



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Caracterización estructural del dominio BAR de isoformas de AnfifisinalI/Bin1**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Luis Pablo Avila Barrientos

Dr. Jaime Mas Oliva

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Enrique García Hernández

[Instituto de Química](#)

Dr. Rolando Castillo Caballero

[Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM](#)

MÉXICO, D. F., noviembre, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

Índice de Figuras .....	vi
Abreviaturas: .....	vii
Resumen:.....	1
Introducción .....	2
Curvatura membranal .....	3
Proteínas y curvatura membranal.....	7
Superfamilia BAR.....	10
Dominios N-BAR y curvatura membranal .....	13
Curvatura membranal en procesos patológicos .....	14
Bin1/Anfifisina II.....	15
Hipótesis.....	19
Objetivo.....	19
Objetivos particulares .....	19
Metodología.....	20
<b>Biología Molecular</b> .....	20
Diseño de construcciones .....	20
Preparación de bacterias competentes. ....	25
Transformación de bacterias competentes. ....	25
Extracción de DNA plasmídico. ....	25
Análisis por electroforesis en geles de agarosa .....	26
Purificación de DNA a partir de geles de agarosa .....	26
Desfosforilación por fosfatasa alcalina .....	27
Ligación de DNA .....	27
<b>Producción de proteínas recombinantes</b> .....	28
Pruebas de expresión.....	28
Cuantificación de proteína por reducción de ácido biconínico.....	29
Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.....	30
Escalamiento de sobreexpresión .....	31
<b>Purificación de proteínas</b> .....	31
Purificación por precipitación con sulfato de amonio .....	31

Sistema de cromatografía líquida de desempeño rápido (FPLC) .....	31
Purificación por cromatografía de intercambio aniónico .....	32
Purificación por cromatografía de filtración en gel .....	33
Inmunoensayo tipo western .....	33
<b>Análisis de remodelado de vesículas lipídicas</b> .....	34
Preparación de vesículas gigantes .....	34
Caracterización de liposomas mediante ensayos de turbidez. ....	34
Microscopía electrónica de transmisión. ....	35
Resultados .....	36
Generación de construcciones .....	36
Pruebas de sobreexpresión .....	39
Detección de dominios BAR en ensayos de expresión. ....	42
Purificación del dominio BAR .....	43
Análisis funcional del dominio BAR .....	51
Discusión: .....	59
Conclusiones: .....	63
Perspectivas .....	63
Participación en artículos sometidos a publicación .....	64
Referencias .....	65



## **Agradecimientos:**

A México, por la oportunidad de completar un ciclo más en esta universidad.

A mi madre, por todo su amor y esfuerzos. Nuevamente, sin ti, ésto no hubiera sido posible.

A mi hermano, Hugo, a Caty, a Bruno y Santiago, por su apoyo y solidaridad en tiempos difíciles.

Al Dr. Jaime Mas Oliva, por permitirme realizar una estancia más en el laboratorio 322-N.

Al C.Dr. Salvador Damián Zamacona, Chava, por su apoyo y guía en el inicio de esta etapa.

A los integrantes del laboratorio 322-N, Blanquita, Danaí, Fory, Sra. Lupita, Nadia, Nitrosa y Pao. Por aguantarme dos años más. He aprendido mucho, con ustedes he visto mis deficiencias y me han ayudado a forjar una idea de lo que tengo que hacer para formar parte del mundo que me gustaría ver.

A todos los amigos y personas que me han apoyado en momentos difíciles, valoro más la vida por ustedes y me han hecho cuestionarme en todo momento.

## Índice de Figuras

Figura 1: Vista actual del mosaico fluido.....	2
Figura 2. Componentes de curvatura.....	4
Figura 3. Drogas anfipáticas inductoras de curvatura membranal en eritrocitos.....	6
Figura 4. Modelos de generación de curvatura membranal por proteínas.....	7
Figura 5. Dominios de la superfamilia BAR.....	12
Figura 6. Composición exónica de Anfifisina II/Bin1.....	16
Figura 7. Isoformas de Anfifisina II/Bin1.....	18
Figura 8: Alineamiento de secuencias nucleotídicas.....	21
Figura 9: Alineamiento de secuencias proteicas.....	22
Figura 10: Secuencias de los genes sintéticos obtenidos de la compañía Genscript.....	23
Figura 11: Vector de clonación pUC57.....	23
Figura 12: Vector de expresión pET23.....	24
Tabla 1: Curva de calibración para determinación de concentración de proteína por método de ácido bicinconónico.....	30
Figura 13. Digestiones diagnóstico de construcciones.....	36
Figura 14. Liberación de insertos para subsecuente ligación.....	37
Figura 15. Digestiones diagnóstico de nuevas construcciones.....	38
Figura 16: Sobreexpresión de proteína recombinante BARFULL.....	39
Figura 17: Optimización de la expresión de proteína recombinante BAR6.....	40
Figura 18: Optimización de la expresión de proteína recombinante BAR6.....	41
Figura 19: Inmunodetección de los dominios BAR en ensayos de expresión.....	42
Figura 20: Precipitación con sulfato de amonio de la proteína BAR.....	43
Figura 21: Purificación por cromatografía de intercambio aniónico.....	44
Figura 22: Purificación por intercambio aniónico de la proteína BAR.....	45
Figura 23: Purificación por intercambio aniónico de la proteína BAR.....	45
Figura 24: Purificación por cromatografía de intercambio aniónico de la proteína BAR- Expresión escalada.....	46
Figura 25: Purificación por intercambio aniónico de la proteína BAR- fracción no-acoplada.....	47
Figura 26: Purificación por filtración en gel de la proteína BARF.....	48
Figura 27: Purificación por intercambio aniónico de la proteína BARFULL.....	49
Figura 28: Purificación por filtración en gel de la proteína BARF.....	50
Figura 29: Modificación de vesículas de POPG por BAR a 150 mM de NaCl.....	51
Figura 30: Modificación de vesículas de POPG por BAR a 75 mM de NaCl.....	52
Figura 31: Modificación de vesículas de POPG por BAR en ausencia de sal.....	53
Figura 32: Modificación de vesículas de POPC por BAR a 75 mM de NaCl.....	54
Figura 33: Modificación de vesículas de POPC por BAR en ausencia de sal.....	55
Figura 34: Modificación de vesículas de lípidos polares a 1.2 mM por el dominio BAR.....	56
Figura 35: Modificación de vesículas de POPG por el dominio BAR.....	57
Figura 36: Modificación de vesículas de POPC por el dominio BAR.....	58

