs de P0PC:CL pueden explicarse teniendo en cuenta dos factores. En primer lugar, por la

5.4 Cambios morfológicos en membranas inducidos por los péptidos

propensión de CL a la formación de fases lipídicas invertidas, lo cual ha sido observado incluso directamente en un contexto biológico [292]. En segundo lugar, debido al carácter multicatiónico del péptido que se encuentra unido a la membrana en una concentración relativamente alta, lo cual acentúa la tendencia formadora de estructuras no lamelares de la CL [288]. En relación con los hechos aquí descritos, se ha observado que la proteína τ Bid (proapoptótica, aunque de una subfamilia diferente a Bax y Bak) promueve la formación de fases hexagonales a gran escala en membranas con CL [293].

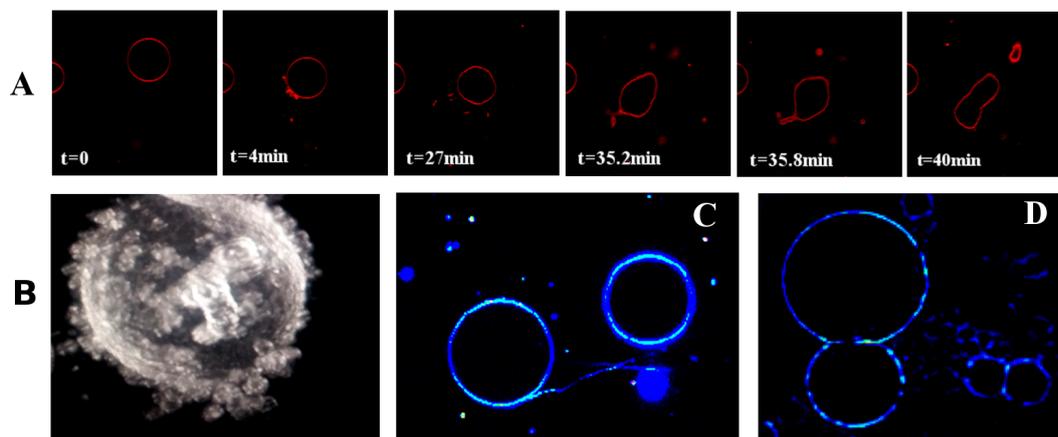


Fig. 5.6: Ejemplos de cambios morfológicos inducidos por $Bak-\alpha56$ en GUVs de POPC:CL. El péptido correspondiente a cada caso se indica en la misma figura. (A) Evolución temporal de una GUV con aparición de ondulaciones y deformaciones de la membrana así como fisión de la membrana y la consiguiente reducción de tamaño de la vesícula original. (B) Imagen tridimensional adquirida a través de un barrido del plano focal (coordenada z) en la que pueden observarse multitud de *buds* asociadas a la membrana de una GUV. (C) Tubulaciones. (D) *Tethering* de varias vesículas a través de túbulos. (E) Fusión de las membranas de dos vesículas. En todos los casos las condiciones fueron: $pH = 7.4$, $I = 159 \text{ mM}$, $T = 22.5 \text{ }^\circ\text{C}$, $P/L = 1/80$.

5.4 Cambios morfológicos en membranas inducidos por los péptidos

La **Tabla 5.1** recoge los principales cambios morfológicos, debidos a la actividad de los péptidos, en GUVs de los dos tipos de composición lipídica ensayados en la Tesis. Tales perturbaciones ocurren de manera aparentemente aleatoria y no afectan por igual a todas las vesículas. Además, no hay un patrón definido que permita asociar estos efectos con un tipo determinado de vesículas, ya sea en función de su tamaño u otras características. Existe una relación entre estos cambios y la concentración peptídica, ya que ocurren con mayor frecuencia y de manera más clara al aumentar la relación P/L (ver por ejemplo la **Fig. 5.4**). Igualmente, en los casos de péptidos marcados fluorescentemente, en general observamos que para un valor determinado de P/L existe variabilidad en el comportamiento de remodelado dependiendo de la cantidad de péptido unido a cada GUV

(ver **Sec. 5.3.2**).

Tab. 5.1: Cuadro resumen de cambios morfológicos y eventos de remodelado lipídico inducidos por los péptidos para las dos composiciones lipídicas estudiadas. Entre los péptidos se incluye melitina, a efectos comparativos, aunque los detalles sobre este péptido a penas se discuten en la Tesis. La valoración (–, +, ++ ó +++); en orden creciente de intensidad) se asignó por simple inspección visual de imágenes de microscopía con focal de fluorescencia, teniendo en cuenta la magnitud y frecuencia cualitativa de las morfologías o eventos observados. A menos que se especifique otra cosa, las condiciones en todos los casos fueron: pH = 7.4, $I = 159 \text{ mM}$, $T = 22.5 \text{ }^\circ\text{C}$, P/L = 1/80 Valores más altos de P/L tienen en general como consecuencia un aumento en la frecuencia e intensidad de todas las morfologías y eventos descritos.

Morfología o evento	POPC:CL				POPC			
	Bax- $\alpha 5$	Bax- $\alpha 56$	Bak- $\alpha 56$	melitina	Bax- $\alpha 5$	Bax- $\alpha 56$	Bak- $\alpha 56$	melitina
Poros (Cap. 4)	++	++	++	++	+	+	ne ^a	++
Ondulaciones (Fig. 5.6 A)	+	++	+++	+	+	+	ne	++
Budding (Fig. 5.5 B y 5.6B)	+	+++	+++	+	+	+	ne	++ ^b
Segregación de fases, Ld/Lo (Fig. 5.2)	– ^c	– ^c	– ^c	– ^c	++	+++	ne	+++
Fisión (Fig. 5.5 B y 5.6A)	+	++	+++	+	–	–	ne	–
Tethering (Fig. 5.6 C)	–	++	++	–	–	–	ne	–
Fusión (Fig. 5.6 D)	++	++	++	+	++	+	ne	++
Túbulos (Fig. 5.3 D)	+	++	++	+	+	+	ne	+

^a ne: Caso no estudiado.^b P/L > 1/30.^c Aunque no se observa segregación de fases de manera directa, sí puede deducirse la presencia de fases Ld asociadas a determinadas morfologías.Bax- $\alpha 56$ y Bak- $\alpha 56$ presentan mayor actividad de remodelado, en todos sus aspectos,

que los otros péptidos investigados, aunque ninguna de las perturbaciones analizadas es exclusiva de estos dos casos. Eventos de *budding* y fisión han sido descritos en estudios anteriores de los péptidos membranolíticos *melitina* y *magainina* [294]. A efectos comparativos, nosotros hemos estudiado también *melitina*, y los resultados correspondientes a este caso se recogen en la **Tabla 5.1**. Procesos de fisión como los inducidos por *Bak- α 56* (**Fig. 5.5 B**) o *Bak- α 56* (**Fig. 5.6 A**) no ocurren en presencia de *melitina* [294] y **Tabla 5.1**) o *magainina* [294].

Estos eventos dependen también de la composición lipídica; en concreto de la presencia de CL. De hecho, con la misma composición lipídica (POPC:CL, 80:20) y en ausencia de péptido existe en algunos casos discriminación de pequeños dominios muy dinámicos, ya que CL fomenta por sí sola la separación de fases Ld, en las cuales se concentra, frente a fases Lo (**Fig. 5.1**). La partición preferente del marcador fluorescente DiD C18 hacia las fases Ld nos ha permitido su observación en membranas sin péptido, e igualmente hemos podido comprobar que en presencia de *Bax- α 56* estos dominios aumentan de tamaño (**Fig. 5.3 A**). El propio hecho de no observar fisión en membranas compuestas por POPC con cualquiera de los péptidos quiere decir que el componente lipídico tiene un papel importante en el mecanismo molecular de este proceso, seguramente a través de la estabilización del intermediario de *hemifisión*. Además, dado que en GUVs de POPC con péptido la presencia de dominios lipídicos es clara, podemos afirmar que el factor tensión lineal (que se encuentra estabilizando los dominios,) no es un propulsor suficiente para facilitar la fisión de membranas. La misma tensión lineal de la interfase entre dominios sí puede relacionarse, sin embargo, con la activación de procesos de *budding* [295], y de hecho este fenómeno sí se observa en membranas de POPC con péptido. Sin embargo, como se discutirá más adelante, existen mecanismos alternativos para explicar la formación de las *buds* (**Sec. 5.5**).

A continuación analizamos con más detalle las diferentes perturbaciones de la estructura de la membrana de las GUVs inducidas por los péptidos ensayados, comenzando por aquellas que parecen tener menos importancia o una incidencia menor (ondulaciones, tubulaciones, *tethering*/fusión) y dedicando mayor atención a los fenómenos de *budding* y fisión.

5.4.1 Ondulaciones de la membrana

Las ondulaciones son cambios oscilantes en la membrana de la vesícula provocadas en general por una perturbación. Pueden entenderse como una secuencia de formas en equilibrio que aparecen como respuesta de la membrana en su intento de mitigar el exceso de energía de excitación que corresponde a la perturbación [296]. En el caso que nos ocupa, la perturbación es consecuencia de la unión del péptido (ya sea *Bax- α 5*, *Bax- α 56*, *Bak- α 56* o *melitina*) y aumenta con la concentración del mismo. El resultado puede ser una deformación de la GUV, que se desvía de su geometría normal esférica hacia otras de tipo esferooidal, ya sea en forma de prolato u oblato [297]. La morfología adquirida es dinámica (cambiante con el tiempo) y oscila entre formas alternativas, que guardan relación con las fluctuaciones térmicas intrínsecas de la propia forma de la vesícula alrededor de un estado de equilibrio que resulta estable en un ambiente viscoso

[298].

Por lo general, frente a la tensión que surge por la unión de moléculas de péptido se produce una extensión local de la membrana en determinadas fases o dominios. Si el exceso de área disponible lo permite, dicha tensión puede liberarse, por ejemplo, mediante la formación de una pequeña protrusión o yema esférica (*budding*, **Sec. 5.5**). Por el contrario, si no existe tal área disponible, el anterior mecanismo de relajación resultará geoméricamente imposible [133], por lo que en su lugar la membrana se relajará a través de ondulaciones.

5.4.2 Tubulaciones

Como se muestra en las **Fig. 5.3 D** y **Fig. 5.6 A,C**, los túbulos que emergen de las membranas de las **GUVs** pueden ser de varias longitudes y grosores. Es interesante el hecho de que estas protuberancias se producen tanto hacia el interior como hacia el exterior de la vesícula, aunque se observan con más frecuencia las formaciones desde la cara exterior. Este tipo de morfología de membrana es variable (entre los distintos casos observados). Es también dinámica, en cuanto a su forma, longitud, grosor y presencia de fases, si atendemos para esto último a las características de su marcaje fluorescente. Un ejemplo de ello se muestra en la **Fig. 5.3 D**.

Composición y formación de los túbulos

Como se observa en la **Fig. 5.7** en algunos casos los túbulos presentan dominios o segregación de fases **Lo/Ld**, también visibles en la **Fig. 5.2 C**. Esta observación nos lleva a plantearnos la formación de las estructuras tubulares en presencia de péptidos como el resultado de la fusión de dominios de **CL** cercanos. Según un modelo reciente [299], en presencia de péptidos catiónicos los dominios de **CL** funcionarían como “dipolos” **CL(-)-péptido(+)** capaces de interactuar entre ellos cuando se acercan debido a las fluctuaciones térmicas ondulatorias de la membrana. Este mismo mecanismo sirve para justificar la formación de *buds* [299] (**Sec. 5.5**).

5.4.3 Fenómenos de *tethering*

Entre las actividades que han sido atribuidas a la proteína apoptótica **Bax** se encuentra la capacidad de fusión o unión de membranas, a la cuál se ha asignado un papel fisiológico [300, 301]. En nuestros experimentos con **GUVs**, después del tiempo de 1-2 *h* que duraban las observaciones, muchas de las vesículas terminan estableciendo contacto a través de sus membranas con otras vesículas cercanas. A su vez, una buena parte de estos contactos acaban como fusión entre las membranas (**Fig. 5.6 D**). Sin embargo, de este proceso no siempre se origina una sola vesícula, lo que nos lleva a pensar que o bien el intermediario resultante no evoluciona con facilidad de forma espontánea hasta concluir el proceso de fusión. De cualquier forma, es interesante observar como los extremos del plano de contacto entre las vesículas constituyen probablemente la zona crítica en el mecanismo de fusión. Por ejemplo, puede observarse un mayor brillo fluorescente en el ángulo de

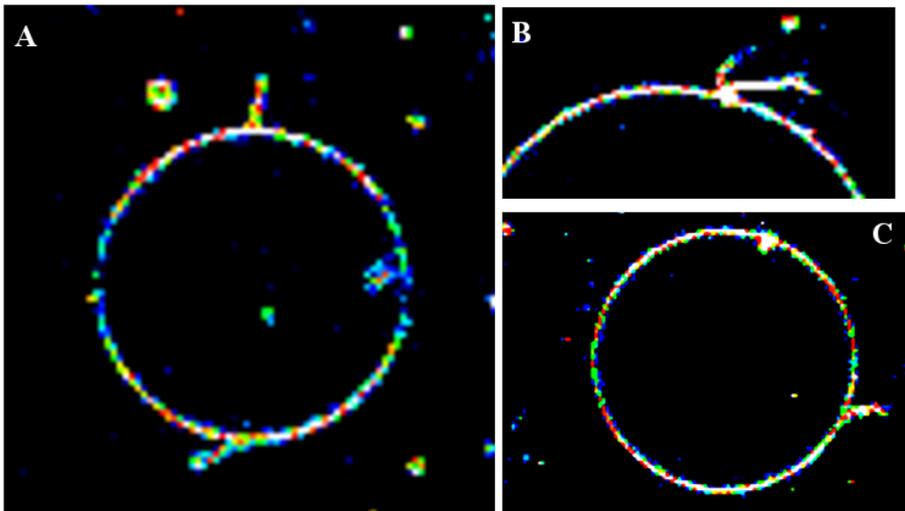


Fig. 5.7: Ejemplos de tubulaciones en GUVs de POPC:CL inducidas por Bax- α 56. A, B y C son tres vesículas distintas. Se observan elongaciones cilíndricas (*túbulos*) de tamaño pequeño y grosor similar al de la membrana como resultado de la acción del péptido. La fluorescencia corresponde al marcador lipídico DiI(3)C18, que segrega preferentemente en fases Ld. En algunos casos se observan segregaciones en fases en los túbulos.

contacto, que indica una mayor concentración de la sonda lipofílica y por lo tanto una mayor fluidez de membrana (Fig. 5.6 D).

5.5 Budding

Budding puede traducirse como “gemación” (*nota 4 en la página 9*). Se describe como la formación en una zona de la membrana de pequeñas protrusiones esféricas (yemas, o *buds*), que en muchos casos pueden evolucionar hasta la fisión o separación completa de una nueva vesícula a partir de la original. Puede entenderse, como acabamos de describir arriba, como un posible mecanismo de relajación de la membrana ante una perturbación o tensión, y se trata además de un fenómeno frecuente en composiciones lipídicas con presencia de CL. Este proceso es de capital importancia en las células, donde es dirigido, ejecutado y regulado por una compleja maquinaria de proteínas especializadas [302].

Sin embargo, la presencia de sistemas proteicos específicos no es obligada para que tengan lugar fenómenos de *budding*. Éstos pueden ocurrir en membranas mono- o multicompuestas (como POPC o POPC:CL), independientemente de la uniformidad de la curvatura espontánea de la bicapas, y en presencia de proteínas o péptidos sencillos cuya función normal puede no estar relacionada con el contexto fisiológico del *budding* a nivel celular. Incluso, puede tener lugar *budding* en membranas solo lipídicas. Este proceso en general se debe a inestabilidad generada en la interfase de dominios lipídicos que se traduce en tensión de la membrana por efectos de curvatura, la cual, en presencia de lípidos con tendencia a organizarse en fases no lamelares, hace posible la formación de

buds. Estas morfologías de membrana con frecuencia evolucionan hacia la emisión de nuevas vesículas a través de procesos de fisión, que se discuten más adelante (**Sec. 5.6**).

5.5.1 Patrones de formación de las *bud*

En la **Fig. 5.8** se muestra una secuencia temporal de formación de *buds* con patrones distintos en dos vesículas cercanas de POPC:CL, producto de la acción de Bax- α 56. En una de las GUVs la *buds* se forman hacia la disolución exterior, mientras que en la otra se forman principalmente hacia el interior. De manera general, en nuestras observaciones la mayoría de los casos de formación de *buds* se encuentra polarizada hacia el exterior de las GUVs. Esto seguramente se debe a que la interacción de los péptidos con las GUVs ocurre en primer lugar con la superficie exterior de las membranas. Como consecuencia, puede aparecer curvatura positiva en la monocapa externa y asimetría de diversos tipos entre las monocapas externa e interna, incluyendo desajuste de área, de carga (dado el carácter catiónico de los péptidos) y de interacciones y dinámica de los lípidos [303–305]. Esta situación es la base de diversos tipos de mecanismos desestabilizadores que explican por ejemplo la formación de poros por parte de los péptidos [64, 87, 261, 306, 307]. Por otro lado, la formación de *buds* en la monocapa interna implica una situación diferente, ya que en principio significa que el péptido ha sido capaz de acceder al interior de la GUV, y por lo tanto está presente en ambas monocapas. El mecanismo de penetración es probablemente a través de los mismos poros que forman los péptidos, en cuyo caso el paso del péptido va asociado a permeabilidad de la GUV, aunque también pueden existir otros mecanismos, como por ejemplo a través de la formación de fases invertidas (algo que resulta asumible cuando CL forma parte de la composición lipídica). De esta forma, ambos tipos de *budding* se corresponden también claramente con estados distintos de la membrana en cuanto a su interacción con los péptidos.

Por otro lado, aunque en ambos casos el proceso evoluciona hacia fisión y vesiculación, generalmente las GUV con *budding* exterior disminuyen claramente su tamaño, mientras que el cambio de tamaño no es tan claro en GUVs que presentan *budding* interior. Este hecho, del cual ya hemos descrito otro ejemplo (**Fig. 5.5 A**), sugiere la existencia de reciclado de membrana en el caso de *budding* interior, seguramente mediante la alternancia de procesos de fusión y fisión, todo ello facilitado por el confinamiento de las vesículas recicladas dentro de la GUV madre.