## Abreviaturas:

<b>ANTH</b>	Dominio de homología amino terminal de AP180
<b>ALP-1</b>	Amphiphysin-like-protein 1
<b>AMPc</b>	Adenilil monofosfato cíclico
<b>BAR</b>	Bin Anfifisina Rvs
<b>CAP</b>	Proteína asociada a adenilil ciclase
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CHO-F7</b>	Células de ovario de hámster chino transfectadas con el receptor pepenador
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ENTH</b>	Dominio de homología amino terminal de Epsina
<b>DMPC</b>	Dimiristoilfosfatidilcolina
<b>FPLC</b>	Cromatografía líquida de desempeño rápido
<b>GAP</b>	Proteína activadora de GTPasa
<b>GTP</b>	Guanilil trifosfato
<b>GTPasa</b>	Proteína degradadora de GTP
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>MBD</b>	Dominio de unión a MYC
<b>MOPS</b>	Ácido 3-(n-Morfolino)-Propanosulfónico
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>PDB</b>	Banco de proteínas
<b>PC12</b>	Células de feocromocitoma de médula adrenal de rata
<b>PI(4,5)P<sub>2</sub></b>	Fosfatidil-inositol-(4,5)bifosfato
<b>POPC</b>	Palmitoil oleoil fosfatidilcolina
<b>POPG</b>	Palmitoil oleoil fosfatidilglicerol
<b>PVPE</b>	Palmitoil 2-cis-vaccénico fosfatidil etanolamina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SDS</b>	Dodecil-sulfato de sodio

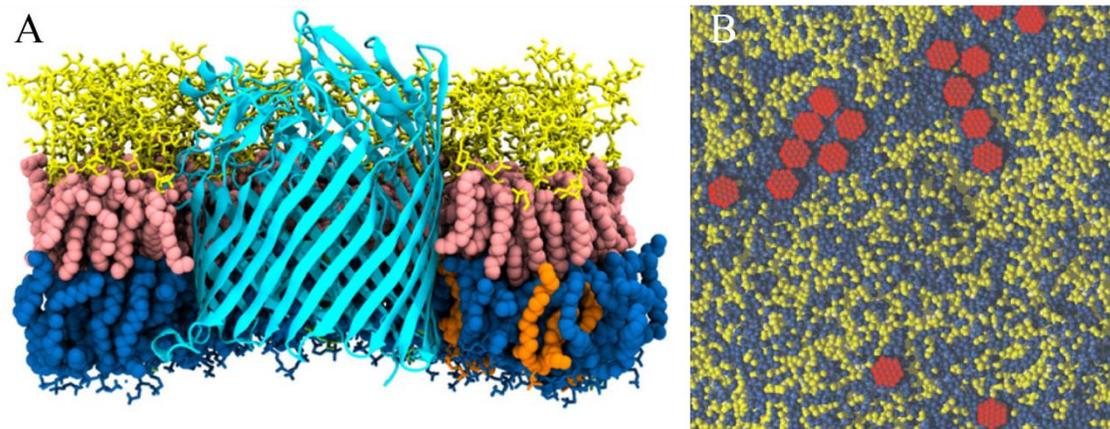
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
<b>SOB</b>	Medio súper óptimo
<b>TFBI</b>	Amortiguador de transformación I
<b>TFBII</b>	Amortiguador de transformación II
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil)aminometano

## **Resumen:**

La superfamilia de proteínas BAR incluye proteínas que participan en el control del ciclo celular y modulan la morfología de membranas intracelulares. Nuestro equipo de trabajo aisló una isoforma novedosa de la proteína perteneciente a esta superfamilia, Bin1/Anfifisina II, que carece del exón 6. La secuencia del exón 6 codifica para residuos de aminoácidos entre las hélices 2 y 3 del dominio BAR de Bin1/Anfifisina II. Esta región del dominio BAR incluye un asa desordenada rica en residuos de aminoácidos con carga positiva, que se ha propuesto son importantes para la interacción de esta proteína con membranas intracelulares. Para estudiar las diferencias estructurales entre el dominio BAR de la isoforma aislada por el laboratorio y el dominio BAR de configuración exónica descrito en la literatura, en este trabajo se clonaron secuencias para estos dominios en vectores de expresión de proteínas recombinantes en bacterias. La expresión en bacterias del dominio BAR carente del exón 6 fue deficiente. No obstante, se logró la sobreexpresión y purificación del dominio BAR, con el que se realizaron experimentos para determinar su capacidad de deformar membranas. Se confirmó que el dominio BAR es capaz de deformar vesículas de lípidos de carga negativa, sin embargo y contrario a lo establecido en la literatura, también se observó que este dominio genera estructuras tubulares a partir de vesículas de lípidos de carga positiva.

## Introducción

Las células delimitan el espacio intracelular con barreras conocidas como membranas. Estas barreras de entre 5 y 15 nm de grosor están compuestas principalmente por lípidos y proteínas. Existen diferentes tipos de membranas que varían en la proporción de sus componentes, sin embargo todas tienen un arreglo básico conocido como mosaico fluido<sup>1</sup>. En este arreglo, lípidos normalmente anfifílicos, compuestos por cadenas hidrocarbonadas con grupos polares en un extremo forman una bicapa. En esta bicapa las cadenas hidrocarbonadas se encuentran orientadas hacia sí mismas y los grupos polares se encuentran en el exterior, en contacto con el medio acuoso. Las proteínas pueden estar embebidas en esta bicapa con residuos hidrofóbicos en contacto con las cadenas hidrocarbonadas y los residuos hidrofílicos protruyendo en ambas caras de la bicapa (**Fig.1.A**), asociadas a la membrana a través de modificaciones lipídicas, o bien, en contacto superficial con la membrana a través de interacciones con los grupos polares de los lípidos. Procesos críticos para la célula tales como la endocitosis, la señalización celular, o la generación de gradientes quimiosmóticos son mediados por la membrana y su estructura es clave para el funcionamiento de éstos.