5.5.2 Composición lipídica de las *buds*

Como habíamos visto en el caso de los túbulos, también aquí, y para los dos tipos descritos de patrones de *budding*, el mayor brillo fluorescente de la sonda en las *buds* y en regiones de la vesícula madre donde estas se forman (en general hasta 20 veces más intenso que en otras partes de las membranas) está de acuerdo con una mayor fluidez y desorden en estas zonas, que presentarían características de dominio Ld. Este hecho sugiere que tanto de las membranas de las *buds* como de las áreas formadoras de *budding* son ricas en CL, lo que concuerda con estudios previos [299, 308, 309], coincidentes en señalar que en sistemas lipídicos con CL ésta se organiza en pequeños dominios muy

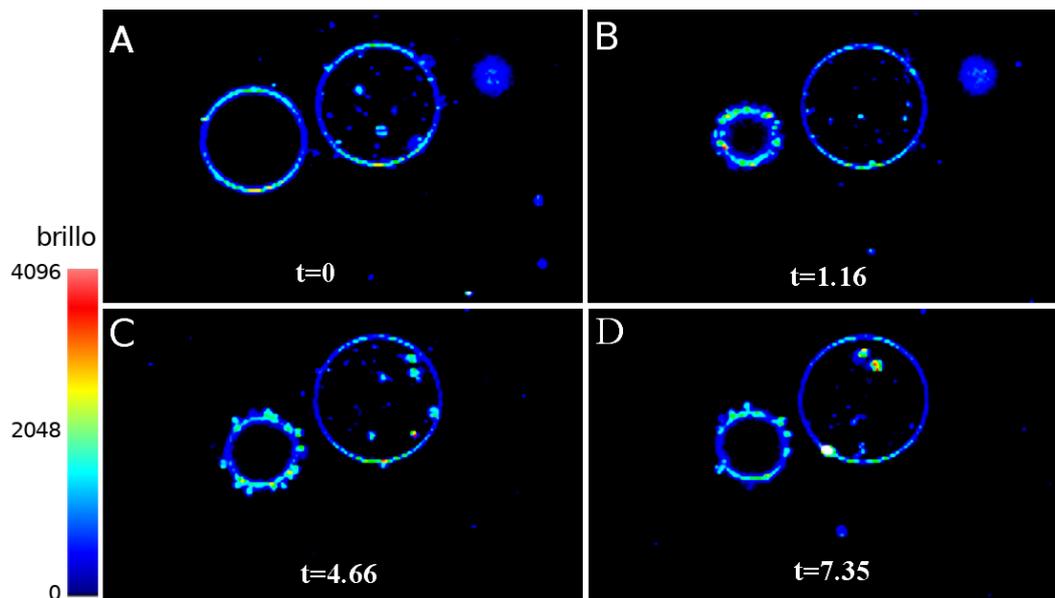


Fig. 5.8: Budding exterior e interior en GUVs de composición binaria bajo la acción de Bax- α 56. La vesícula de la izquierda experimenta desde el primer minuto procesos de *budding* con emisión de un número múltiple de pequeñas vesículas similares entre ellas. A juzgar por la fluorescencia de la sonda, la membrana en las *buds* es más fluida/desordenada que en la membrana de la vesícula parental, por lo que probablemente es más rica en CL. Por su parte, la vesícula de la derecha sufre *budding* desde su monocapa interna, así como colapso local de dominios (punto brillante, en la parte inferior de la GUV). La composición lipídica era POPC:CL (80:20) y la razón P/L = 1/80. El tiempo indicado en las imágenes se expresa en minutos, donde $t = 0$ representa el momento en que se comienzan a tomar las imágenes (aproximadamente 5 *min* después de la adición de las GUVs sobre la disolución que contiene el péptido en la cámara de observación).

fluidos.

5.5.3 Tamaño y frecuencia de las buds

Estudios previos realizados con péptidos membrano-activos [290] mostraron que el tamaño de las *buds* no está relacionado ni con la curvatura espontánea de la membrana ni con la expansión de área causada por la unión de los péptidos. En nuestro caso, los tamaños de las *buds* son variados, si consideramos todas las *GUVs* presentes en una determinada muestra. Este tamaño oscila entre unas pocas micras de diámetro y un tamaño tan pequeño que no puede apreciarse el anillo de su membrana ni su lumen interior. En este último caso, que suele ser abundante en las muestras, es posible que ni siquiera se trate de vesículas, sino de algún tipo de agregado lipídico relacionado con fases no lamelares. En lo sucesivo nos referiremos a este tipo de emisiones lipídicas como **puntos vesiculares**.

Por otro lado, las *buds* emitidas por una misma *GUV* son siempre muy similares en tamaño. Esto hace pensar que las características de cada evento de *budding* son el resultado de unas propiedades moleculares definidas de la *GUV* donde se origina. Además, este patrón es el mismo, independientemente de la variante peptídica con que se ensaye. Probablemente, el factor determinante para el tamaño y otras características de las *buds* no sea el péptido, cuyo papel sería el de activador del proceso, sino la cantidad presente de CL y las características de su organización en dominios.

5.5.4 Mecanismos de *budding* en sistemas modelo

En sistemas lipídicos sencillos se ha propuesto un mecanismo según el cual los *bud* son el resultado de un proceso competitivo entre la energía elástica que corresponde al doblado o flexión de la membrana y la tensión lineal del borde de los dominios o fases lipídicas [310]. Según esta teoría, la tensión lineal que caracteriza la interfase entre dominios sirve para propiciar fenómenos de *budding* [290], de manera, que la perturbación que dio lugar a la separación de fases, por ejemplo, a través de la interacción de los péptidos en nuestro caso, es trasladada al cuello del *bud*. Sin embargo, investigaciones anteriores de nuestro grupo [207], utilizando espectroscopía de fuerza, AFM y microscopía de fluorescencia en bicapas soportadas, concluyen que la presencia en las membranas de un péptido que contiene la secuencia de Bax- α 5 y parte de Bax- α 56¹² da lugar a una disminución de la tensión lineal. Si tenemos en cuenta estos hechos en el contexto de la teoría anteriormente mencionada, esperaríamos que la presencia de los péptidos inhibe la formación de *buds*, en lugar de activarla.

¹² En el trabajo mencionado [207] se utiliza una versión distinta del péptido Bax- α 5. Su longitud se alarga por ambos extremos con respecto al utilizado aquí con el mismo nombre, por lo que también se asemeja a Bax- α 56 (Tabla 2.1). La secuencia de aquella versión del péptido era: Ac-DGNFNWGRVVALFYFASKLVLKALSTKVPELIRT-NH₂, donde el doble subrayado ondulado marca la zona coincidente con los dos péptidos de Bax utilizados en esta Tesis, el subrayado simple corresponde a la zona coincidente solo con Bax- α 5 y el subrayado doble corresponde a la zona coincidente solo con Bax- α 56.

Recientemente se ha descrito un mecanismo alternativo [299], a partir del estudio de los cambios morfológicos inducidos por citocromo *c* y otras proteínas catiónicas en GUVs con segregación de fases que contienen CL y colesterol. En este trabajo se propone que la formación de los *buds* y otras estructuras curvadas se debe al acercamiento entre dominios de CL en la base de pliegues transitorios formados a partir de fluctuaciones térmicas de la membrana. El acercamiento es posible gracias a que la proteína policatiónica actúa como ligando puente entre dominios, a la vez que neutraliza la repulsión electrostática entre CL de distintos dominios. A su vez, la curvatura negativa de la CL y su tendencia a formar fases invertidas, acentuada por la interacción con el policatión, estabilizaría la base del cuello. Este atractivo mecanismo es adecuado para nuestro caso, ya que todos los péptidos con actividad de remodelado que hemos estudiado son policatiónicos. Sin embargo, creemos que la propuesta no es completa y debe incluir otros ingredientes además de fuerzas electrostáticas, ya que el orden de actividades que observamos (Tabla 5.1) no correlaciona con el orden de carga neta de los péptidos (Tabla 2.1 en la página 44).

5.6 Fisión de membranas inducida por Bax- α 56 y Bak- α 56

La fisión procede a través de la formación de un *cuello* de membrana, que recuerda a un poro de fusión, excepto que en este caso el cuello se estrecha en lugar de expandirse. El estrechamiento llega hasta el punto en que tiene lugar la fusión de la monocapa interior de la membrana del cuello, formándose que genera un intermediario de fisión que es análogo al intermediario de fusión. La fusión posterior de la monocapa externa del cuello de la membrana completa el proceso de fisión [311]. Es decir, la fisión y la fusión de membranas son procesos íntimamente relacionados.

Los eventos de fisión que observamos en nuestros experimentos van acompañados en algunos casos de fusión, aunque con mayor frecuencia dan lugar a la emisión de vesículas cuyo radio es mucho menor que el de la GUV progenitora. Como hemos comentado arriba, en muchos casos el tamaño de las vesículas hijas es muy pequeño (puntos vesiculares) y podría incluso no tratarse de vesículas sino de algún tipo de agregado de lípido. Por otro lado, a la luz de nuestras observaciones el proceso de fisión en GUVs de POPC:CL parece no ser reversible, aunque es muy difícil asegurarlo, dada la dinámica y complejidad del sistema. A pesar de no haber un patrón claro, si vemos que cuando se trata de puntos vesiculares la fisión es total y abundante, aunque a penas se acompaña de una disminución del diámetro del GUV. Por otro lado, cuando la vesícula hija tiene un tamaño tal que se puede apreciar su membrana, su separación de la membrana madre sucede con mayor dificultad o simplemente (mayoría de los casos) no llega a separarse. Existe un tercer caso, donde la fisión ocurre completamente y se observa claramente un disminución brusca del diámetro del GUV madre, pero las vesículas resultantes permanecen asociadas a la membrana de la cual se originan. Cabe señalar que cuando se produce emisión de puntos vesiculares, esta no va unida necesariamente a la formación de poros, pero en la totalidad de los casos de emisión de vesículas con membrana observable la vesícula progenitora se encuentra permeabilizada.

La separación de las *bud* parece estar relacionada a la existencia de separación entre

fases justo en la zona del cuello, lo que corresponden, como hemos dicho ya, a una composición lipídica diferente entre las membranas de la vesícula naciente y la vesícula madre [312]. Al parecer, el área de las *bud* de mayor tamaño es grande en comparación con el área de los dominios líquido-desordenados de las GUV, lo que hace difícil la coincidencia del límite de separación de fases en el cuello de fisión y complica la la separación.

5.6.1 Transitoriedad de los procesos de fisión

En la célula, la temporalidad de un determinado proceso es algo importante para el éxito de una determinada función. Uno de los detalles a los que prestamos especial atención fue la durabilidad de las distintas morfologías y evento así como la posibilidad de que alcance una situación de estabilidad.

Todo indica que existe una relación entre la composición lipídica y el tiempo necesario para que se desarrollen procesos de vesiculación, *budding* o fisión. Las composiciones lipídicas capaces de generar fases lipídicas no lamelares (POPC:CL) favorecen y aceleran los eventos mencionados, en comparación con las vesículas de POPC, donde solo los fenómenos de *tubulación* son de frecuencia similar a la observada en composiciones binarias. Por otro lado, no hay una relación temporal entre la formación de poros y aparición o existencia de estas morfologías de remodelación de membranas, puesto que éstas se observan indistintamente antes, durante y después de que la vesícula se permeabilice. En cualquier caso, en muchas GUVs los cambios de forma de la membrana ocurrieron después de la permeabilización de la membrana. Ello por un lado garantiza una igualdad en la concentración de las especies iónicas, u otras osmóticamente activas, a ambos lados de la membrana, descartándose de esta manera que las perturbaciones que dan origen a eventos de remodelación se deban a estrés osmótico o efectos de curvatura sobre CL relacionados con la asimetría de las concentraciones iónicas. Por otro lado, en estos casos de GUVs permeables también demuestran el péptido puede acceder en principio a ambas monocapas, demostrando que la remodelación de membrana no se asocia necesariamente a una unión asimétrica de los péptidos a la membrana.

5.7 Mecanismo de acción de los fragmentos de Bax- α 56 y Bak- α 56

Durante todo este capítulo hemos ofrecido indicios, con mayor o menor detalle sobre cómo, a nuestro entender, estos péptidos *remodelan* la membrana. Para ello nos hemos apoyado en evidencias científicas e hipótesis, nuestras y de otros autores que consideramos adecuadas para soportar nuestras observaciones. En esta sección queremos resumir el papel de cada componente, lipídico o peptídico, y su implicación los mecanismos de remodelado de membranas lipídicas.

Los fenómenos de *budding*, tubulaciones o vesiculación (aunque no fisión) pueden ser logrados en ciertas condiciones por el propio sistema lipídico sin la presencia de péptidos o proteínas [133]. Por ejemplo una simple disminución del pH puede causar invaginaciones y tubulación de varios nanómetros en vesículas compuestas por POPC:CL (90:10) [313].

A pesar de ello, lo cierto es que se necesita un agente externo capaz de activar tales procesos, y en nuestro caso la activación corre a cargo de los péptidos. Los eventos de fisión, como los mostrados aquí en presencia de Bak- α 56 (**Fig. 5.5**) y Bax- α 56 (**Fig. 5.6**) no han sido observados antes para otros péptidos, con la excepción de fragmentos derivados de proteínas víricas. La mayoría de los modelos propuestos para explicar la fisión de la membrana se apoyan en reacciones bien caracterizadas, mediadas por maquinarias proteicas (clatrina, dinamina-1 y endofilina), asumiendo éstas todo el protagonismo. Aquí hemos demostrado, sin embargo, que no es necesario tan alto nivel de complejidad, para llevar a cabo como tal procesos de fisión. Será necesario, eso sí, en los casos en los que se requiera control y regulación, como en el contexto celular. Pero la capacidad de ejecución del proceso por sistemas sencillo tiene la utilidad de que sirve para poner de manifiesto los requerimientos básicos y las características del mecanismo a través de los pasos más fundamentales.

Incluso en sistemas minimalistas como el nuestro, existen muchos factores a tener en cuenta para explicar las actividades de fisión y fusión llevadas a cabo por nuestros fragmentos peptídicos. Para su mejor entendimiento vamos a explicarlo partiendo de cada uno de los protagonistas

El componente lipídico. La presencia de CL reduce el grosor de la membrana haciéndola más propensa a transiciones termotrópicas (cambios de fase) y a fluctuaciones activadas térmicamente [299]. Estas fluctuaciones, a partir de la forma esférica de las GUVs son de escala nanométrica [314], por lo que no son apreciables microscópicamente. Aún así, influyen de manera decisiva posibilitando eventos que en principio se encuentran impedidos cinéticamente, como la formación de poros (**Cap. 4**) y el remodelado de membranas. Para ello resulta también crucial la curvatura intrínseca de la CL, puesta de manifiesto con dependencia de las condiciones de su entorno, como la composición iónica, así como la capacidad de este lípido para formar fases no lamelares.

El componente peptídico. El agente causal de estos fenómenos, en nuestros experimentos, son los péptidos. Los efectos de invaginaciones (túbulos y *buds*) que se producen hacia el interior vesicular, y el propio hecho de la existencia de poros lípido-peptídicos estables en el tiempo, dejan claro que el péptido se une a ambas monocapas y no solamente a la exterior. Por tal motivo, la explicación de estos fenómenos solamente desde la óptica de la diferencia de expansión de área entre ambas monocapas, no es completa. Por otro lado, los péptidos modelo utilizados en este estudio son generadores de curvatura, tienen la capacidad de segregar la membrana en fases y sus características físico-químicas permite que el complejo lípido-péptido alcance con relativa rapidez el intermediario de fisión, después de lo cual ocurre la ruptura del cuello de manera espontánea [315].

El proceso de Fisión. Para muchos, el principio físico que mejor se explica los eventos del proceso de fisión es la teoría de elasticidad, en la cual se apoya el modelo de HELFRICH [296]. Dado que para que ocurran fenómenos de fisión es necesario el acercamiento de las membranas involucradas, se debe generar un nivel de curvatura

tal que lo permita. El modelo de HELFRICH propone que los *buds*, originados a partir de dominios Ld, resultan de un incremento en la tensión lineal al borde de estos, insostenible para la membrana, y que ocurren probablemente a través de una la transición que implica fases no lamelares. Todo ello sería potenciado por la unión del péptido a nivel interfacial, donde la concentración peptídica tendría importancia crucial. Como ya hemos comentado (**Sec. 5.5.4**) este modelo presenta una debilidad, que deriva del hecho de que la presencia de los péptidos disminuye la tensión lineal. Puede ser un modelo válido para explicar procesos de *budding* en membranas solo lipídicas con segregación de fases, pero no en presencia de péptidos que tengan actividad interfacial. Para estos casos creemos que aunque la presencia de dominios de CL y sus propiedades mecánicas (sobre todo la curvatura) juegan un papel importante, su protagonismo se sitúa a un nivel distinto.

Para explicarlo adoptamos el modelo de BEALES y colaboradores [299] (**Sec. 5.5.4**). De acuerdo con este modelo, los *buds* se forman al producirse el acercamiento de dominios de CL situados en la base de pliegues de la membrana. Los pliegues aparecen de manera natural debido a fluctuaciones térmicas de la bicapa, pero la estabilización de estos pliegues, y por lo tanto la activación de la formación de *buds*, sería solo posible cuando los péptidos, por su naturaleza catiónica, actúan como puente propiciando el acercamiento entre dominios de CL. El atractivo de este modelo consiste en que combina bien el papel de los protagonistas lipídico y peptídico. Por un lado las propiedades de la CL facilitan la formación de estructuras curvadas. Esto es particularmente importante en la zona del cuello donde la formación de estructuras no lamelares ayudaría en el proceso, y donde además la unión del péptido haría posible que CL manifieste su potencial de curvatura negativa. CL es además importante porque sirve de plataforma de anclaje, a la cual se unen los péptidos puente que estabilizan el cierre de los pliegues. Por lo tanto el papel de los péptidos queda claro como activadores de todo el proceso.