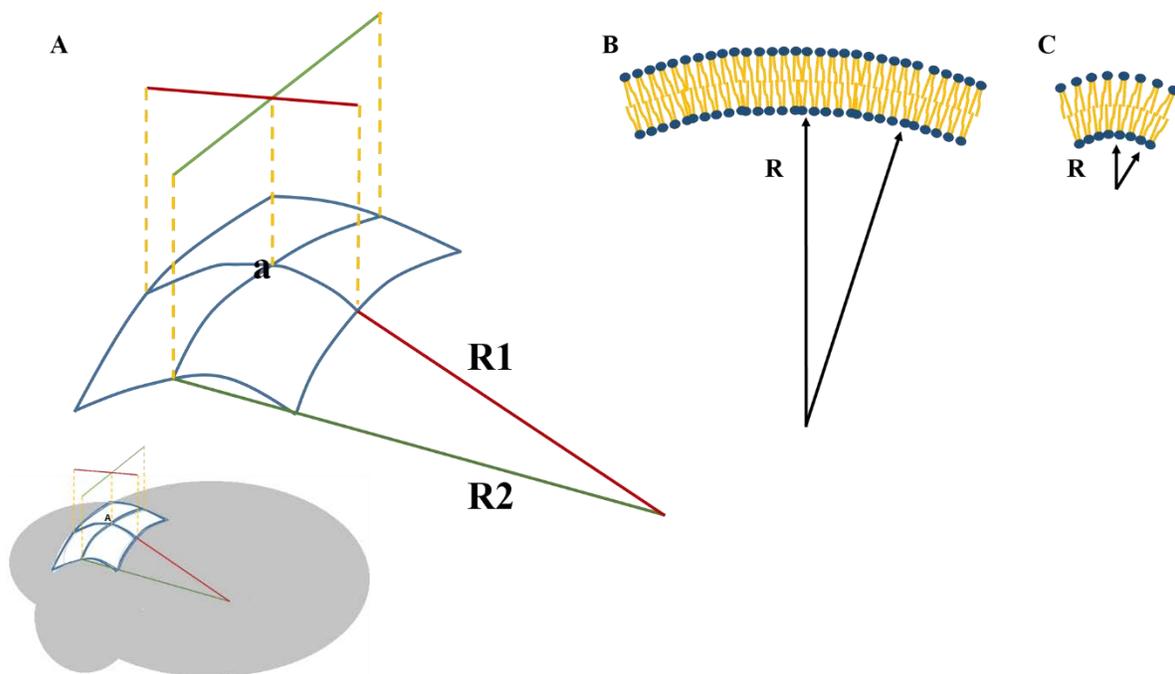
**Figura 1: Vista actual del mosaico fluido.** A Se muestra una simulación de tipo grano grueso (Coarse Grain) de una bicapa de composición lipídica binaria, en la que el lípido a (Azul) interacciona preferencialmente con la proteína embebida en la bicapa (Rojo) en comparación con el lípido b (Amarillo) [Tomada de Reynwar B *et al.*, 2008<sup>2</sup>] B Simulación de la proteína transportadora de sideróforos, FecA de *Escherichia coli* en una membrana compuesta de: lipopolisacáridos, con grupos alquilo (rosa) y carbohidratos (amarillo), 1-palmitoil 2-cis-vaccénico fosfatidil etanolamina, PVPE, (azul) y cardiolipina (naranja) [Tomada de Piggot T *et al.*, 2013<sup>3</sup>].

Las propiedades de la membrana dependen de las interacciones entre sus componentes: lípidos y proteínas. Los lípidos tienen tres papeles cruciales para la célula: almacenan energía como fuentes de poder reductor, funcionan como moléculas de señalización celular y brindan el soporte estructural de la membrana. Los lípidos membranales son moléculas anfífilas con cadenas acilo esterificadas a grupos polares. Las cadenas acilo varían en su longitud y pueden presentar insaturaciones; los grupos polares varían en su tamaño, polaridad y carga. Las interacciones entre los grupos acilo de los lípidos son interacciones tipo van der Waals, mientras que los grupos polares pueden atraerse o repelerse por sus cargas, resultando en un soporte fluido a la membrana<sup>1</sup>. Las proteínas membranales se clasificaron en un inicio de acuerdo a la facilidad de su aislamiento de la membrana, las proteínas periféricas requieren tratamientos tenues tales como cambios en la fuerza iónica, mientras que las proteínas integrales requieren tratamientos más severos, como tratamientos con detergentes<sup>1</sup>. Como se mencionó, la interacción entre las proteínas integrales y los grupos acilo de los lípidos membranales son de tipo hidrofóbico; mientras que las interacciones entre las proteínas periféricas y los grupos polares de los lípidos membranales son de tipo electrostático. Se ha estimado que la proporción de peso de proteínas entre lípidos varía entre 1.5 a 4<sup>1</sup>, de manera que la membrana es una estructura rica en proteínas en la que inicialmente se propuso, que el movimiento sobre el plano membranal era únicamente limitado por la difusión<sup>4</sup>. Sin embargo, poco tiempo después de la propuesta del mosaico fluido, se obtuvo evidencia de la segregación preferencial de algunos lípidos<sup>5</sup>, así como la existencia de dominios proteicos con longitudes en el rango de micrómetros<sup>6</sup> y la influencia del citoesqueleto sobre la difusión de lípidos sobre el plano de la membrana<sup>7</sup> (**Fig.1B**). Ahora el concepto de la estructura membranal pretende extenderse para incluir fenómenos como la influencia de proteínas sobre la conformación lipídica así como propiedades como la curvatura membranal<sup>8</sup>.