Explicar con esta teoría fenómenos de fisión en particular, como el caso mostrado en la **Fig. 5.5 B**, no es fácil. Tal sucesión vertiginosa de eventos de fisión y fusión sugiere que la cantidad de péptido unido a la membrana es muy alta. Dado que casos como el de la figura ocurren en una minoría de vesículas, podrían estar relacionados con la presencia en ellas de una cantidad de CL superior al 20%, lo que a su vez podría deberse a la variabilidad que creemos que existe en el caso de GUVs preparadas mediante electroformación. Dicha variabilidad explicaría la diversidad de complejos péptido GUV que ya hemos comentado anteriormente (en la página 126). Precisamente nos interesa el ejemplo de la **Fig. 5.5 B** porque presenta características que se asemejan a las que se dan en las crestas de la membrana mitocondrial interna: Una rápida reorganización de abundantes dominios Ld ricos en CL (con presencia de fases invertidas) y que además presentan una distribución asimétrica entre monocapas podría conducir a esta situación, si además se añaden péptidos con capacidad para reorganizar la distribución lateral de CL, potenciar su curvatura intrínseca y modificar la fluidez y otras propiedades de la membrana. En un escenario como el anterior donde no puede producirse *budding* (debido a

la asimetría transmembranal y al tamaño de los dominios) los intermediarios de fisión/fusión estarían muy favorecidos energéticamente, pasando de la fisión a la fusión con igual facilidad.

El proceso de fusión. Fusión y fisión son dos procesos distintos aunque íntimamente relacionados, ya que ambos comparten las mismas formas o estructuras intermedias adoptadas por la membrana, aunque en secuencia inversa, de manera que la transformación topológica global que sufre la superficie de la membrana en cualquiera de los dos casos es opuesta a la que corresponde al otro [311]. Existen dos modelos principales para explicar la fusión entre dos membranas adyacentes [316]: el modelo del “*stalk*” y el modelo del “defecto”. En el primero, después de la formación del *stalk* entre las vesículas, se produce una hemifusión seguida por la formación de la bicapa entre las vesículas asociadas. En el segundo, se crea un desorden lipídico local en la membrana de las dos vesículas asociadas, seguido de la fusión y la reorganización lipídica. La teoría modificada del *stalk* [317] básicamente introduce un tipo estructural nuevo de baja energía, a parte del el *stalk*, denominado contacto trans-monocapa (trans-monolayer contact, TMC). Ambas estructuras son estados intermedios entre la fase lamelar y fases no lamelares invertidas cúbica o hexagonal (QII y HII, respectivamente) (Fig. 5.9). De acuerdo con este mecanismo de fusión, las propiedades más importantes son el módulo de curvatura Gaussiana y la tensión de rotura de la membrana. Ambas dependen de la composición lipídica de la membrana (por ejemplo, de la presencia de CL y de su proporción) y tienen la capacidad de influir en la estabilidad de los TMC de manera que pueden determinar el destino final del proceso [318–320].

Teniendo en cuenta el marco teórico que acabamos de presentar, la forma de actuar de Bax- α 56 o Bak- α 56, es, esencialmente, a través de cambios locales que afectan a la curvatura Gaussiana y a la tensión de rotura de la membrana. En mi opinión estas premisas básicas son válidas para explicar tanto la fusión como la fisión de membranas, llevadas a cabo por nuestros péptidos. El resultado final que se observa en cada caso depende de la combinación de una serie de factores, entre los cuales se encuentra la secuencia peptídica, con las propiedades físico-químicas que se derivan de ella, y la concentración del péptido que corresponda en la membrana de cada GUV, que como sabemos puede acabar siendo variable a pesar de la pretendida homogeneidad de las disoluciones. Al parecer, la naturaleza del complejo final péptido-lípido no determina principalmente si las vesículas sufrirán inicialmente un evento de fisión o si colapsarán en estructuras no vesiculares (colapso de dominios), por lo que también existen seguramente múltiples aspectos comunes en os mecanismos de estos dos eventos.

Por último, a pesar de la importancia dada a la presencia de CL en las membranas, no hemos de olvidar que los péptidos también presentan actividad de remodelado sobre membranas que contienen solo POPC. En este caso, la relativamente baja tasa de observación de fisión se explicaría por una energía de estabilidad muy alta de los intermediarios. En este sentido, existe evidencia experimental [321] de que la composición lipídica es un factor importantísimo para superar la barrera energética necesaria para completar los procesos de fisión o fusión.

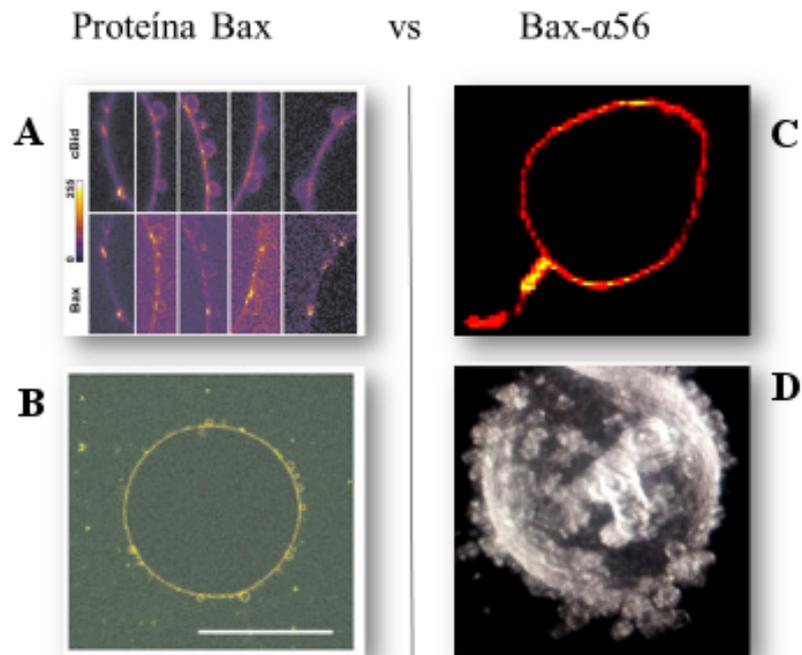


Fig. 5.9: Comparación de los efectos de la proteína Bax y el péptido Bax- α 56 sobre la membrana de las GUVs. (A y B) GUV compuesta de 30% de CL y 70% de PC después de 30 minutos de incubación con 20 nM de cBid y 40 nM de Bax, ambas marcadas fluorescentemente. La imagen en el panel A muestra una ampliación de la imagen en el panel B, donde se observa la ubicación preferencial de Bax en zonas curvadas de la membrana. (C y D) Túbulos y *buds*, respectivamente (veanse también las Fig. 5.3C y 5.6B) formados en una GUV compuesta por 20% de CL y 80% de PC después de un tiempo de incubación con el péptido Bax- α 56. En las morfologías de *budding* inducidas por la proteína y por el péptido se observan patrones de vesiculación similares. Las imágenes de los paneles A y B fueron tomadas y adaptadas de [322].

5.8 Péptido vs proteína: Repercusión de esta investigación

Los diferentes fenómenos de remodelación descritos hasta aquí son de gran interés, ya que se han demostrado comportamientos similares en presencia de proteínas encargadas de procesos de fusión y fisión de membranas biológicas en contextos celulares. Entre ellas destaca Drp1 [121, 140, 323], implicada en procesos de fisión mitocondrial en relación tanto con la división celular como con la muerte apoptótica. Esta proteína se encuentra relacionada con Bax, la cual también induce remodelado de membranas de manera muy similar a la que observamos aquí [143, 145, 324]. Además, tanto Drp1 como Bax necesitan la presencia de CL para llevar a cabo su actividad y se asocian preferentemente con dominios Ld de la membrana [325–327].

En la **Fig. 5.9** se muestra una imagen de los eventos observados en GUVs (POPC:CL, 70:30) incubadas con la proteína Bax [322]. Ahora podemos establecer una comparación de los efectos provocados por nuestros péptidos derivados de Bax, frente a vesículas de POPC:CL 80:20, en especial Bax- α 56, al cual nos referiremos. Este péptido con tan solo 27 residuos puede considerarse como sistema modelo, reducido o minimalista, de la proteína. Es evidente que pese a su sencillez Bax- α 56 reproduce una parte importante de los fenotipos de estructura y actividad observados en sistemas modelo en presencia de Bax completa, lo que sugiere que la actividad de la propia proteína se focaliza en gran medida en la sección que comprende la horquilla de hélices α 5- α 6.

Como hemos podido observar, el péptido Bax- α 5 presenta claramente menor capacidad de remodelado de membranas que Bax- α 56 (**Tabla 5.1**). En la secuencia de este último péptido los 10 del extremo N-terminal son idénticos a los 10 residuos del extremo C-terminal de Bax- α 5, pero además incluye los residuos que abarcan hasta el final de la hélice 6 de Bax (**Tabla 2.1**). Parece por lo tanto que ambas hélices recapitulan parte de la actividad remodeladora de membranas de la proteína parental, aunque los resultados indican que los residuos del giro y la hélice 6 tienen una importancia mayor. En la proteína Bax completa dichos residuos de aminoácido se encuentran en una zona intermedia entre las hélices 5 y 6 e interactúan muy probablemente con la interfase de la bicapa lipídica. Nuestros resultados sugieren que dicha interacción interfacial es esencial para desencadenar procesos de remodelación de membrana, los cuales se asocian muy probablemente con una tendencia a curvar la monocapa debido a interacciones péptido-lípido.

La importancia de la horquilla de hélices α 5- α 6 había sido propuesta tempranamente en cuanto a la actividad formadora de poros de proteínas de la familia Bcl-2, y apoyada después con fuerza a través de múltiples investigaciones de nuestro grupo [1–3, 34, 64, 171, 197, 207, 208]. La destacable novedad aquí es que prácticamente la misma zona estructural de la proteína recapitula de manera notable la actividad de remodelado de membranas. La concentración de proteína a la cual se observaron efectos de remodelado, en experimentos *in vitro* con sistemas lipídicos modelo (POPC:CL, 70:30), es del orden de decenas de nanomolar (40 nM). Nosotros registramos efectos muy similares, incluido fisión de membranas, en GUVs compuestas por POPC:CL 80:20 a concentraciones del péptido Bax- α 56 tan solo \sim 10 veces mayores (435 nM). Además, y como resultado también destacable de esta Tesis, un péptido análogo diseñado a partir de secuencias de

las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ en Bak (Bak- $\alpha 56$) muestra también los mismos patrones de actividad remodeladora de membranas, aunque con intensidad si cabe mayor. Es interesante, en este último caso, el hecho de que tal actividad de remodelado no ha sido aún asignada entre las funciones biológicas de la proteína Bak, y tampoco ha sido demostrada en sistemas modelo, como fue el caso de Bax [322].

Las características que adquieren las GUVs *in vitro* al entrar en contacto con el agente modificador, ya sea éste péptido o proteína, son muy similares. Por ello, otra conclusión importante de este trabajo es que los hechos que describe son un nuevo soporte a las capacidades de Bax y Bak para activar eventos de remodelado de membranas, y así mismo apoyan la posibilidad de que dicha actividad tenga importancia fisiológica, por ejemplo, a través de la participación de estas proteínas en procesos de fisión mitocondrial. En el supuesto mecanismo de acción de las proteínas completas, tal actividad debe recaer con especial protagonismo sobre las zonas centrales de su secuencia que corresponden a la horquilla de hélices $\alpha 5$ - $\alpha 6$, ya, como hemos demostrado, fragmentos correspondientes a esa horquilla son suficientes para llevar a cabo la actividad.

No hemos de olvidar tampoco que péptidos correspondientes a esta misma zona han sido propuestos como posibles anticancerígenos, en base a su actividad permeabilizante, incluso *in vivo*, sobre membranas mitocondriales y a su demostrada capacidad para inducir apoptosis en células [3, 4]. Se ha observado también que melitina es capaz de inducir apoptosis a través de la activación de la vía mitocondrial, con la consecuente liberación de citocromo *c*, así como de causar importantes cambios morfológicos en las crestas mitocondriales [206]. En este sentido, los resultados que aquí se describen pueden abrir nuevas vías de posibles aplicaciones de estos péptidos diseñados a partir de las secuencias de Bax y Bak que incluyan su capacidad remodeladora de membranas. Aunque otros péptidos han demostrado anteriormente actividad de fisión, la actividad que demuestran Bax- $\alpha 56$ y Bak- $\alpha 56$ es netamente superior a la de otros casos, como melitina (Tabla 5.1) o magainina (resultados no mostrados).

6 Discusión general, perspectiva y conclusiones

6.1 Estrategia y metodología

En esta tesis hemos empleando principalmente dos estrategias de trabajo que nos han permitido alcanzar los objetivos propuestos: (i) Una aproximación experimental reduccionista, gracias a la cual hemos abordado problemas que acontecen en un contexto biológico complejo y enormemente dinámico, como lo es la mitocondria, a través de sistemas modelo sencillos, posibilitando así el estudio tanto del mecanismo de formación de poros, como de los eventos de remodelación de membranas. Así, partiendo de dominios mínimos activos de las proteínas pro-apoptóticas **Bax** y **Bak**, y de membranas modelo que mimetizan las principales características de la membrana mitocondrial hemos podido reproducir eventos que dentro de la célula son ejecutados de una forma altamente regulada por complejas maquinarias proteicas. (ii) Se utilizó una metodología basada en el estudio y análisis de propiedades de partícula individual, que parte de la observación directa de vesículas lipídicas individuales mediante microscopia de fluorescencia. Cada vesícula lipídica puede ser considerada como un complejo surpamolecular singular donde los péptidos estudiados ejercen su actividad, por lo que a pesar de la escala micrométrica de las **GUV** nuestra estrategia se asemeja a la de estudios de molécula individual. A diferencia de las investigaciones clásicas, donde el comportamiento individual se pierde y solo puede accederse a valores promedio, el estudio individualizado nos ha permitido evaluar cuantitativamente desde las cinéticas de permeabilización a la aparición y evolución de distintos tipos de morfologías. Ello ha sido determinante para poder elaborar y aplicar una metodología cuantitativa, basada en la primera ley de **FICK**, para analizar las cinéticas obtenidas por medio de la microscopia confocal de fluorescencia, de forma que se pudo acceder a detalles como el tamaño y número de poros presentes en las vesículas. Es decir, pudimos obtener información de un fenómeno que ocurre a escala nanométrica (poros de membrana) partiendo de datos cinéticos medidos en imágenes que corresponden a una escala de resolución micrométrica.

6.2 Estructura e interacciones

Bax- α 5 y **Bax- α 56** son dos fragmentos con actividad en membranas que tienen una parte importante de su secuencia en común. A pesar de ello, tienen diferencias estructurales que de una u otra forma modulan su actividad. **Bax- α 5** es un segmento policatiónico, hidrofóbico, de limitada anfipaticidad, si observamos el ángulo de la cara polar de esta

molécula (**Fig. 3.1**). Por su parte **Bax- α 56** posee una combinación cuando menos interesante de cargas positivas y negativas, homogéneamente distribuidas a lo largo de su secuencia. El resultado son dos caras opuestas (polar / apolar), de $\sim 180^\circ$ cada una si se concibe al péptido de manera simplificada como un cilindro (**Fig. 3.1**). Ambos péptidos son capaces de modificar la organización lateral de la membrana dando lugar a la formación y/o coalescencia de dominios. Las observaciones realizadas en membranas marcadas con **NBD-PE** por microscopia confocal sobre el apagado o auto-desactivación de la fluorescencia de esta sonda avalan que dicha actividad es mayor en **Bax- α 56** que en **Bax- α 5**, lo que puede estar relacionado con dos variables: longitud de la secuencia y capacidad de interactuar con las cadenas acílicas de los lípidos. **Bax- α 56** tiene 27 residuos de aminoácido en su secuencia, en comparación con **Bax- α 5** cuya longitud es de 22 residuos (**Tabla 2.1**). Solo atendiendo a esa pequeña diferencia de longitud podría argumentarse una ventaja a la hora de interactuar con membranas. Por otro lado, en este trabajo no hemos encontrado evidencias que apoyen la dimerización de **Bax- α 5**. Sin embargo, sí hemos aportado pruebas de que **Bax- α 56** dimeriza¹ en membranas lipídicas, según los resultados obtenidos mediante CD (**Sec. 3.2.2**) y sobre todo teniendo en cuenta la detección de excímeros de **pireno** a través de espectroscopía de fluorescencia (**Sec. 3.4**). Así, nuestros resultados indican que la existencia de dímeros es independiente de la composición lipídica de la membrana. Sin embargo, los experimentos de detección de excímeros de **pireno** sugieren que la estructura de los posibles dímeros cambia dependiendo de las características de la membrana, lo que puede significar incluso un cambio en la interfase de interacción entre los péptidos.

La estructura secundaria de un péptido puede verse afectada por el medio circundante, como así lo indican las medidas de CD. En el caso de **Bax- α 56** los cambios relacionados con la composición de la membrana parecen afectar incluso a la estructura cuaternaria. La relación de mínimos de elipticidad a 208 *nm* versus 222 *nm* en los espectros de CD de **Bax- α 56** sugiere que este péptido es capaz de dimerizar tanto en membranas zwitteriónicas como aniónicas (**Fig. 3.3**). Por otro lado, se detectan excímeros de **pireno** solo frente a membranas aniónicas (con **CL**). Podría pensarse que ambos resultados son contradictorios. Sin embargo, podemos considerar la posibilidad de que la estructura dimérica de **Bax- α 56** sufre cambios y puede adaptar su modo de su interacción con la bicapa dependiendo de la composición lipídica, lo cual no es descabellado si se tiene en cuenta que la interacción con membranas de **POPC** es mayormente hidrofóbica, mientras que en vesículas compuestas por **POPC:CL** la interacción es de tipo iónico, debido a la presencia de **CL**. Para justificar estos hechos, hipotetizamos dos modelos que explicarían adecuadamente la posible dualidad de formas de interacción respetando la existencia de dímeros del tipo *coiled-coil*. La **Fig. 6.1** muestra una posible interfase de interacción en medio zwitteriónico (**POPC**) con dos posibilidades de ordenamiento correspondientes a hélices paralelas o anti-paralelas.

Hemos podido ver que el reordenamiento en dominios que sufre la estructura lateral

¹ En realidad nuestros datos no distinguen entre dímeros u otras formas de oligomerización, aunque para simplificar esta discusión utilizaremos preferentemente el término dímero.

ricos en CL, y por lo tanto en forma de dímero estabilizado por la cara hidrofóbica.