### **Curvatura membranal**

La curvatura de las membranas es un aspecto que se ha observado desde la invención del microscopio, en el que se observó que los eritrocitos cuentan con barreras, cuya forma y grosor responden a cambios en la osmolaridad del medio<sup>9</sup>. Esta propiedad es el resultado de múltiples factores, que se discutirán posteriormente, y modula procesos tales como la endocitosis, el tráfico vesicular o la fisión celular. Las bases teóricas utilizadas hasta ahora

para describir fenómenos relacionados a la curvatura membranal se asentaron en 1973, cuando Wolfgang Helffrich describió las propiedades elásticas de la membrana<sup>10</sup>. Bajo el modelo de propiedades elásticas de la membrana de Helffrich, la curvatura de una membrana se describe con dos componentes de curvatura principal,  $c_1$  y  $c_2$ , siendo  $c = 1/R$  y  $R$  el radio del espacio esférico recubierto por la membrana (**Fig.2**). Con los dos componentes de curvatura se pueden describir la curvatura total  $J$ ,  $J = c_1 + c_2$  o la curvatura Gaussiana  $\kappa = c_1 c_2$ <sup>11</sup>. Una vesícula de radio pequeño se describe como una vesícula de curvatura grande, mientras que una vesícula con un radio grande se describe como una de curvatura pequeña. De manera que la célula contiene membranas de curvaturas pequeñas, como la membrana plasmática, de diámetros en el orden de micrómetros y membranas de grandes curvaturas tales como las vesículas que transitan entre las cisternas del aparato de Golgi, de diámetros de decenas de nanómetros<sup>11</sup>.

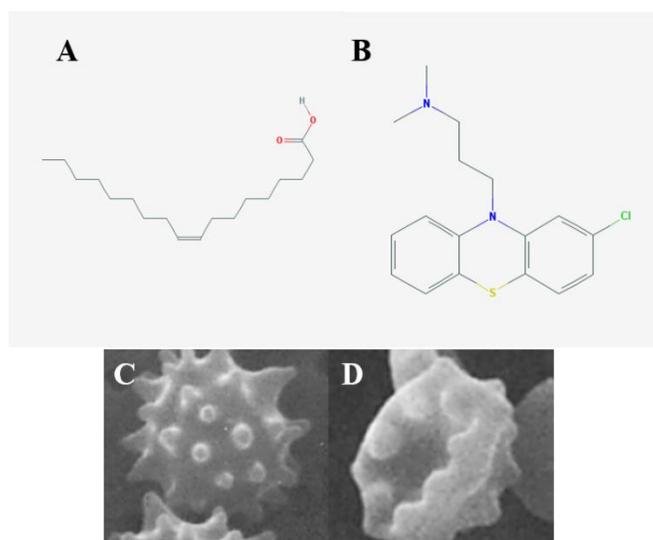


**Figura 2. Componentes de curvatura.** **A:** En una célula (Gris), la curvatura de membrana en un punto a se puede describir con dos componentes de curvatura,  $c_1$  y  $c_2$ , a su vez derivados de los radios 1 y 2,  $R_1$  y  $R_2$ . Los componentes de curvatura son inversamente proporcionales a los radios de curvatura, de manera que  $c_1 = 1/R_1$  y  $c_2 = 1/R_2$ . La curvatura principal en el punto A es la suma de  $c_1$  y  $c_2$ ,  $j = c_1 + c_2$  y la curvatura Gaussiana es el producto de los componentes  $c_1$  y  $c_2$ , de manera que  $\kappa = c_1 c_2$ . **B:** Una célula de diámetro R más grande que una con radio de menor longitud **C**, tendrá menor curvatura.

Así como en las proteínas, en las membranas la forma también dicta la función. En comparación con las proteínas, las membranas aparentan prescindir de estructura u orden. Sin embargo, la curvatura determina algunas de sus funciones. Los lípidos membranales, sus propiedades e interacciones entre ellos dictan en gran medida el tipo de curvatura que estas pueden adquirir<sup>12</sup>, a la que se ha denominado curvatura espontánea<sup>11</sup>. Como se ha establecido, las interacciones entre los lípidos dan origen a la formación de bicapas. En las células las bicapas son asimétricas en su composición lipídica, por ejemplo, en células eucariontes, el lípido fosfatidilserina es abundante en la cara intracelular, mientras que en bacterias los glucolípidos son abundantes en la cara externa<sup>13</sup>. Además de las propiedades químicas que le brindan a los lípidos sus composiciones, la composición molecular de éstos también tiene como consecuencia que cada lípido posea una geometría característica. Dependiendo de la longitud de las cadenas acilo, las insaturaciones en éstas, y el radio del grupo polar, los lípidos se pueden describir como cilindros, o conos con bases en sus grupos acilo o en sus grupos polares. La distribución asimétrica de éstos entre las caras de la bicapa tiene como consecuencia la generación de curvatura; de manera que la presencia de lípidos de geometría cilíndrica en una monocapa interna y la presencia de lípidos de forma cónica en la otra llevarán a la formación de una vesícula<sup>14</sup>. La distribución de lípidos sobre el plano de una monocapa también tiene consecuencias estructurales y funcionales para la membrana. En años recientes se ha establecido una relación entre el ordenamiento de los lípidos y la curvatura membranal, pues se demostró que lípidos en fase líquido ordenada,  $L_o$ , se segregan preferencialmente a regiones de curvatura pronunciada, tales como las puntas de proyecciones vesiculares<sup>15</sup>.

Las membranas contienen proteínas embebidas en la bicapa o adheridas a sus superficies, las interacciones entre éstas alteran la curvatura intrínseca, dando origen a las diversas estructuras membranales observadas en membranas plasmáticas y organelares. Los primeros acercamientos al estudio de la deformación de la curvatura intrínseca de la membrana se realizaron con moléculas pequeñas, tales como drogas o polímeros. Una de las primeras bases teóricas a través de la cual se ha explicado la adquisición de curvatura membranal surgió gracias a experimentos realizados con drogas anfipáticas y eritrocitos. En estos experimentos se observó el efecto de dos drogas sobre la membrana de eritrocitos, oleato (**Fig.3A**) y clorpromazina (**Fig.3B**), ambas moléculas anfipáticas, la primera con una cara polar negativa

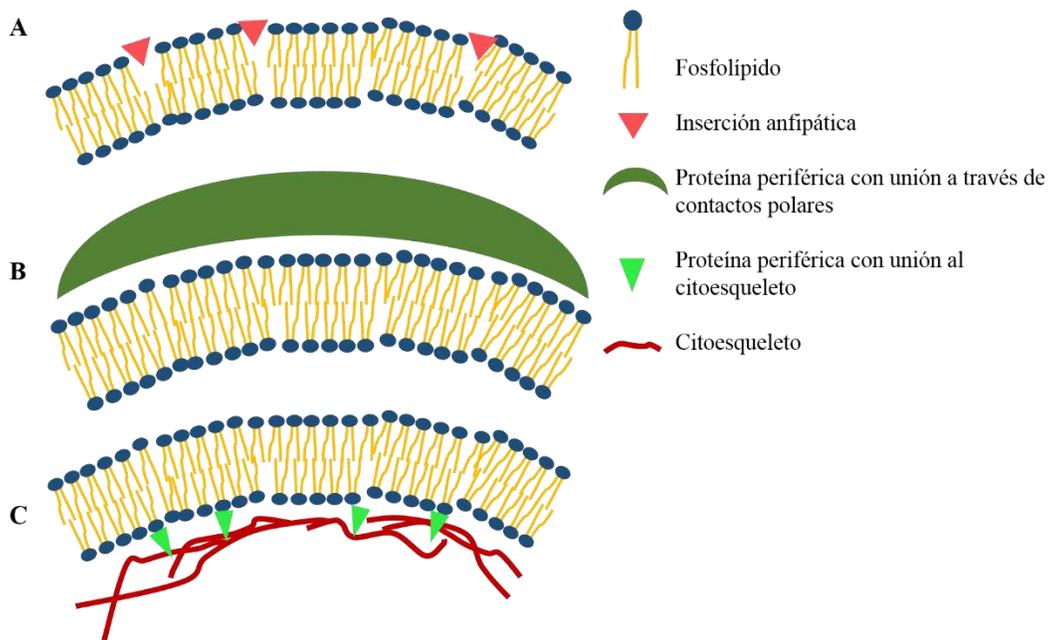
y la segunda con una cara polar positiva. La clorpromazina generó invaginaciones en la membrana de los eritrocitos (**Fig.3D**), mientras que el ácido oleico generó proyecciones de la membrana hacia el exterior<sup>16</sup> (**Fig.3C**). Estos resultados se interpretaron como la inserción de la clorpromazina con carga positiva en la cara interna de la membrana y la inserción del oleato en la cara exterior de la membrana, lo que llevó a que en el primer caso, la cara interior de la membrana adquiriera mayor área que la cara externa y en el caso de la clorpromazina a un incremento en el área de la cara externa respecto a la cara interna de la membrana. Esto a su vez, llevó a la postulación del modelo de monocapas apareadas, en el que se propuso, que la diferencia entre el área de las monocapas externa e interna resulta en una bicapa con una curvatura, por otro lado, si el área de las monocapas es idéntico, éstas estarán organizadas como una bicapa plana<sup>16</sup>. De manera similar, a través del estudio in vitro de vesículas de lípidos artificiales se ha observado la generación de morfologías similares a cuerpos membranales complejos, tales como la generación de fenestras similares al retículo endoplásmico a través de la utilización de polímeros con un esqueleto hidrofílico de dextrán acoplado a 40 cadenas de ácido palmítico<sup>17</sup>. Resulta evidente que la curvatura membranar espontánea se puede alterar generando inserciones en la membrana que alteren la diferencia entre el área de la monocapa, sin embargo, no es la única manera de lograr esto, las células cuentan con un gran número de proteínas capaces de modificar esta propiedad.



**Figura 3. Drogas anfipáticas inductoras de curvatura membranar en eritrocitos:** Se muestran las estructuras de las moléculas anfipáticas **A** ácido oleico y **B** Clorpromazina, y sus respectivos efectos sobre las membranas de eritrocitos, **C** y **D** (Imágenes tomadas de Sheetz et al. 1976<sup>16</sup>).

## Proteínas y curvatura membranal

En la propuesta inicial del modelo del mosaico fluido se le asignó un papel marginal a las proteínas transmembranales en la modulación estructura membranal y, prácticamente, se descartó la participación de las proteínas periféricas<sup>1</sup>. Sin embargo, poco tiempo después de esta propuesta se comenzó a reportar el papel que proteínas periféricas de membrana tenían sobre la movilidad de lípidos sobre el plano de la bicapa<sup>7</sup> así como los efectos de proteínas transmembranales sobre la organización de los lípidos que las rodeaban<sup>18</sup>. A pesar de que es posible generar vesículas *in vitro* con grandes curvaturas, la asimetría lipídica para generar estas estructuras es mayor a las asimetrías lipídicas que se encuentran en membranas biológicas<sup>19</sup>, lo que indica que las curvaturas membranales pronunciadas que se observan *in vivo* se generan por la acción de otras moléculas, entre ellas, las proteínas<sup>11</sup>. Ahora se conocen múltiples familias de proteínas periféricas como transmembranales capaces de deformar las membranas que unen<sup>19</sup>. La capacidad de proteínas de deformar membranas se ha descrito bajo tres modelos, a través de la aplicación de fuerzas mecánicas utilizando motores moleculares (**Fig.4C**), a través de moldes con cierta curvatura (**Fig.4B**) o a través de inserciones hidrofóbicas en la membrana (**Fig.4A**)<sup>11</sup>.



**Figura 4. Modelos de generación de curvatura membranal por proteínas:** Se muestran los modelos propuestos para explicar la generación de curvatura membranal por proteínas; A: el modelo de curvatura espontánea local, en el que una inserción en una cara de la membrana ocasiona una diferencia de áreas entre las

monocapas, por lo tanto generando curvatura; B. el modelo de moldeado, en el que una proteína periférica adherida a través de contactos polares a la membrana, impone su curvatura a ésta y C: el modelo de acoplamiento a motores moleculares, en el que la membrana se deforma por el acoplamiento a motores acoplados al citoesqueleto.