6.3 Cinéticas de permeabilidad y características individuales de los poros

En trabajos previos de nuestro grupo se había descrito la actividad formadora de poros de Bax- $\alpha 5$, aunque esencialmente a nivel cualitativo. Uno de los objetivos de esta Tesis fue desarrollar una estrategia y metodología de análisis adecuada para extraer propiedades de poros individuales (fundamentalmente su tamaño) a partir de las cinéticas de difusión de marcadores fluorescentes. El modelo matemático utilizado para el ajuste de las cinéticas se basó en la integración de la primera ley de FICK, como en ocasiones anteriores. Sin embargo, en este caso llevamos a cabo un estudio previo del régimen de difusión para determinar la conveniencia del uso de valores de coeficientes de difusión libre a través de los poros. Además, mediante el registro simultáneo de la difusión transmembrana de sondas de distinto tamaño y el ajuste en paralelo de las correspondientes cinéticas pudimos resolver la ambigüedad del análisis que se deriva del hecho de que los poros disminuyen su tamaño desde el momento de su apertura. Como resultado, obtenemos valores del radio de apertura inicial de los poros, del tiempo de relajación de los mismos y de su densidad en la membrana.

Los poros iniciales de Bax- $\alpha 5$ presentan un radio de $5.64 \pm 0.21 \text{ nm}$ (Sec. 4.2.4). Con este tamaño, las moléculas de tamaño medio ($r_h < 1 \text{ nm}$) como marcadores de la serie Alexa, difunden libremente. Sin embargo, moléculas más grandes, como dextranos con más de 10 KDa de masa molecular difunden de manera restringida a través de los poros (más lentamente que en difusión libre). Dicha restricción aumenta con la relajación de los poros, que ocurre en tiempos de $\sim 300 - 1200 \text{ s}$ (Sec. 4.3). Aunque sondas poliméricas con estructura desorganizada, como los dextranos, siguen pudiendo difundir a través de los poros equilibrados, es de esperar que estos poros no permitan el paso de polímeros globulares bien estructurados, como la mayoría de las proteínas, incluido el citocromo *c*. Dado que se ha descrito que los poros de Bax (proteína completa) son también de tipo proteolipídico [32, 107], como los de Bax- $\alpha 5$, estos resultados tienen importancia en cuanto a la comprensión del mecanismo de acción de la propia proteína apoptótica Bax y sugieren que la liberación de citocromo *c* y otros factores apoptóticos mitocondriales ocurre fundamentalmente a través de poros iniciales. No obstante, es de esperar que el radio de los poros formados por Bax sea mayor que el que corresponde al fragmento Bax- $\alpha 5$. Por otro lado, tanto para Bax como para Bak se ha descrito que el tamaño de los poros depende de la relación proteína/lípido presente en las muestras [107]. Sin embargo, esta última conclusión debería contrastarse a través de un estudio cuantitativo del tamaño de los poros, como el descrito aquí.

Otro resultado importante del estudio cuantitativo de la permeabilidad inducida por Bax- $\alpha 5$ es la baja densidad de poros presentes en las membranas y la diversidad de dichos valores de densidad, a unas condiciones dadas (entre 1 y 17 poros por $1000 \mu\text{m}^2$, para P/L= 1/80, Sec. 4.2.4). Sería interesante llevar a cabo una cuantificación similar en el caso de Bax completa, aunque *a priori*, dado que forma poros del mismo tipo que

el fragmento **Bax- α 5**, esperaríamos también una densidad baja de poros. De hecho, las cinéticas descritas en la literatura para el caso de **Bax** son similares a las de **Bax- α 5**, y teniendo en cuenta que los poros de la proteína serían de mayor tamaño que los del péptido cabe esperar que al menos en **GUVs** la densidad de poros de **Bax** es del mismo orden que los valores descritos aquí. Una pregunta interesante es si tal densidad de poros se mantendría en su contexto natural (la mitocondria), aunque en ese caso la mayor complejidad de la composición de la membrana, en cuanto a variabilidad de tipos de lípidos y concentración de proteínas, podrían propiciar densidades de poros mucho mayores.

En cuanto a la alta variabilidad de la densidad de poros en la población de **GUVs**, es posible que esté relacionada con una alta cooperatividad positiva en la unión del péptido, o bien con una variabilidad de composición de las vesículas, probablemente relacionada con el método de electroformación utilizado para su síntesis. De cualquier forma, es poco probable que dicha característica esté presente en el medio natural de actuación de **Bax**, ya que la unión de esta proteína a la membrana mitocondrial se encuentra altamente regulada y sigue pautas muy diferentes a la unión de péptidos a las **GUVs**.

6.4 Remodelado de la membrana

En contextos biológicos el remodelado de membranas tiene lugar en escenarios complejos y está sometido a un alto nivel de regulación. Es por ello que en las células estos procesos requieren de la existencia de conjuntos proteicos, modulados a través de cambios alostéricos y que en ocasiones incluso dependen de la hidrólisis de moléculas rico-energéticas. Sin embargo, eventos de remodelación lipídica como los que se producen a nivel celular se pueden explicar a partir de leyes físicas y pueden ser estudiados mediante la utilización de sistemas simplificados, como el empleado en esta Tesis. Así, desde un punto de vista estrictamente molecular el remodelado lipídico implica la combinación de diversos mecanismos de inducción de curvatura, relacionados con factores que tienen que ver con los lípidos, los péptidos (o proteínas, según los casos) y los principios físicos que rigen la interacción entre ambos.

Los lípidos pueden por si solos dar lugar a diferentes geometrías de membrana, siempre que puedan superar la barrera energética necesaria para ello [331]. Por su parte, los péptidos y/o proteínas posibilitan o potencian la adquisición de geometría lipídica a través de la disminución de la barrera energética correspondiente. Es decir, su efecto puede entenderse como un tipo especial de *catálisis*, cuya eficacia influye de manera directa en las formas que pueden llegar a adoptar las membranas. Los cambios de morfología lipídica originados por la unión de péptidos en membranas ocurren de manera dinámica a partir del momento de interacción entre ambos y pueden observarse de manera directa en vesículas individuales mediante microscopía confocal de fluorescencia. En el **Cap. 5** se ha descrito dicha actividad remodeladora para los péptidos **Bax- α 5**, **Bax- α 56** y **Bak- α 56**. Los péptidos con secuencias de dos hélices, **Bax- α 56** y **Bak- α 56**, presentan una capacidad de remodelación de membranas superior a la de **Bax- α 5**. Ello debe estar relacionado con la estructura y las características físico-químicas de cada caso, como su anfipatici-

dad, su distribución de cargas y su flexibilidad estructural. También tiene importancia la posibilidad de oligomerización de cada péptido, así como la forma tridimensional que asuma el oligómero.

Dada la tendencia de los péptidos que hemos estudiado a formar estructuras helicoidales en medio lipídico (**Sec. 3.2.2**), pueden considerarse de manera simplificada como *barras* alargadas. Sin embargo, los dos péptidos con mayor actividad remodeladora presentan al menos una zona de flexibilidad en su secuencia, lo que facilitaría un *acodamiento* en la estructura de barra. **Bax- α 56** contiene un residuo de **Pro** en la posición 12 de su secuencia (posición 130 en la numeración de la proteína completa). Por su parte en **Bak- α 56** existe la secuencia **-G¹³xxG¹⁶-** (**Tabla 2.1**). Aunque ambos motivos son compatibles con estructura en hélice- α , se encuentran con frecuencia en giros. De hecho, los mismos residuos se sitúan en el giro entre las hélices α 5 y α 6 de sus respectivas proteínas completas. La estabilización de un acodamiento en ese punto estaría además acentuada si las hélices dimerizan y si los acodamientos de las dos hélices del dímero coinciden. En ese caso se generaría una estructura angular o curvada. También puede formarse una estructura dimérica curvada si las dos hélices se cruzan en una estructura de *coiled-coil*, sobre todo si el punto de cruce se encuentra desplazado hacia un lado de la hélice. Por otro lado, la combinación de ambos mecanismos (cruce de hélices desplazadas en un *coiled-coil* y acodamiento) daría lugar a un dímero curvado, que además sería adaptable a través de pequeñas variaciones del ángulo de cruce y del ángulo de acodamiento, lo que otorga una gran capacidad de inducir curvatura lipídica.

Hemos observado que estos péptidos son capaces de remodelar la membrana de las **GUVs** de manera heterogénea (**Sec. 5.4**), induciendo geometrías esféricas (*buds*) o cilíndricas (túbulos). La generación de estas morfologías implica altos grados de curvatura que en principio tienen un origen nanoscópico, dado el tamaño de estos fragmentos. Sin embargo, como hemos señalado, la presencia de dímeros puede ser la clave para curvar la superficie de la membrana. Así lo indica el hecho de que **Bax- α 56** (dímero) manifiesta mucha mayor actividad remodeladora que **Bax- α 5** (monómero). Aunque no hemos investigado la posible oligomerización de **Bak- α 56**, su semejanza con el fragmento homólogo de **Bax** indica que también se encontraría en estado dimérico, en consonancia con su gran actividad de remodelación de membranas. De esta forma la interacción péptido-péptido sería la característica clave que permite mantener una actividad tan compleja como el remodelado de membrana en condiciones minimalistas, a través de pequeños fragmentos de las proteínas **Bax** y **Bak**. Además, nuestros resultados también permiten identificar el dominio responsable de este tipo de actividad en ambas proteínas, que incluiría al menos el fragmento de 27 residuos que identificamos aquí con la denominación α 56 para cada una de las proteínas.

Resulta interesante que este tipo de estructura dimérica que estamos proponiendo se asemeja mucho a la parte correspondiente del dímero *domain-swapping* cuya estructura cristalográfica en presencia de detergente **CHAPS** e inducida por interacción con un dominio **BH3**, se ha resuelto tanto para **Bax** [330] como para **Bak** [332]. Tales estructuras, así como otra similar descrita en el caso de la proteína antiapoptótica **Bcl-xL** [333], han sido catalogadas como no funcionales. Sin embargo, si tenemos en cuenta los resultados de esta Tesis, con arreglo a lo que acabamos de comentar, podría tratarse de intermediarios

estructurales funcionales. Al menos en el caso de **Bax**, este tipo de dímero podría estar relacionado con la generación de curvatura, o bien podría actuar como sensor de zonas curvadas de la membrana mitocondrial, con el papel de facilitar procesos de fisión o fusión.

La actividad de fisión mitocondrial se atribuye casi exclusivamente a la proteína **Drp1**, a pesar de que existen evidencias de que **Bax** y **Drp1** colocalizan en ciertas zonas de la membrana mitocondrial en eventos fisiológicos [144, 145]. En nuestra opinión, la capacidad de remodelación de membranas en presencia de CL, observada especialmente para los péptidos **Bax- α 56** y **Bak- α 56**, sugiere fuertemente que las proteínas respectivas estarían implicadas en eventos de fisión. En este sentido, es importante remarcar que la actividad de remodelado de membrana solo ha sido descrita para la proteína **Bax**, por lo que nuestros resultados suponen la primera evidencia de que tal tipo de actividad es también propia de la proteína **Bak**.

6.5 Perspectiva

En esta Tesis se abordaron aspectos principalmente funcionales relacionados con fragmentos activos mínimos de las proteínas **Bax** y **Bak**. En paralelo, resolvemos problemas metodológicos y experimentales relacionadas con el estudio de la permeabilidad de membrana en estos sistemas. Hemos propuesto la existencia de especies oligoméricas en membranas, muy probablemente dímeros, de un fragmento de **Bax** que contiene parte de las hélices α 5 y α 6. La interacción da lugar a estructuras de tipo *coiled-coil* que al parecer se organizan de forma distinta en función de la composición lipídica, y que en presencia de CL creemos implica una cara de interacción hidrofóbica del tipo cremallera de **Leu**. Pensamos que este tipo de interacción está también presente en la proteína **Bax** completa. De hecho, el modelo que proponemos es muy similar a la asociación de hélices α 5 y α 6 de unidades proteicas distintas en el dímero *domain-swapping* de **Bax**. Además, la curvatura de este dímero de hélices sugiere que estaría implicado en la actividad de remodelado de membrana, tanto del fragmento como de la proteína. Por ello, proponemos que el dímero *domain-swapping* de la proteína tiene sentido funcional. Hemos encontrado también que el péptido **Bak- α 56**, homólogo de **Bax- α 56**, muestra una elevada actividad remodeladora de membranas. Aunque no hemos caracterizado la posibilidad de dimerización de este último, su secuencia permite predecir un tipo de estructura dimérica similar a la de **Bax- α 56**. Dado que se ha descrito un dímero *domain-swapping* de **Bak**, creemos que también en este caso la dimerización a través de las hélices α 5 y α 6 tiene sentido funcional. Es interesante hacer notar que la secuencia de **Bak- α 56** contiene cuatro residuos de **His**, lo que permitiría que su actividad esté regulada por el pH en un rango de valores fisiológicos.

En cuanto a la actividad formadora de poros, el estudio que aporta esta Tesis ha permitido profundizar en el mecanismo de formación, el tamaño y la densidad de los poros formados por **Bax- α 5**. Para ello se diseñó y desarrolló una estrategia de análisis cuantitativo basada en el ajuste fino de cinéticas de difusión a través de los poros y en el análisis estadístico de las velocidades de difusión en una población de vesículas

individuales. Los resultados de este análisis indican que el número de poros por unidad de área y por vesícula es sorprendentemente bajo, lo que implica que solo una pequeña fracción de moléculas de péptido y de lípido se encuentran efectivamente implicadas en estructuras de poro. A su vez, da cuenta de las dificultades intrínsecas para obtener información a cerca de la estructura y propiedades de los poros. En cuanto al tamaño de los mismos, su radio ($5.64 \pm 0.21nm$) es suficiente para permitir una difusión libre de moléculas de tamaño moderado, como los marcadores del tipo **Alexa**. Sin embargo, la difusión de moléculas poliméricas es de tipo restringido y por tanto no es correcto asumir su coeficiente de difusión libre. Nuestra estrategia y método de estudio de poros es exportable a otros sistemas relacionados, incluyendo péptidos antimicrobianos y toxina bacterianas y proteínas apoptóticas.

En definitiva, hemos aportado nuevos e interesantes datos relativos a la actividad de las proteínas apoptóticas **Bax** y **Bak** en membranas a través del estudio de fragmentos de estas proteínas. Queda por ver si los fragmentos son capaces de trasladar las propiedades funcionales observadas en **GUVs** a sistemas más complejos (membranas de mitocondrias aisladas, e incluso en el contexto de la propia célula), lo que abriría nuevas posibilidades de utilizar este tipo de péptidos con capacidades terapéuticas. Al mismo tiempo, nuestros resultados surgieron posibles nuevas implicaciones de las proteínas **Bax** y **Bak** en otros procesos mitocondriales relacionados con la remodelación de membranas que deben ser clarificadas. En este sentido consideramos que hemos abierto una puerta que muestra nuevas funciones de estas proteínas aún no descritas. Esto incluye también la posible relevancia funcional de los dímeros de tipo *domain-swapping*.

En este trabajo no se llevaron a cabo estudios de determinación estructural, lo cual habría sido ideal para establecer un modelo del dímero con base experimental y resolución atómica. De manera similar, la actividad formadora de poros de **Bax- α 56** debe ser caracterizada cuantitativamente, aunque es necesario tener en cuenta que la actividad de remodelación de membrana que acompaña a este caso puede introducir errores en la interpretación cuantitativa. En cuanto a **Bak- α 56**, como vimos en este trabajo, su actividad remodeladora de membranas es alta, por lo que es necesario profundizar en su caracterización funcional y a su vez llevar a cabo una caracterización estructural. Ello permitiría además desvelar los posibles secretos ocultos de otra proteína apoptótica muy importante y pobremente estudiada, como es **Bak**.

6.6 Conclusiones

1. La unión de **Bax- α 56** a membranas lipídicas lleva consigo su plegamiento en estructura α -helicoidal. El contenido de este confórmero depende de la composición lipídica, siendo mayor en presencia de **CL**.
2. **Bax- α 56** dimeriza en el estado unido a la membrana, tanto en vesículas con solo **POPC** como en presencia de **CL**, aunque la estructura de los dímeros es distinta en los dos medios lipídicos. Sin embargo, para **Bax- α 5** no encontramos evidencias de dimerización.

6 Discusión general, perspectiva y conclusiones

3. De acuerdo con la secuencia de **Bax- α 56** proponemos para este péptido una estructura dimérica de tipo *coiled-coil* anti-paralelo, en la que la superficie de interacción enfrenta a residuos de la hélice α 5 con residuos de la hélice α 6. Además, esta superficie de interacción podría cambiar dependiendo de la composición lipídica, implicando residuos hidrofóbicos en presencia de CL e iónicos en vesículas de solo POPC. Dicho modelo de dímero se asemeja a la asociación entre hélices α 5 y α 6 que se observa en estructuras del tipo *domain-swapping*, tanto en el caso de **Bax** como de **Bak**.
4. **Bax- α 5** y **Bax- α 56** tienen la capacidad de modificar la organización lateral de la membrana, dando lugar a la formación y/o coalescencia de dominios gracias a la preferencia de ambos péptidos por zonas Ld de la membrana, las cuales además son ricas en CL.
5. La zona de **Bax** correspondiente al fragmento **Bax- α 56** es suficiente para reproducir la actividad de remodelación *in vitro* observada para la proteína entera en membranas de POPC:CL, incluyendo la inducción de túbulos, *buds* y fisión. Un péptido homólogo a este último procedente de la proteína **Bak** presenta aún mayor capacidad de remodelación de membranas e induce procesos de fusión y fisión. El mecanismo de remodelación podría relacionarse con un fenómeno de inducción de curvatura, del cual sería responsable la estructura dimérica de los péptidos.
6. A partir de las conclusiones anteriores, proponemos que las proteínas **Bax** y **Bak** están implicadas en procesos fisiológicos de dinámica mitocondrial, además de su papel como formadores de poros. Creemos que es posible que tal función ocurra a través de estructuras del tipo *domain-swapping*, como generadoras potenciales de curvatura. Dichas estructuras han sido descritas para ambas proteínas, aunque no se les ha asignado un papel funcional hasta a fecha.
7. **Bax- α 5** forma en GUVs de POPC:CL poros lipo-peptídicos discretos, poco variables en tamaño y con un radio medio inicial de 5.64 ± 0.21 nm. A través de estos poros las sondas de tamaño medio (Alexa, $r_h < 1$ nm) difunden libremente. Los dextranos, sin embargo, difunden de manera restringida aunque menos de lo esperado teniendo en cuenta su radio hidrodinámico, debido a su estructura desordenada y carácter fibrilar.
8. La densidad de poros en la membrana de las GUVs es variable y muy baja (1 - 17 poros por cada $1000 \mu m^2$). La variabilidad parece relacionada con la existencia de distintos grados de asociación de los péptidos con las GUVs, lo que probablemente se debe a una composición lipídica heterogénea en las muestras. La baja densidad de poros sugiere que su número es también muy bajo en otros sistemas relacionados, como los péptidos antimicrobianos y las propias proteínas apoptóticas, probablemente incluso en el medio natural donde estos sistemas ejercen su actividad. Así mismo explica las dificultades en la caracterización estructural de este tipo de poros.