---

La confirmación experimental del modelo del mosaico fluido llegó con la primera estructura cristalográfica de una proteína transmembranal. Esta estructura reveló una proteína con dos subunidades de 5 hélices alfa ricas en residuos hidrofóbicos, propuestas como hélices transmembranales<sup>20</sup>. La obtención de estructuras cristalográficas de proteínas integrales ha confirmado la presencia de porciones hidrofóbicas que se encuentran embebidas en la membrana. La arquitectura de estas proteínas les permite participar en una gran variedad de procesos, entre los que destacan el transporte de iones, la transducción de señales extracelulares y la adhesión celular. Aunado a esto, la morfología de las regiones transmembranales puede alterar la curvatura membranal, ya que éstas pueden ocupar más área en una de las caras de la membrana, desplazando consecuentemente más lípidos en esa cara y provocando una diferencia de área de superficie entre las caras de la bicapa<sup>19</sup>. Ejemplos de la influencia de la estructura de las porciones hidrofóbicas sobre la curvatura membranal incluyen a la ATP sintasa, que mediante la inserción de sus dímeros que forman un ángulo de 86 ° entre sus monómeros genera la curvatura característica de las crestas de la membrana interna mitocondrial<sup>21</sup> y los reticulones, cuya porción hidrofóbica es de geometría cónica, importante para la formación de las cisternas del aparato de Golgi<sup>19,22</sup>. Las proteínas transmembranales también pueden generar curvatura membranal de manera indirecta, tal como lo hacen las flipasas, transportando lípidos preferencialmente hacia una cara de la membrana, por lo tanto provocando una diferencia de área de superficie entre las caras de la membrana, sin embargo, se considera que este mecanismo es escasamente empleado por la célula<sup>19</sup>.

El estudio de la relación entre proteínas periféricas y curvatura membranal surgió en parte por el estudio de la endocitosis mediada por clatrina<sup>19</sup>. A pesar de las primeras observaciones por microscopía electrónica en las que se observó la recubierta de clatrina rodeando vesículas endocíticas<sup>23</sup>, ésta no interacciona directamente con la membrana<sup>23</sup>, ni forma un molde suficientemente rígido para deformar la membrana<sup>19</sup>, por lo que se dedujo que otras proteínas

provocan la curvatura necesaria para la formación de vesículas. Las proteínas periféricas que deforman la curvatura membranal llevan a cabo este proceso a través de los tres modelos previamente mencionados y con combinaciones de éstos.

Para llevar a cabo los procesos de deformación membranal, estas proteínas tienen algunas características estructurales, tales como parches de residuos positivos, hélices alfa anfipáticas y estructuras rígidas<sup>24</sup>. Las hélices anfipáticas inicialmente se identificaron en proteínas globulares solubles, sin embargo, esta clase de motivo estructural también se encontró en proteínas asociadas a lípidos e involucradas en el transporte de estos, conocidas como Apolipoproteínas. A pesar de su alto contenido de hélices alfa, las Apolipoproteínas también poseen regiones desordenadas que en presencia de lípidos de clase negativa sufren una reestructuración que genera hélices alfa anfipáticas<sup>25</sup>. Las hélices anfipáticas, son un motivo estructural abundante, por lo que se propuso una clasificación de acuerdo a la distribución de tipos de residuos de aminoácidos en sus superficies<sup>26</sup>. Algunas de estas clases de hélices, se ha reportado, podrían resultar tóxicas pues penetrarían y crearían poros en la membrana; tal es el caso de las hélices tipo L, cuya porción hidrofóbica tiene uno de los valores más altos de hidrofobicidad, mientras que su cara polar es pequeña pero rica en residuos de aminoácidos positivos, particularmente lisinas, ejemplos de este tipo de hélices son los péptidos antimicrobianos conocidos como Magaininas<sup>26</sup>. La mayoría de las proteínas periféricas de membrana que provocan cambios en la curvatura membranal poseen hélices anfipáticas, cuya inserción en la membrana no tiene resultados tan drásticos para la célula, sino que provoca un cambio en el área de las monocapas. Existen múltiples familias de dominios estructurales tales como los dominios de homología amino-terminal de epsina, ENTH, de homología amino terminal de AP128, ANTH<sup>27</sup>, C2<sup>28</sup>, o Sec<sup>11</sup>, que inducen curvatura membranal a través de inserciones de hélices anfipáticas en la membrana, importantes para procesos como endocitosis, en el caso de los dominios ENTH y ANTH; señalización en el caso de los dominios C2 y mantenimiento de estructura de vesículas de transporte del retículo endoplásmico en el caso de la proteína Sec.

Aunado a lo anterior, existen proteínas cuyas estructuras multiméricas u oligoméricas tienen curvaturas con las que moldean la membrana a través de interacciones electrostáticas. La oligomerización sobre la membrana de las proteínas Sec23<sup>11</sup> lleva a la formación de

moldes que imponen su curvatura a la membrana. Otro ejemplo interesante de proteínas que deforman la membrana con un mecanismo de moldeado es el de la GTPasa dinamina, se ha observado la formación de arreglos espirales de esta proteína sobre el cuello de la vesícula endocítica, lo que se propone, lleva a la escisión de la membrana plasmática<sup>29</sup>. Se ha propuesto que esta oligomerización es dependiente de la unión a GTP y la disociación a la hidrólisis del GTP, sin embargo, se han generado oligómeros *in vitro* sin GTP, lo que indica que otro mecanismo lleva a la formación del arreglo espiral que escinde la vesícula endocítica<sup>30</sup>.