Índice de figuras

1.1	Modelos de membrana biológica.	5
1.2	Estructura química de los principales lípidos encontrados en membranas biológicas.	6
1.3	Composición lipídica de diferentes membranas celulares.	7
1.4	Mecanismos de generación de curvatura en membranas biológicas.	9
1.5	Ejemplos de membranas biológicas con curvatura intrínseca y sus dominios proteicos sensores relacionados.	11
1.6	Polimorfismo lipídico en relación con los distintos tipos de fases posibles en membranas.	14
1.7	Fluidez y permeabilidad en membranas lipídicas dependiendo de su estado de fase.	16
1.8	Tipos de vesículas lipídicas sintéticas.	19
1.9	Modelos del mecanismo de actividad de péptidos antimicrobianos capaces de permeabilizar bicapas lipídicas.	26
1.10	Esquema general de la apoptosis.	28
1.11	Miembros y dominios de homología en la familia de proteínas Bcl-2.	29
1.12	Tipos de poro apoptótico descritos o propuestos en la membrana mitocondrial.	30
1.13	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa.	31
1.14	Dinámica mitocondrial.	32
1.15	Mecanismo de fisión mitocondrial por Drp1.	35
1.16	Modelos de competencia entre la maquinaria de morfogénesis mitocondrial y la progresión de la apoptosis.	37
2.1	Método de extrusión de suspensiones lipídicas.	39
2.2	Equipamiento utilizado en el proceso de electroformación de GUVs.	41
2.3	Diagrama de Jablonski simplificado.	49
2.4	Pireno	51
2.5	Espectros de CD característicos de proteínas.	54
2.6	Principio de microscopia confocal de fluorescencia.	56
2.7	Representación esquemática del método de estudio de la permeabilización de GUVs individuales mediante microscopia confocal de fluorescencia.	57
2.8	Esquema general del estudio de la difusión a través de la membrana de una vesícula lipídica	63
3.1	Modelos estructurales de Bax- $\alpha 5$ y Bax- $\alpha 56$	70
3.2	Espectros de CD de Bax- $\alpha 56$ en disolución acuosa y en ambiente micelar.	73

3.3	Espectros de CD de Bax- α 5 y Bax- α 56 en membranas.	74
3.4	Estructura y propiedades espectroscópicas de la sonda lipídica NBD-PE.	78
3.5	Auto-desactivación de la fluorescencia de NBD-PE en presencia Bax- α 5 o Bax- α 56.	79
3.6	Observación de la unión de los péptidos a membranas a través de la fluorescencia intrínseca del Trp.	81
3.7	Transferencia de energía fluorescente en el par Trp-NBD para el caso de de Bax- α 5.	82
3.8	Péptidos marcados con pireno en ambiente micelar.	85
3.9	Monitorización temporal de la formación de excímeros de pireno de Bax- α 5 ^{CpyS} y Bax- α 56 ^{Pyl} en ambiente lipídico.	86
3.10	Monitorización temporal de la formación de excímeros de pireno de Bax- α 5 ^{CpyS} y Bax- α 56 ^{Pyl} en membranas con CL.	87
4.1	Entrada simultanea de dos marcadores fluorescentes de distinto tamaño en GUVs, en presencia de Bax- α 5.	92
4.2	Cinéticas de entrada simultanea de sondas fluorescentes de distinto tamaño a GUVs individuales en en presencia de Bax- α 5.	94
4.3	Ajuste teórico de las cinéticas de entrada de marcador fluorescente en GUVs individuales en presencia de Bax- α 5.	96
4.4	Distribuciones de valores kV para la entrada de distintas sondas en GUVs individuales en presencia de Bax- α 5.	98
4.5	Correlación de constantes de velocidad de entrada (valores k_s^pV) en presencia de Bax- α 5 para sondas de distinto tamaño medidas simultáneamente en las mismas GUVs.	100
4.6	Fracción de velocidades de dos sondas de distinto tamaño y entrada simultanea frente a la velocidad correspondiente a cualquiera de ellas.	102
4.7	Distribuciones del área total permeable en la población de GUVs estudiadas.	103
4.8	Análisis de <i>clusters</i> en la distribución de A_p	104
4.9	Propiedades de poros individuales.	104
4.10	Distribución del número de poros por GUV y su correlación con el área de la membrana.	106
4.11	GUVs en presencia de Bax- α 5 marcado fluorescentemente.	108
4.12	Re-entrada de marcadores fluorescentes en GUVs que han sufrido una permeabilización previa en presencia de Bax- α 5.	113
5.1	Microscopia confocal de GUVs con CL en su membrana, en ausencia de péptidos.	118
5.2	Segregación de fases en la membranas por acción de fragmentos de Bax.	122
5.3	Preferencia de Bax- α 56 por fases Ld.	124
5.4	Cambios en la morfología de las GUVs en presencia de Bax- α 5 a distintas concentraciones.	125
5.5	Efectos de Bak- α 56 en vesículas de POPC:CL.	128

5.6	Ejemplos de cambios morfológicos inducidos por Bak- α 56 en GUVs de POPC:CL.	129
5.7	Ejemplos de tubulaciones en GUVs de POPC:CL inducidas por Bax- α 56.	133
5.8	Proceso de <i>budding</i> exterior e interior en GUVs de composición binaria bajo la acción de Bax- α 56.	135
5.9	Comparación de los efectos de la proteína Bax y el péptido Bax- α 56 sobre la membrana de las GUVs.	142
6.1	Estructuras de rueda helicoidal dimérica de Bax- α 56 en presencia de LUVs compuestas por POPC.	147
6.2	Estructuras de rueda helicoidal dimérica de Bax- α 56 en LUVs con CL.	148

Índice de tablas

2.1	Péptidos utilizados en esta Tesis.	44
2.2	Datos espectroscópicos de péptidos y sondas de marcaje.	47
2.3	Efecto teórico esperado en régimen de difusión restringida	67
3.1	Secuencia y propiedades físico-químicas de Bax- α 5 y Bax- α 56.	70
3.2	Estructura secundaria de Bax- α 5 a partir del análisis de espectros de CD.	75
3.3	Estructura secundaria de Bax- α 56 a partir del análisis de espectros de CD.	76
4.1	Sondas utilizadas en medidas de permeabilidad de GUVs, con su masa molecular, coeficiente de difusión y radio hidrodinámico.	93
5.1	Cuadro resumen de cambios morfológicos y eventos de remodelado lipídico inducidos por los péptidos para las dos composiciones lipídicas estudiadas.	130

Índice de abreviaturas

- AFM, microscopia de fuerza atómica, **24**
- Alexa488, Alexa fluor 488 C2
maleimida, **47**
- Alexa555, Alexa fluor 555 C2
maleimida, **47**
- AMP, péptidos antimicrobianos, **21**
- Bak, Proteína *killer* antagonista de
Bcl-2, **3**
- Bak- α 56, fragmento mínimo de Bak que
contiene secuencias de las
hélices α 5 y α 6, **36**
- Bax, proteína X (o proteína 4) de la
familia Bcl-2, **3**
- Bax- α 5, fragmento mínimo de Bax que
contiene únicamente la
secuencia de la hélice α 5, **36**
- Bax- α 56, fragmento mínimo de Bax que
contiene secuencias de las
hélices α 5 y α 6, **36**
- Bcl-2, B-cell linfoma 2, **3**
- Bcl-xL, B-cell linfoma *extra large*, **31**
- BH, dominio de homología con Bcl-2, **27**
- Bid, proteína de muerte con dominio de
interacción de tipo BH3, (o
BH3-only). τ -Bid es la versión
activada de Bid por corte
proteolítico., **29**
- BSA, albúmina de suero bovino, **41**
- CD, dicroísmo circular, **53**
- Chol, colesterol, **7**
- CL, cardiolipina, **7**
- DCM, diclorometano, **42**
- DiD (DiD C18 (3)): 3H-Indolium,
2-(5-(1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-
octadecil-2H-indol-2-ilideno)-
1,3-pentadienil)-3,3-dimetil-1-
octadecil-, perclorato,
41
- DIEA, N,N-Diisopropil-etil-amina, **42**
- DiI (DiI C18 (3)): 3H-Indolium,
2-[3-(1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-
octadecil-2H-indol-2-ilideno)-1-
propenil]-3,3-dimetil-1-
octadecil-, perclorato,
41
- DiO (DiO C18 (3)): Benzoxazolium,
3-octadecil-2-[3-(3-octadecil-
2(3H)-benzoxazolilideno)-1-
propenil]-, perclorato,
41
- DISC, complejo de señalización inductor
de muerte, **27**
- DLS, dispersión dinámica de la luz, **40**
- DMF, N,N-Dimetilformamida, **48**
- DOL, grado de marcaje, **48**
- DOPE, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-
fosfoetanolamina,
12
- Drp1, proteína similar a la dinamina de
tipo 1, **34**
- FCS, *Fluorescence correlation
spectroscopy*, **49**
- FD10, FD20 o FD40, dextranos
conjugados con fluoresceína o
rodamina B de 10, 20 o 40
KDa, **58**

Índice de abreviaturas

- Fis1, fisión mitocondrial 1, **33**
FRAP, *Fluorescence recovery after photobleaching*, **49**
FRET, transferencia de energía de fluorescencia por resonancia, **82**
- GSL, glicosfingolípidos, **7**
GUV, vesícula unilamelar gigante, **19**
- H, hidrofobicidad, **21**
HBTU, N,N,N,N-Tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il) uronium hexafluorofosfato, **42**
HEPES, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico, **46**
HFIP, 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol, **45**
HI, fase hexagonal normal, **15**
HII, fase hexagonal invertida, **14**
HOBT, 1-Hidroxibenzotriazol hidrato, **42**
HPLC, cromatografía líquida de alta presión, **43**
- I, fuerza iónica, **117**
ImageJ, *Image Processing and Analysis in Java*, **59**
- L α , fase fluida, **15**
L β (o Lc) fase *crystalina* o fase gel, **15**
L β' , fase sólida ordenada, **16**
Ld, fase líquida desordenada, **16**
Lo, fase líquida ordenada, **16**
LSCM, Microscopía confocal láser de barrido, **55**
LUV, vesícula unilamelar grande, **19**
- MEF1, factor de elongación mitocondrial 1, **34**
Mff, factor de fisión mitocondrial, **33**
Mfn2, mitofusina 2, **35**
MLV, vesícula lipídica multilamelar, **40**
MME, membrana mitocondrial externa, **30**
- MMI, membrana mitocondrial interna, **30**
MRE[θ], elipticidad media por residuo, **53**
 μH , momento hidrofóbico, **21**
- NBD, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il, **69**
NBD-PE, 1,2-dioleil-sn-3-glicerofosfoetanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il), **41**
NBD-PE, N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina, **78**
NMP, N-metil 2-pirrolidona, **43**
OMV, vesícula de membrana mitocondrial externa, **31**
- P/L, relación molar péptido/lípido, **52**
PA, fosfatídico, **7**
PB, tampón fosfato, pH 7.4, **40**
PBS, tampón fosfato salino (PB 10 mM con NaCl 137 mM), **40**
PC, fosfatidilcolina, **7**
PE, fosfatidiletanolamina, **7**
PG, fosfatidilglicerol, **12**
PI, fosfatidilinositol, **7**
Pireno, N-(1-Pirenil)-maleimida, **47**
POPC, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina, **40**
POPG, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilglicerol, **40**
PPC, péptidos de penetración celular, **21**
PS, fosfatidilserina, **7**
py, pireno, **44**
- QI, fase cúbica normal, **17**
QII, fase cúbica invertida, **15**
- RET, *Resonance energy transfer*, **49**

RMN, resonancia magnética nuclear, 53

SDS, dodecil-sulfato sódico, 72

SM, esfingomielina, 7

SUV, vesícula unilamelar pequeña, 19

T_c , temperatura de transición entre
fases, 16

TCEP, tris[2-carboxi-etil] fosfina
clorhidrato, 46

TFA, ácido trifluoroacético, 42

TMC, contacto trans-monocapa, 141

TMCL: 1,2,-1,2 -
tetramiristoilcardiolipina,
117

z , carga neta, 21

Índice de abreviaturas

Bibliografía

- [1] García-Sáez, A. J., M. Coraiola, M. Dalla Serra, I. Mingarro, G. Menestrina, and J. Salgado, 2005. Peptides derived from apoptotic Bax and Bid reproduce the poration activity of the parent full-length proteins. *Biophys J* 88:3976–3990.
- [2] Guillemin, Y., J. Lopez, D. Gimenez, G. Fuertes, J. G. Valero, L. Blum, P. Gonzalo, J. Salgado, A. Girard-Egrot, and A. Aouacheria, 2010. Active fragments from pro- and antiapoptotic BCL-2 proteins have distinct membrane behavior reflecting their functional divergence. *Plos One* 5:e9066.
- [3] Valero, J. G., L. Sancey, J. Kucharczak, Y. Guillemin, D. Gimenez, J. Prudent, G. Gillet, J. Salgado, J.-L. Coll, and A. Aouacheria, 2011. Bax-derived membrane-active peptides act as potent and direct inducers of apoptosis in cancer cells. *J Cell Sci* 124:556–564.
- [4] Aouacheria, A., 2010. Molecules capable of inducing cell death by targeting the mitochondria and applications thereof. US Patent App. 13/394,941.
- [5] Israelachvili, J. N., S. Marčelja, and R. G. Horn, 1980. Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys* 13:121–200.
- [6] Day, C. A., and A. K. Kenworthy, 2009. Tracking microdomain dynamics in cell membranes. *BBA-Biomembranes* 1788:245–253.
- [7] Yeagle, P. L., 2016. Chapter 7 - Structures of Lipid Assemblies. *In* The Membranes of Cells (Third Edition), Academic Press, Boston, 115–154.
- [8] Lee, M.-T., W.-C. Hung, F.-Y. Chen, and H. W. Huang, 2005. Many-Body Effect of Antimicrobial Peptides: On the Correlation Between Lipid's Spontaneous Curvature and Pore Formation. *Biophys J* 89:4006–4016.
- [9] Andersen, O. S., and I. Roger E. Koeppe, 2007. Bilayer Thickness and Membrane Protein Function: An Energetic Perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36:107–130.
- [10] van Meer, G., D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124.
- [11] Singer, S. J., and G. L. Nicolson, 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.

Bibliografía

- [12] Engelman, D. M., 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438:578–580.
- [13] Danielli, J. F., and H. Davson, 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Physiol* 5:495–508.
- [14] Kusumi, A., T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, and K. G. N. Suzuki, 2012. Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson’s Fluid-Mosaic Model. *Annu Rev Cell Dev Bi* 28:215–250.
- [15] Grecco, H. E., M. Schmick, and P. I. H. Bastiaens, 2011. Signaling from the Living Plasma Membrane. *Cell* 144:897–909.
- [16] De Marothy, M. T., and A. Elofsson, 2015. Marginally hydrophobic transmembrane -helices shaping membrane protein folding. *Protein Sci* 24:1057–1074.
- [17] Malinsky, J., M. Opekarová, G. Grossmann, and W. Tanner, 2013. Membrane Microdomains, Rafts, and Detergent-Resistant Membranes in Plants and Fungi. *Annu Rev Plant Biol* 64:501–529.
- [18] Goñi, F. M., 2014. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *BBA-Biomembranes* 1838:1467–1476.
- [19] Sezgin, E., T. Gutmann, T. Buhl, R. Dirkx, M. Grzybek, . Coskun, M. Solimena, K. Simons, I. Levental, and P. Schwille, 2015. Adaptive Lipid Packing and Bioactivity in Membrane Domains. *Plos One* 10:e0123930.
- [20] Denning, E. J., and O. Beckstein, 2013. Influence of lipids on protein-mediated transmembrane transport. *Chem Phys Lipids* 169:57–71.
- [21] Van Meer, G., D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124.
- [22] Epand, R. M., 2007. Membrane lipid polymorphism: relationship to bilayer properties and protein function. *Methods Mol Biol* 400:15–26.
- [23] Mouritsen, O. G., and K. Jørgensen, 1994. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids* 73:3–25.
- [24] Epand, R. M., K. D’Souza, B. Berno, and M. Schlame, 2015. Membrane curvature modulation of protein activity determined by NMR. *BBA-Biomembranes* 1848:220–228.
- [25] Haney, E. F., S. Nathoo, H. J. Vogel, and E. J. Prenner, 2010. Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chem Phys Lipids* 163:82–93.

- [26] Chang-Ileto, B., S. G. Frere, R. B. Chan, S. V. Voronov, A. Roux, and G. Di Paolo, 2011. Synaptojanin 1-Mediated PI(4,5)P₂ Hydrolysis Is Modulated by Membrane Curvature and Facilitates Membrane Fission. *Dev Cell* 20:206–218.
- [27] McMahon, H. T., and E. Boucrot, 2015. Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci* 128:1065–1070.
- [28] Bigay, J., J.-F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, and B. Antonny, 2005. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J* 24:2244–2253.
- [29] Jiko, C., K. M. Davies, K. Shinzawa-Itoh, K. Tani, S. Maeda, D. J. Mills, T. Tsukihara, Y. Fujiyoshi, W. Kühlbrandt, and C. Gerle, 2015. Bovine F1Fo ATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. *eLife* 4:e06119.
- [30] Arumugam, S., and P. Bassereau, 2015. Membrane nanodomains: contribution of curvature and interaction with proteins and cytoskeleton. *Essays Biochem* 57:109–119.
- [31] Koller, D., and K. Lohner, 2014. The role of spontaneous lipid curvature in the interaction of interfacially active peptides with membranes. *BBA-Biomembranes* 1838:2250–2259.
- [32] Terrones, O., B. Antonsson, H. Yamaguchi, H.-G. Wang, J. Liu, R. M. Lee, A. Herrmann, and G. Basañez, 2004. Lipidic Pore Formation by the Concerted Action of Proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem* 279:30081–30091.
- [33] Sobko, A. A., E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, S. D. Zakharov, and W. A. Cramer, 2004. Effect of lipids with different spontaneous curvature on the channel activity of colicin E1: evidence in favor of a toroidal pore. *FEBS Lett* 576:205–210.
- [34] García-Sáez, A. J., M. Coraiola, M. D. Serra, I. Mingarro, P. Müller, and J. Salgado, 2006. Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS J* 273:971–981.
- [35] 2017. Physics LibreTexts, UC Davis ChemWiki, chapter Membrane Curvature.
- [36] E.V. Shikin (originator), 2011. Encyclopedia of Mathematics, chapter Principal curvature.
- [37] Zimmerberg, J., and M. M. Kozlov, 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:9–19.
- [38] de Kruijff, B., 1997. Lipids beyond the bilayer. *Nature* 386:129–130.
- [39] Simunovic, M., G. A. Voth, A. Callan-Jones, and P. Bassereau, 2015. When physics takes over: BAR proteins and membrane curvature. *Trends Cell Biol* 25:780–792.

Bibliografía

- [40] Frolov, V. A., A. V. Shnyrova, and J. Zimmerberg, 2011. Lipid Polymorphisms and Membrane Shape. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- [41] Tyler, A. I. L., G. C. Shearman, N. J. Brooks, H. Delacroix, R. V. Law, R. H. Templar, O. Ces, and J. M. Seddon, 2011. Hydrostatic pressure effects on a hydrated lipid inverse micellar Fd3m cubic phase. *Phys Chem Chem Phys* 13:3033–3038.
- [42] Kaiser, H.-J., D. Lingwood, I. Levental, J. L. Sampaio, L. Kalvodova, L. Rajendran, and K. Simons, 2009. Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16645–16650.
- [43] Shimshick, E. J., and H. M. McConnell, 1973. Lateral phase separation in phospholipid membranes. *Biochemistry* 12:2351–2360.
- [44] Stöckl, M., A. P. Plazzo, T. Korte, and A. Herrmann, 2008. Detection of Lipid Domains in Model and Cell Membranes by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy of Fluorescent Lipid Analogues. *J Biol Chem* 283:30828–30837.
- [45] Kulkarni, C. V., 2011. Nanostructural Studies on Monoelaidin–Water Systems at Low Temperatures. *Langmuir* 27:11790–11800.
- [46] Mouritsen, O. G., 2011. Model Answers to Lipid Membrane Questions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004622.
- [47] Stenberg, F., P. Chovanec, S. L. Maslen, C. V. Robinson, L. L. Ilag, G. von Heijne, and D. O. Daley, 2005. Protein complexes of the Escherichia coli cell envelope. *J Biol Chem* 280:34409–34419.
- [48] Heberle, F. A., and G. W. Feigenson, 2011. Phase Separation in Lipid Membranes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- [49] Monteiro, N., A. Martins, R. L. Reis, and N. M. Neves, 2014. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface* 11:20140459.
- [50] Luzzati, V., 1997. Biological significance of lipid polymorphism: the cubic phases. *Curr Opin Struc Biol* 7:661–668.
- [51] Hickel, A., S. Danner-Pongratz, H. Amenitsch, G. Degovics, M. Rappolt, K. Lohner, and G. Pabst, 2008. Influence of antimicrobial peptides on the formation of nonlamellar lipid mesophases. *BBA-Biomembranes* 1778:2325–2333.
- [52] Tenchov, B. G., R. C. MacDonald, and B. R. Lentz, 2013. Fusion peptides promote formation of bilayer cubic phases in lipid dispersions. An x-ray diffraction study. *Biophys J* 104:1029–1037.
- [53] Koynova, R., and B. Tenchov, 2013. Transitions between lamellar and non-lamellar phases in membrane lipids and their physiological roles. *OA Biochemistry* 1:1–9.

- [54] Giorgione, J. R., Z. Huang, and R. M. Epanand, 1998. Increased Activation of Protein Kinase C with Cubic Phase Lipid Compared with Liposomes. *Biochemistry* 37:2384–2392.
- [55] Gri, G., B. Molon, S. Manes, T. Pozzan, and A. Viola, 2004. The inner side of T cell lipid rafts. *Immunol Lett* 94:247–252.
- [56] Celli, A., and E. Gratton, 2010. Dynamics of lipid domain formation: Fluctuation analysis. *Biochim Biophys Acta* 1798:1368–1376.
- [57] McCarthy, N. L. C., O. Ces, R. V. Law, J. M. Seddon, and N. J. Brooks, 2015. Separation of liquid domains in model membranes induced with high hydrostatic pressure. *Chem Commun* 51:8675–8678.
- [58] van Swaay, D., et al., 2013. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab on a Chip* 13:752–767.
- [59] Ackerman, D. G., and G. W. Feigenson, 2015. Lipid Bilayers: Clusters, Domains and Phases. *Essays Biochem* 57:33–42.
- [60] Hermann, E., J. Ries, and A. J. García-Sáez, 2015. Scanning fluorescence correlation spectroscopy on biomembranes. *Methods Mol Biol* 1232:181–197.
- [61] García-Sáez, A. J., J. Ries, M. Orzáez, E. Pérez-Payà, and P. Schwillle, 2009. Membrane promotes tBID interaction with BCL(XL). *Nat Struct Mol Biol* 16:1178–1185.
- [62] Dimitrov, D., and M. Angelova, 1988. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. *Bioelectrochem Bioenerg* 19:323–336.
- [63] Méléard, P., L. A. Bagatolli, and T. Pott, 2009. Giant unilamellar vesicle electroformation from lipid mixtures to native membranes under physiological conditions. *Methods Enzymol* 465:161–176.
- [64] Fuertes, G., 2011. Bax 5 at lipid membranes: Structure, assembly and pore formation. Ph.D. thesis, University of Valencia.
- [65] Tanaka, T., Y. Tamba, S. M. Masum, Y. Yamashita, and M. Yamazaki, 2002. La(3+) and Gd(3+) induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1564:173–182.
- [66] Tamba, Y., H. Terashima, and M. Yamazaki, 2011. A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles. *Chem Phys Lipids* 164:351–358.
- [67] Montes, L.-R., A. Alonso, F. M. Goni, and L. A. Bagatolli, 2007. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. *Biophys J* 93:3548–3554.

Bibliografía

- [68] Chan, Y.-H. M., and S. G. Boxer, 2007. Model membrane systems and their applications. *Curr Opin Chem Biol* 11:581–587.
- [69] Dong, N., X. Zhu, S. Chou, A. Shan, W. Li, and J. Jiang, 2014. Antimicrobial potency and selectivity of simplified symmetric-end peptides. *Biomaterials* 35:8028–8039.
- [70] Sun, Y., T.-L. Sun, and H. W. Huang, 2016. Mode of Action of Antimicrobial Peptides on E. coli Spheroplasts. *Biophys J* 111:132–139.
- [71] Last, N. B., D. E. Schlamadinger, and A. D. Miranker, 2013. A common landscape for membrane-active peptides. *Protein Sci* 22:870–882.
- [72] Mäler, L., 2013. Solution NMR studies of cell-penetrating peptides in model membrane systems. *Adv Drug Deliver Rev* 65:1002–1011.
- [73] Terwilliger, T. C., 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* 299:371–374.
- [74] Drin, G., and B. Antonny, 2010. Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett* 584:1840–1847.
- [75] Teixeira, V., M. J. Feio, and M. Bastos, 2012. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res* 51:149–177.
- [76] Wieprecht, T., M. Dathe, E. Krause, M. Beyermann, W. Maloy, D. L. MacDonald, and M. Bienert, 1997. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Lett* 417:135–140.
- [77] Dathe, M., T. Wieprecht, H. Nikolenko, L. Handel, W. L. Maloy, D. L. MacDonald, M. Beyermann, and M. Bienert, 1997. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett* 403:208–212.
- [78] Yin, L. M., M. A. Edwards, J. Li, C. M. Yip, and C. M. Deber, 2012. Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions. *J Biol Chem* 287:7738–7745.
- [79] Seelig, J., 2004. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *BBA-Biomembranes* 1666:40–50.
- [80] Grau-Campistany, A., E. Strandberg, P. Wadhvani, F. Rabanal, and A. S. Ulrich, 2016. Extending the Hydrophobic Mismatch Concept to Amphiphilic Membranolytic Peptides. *J Phys Chem Lett* 7:1116–1120.
- [81] Lee, M.-T., W.-C. Hung, F.-Y. Chen, and H. W. Huang, 2008. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5087–5092.

- [82] Schmidt, N. W., A. Mishra, G. H. Lai, M. Davis, L. K. Sanders, D. Tran, A. Garcia, K. P. Tai, P. B. McCray Jr, A. J. Ouellette, et al., 2011. Criterion for amino acid composition of defensins and antimicrobial peptides based on geometry of membrane destabilization. *J Am Chem Soc* 133:6720–6727.
- [83] Sani, M.-A., and F. Separovic, 2016. How Membrane-Active Peptides Get into Lipid Membranes. *Acc Chem Res* 49:1130–1138.
- [84] Huang, H. W., 2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochim Biophys Acta* 1758:1292–1302.
- [85] Li, Z.-l., H.-m. Ding, and Y.-q. Ma, 2016. Interaction of peptides with cell membranes: insights from molecular modeling. *J Phys: Condens Matter* 28:083001.
- [86] Heimburg, T., 2010. Lipid ion channels. *Biophys Chem* 150:2–22.
- [87] Fuertes, G., D. Giménez, S. Esteban-Martín, O. L. Sánchez-Muñoz, and J. Salgado, 2011. A lipocentric view of peptide-induced pores. *Eur Biophys J* 40:399–415.
- [88] Giménez, D., O. L. Sánchez-Muñoz, and J. Salgado, 2015. Direct observation of nanometer-scale pores of melittin in supported lipid monolayers. *Langmuir* 31:3146–3158.
- [89] Lee, M.-T., T.-L. Sun, W.-C. Hung, and H. W. Huang, 2013. Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:14243–14248.
- [90] Ehrenstein, G., and H. Lecar, 1977. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* 10:1–34.
- [91] Shai, Y., 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *BBA-Biomembranes* 1462:55–70.
- [92] Shai, Y., 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by β -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *BBA-Biomembranes* 1462:55–70.
- [93] Allende, D., S. A. Simon, and T. J. McIntosh, 2005. Melittin-Induced Bilayer Leakage Depends on Lipid Material Properties: Evidence for Toroidal Pores. *Biophys J* 88:1828–1837.
- [94] Gottler, L. M., and A. Ramamoorthy, 2009. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan—a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *BBA-Biomembranes* 1788:1680–1686.
- [95] Salditt, T., C. Li, and A. Spaar, 2006. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. *BBA-Biomembranes* 1758:1483–1498.

Bibliografía

- [96] Lalier, L., P.-F. Cartron, P. Juin, S. Nedelkina, S. Manon, B. Bechinger, and F. M. Vallette, 2007. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 12:887–896.
- [97] Basañez, G., L. Soane, and J. M. Hardwick, 2012. A New View of the Lethal Apoptotic Pore. *PLOS Biol* 10:e1001399.
- [98] Renault, T., and J. Chipuk, 2014. Death upon a Kiss: Mitochondrial Outer Membrane Composition and Organelle Communication Govern Sensitivity to BAK/BAX-Dependent Apoptosis. *Chem Biol* 21:114–123.
- [99] Bai, L., and S. Wang, 2014. Targeting Apoptosis Pathways for New Cancer Therapeutics. *Annu Rev Med* 65:139–155.
- [100] Xu, Y. Z., C. Kanagaratham, M. Youssef, and D. Radzioch, 2016. New frontiers in cancer chemotherapy—targeting cell death pathways. In *Cell Biology-New Insights*, InTech.
- [101] Engel, T., and D. C. Henshall, 2009. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 1:97–115.
- [102] Chipuk, J. E., and D. R. Green, 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology* 18:157–164.
- [103] Cory, S., D. C. S. Huang, and J. M. Adams, 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22:8590–8607.
- [104] Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, and D. R. Green, 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13:1396–1402.
- [105] Youle, R. J., and A. Strasser, 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47–59.
- [106] Yan, N., and Y. Shi, 2005. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Bi* 21:35–56.
- [107] Bleicken, S., O. Landeta, A. Landajueta, G. Basañez, and A. J. García-Sáez, 2013. Proapoptotic Bax and Bak proteins form stable protein-permeable pores of tunable size. *J Biol Chem* 288:33241–33252.
- [108] García-Sáez, A. J., M. Coraiola, M. D. Serra, I. Mingarro, P. Müller, and J. Salgado, 2006. Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS Journal* 273:971–981.
- [109] McBride, H. M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, 2006. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr Biol* 16:R551–R560.

- [110] Seddon, J. M., 1990. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *BBA-Rev Biomembranes* 1031:1–69.
- [111] Stepanyants, N., P. J. Macdonald, C. A. Franczy, J. A. Mears, X. Qi, and R. Ramachandran, 2015. Cardiolipin’s propensity for phase transition and its reorganization by dynamin-related protein 1 form a basis for mitochondrial membrane fission. *Mol Biol Cell* 26:3104–3116.
- [112] de Kruijff, B., and P. R. Cullis, 1980. Cytochrome c specifically induces non-bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes. *BBA-Biomembranes* 602:477–490.
- [113] Chernomordik, L. V., and M. M. Kozlov, 2008. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:675–683.
- [114] Doan, T., J. Coleman, K. A. Marquis, A. J. Meeske, B. M. Burton, E. Karatekin, and D. Z. Rudner, 2013. FisB mediates membrane fission during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 27:322–334.
- [115] Raemy, E., S. Montessuit, S. Pierredon, A. van Kampen, F. Vaz, and J. Martinou, 2016. Cardiolipin or MTCH2 can serve as tBID receptors during apoptosis. *Cell Death Differ* .
- [116] DeVay, R. M., L. Dominguez-Ramirez, L. L. Lackner, S. Hoppins, H. Stahlberg, and J. Nunnari, 2009. Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol* 186:793–803.
- [117] Bergstrom, C. L., P. A. Beales, Y. Lv, T. K. Vanderlick, and J. T. Groves, 2013. Cytochrome c causes pore formation in cardiolipin-containing membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:6269–6274.
- [118] Gogvadze, V., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, 2006. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *BBA-Bioenergetics* 1757:639–647.
- [119] Bleicken, S., G. Jeschke, C. Stegmüller, R. Salvador-Gallego, A. J. García-Sáez, and E. Bordignon, 2014. Structural model of active Bax at the membrane. *Mol Cell* 56:496–505.
- [120] Lewis, M. R., and W. H. Lewis, 1915. Mitochondria (and other cytoplasmic structures) in tissue cultures. *Dev Dyn* 17:339–401.
- [121] Frank, S., B. Gaume, E. S. Bergmann-Leitner, W. W. Leitner, E. G. Robert, F. Catez, C. L. Smith, and R. J. Youle, 2001. The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Dev Cell* 1:515–525.
- [122] Westermann, B., 2002. Merging mitochondria matters. *EMBO Rep* 3:527–531.
- [123] Newmeyer, D. D., and S. Ferguson-Miller, 2003. Mitochondria: Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death. *Cell* 112:481–490.

Bibliografía

- [124] Grumati, P., L. Coletto, P. Sabatelli, M. Cescon, A. Angelin, E. Bertaglia, B. Blaauw, A. Urciuolo, T. Tiepolo, L. Merlini, N. M. Maraldi, P. Bernardi, M. Sandri, and P. Bonaldo, 2010. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med* 16:1313–1320.
- [125] Youle, R. J., and A. M. v. d. Blik, 2012. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* 337:1062–1065.
- [126] Kozlov, M. M., and L. V. Chernomordik, 2015. Membrane tension and membrane fusion. *Curr Opin Struct Biol* 33:61–67.
- [127] Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser, and J. M. Adams, 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:49–63.
- [128] Shamas-Din, A., J. Kale, B. Leber, and D. W. Andrews, 2013. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 5:a008714.
- [129] Autret, A., and S. J. Martin, 2010. Bcl-2 family proteins and mitochondrial fission/fusion dynamics. *Cell Mol Life Sci* 67:1599–1606.
- [130] Edlich, F., and J.-C. Martinou, 2016. Bcl-2 Protein Interplay on the Outer Mitochondrial Membrane. In *Mitochondria and Cell Death*, Springer, 69–83.
- [131] D’Orsi, B., J. Mateyka, and J. H. Prehn, 2017. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int* .
- [132] Markvoort, A. J., A. F. Smeijers, K. Pieterse, R. A. van Santen, and P. A. J. Hilbers, 2007. Lipid-Based Mechanisms for Vesicle Fission. *J Phys Chem B* 111:5719–5725.
- [133] Döbereiner, H. G., J. Käs, D. Noppl, I. Sprenger, and E. Sackmann, 1993. Budding and fission of vesicles. *Biophys J* 65:1396–1403.
- [134] Youle, R. J., and M. Karbowski, 2005. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:657–663.
- [135] Ugarte-Uribe, B., and A. J. García-Sáez, 2014. Membranes in motion: mitochondrial dynamics and their role in apoptosis. *Biol Chem* 395.
- [136] Chan, D. C., 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:79–99.
- [137] Zhang, Z., L. Liu, S. Wu, and D. Xing, 2016. Drp1, Mff, Fis1, and MiD51 are coordinated to mediate mitochondrial fission during UV irradiation-induced apoptosis. *FASEB J* 30:466–476.