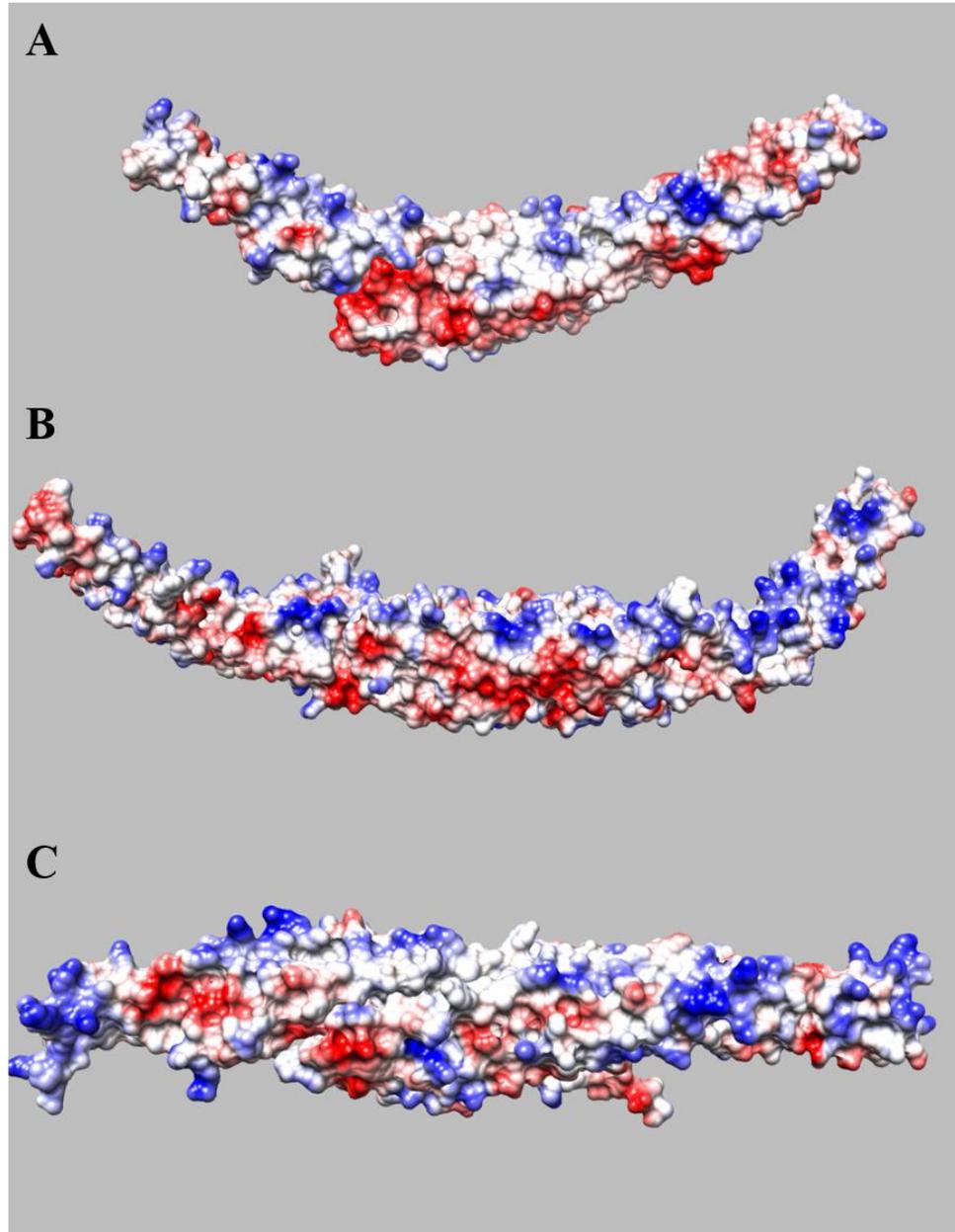
La unión entre las proteínas periféricas y la membrana es modulada por diferentes factores. Existen proteínas que reconocen específicamente algún lípido, mientras que otras proteínas únicamente reconocen la carga de los grupos polares de los lípidos y en años recientes, se han descrito proteínas cuya afinidad a la membrana es dictada por la curvatura de ésta<sup>31</sup>. Ya en 1992, se describía la relación entre la curvatura de vesículas lipídicas y la unión de péptidos. Se describió un cambio en los componentes termodinámicos de asociación entre un péptido derivado de la somatostatina y vesículas que era dependiente de la curvatura de éstas; entre más pequeñas eran las vesículas, la unión era favorecida principalmente por el componente entálpico, mientras que en vesículas de mayor diámetro, esto es de menor curvatura; la asociación tenía un componente entrópico más favorable<sup>32</sup>. Si bien, con esto se estableció el efecto que tendría la curvatura membranal sobre la adsorción de péptidos en ella, la primer familia de proteínas que se reportó que podría reconocer ésta propiedad de la membrana fue la familia BAR<sup>33</sup>.

### **Superfamilia BAR**

El aislamiento del gen de Bin1, o Anfifisina II en humano llevó a la definición de una nueva familia de proteínas relacionadas con el control del ciclo celular<sup>34</sup>. Reportes previos describían a este gen como una isoforma más de Anfifisina, sin embargo se identificó a este gen en un locus diferente al de Anfifisina<sup>35</sup>. Al aislar la secuencia de Bin1, se identificó una secuencia homóloga de alrededor de 270 residuos de aminoácidos en el extremo 5' de los genes Anfifisina I y RVS, por lo que se le denominó dominio Bin Anfifisina Rvs, BAR<sup>34</sup>. En esta superfamilia hoy se incluyen un gran número de proteínas que comparten un extremo amino homólogo y participan en procesos relacionados a la estructura membranal<sup>36</sup>. Sin

embargo, el dominio BAR no es el único común denominador entre estas proteínas, también lo es un dominio de interacción proteica SH3 en el extremo carboxilo<sup>36</sup>. De manera que las proteínas de esta familia poseen por lo menos dos módulos funcionales, uno de interacción membranal y el otro de interacción proteína-proteína, representando nodos de comunicación entre estas dos clases de procesos<sup>37</sup>.