- [138] Hoppins, S., L. Lackner, and J. Nunnari, 2007. The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:751–780.
- [139] Otera, H., C. Wang, M. M. Cleland, K. Setoguchi, S. Yokota, R. J. Youle, and K. Mihara, 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191:1141–1158.
- [140] Blik, A. M. v. d., Q. Shen, and S. Kawajiri, 2013. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a011072.
- [141] Frolov, V. A., A. Escalada, S. A. Akimov, and A. V. Shnyrova, 2015. Geometry of membrane fission. *Chem Phys Lipids* 185:129–140.
- [142] Oh, P., D. P. McIntosh, and J. E. Schnitzer, 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141:101–114.
- [143] Bleicken, S., G. Hofhaus, B. Ugarte-Urbe, R. Schröder, and A. J. García-Sáez, 2016. cBid, Bax and Bcl-xL exhibit opposite membrane remodeling activities. *Cell Death Dis* 7:e2121.
- [144] Wang, P., P. Wang, B. Liu, J. Zhao, Q. Pang, S. G. Agrawal, L. Jia, and F.-T. Liu, 2015. Dynamin-related protein Drp1 is required for Bax translocation to mitochondria in response to irradiation-induced apoptosis. *Oncotarget* 6:22598.
- [145] Karbowski, M., Y.-J. Lee, B. Gaume, S.-Y. Jeong, S. Frank, A. Nechushtan, A. Santel, M. Fuller, C. L. Smith, and R. J. Youle, 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159:931–938.
- [146] Roux, A., D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, and B. Goud, 2005. Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO J* 24:1537–1545.
- [147] Montessuit, S., S. P. Somasekharan, O. Terrones, S. Lucken-Ardjomande, S. Herzig, R. Schwarzenbacher, D. J. Manstein, E. Bossy-Wetzl, G. Basañez, P. Meda, and J.-C. Martinou, 2010. Membrane Remodeling Induced by the Dynamin-Related Protein Drp1 Stimulates Bax Oligomerization. *Cell* 142:889–901.
- [148] Sheridan, C., P. Delivani, S. P. Cullen, and S. J. Martin, 2008. Bax- or Bak-Induced Mitochondrial Fission Can Be Uncoupled from Cytochrome c Release. *Molecular Cell* 31:570–585.
- [149] Gautier, R., D. Douguet, B. Antonny, and G. Drin, 2008. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics* 24:2101–2102.

Bibliografia

- [150] Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch, 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Springer.
- [151] Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- [152] Grintsevich, E. E., M. Phillips, D. Pavlov, M. Phan, E. Reisler, and A. Muhrad, 2010. Antiparallel dimer and actin assembly. *Biochemistry* 49:3919–3927.
- [153] Kim, Y., S. O. Ho, N. R. Gassman, Y. Korlann, E. V. Landorf, F. R. Collart, and S. Weiss, 2008. Efficient site-specific labeling of proteins via cysteines. *Bioconjugate Chem* 19:786–791.
- [154] Fujii, A., Y. Sekiguchi, H. Matsumura, T. Inoue, W.-S. Chung, S. Hirota, and T. Matsuo, 2015. Excimer emission properties on pyrene-labeled protein surface: correlation between emission spectra, ring stacking modes, and flexibilities of pyrene probes. *Bioconjugate Chem* 26:537–548.
- [155] Bains, G., A. B. Patel, and V. Narayanaswami, 2011. Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes. *Molecules* 16:7909–7935.
- [156] Betcher-Lange, S. L., and S. S. Lehrer, 1978. Pyrene excimer fluorescence in rabbit skeletal alphaalphanthropomyosin labeled with N-(1-pyrene)maleimide. A probe of sulfhydryl proximity and local chain separation. *J Biol Chem* 253:3757–3760.
- [157] Lakowicz, J. R., 2013. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science & Business Media, 3rd edition edition.
- [158] Llères, D., S. Swift, and A. I. Lamond, 2007. Detecting protein-protein interactions in vivo with FRET using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Current protocols in cytometry* Chapter 12:Unit12.10.
- [159] Bains, G. K., S. H. Kim, E. J. Sorin, and V. Narayanaswami, 2012. The extent of pyrene excimer fluorescence emission is a reflector of distance and flexibility: analysis of the segment linking the LDL receptor-binding and tetramerization domains of apolipoprotein E3. *Biochemistry* 51:6207–6219.
- [160] Lehrer, S. S., 1995. Pyrene excimer fluorescence as a probe of protein conformational change. *Subcell Biochem* 24:115–132.
- [161] Hanlon, A. D., and B. H. Milosavljevic, 2013. Appropriate excitation wavelength removes obfuscations from pyrene excimer kinetics and mechanism studies. *Photoch Photobio Sci* 12:787–797.
- [162] Kelly, S. M., and N. C. Price, 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 1:349–384.

- [163] Kelly, S. M., T. J. Jess, and N. C. Price, 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751:119–139.
- [164] Sreerama, N., and R. W. Woody, 2004. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol* 383:318–351.
- [165] Greenfield, N. J., 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 1:2876–2890.
- [166] Whitmore, L., and B. A. Wallace, 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32:W668–W673.
- [167] Whitmore, L., and B. A. Wallace, 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89:392–400.
- [168] Sreerama, N., S. Y. Venyaminov, and R. W. Woody, 1999. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci* 8:370–380.
- [169] Provencher, S. W., and J. Gloeckner, 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20:33–37.
- [170] Minsky, M., 1961. Microscopy apparatus. US Patent 3,013,467.
- [171] Fuertes, G., A. J. García-Sáez, S. Esteban-Martín, D. Giménez, O. L. Sánchez-Muñoz, P. Schwille, and J. Salgado, 2010. Pores formed by Bax 5 relax to a smaller size and keep at equilibrium. *Biophys J* 99:2917–2925.
- [172] Friedman, M. H., 2008. Principles and models of biological transport. Springer Science & Business Media.
- [173] Brown, R., 1828. XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philos Mag Series 2* 4:161–173.
- [174] Einstein, A., 1906. Zur Theorie der Brownschen Bewegung / On the Theory of Brownian Motion. *Annalen der Physik* 19:371–381.
- [175] Fick, A., 1855. Über Diffusion / On Diffusion. *Annalen der Physik* 170:59–86.
- [176] Fick, A., 1855. V. On liquid diffusion. *Philos Mag Series 4* 10:30–39.
- [177] Philibert, J., 2006. One and a half century of diffusion: Fick, Einstein, before and beyond. *Diffusion Fundamentals* 4:1–19.
- [178] Chadwick, A., J. Sherwood, J. Sherwood, A. Chadwick, W. Muir, and F. Swinton, 1971. Diffusion Processes. *Gordon and Breach, London* 477.

Bibliografía

- [179] Teorell, T., 1935. Studies on the "Diffusion Effect" upon Ionic Distribution. Some Theoretical Considerations. *Proc Natl Acad Sci USA* 21:152–61.
- [180] Gorban, A. N., H. P. Sargsyan, and H. A. Wahab, 2011. Quasichemical Models of Multicomponent Nonlinear Diffusion. *Math Model Nat Phenom* 6:184–262.
- [181] Einstein, A., 1956. Investigations on the Theory of the Brownian Movement. Dover Publications, INC.
- [182] Einstein, A., 1905. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen / On the Movement of Small Particles Suspended in Stationary Liquids, Required by the Molecular-Kinetic Theory of Heat. *Annalen der Physik* 17:549–560.
- [183] Einstein, A., 1906. Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen / A New Determination of Molecular Dimensions. *Annalen der Physik* 19:289–306.
- [184] Sutherland, W., 1905. LXXV. A dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin. *Philos Mag Series 6* 9:781–785.
- [185] Fuertes, G., D. Giménez, S. Esteban-Martin, A. Garcia-Sáez, O. Sánchez, and J. Salgado, 2010. Role of membrane lipids for the activity of pore forming peptides and proteins. *Adv Exp Med Biol* 677:31–55.
- [186] Pappenheimer, J. R., 1952. Capillary permeability: deductions concerning the number and dimensions of ultramicroscopic openings in the capillary walls. *Annals of the New York Academy of Sciences* 55:465–466.
- [187] Renkin, E. M., 1954. Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *J Gen Physiol* 38:225–243.
- [188] Wang, H. Z., and R. D. Veenstra, 1997. Monovalent ion selectivity sequences of the rat connexin43 gap junction channel. *J Gen Physiol* 109:491–507.
- [189] Levitt, D. G., 1991. General continuum theory for multiion channel. II. Application to acetylcholine channel. *Biophys J* 59:278–288.
- [190] Heyman, N. S., and J. M. Burt, 2008. Hindered diffusion through an aqueous pore describes invariant dye selectivity of Cx43 junctions. *Biophys J* 94:840–854.
- [191] Lemièrre, J., K. Guevorkian, C. Campillo, C. Sykes, and T. Betz, 2013. α -Hemolysin membrane pore density measured on liposomes. *Soft Matter* 9:3181–3187.
- [192] Dwyer, T. M., D. J. Adams, and B. Hille, 1980. The permeability of the endplate channel to organic cations in frog muscle. *J Gen Physiol* 75:469–492.
- [193] Wimley, W. C., and S. H. White, 1996. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Mol Biol* 3:842–848.

- [194] Dathe, M., and T. Wieprecht, 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *BBA-Biomembranes* 1462:71–87.
- [195] Powers, J.-P. S., and R. E. Hancock, 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24:1681–1691.
- [196] Kyte, J., and R. F. Doolittle, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105–132.
- [197] García-Sáez, A. J., I. Mingarro, E. Pérez-Payá, and J. Salgado, 2004. Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* 43:10930–10943.
- [198] Schiffer, M., and A. B. Edmundson, 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys J* 7:121–135.
- [199] Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede, 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195–201.
- [200] Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, and T. Schwede, 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42:W252–W258.
- [201] Bordoli, L., F. Kiefer, K. Arnold, P. Benkert, J. Battey, and T. Schwede, 2009. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc* 4:1–13.
- [202] Suzuki, M., R. J. Youle, and N. Tjandra, 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103:645–654.
- [203] Terwilliger, T. C., and D. Eisenberg, 1982. The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *J Biol Chem* 257:6016–6022.
- [204] Lee, M.-T., T.-L. Sun, W.-C. Hung, and H. W. Huang, 2013. Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:14243–14248.
- [205] Qian, S., W. Wang, L. Yang, and H. W. Huang, 2008. Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: evidence for lipidic pores. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17379–17383.
- [206] Kong, G.-M., W.-H. Tao, Y.-L. Diao, P.-H. Fang, J.-J. Wang, P. Bo, and F. Qian, 2016. Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol* 22:3186–3195.

Bibliografía

- [207] García-Sáez, A. J., S. Chiantia, J. Salgado, and P. Schwille, 2007. Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM. *Biophys J* 93:103–112.
- [208] García-Sáez, A. J., 2005. Characterising the interactions of fragments derived from Bcl-xL, Bax and Bid with lipid membranes. Ph.D. thesis, University of Valencia, Valencia, Spain.
- [209] Gurezka, R., R. Laage, B. Brosig, and D. Langosch, 1999. A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem* 274:9265–9270.
- [210] Struhl, K., 1989. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 14:137–140.
- [211] Kelly, S., and N. Price, 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 1:349.
- [212] Burkhard, P., J. Stetefeld, and S. V. Strelkov, 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11:82–88.
- [213] Lau, S., A. Taneja, and R. Hodges, 1984. Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol Chem* 259:13253–13261.
- [214] Zhou, N. E., C. M. Kay, and R. Hodges, 1992. Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol Chem* 267:2664–2670.
- [215] Greenfield, N. J., and S. E. Hitchcock-Degregori, 1993. Conformational intermediates in the folding of a coiled-coil model peptide of the N-terminus of tropomyosin and α -tropomyosin. *Protein Sci* 2:1263–1273.
- [216] Schnell, J. R., G.-P. Zhou, M. Zweckstetter, A. C. Rigby, and J. J. Chou, 2005. Rapid and accurate structure determination of coiled-coil domains using NMR dipolar couplings: Application to cGMP-dependent protein kinase I α . *Protein Sci* 14:2421–2428.
- [217] Crick, F. H., 1953. The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr* 6:689–697.
- [218] Harbury, P. B., T. Zhang, P. S. Kim, and T. Alber, 1993. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262:1401–1407.
- [219] Chattopadhyay, A., 1990. Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes. *Chem Phys Lipids* 53:1–15.

- [220] Talukder, P., S. Chen, C. T. Liu, E. A. Baldwin, S. J. Benkovic, and S. M. Hecht, 2014. Tryptophan-based fluorophores for studying protein conformational changes. *Bioorgan Med Chem* 22:5924–5934.
- [221] Samanta, U., D. Pal, and P. Chakrabarti, 2000. Environment of tryptophan side chains in proteins. *Proteins* 38:288–300.
- [222] Joseph, M., and R. Nagaraj, 1998. Insight into the environment of tryptophan in a hydrophobic model peptide upon aggregation and interaction with lipid vesicles: a steady state and time resolved fluorescence study. *Indian J Biochem Bio* 35:67–75.
- [223] Haldar, S., and A. Chattopadhyay, 2012. Application of NBD-labeled lipids in membrane and cell biology. *In* *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*, Springer, 37–50.
- [224] Hong, K., P. A. Baldwin, T. M. Allen, and D. Papahadjopoulos, 1988. Fluorometric detection of the bilayer-to-hexagonal phase transition in liposomes. *Biochemistry* 27:3947–3955.
- [225] Coste, V., N. Puff, D. Lockau, P. J. Quinn, and M. I. Angelova, 2006. Raft-like domain formation in large unilamellar vesicles probed by the fluorescent phospholipid analogue, C12NBD-PC. *BBA-Biomembranes* 1758:460–467.
- [226] Hoekstra, D., 1982. Role of lipid phase separations and membrane hydration in phospholipid vesicle fusion. *Biochemistry* 21:2833–2840.
- [227] Brown, R. S., J. D. Brennan, and U. J. Krull, 1994. Self-quenching of nitrobenzoxadiazole labeled phospholipids in lipid membranes. *J Chem Phys* 100:6019–6027.
- [228] Hoekstra, D., 1982. Fluorescence method for measuring the kinetics of calcium ion-induced phase separations in phosphatidylserine-containing lipid vesicles. *Biochemistry* 21:1055–1061.
- [229] Christiaens, B., S. Symoens, S. Vanderheyden, Y. Engelborghs, A. Joliot, A. Prochiantz, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, and B. Vanloo, 2002. Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *FEBS J* 269:2918–2926.
- [230] Ladokhin, A. S., S. Jayasinghe, and S. H. White, 2000. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal Biochem* 285:235–245.
- [231] Bonucci, A., E. Caldaroni, E. Balducci, and R. Pogni, 2015. A spectroscopic study of the aggregation state of the human antimicrobial peptide LL-37 in bacterial versus host cell model membranes. *Biochemistry* 54:6760–6768.

Bibliografía

- [232] Swiecicki, J.-M., F. Thiebaut, M. Di Pisa, S. Gourdin-Bertin, J. Tailhades, C. Mansuy, F. Burlina, S. Chwetzoff, G. Trugnan, G. Chassaing, et al., 2016. How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides. *Sci Rep* 6:20237.
- [233] Kobayashi, H., and P. L. Choyke, 2010. Target-cancer-cell-specific activatable fluorescence imaging probes: rational design and in vivo applications. *Accounts Chem Res* 44:83–90.
- [234] Loura, L. M. S., and M. Prieto, 2011. FRET in Membrane Biophysics: An Overview. *Front Physiol* 2:82.
- [235] Zoonens, M., F. Giusti, F. Zito, and J.-L. Popot, 2007. Dynamics of membrane protein/amphipol association studied by Förster resonance energy transfer: implications for in vitro studies of amphipol-stabilized membrane proteins. *Biochemistry* 46:10392–10404.
- [236] Salvador-Gallego, R., M. Mund, K. Cosentino, J. Schneider, J. Unsay, U. Schraermeyer, J. Engelhardt, J. Ries, and A. J. García-Sáez, 2016. Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J* 35:389–401.
- [237] Subburaj, Y., K. Cosentino, M. Axmann, E. Pedrueza-Villalmanzo, E. Hermann, S. Bleicken, J. Spatz, and A. J. García-Sáez, 2015. Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat Commun* 6:8042.
- [238] Bains, G., A. B. Patel, and V. Narayanaswami, 2011. Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes. *Molecules* 16:7909–7935.
- [239] Ishii, Y., and S. S. Lehrer, 1990. Excimer fluorescence of pyrenyliodoacetamide-labeled tropomyosin: a probe of the state of tropomyosin in reconstituted muscle thin filaments. *Biochemistry* 29:1160–1166.
- [240] Wu, C.-W., L. R. Yarbrough, and F. Y. Wu, 1976. N-(1-pyrene) maleimide: a fluorescent crosslinking reagent. *Biochemistry* 15:2863–2868.
- [241] Jain, N., M. Bhattacharya, and S. Mukhopadhyay, 2011. Chain collapse of an amyloidogenic intrinsically disordered protein. *Biophys J* 101:1720–1729.
- [242] Barenholz, Y., T. Cohen, R. Korenstein, and M. Ottolenghi, 1991. Organization and dynamics of pyrene and pyrene lipids in intact lipid bilayers. Photo-induced charge transfer processes. *Biophys J* 60:110–124.
- [243] Thongngam, M., and D. J. McClements, 2005. Influence of pH, ionic strength, and temperature on self-association and interactions of sodium dodecyl sulfate in the absence and presence of chitosan. *Langmuir* 21:79–86.

- [244] Stangl, M., S. Unger, S. Keller, and D. Schneider, 2014. Sequence-Specific Dimerization of a Transmembrane Helix in Amphipol A8-35. *PLoS One* 9:e110970.
- [245] Shabestari, M. H., N. J. Meeuwenoord, D. V. Filippov, and M. Huber, 2016. Interaction of the amyloid β peptide with sodium dodecyl sulfate as a membrane-mimicking detergent. *J Biol Phys* 42:299.
- [246] Mirkin, N., J. Jaconic, V. Stojanoff, and A. Moreno, 2008. High resolution X-ray crystallographic structure of bovine heart cytochrome c and its application to the design of an electron transfer biosensor. *Proteins* 70:83–92.
- [247] Sanders, S. E., J. L. Madara, D. K. McGuirk, D. S. Gelman, and S. P. Colgan, 1995. Assessment of inflammatory events in epithelial permeability: a rapid screening method using fluorescein dextrans. *Epithelial Cell Biol* 4:25–34.
- [248] Arrio-Dupont, M., S. Cribier, G. Foucault, P. F. Devaux, and A. d’Albis, 1996. Diffusion of fluorescently labeled macromolecules in cultured muscle cells. *Biophys J* 70:2327–2332.
- [249] Tamba, Y., and M. Yamazaki, 2005. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry* 44:15823–15833.
- [250] Schön, P., A. J. García-Sáez, P. Malovrh, K. Bacia, G. Anderluh, and P. Schwille, 2008. Equinatoxin II permeabilizing activity depends on the presence of sphingomyelin and lipid phase coexistence. *Biophys J* 95:691–698.
- [251] Ayuyan, A. G., and F. S. Cohen, 2006. Lipid Peroxides Promote Large Rafts: Effects of Excitation of Probes in Fluorescence Microscopy and Electrochemical Reactions during Vesicle Formation. *Biophys J* 91:2172–2183.
- [252] Petrásek, Z., and P. Schwille, 2008. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 94:1437–1448.
- [253] Kapusta, P., 2010. Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration. Technical report, PicoQuant GmbH.
- [254] Tamba, Y., and M. Yamazaki, 2009. Magainin 2-induced pore formation in the lipid membranes depends on its concentration in the membrane interface. *J Phys Chem B* 113:4846–4852.
- [255] Pan, J., X. Cheng, M. Sharp, C.-S. Ho, N. Khadka, and J. Katsaras, 2015. Structural and mechanical properties of cardiolipin lipid bilayers determined using neutron spin echo, small angle neutron and X-ray scattering, and molecular dynamics simulations. *Soft matter* 11:130–138.
- [256] Caspi, Y., D. Zbaida, H. Cohen, and M. Elbaum, 2009. Anomalous diffusion of high molecular weight polyisopropylacrylamide in nanopores. *Macromolecules* 42:760–767.

Bibliografía

- [257] Tegenfeldt, J. O., C. Prinz, H. Cao, S. Chou, W. W. Reisner, R. Riehn, Y. M. Wang, E. C. Cox, J. C. Sturm, P. Silberzan, and R. H. Austin, 2004. From the Cover: The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10979–10983.
- [258] Oukhaled, G., J. Mathé, A.-L. Biance, L. Bacri, J.-M. Betton, D. Lairez, J. Pelta, and L. Auvray, 2007. Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording. *Phys Rev Lett* 98:158101.
- [259] Matsuzaki, K., S. Yoneyama, and K. Miyajima, 1997. Pore formation and translocation of melittin. *Biophys J* 73:831–838.
- [260] Tamba, Y., H. Ariyama, V. Levadny, and M. Yamazaki, 2010. Kinetic pathway of antimicrobial peptide magainin 2-induced pore formation in lipid membranes. *J Phys Chem B* 114:12018–12026.
- [261] Huang, H. W., F.-Y. Chen, and M.-T. Lee, 2004. Molecular mechanism of Peptide-induced pores in membranes. *Phys Rev Lett* 92:198304.
- [262] Danne, L., M. Aktas, A. Unger, W. A. Linke, R. Erdmann, and F. Narberhaus, 2017. Membrane Remodeling by a Bacterial Phospholipid-Methylating Enzyme. *mBio* 8.
- [263] Oettinghaus, B., D. D’Alonzo, E. Barbieri, L. M. Restelli, C. Savoia, M. Licci, M. Tolnay, S. Frank, and L. Scorrano, 2016. DRP1-dependent apoptotic mitochondrial fission occurs independently of BAX, BAK and APAF1 to amplify cell death by BID and oxidative stress. *BBA-Bioenergetics* 1857:1267–1276.
- [264] Xia, Y., J. Sun, and D. Liang, 2014. Aggregation, Fusion, and Leakage of Liposomes Induced by Peptides. *Langmuir* 30:7334–7342.
- [265] Nir, S., and J. L. Nieva, 2000. Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Prog Lipid Res* 39:181–206.
- [266] Opaliński, ., J. A. K. W. Kiel, C. Williams, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, 2011. Membrane curvature during peroxisome fission requires Pex11. *EMBO J* 30:5–16.
- [267] Inaoka, Y., and M. Yamazaki, 2007. Vesicle Fission of Giant Unilamellar Vesicles of Liquid-Ordered-Phase Membranes Induced by Amphiphiles with a Single Long Hydrocarbon Chain. *Langmuir* 23:720–728.
- [268] Schlame, M., K. Beyer, M. Hayer-Hartl, and M. Klingenberg, 1991. Molecular species of cardiolipin in relation to other mitochondrial phospholipids. *Eur J Biochem* 199:459–466.
- [269] Lewis, R. N. A. H., and R. N. McElhaney, 2009. The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes. *BBA-Biomembranes* 1788:2069–2079.

- [270] Dingeldein, A. P. G., . Pokorná, M. Lidman, T. Sparrman, R. Šachl, M. Hof, and G. Gröbner, 2017. Apoptotic Bax at Oxidatively Stressed Mitochondrial Membranes: Lipid Dynamics and Permeabilization. *Biophys J* 112:2147–2158.
- [271] Huang, K. C., R. Mukhopadhyay, and N. S. Wingreen, 2006. A Curvature-Mediated Mechanism for Localization of Lipids to Bacterial Poles. *PLOS Computational Biology* 2:e151.
- [272] Lewis, R. N. A. H., D. Zweytick, G. Pabst, K. Lohner, and R. N. McElhaney, 2007. Calorimetric, x-ray diffraction, and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior and organization of tetramyristoyl cardiolipin membranes. *Biophys J* 92:3166–3177.
- [273] Powell, G. L., and D. Marsh, 1985. Polymorphic phase behavior of cardiolipin derivatives studied by ^{31}P NMR and X-ray diffraction. *Biochemistry* 24:2902–2908.
- [274] Cullis, P. R., A. J. Verkleij, and P. H. Ververgaert, 1978. Polymorphic phase behaviour of cardiolipin as detected by ^{31}P NMR and freeze-fracture techniques. Effects of calcium, dibucaine and chlorpromazine. *Biochim Biophys Acta* 513:11–20.
- [275] Seddon, J. M., R. D. Kaye, and D. Marsh, 1983. Induction of the lamellar-inverted hexagonal phase transition in cardiolipin by protons and monovalent cations. *BBA-Biomembranes* 734:347–352.
- [276] Baumgart, T., G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb, and G. W. Feigenson, 2007. Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes. *BBA-Biomembranes* 1768:2182–2194.
- [277] Domènech, O., F. Sanz, M. T. Montero, and J. Hernández-Borrell, 2006. Thermodynamic and structural study of the main phospholipid components comprising the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1758:213–221.
- [278] Domènech, ., A. Morros, M. E. Cabañas, M. T. Montero, and J. Hernández-Borrell, 2007. Thermal response of domains in cardiolipin content bilayers. *Ultra-microscopy* 107:943–947.
- [279] Garcia Fernandez, M. I., D. Ceccarelli, and U. Muscatello, 2004. Use of the fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange in quantitative and location assays of cardiolipin: a study on different experimental models. *Anal Biochem* 328:174–180.
- [280] Aldre, G., A. Alessandrini, U. Muscatello, U. Valdre, and V. Annini, 1999. Coexistence of nanoscopic domains in synthetic membranes. *Philos Mag B* 79:1549–1559.
- [281] Muscatello, U., A. Alessandrini, G. Valdré, V. Vannini, and U. Valdré, 2000. Lipid Oxidation Deletes the Nanodomain Organization of Artificial Membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 270:448–452.

Bibliografía

- [282] Sakuma, Y., T. Taniguchi, and M. Imai, 2010. Pore Formation in a Binary Giant Vesicle Induced by Cone-Shaped Lipids. *Biophys J* 99:472–479.
- [283] Himeno, H., H. Ito, Y. Higuchi, T. Hamada, N. Shimokawa, and M. Takagi, 2015. Coupling between pore formation and phase separation in charged lipid membranes. *Phys Rev E* 92.
- [284] Fromherz, P., 1983. Lipid-vesicle structure: Size control by edge-active agents. *Chem Phys Lett* 94:259–266.
- [285] Chou, T., M. V. Jarić, and E. D. Siggia, 1997. Electrostatics of lipid bilayer bending. *Biophys J* 72:2042–2055.
- [286] Mui, B. L., H. G. Döbereiner, T. D. Madden, and P. R. Cullis, 1995. Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys J* 69:930–941.
- [287] Epanand, R. M., 1997. Chapter 6 Modulation of Lipid Polymorphism by Peptides. *Curr Top Membr* 44:237–252.
- [288] Siegel, D. P., V. Cherezov, D. V. Greathouse, R. E. Koeppe II, J. A. Killian, and M. Caffrey, 2006. Transmembrane Peptides Stabilize Inverted Cubic Phases in a Biphase Length-Dependent Manner: Implications for Protein-Induced Membrane Fusion. *Biophys J* 90:200–211.
- [289] Martyna, A., B. Bahsoun, M. D. Badham, S. Srinivasan, M. J. Howard, and J. S. Rossman, 2017. Membrane remodeling by the M2 amphipathic helix drives influenza virus membrane scission. *Sci Rep* 7:44695.
- [290] Yu, Y., J. A. Vroman, S. C. Bae, and S. Granick, 2010. Vesicle Budding Induced by a Pore-Forming Peptide. *J Am Chem Soc* 132:195–201.
- [291] Bhargava, K., and J. B. Feix, 2004. Membrane Binding, Structure, and Localization of Cecropin-Mellitin Hybrid Peptides: A Site-Directed Spin-Labeling Study. *Biophys J* 86:329–336.
- [292] Deng, Y., M. Marko, K. F. Buttle, A. Leith, M. Mieczkowski, and C. A. Mannella, 1999. Cubic Membrane Structure in Amoeba (*Chaos carolinensis*) Mitochondria Determined by Electron Microscopic Tomography. *J Struct Biol* 127:231–239.
- [293] Epanand, R. F., J.-C. Martinou, M. Fornallaz-Mulhauser, D. W. Hughes, and R. M. Epanand, 2002. The Apoptotic Protein tBid Promotes Leakage by Altering Membrane Curvature. *J Biol Chem* 277:32632–32639.
- [294] Woo, H.-J., and A. Wallqvist, 2011. Spontaneous Buckling of Lipid Bilayer and Vesicle Budding Induced by Antimicrobial Peptide Magainin 2: A Coarse-Grained Simulation Study. *J Phys Chem B* 115:8122–8129.

- [295] Vind-Kezunovic, D., C. H. Nielsen, U. Wojewodzka, and R. Gniadecki, 2008. Line tension at lipid phase boundaries regulates formation of membrane vesicles in living cells. *Biochim Biophys Acta* 1778:2480–2486.
- [296] Wiese, W., and W. Helfrich, 1990. Theory of vesicle budding. *J Phys: Condens Matter* 2:SA329.
- [297] Svetina, S., and B. Zeks, 2002. Shape behavior of lipid vesicles as the basis of some cellular processes. *Anat Rec* 268:215–225.
- [298] Bouvrais, H., M. Holmstrup, P. Westh, and J. H. Ipsen, 2013. Analysis of the shape fluctuations of reconstituted membranes using GUVs made from lipid extracts of invertebrates. *Biol Open* 2:373–378.
- [299] Beales, P. A., C. L. Bergstrom, N. Geerts, J. T. Groves, and T. K. Vanderlick, 2011. Single vesicle observations of the cardiolipin-cytochrome C interaction: induction of membrane morphology changes. *Langmuir* 27:6107–6115.
- [300] Hoppins, S., F. Edlich, M. M. Cleland, S. Banerjee, J. M. McCaffery, R. J. Youle, and J. Nunnari, 2011. The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol Cell* 41:150–160.
- [301] Schlesinger, P. H., A. Gross, X. M. Yin, K. Yamamoto, M. Saito, G. Waksman, and S. J. Korsmeyer, 1997. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11357–11362.
- [302] Bonifacino, J. S., and B. S. Glick, 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153–166.
- [303] Fattal, E., S. Nir, R. A. Parente, and F. C. Szoka, 1994. Pore-Forming Peptides Induce Rapid Phospholipid Flip-Flop in Membranes. *Biochemistry* 33:6721–6731.
- [304] LeBarron, J., and E. London, 2016. Effect of lipid composition and amino acid sequence upon transmembrane peptide-accelerated lipid transleaflet diffusion (flip-flop). *Biochim Biophys Acta* 1858:1812–1820.
- [305] Anglin, T. C., K. L. Brown, and J. C. Conboy, 2009. Phospholipid Flip-flop Modulated by Transmembrane Peptides WALP and Melittin. *J Struct Biol* 168:37–52.
- [306] Levadny, V., T.-a. Tsuboi, M. Belaya, and M. Yamazaki, 2013. Rate constant of tension-induced pore formation in lipid membranes. *Langmuir* 29:3848–3852.
- [307] Karal, M. A. S., and M. Yamazaki, 2015. Communication: Activation energy of tension-induced pore formation in lipid membranes. *J Chem Phys* 143:081103.
- [308] Jalmar, O., L. François-Moutal, A.-J. García-Sáez, M. Perry, T. Granjon, F. Gonzalez, E. Gottlieb, J. Ayala-Sanmartin, B. Klösger, P. Schwille, and P. X. Petit, 2013. Caspase-8 Binding to Cardiolipin in Giant Unilamellar Vesicles Provides a Functional Docking Platform for Bid. *Plos One* 8:e55250.

Bibliografía

- [309] Cheniour, M., J. Brewer, L. Bagatolli, O. Marcillat, and T. Granjon, 2017. Evidence of proteolipid domain formation in an inner mitochondrial membrane mimicking model. *BBA-Gen Subjects* 1861:969–976.
- [310] Lipowsky, R., 1993. Domain-induced budding of fluid membranes. *Biophys J* 64:1133–1138.
- [311] Kozlov, M. M., H. T. McMahon, and L. V. Chernomordik, 2010. Protein-driven membrane stresses in fusion and fission. *Trends Biochem Sci* 35:699–706.
- [312] Roux, A., D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, and B. Goud, 2005. Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO J* 24:1537–1545.
- [313] Khalifat, N., M. Rahimi, A.-F. Bitbol, M. Seigneuret, J.-B. Fournier, N. Puff, M. Arroyo, and M. Angelova, 2014. Interplay of Packing and Flip-flop in Local Bilayer Deformation. How Phosphatidylglycerol Could Rescue Mitochondrial Function in a Cardiolipin-deficient Yeast Mutant. *Biophys J* 107:879–890.
- [314] Evans, and Rawicz, 1990. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys Rev Lett* 64:2094–2097.
- [315] Kozlovsky, Y., and M. M. Kozlov, 2003. Membrane Fission: Model for Intermediate Structures. *Biophys J* 85:85–96.
- [316] Tanaka, T., and M. Yamazaki, 2004. Membrane fusion of giant unilamellar vesicles of neutral phospholipid membranes induced by La³⁺. *Langmuir* 20:5160–5164.
- [317] Siegel, D. P., 1999. The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys J* 76:291–313.
- [318] Siegel, D. P., 1993. Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophys J* 65:2124–2140.
- [319] Siegel, D. P., 1999. The Modified Stalk Mechanism of Lamellar/Inverted Phase Transitions and Its Implications for Membrane Fusion. *Biophys J* 76:291–313.
- [320] Keller, S. L., S. M. Gruner, and K. Gawrisch, 1996. Small concentrations of alamethicin induce a cubic phase in bulk phosphatidylethanolamine mixtures. *BBA-Biomembranes* 1278:241–246.
- [321] Salditt, T., and S. Aeffner, 2016. X-ray structural investigations of fusion intermediates: Lipid model systems and beyond. *Semin Cell Dev Biol* 60:65–77.
- [322] Bleicken, S., G. Hofhaus, B. Ugarte-Urbe, R. Schröder, and A. J. García-Sáez, 2016. cBid, Bax and Bcl-xL exhibit opposite membrane remodeling activities. *Cell Death Dis* 7:e2121.

- [323] Smirnova, E., L. Griparic, D. L. Shurland, and A. M. van der Bliek, 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12:2245–2256.
- [324] Wu, S., F. Zhou, Z. Zhang, and D. Xing, 2011. Bax is essential for Drp1-mediated mitochondrial fission but not for mitochondrial outer membrane permeabilization caused by photodynamic therapy. *J Cell Physiol* 226:530–541.
- [325] Bustillo-Zabalbeitia, I., S. Montessuit, E. Raemy, G. Basañez, O. Terrones, and J.-C. Martinou, 2014. Specific Interaction with Cardiolipin Triggers Functional Activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS One* 9:e102738.
- [326] Schug, Z. T., and E. Gottlieb, 2009. Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1788:2022–2031.
- [327] Ugarte-Uribe, B., H.-M. Müller, M. Otsuki, W. Nickel, and A. J. García-Sáez, 2014. Dynamin-related Protein 1 (Drp1) Promotes Structural Intermediates of Membrane Division. *J Biol Chem* 289:30645–30656.
- [328] Grigoryan, G., and A. E. Keating, 2008. Structural specificity in coiled-coil interactions. *Curr Opin Struct Biol* 18:477–483.
- [329] Krylov, D., I. Mikhailenko, and C. Vinson, 1994. A thermodynamic scale for leucine zipper stability and dimerization specificity: e and g interhelical interactions. *EMBO J* 13:2849.
- [330] Czabotar, P. E., D. Westphal, G. Dewson, S. Ma, C. Hockings, W. D. Fairlie, E. F. Lee, S. Yao, A. Y. Robin, B. J. Smith, et al., 2013. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152:519–531.
- [331] Zimmerberg, J., and M. M. Kozlov, 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:9–19.
- [332] Brouwer, J. M., D. Westphal, G. Dewson, A. Y. Robin, R. T. Uren, R. Bartolo, G. V. Thompson, P. M. Colman, R. M. Kluck, and P. E. Czabotar, 2014. Bak core and latch domains separate during activation, and freed core domains form symmetric homodimers. *Mol Cell* 55:938–946.
- [333] O’Neill, J. W., M. K. Manion, B. Maguire, and D. M. Hockenbery, 2006. BCL-X L dimerization by three-dimensional domain swapping. *J Mol Biol* 356:367–381.