Se predecía que el dominio BAR de Anfifisina II sería un dominio rico en hélices alfa, sin embargo no se conocía su estructura<sup>38</sup>. En 2004, se obtuvo la estructura cristalográfica del dominio BAR de Anfifisina de *Drosophila melanogaster*<sup>33</sup>, la primer estructura de un dominio de esta familia. Esta estructura confirmó las predicciones estructurales previas pues el dominio presentaba una estructura terciara de tres hélices alfa organizadas en hélices entrelazadas, "coiled coils", formando dímeros con una interface cóncava rica en residuos positivos y con una interfaz de contacto entre los monómeros rica en residuos hidrofóbicos. La súperfamilia BAR ha crecido, de manera que existen depositadas en el banco de estructuras de proteínas, PDB, alrededor de 40 estructuras de diferentes dominios BAR. En todas estas estructuras están presentes las tres hélices alfa, sin embargo las proteínas de esta familia se han clasificado en familias de acuerdo a las características estructurales de sus dominios BAR, considerando principalmente la curvatura de sus dímeros<sup>36</sup> (**Fig.5**). Tomando en cuenta esta característica, se han delimitado 4 sub-familias: 1) I-BAR, cuya cara convexa es rica en residuos de aminoácidos positivos (**Fig.5C**); 2) F-BAR cuyos dímeros forman estructuras planas en vez de curvas (**Fig.5B**)<sup>36</sup>; 3) BAR, con dímeros de curvaturas pronunciadas, esto es, diámetros de entre 20 y 50 nm y 4) N-BAR (**Fig.5A**) que además de las tres hélices alfa con curvaturas pronunciadas, cuentan con secuencias de entre 40 y 30 residuos de aminoácidos que carecen de estructura secundaria y en presencia de lípidos de carga negativa se estructuran en hélices alfa anfipáticas.



**Figura 5. Dominios de la superfamilia BAR:** Se muestran las estructuras de dímeros de tres diferentes dominios BAR obtenidas por cristalografía de rayos X y su distribución de cargas en la superficie: **A)** el dominio N-BAR de Anfisina I/ Bin1 (PDB: 2FIC). **B)** el dominio F-BAR de Pacsina2 (PDB: 3Q0K) y **C)** el dominio I-BAR de IRSp53 (PDB: 2YKT). Los monómeros se muestran en negro y gris, los residuos de aminoácidos de carga positiva se muestran en azul y en rojo los de carga negativa. (Imagen generada con el programa Chimera)

### **Dominios N-BAR y curvatura membranal**

Estos dominios deforman membranas al unir las y a su vez, la curvatura de éstas determina la afinidad de un dominio a una membrana. En el caso del dominio BAR de Anfifisina de *D. melanogaster*, se demostró que éste consiste de dímeros que forman un arco con una curvatura correspondiente a un diámetro de 220 Å, capaz de deformar liposomas en túbulos con diámetros de alrededor de 50 nm<sup>33</sup>. Esta estructura dimérica con forma de arco parecía indicar que la curvatura sería un factor determinante en la unión de este tipo de proteínas a la membrana<sup>33</sup>. Se demostró que la estructura obtenida no funge únicamente como un efector de curvatura membranal, sino que también funge como un detector de esta propiedad, dado que se observó que el dominio BAR unía con mayor afinidad vesículas de 50 nm respecto a vesículas de 100 nm<sup>33</sup>. Esto revelaba que los dominios BAR no sólo reconocen la carga de la membrana, sino también su curvatura.

La estructura cristalográfica del dominio BAR de Anfifisina de *D. melanogaster* carece de los primeros 34 residuos. Ahora se sabe que este segmento adquiere estructuras alfa helicoidales anfipáticas en presencia de lípidos de carga negativa y es capaz de deformar liposomas en túbulos con diámetros menores a 50 nm<sup>39</sup>. Esta clase de segmentos, se han encontrado en otros dominios BAR, lo que llevó a la denominación de la familia N-BAR, dominios BAR con regiones desordenadas que adquieren estructuras alfa helicoidales en presencia de lípidos de carga negativa.

En los dominios N-BAR existe un balance entre la formación de túbulos y la fisión de membranas. Esto se debe a la naturaleza de estos dominios, que además de contar con dímeros de geometría arqueada, cuentan con regiones desordenadas que se estructuran en hélice alfa en presencia de lípidos con carga negativa. Estos módulos ejercen funciones diferentes, los dímeros favorecen la formación y estabilización de túbulos que varían de diámetros entre 20 y 50 nm, mientras que las hélices anfipáticas desestabilizan membranas y favorecen la fisión membranal a través de inserciones en una de las caras de la membrana<sup>40</sup>. De manera que el dímero de geometría arqueada contrarresta la desestabilización membranal que provoca la inserción de hélices anfipáticas, previniendo un la fragmentación de membranas y generación de vesículas a partir de éstas.

Como se mencionó, se ha reportado la afinidad del dominio BAR por vesículas de diámetros pequeños<sup>33</sup>. Esta clase de selectividad de proteínas se ha explicado bajo dos mecanismos, el primer mecanismo propone que la interfaz de proteínas o regiones de una proteína con una curvatura intrínseca podrían unir membranas con mayor afinidad de acuerdo a la curvatura que presenten<sup>33</sup>. El segundo mecanismo propone que regiones desordenadas de proteínas son esenciales para que una proteína pueda detectar curvatura. En este mecanismo se propone que las regiones desordenadas adquieren conformaciones de hélices anfipáticas en presencia de lípidos con carga negativa y estas hélices se insertarán en la membrana dependiendo de los "defectos" de ésta, esto es, del empaquetamiento de los lípidos en la membrana. Bajo esta propuesta, una bicapa plana no tendrá defectos que puedan ser utilizados por hélices anfipáticas para su inserción y una membrana tendrá más defectos o un menor grado de empaquetamiento lipídico mientras mayor sea su curvatura, permitiendo así la inserción de esta clase de hélices<sup>41</sup>. La capacidad de detectar curvatura membranar de los dominios N-BAR se ha demostrado *in vivo* y se le ha atribuido a la hélice 0, ya que en cultivos crecidos en cajas con nanoestructuras que inducen invaginaciones en las células, se demostró un reclutamiento del dominio N-BAR de endofilina a estas regiones que se abatía al eliminar la secuencia de la hélice 0<sup>42</sup>. Los dominios N-BAR, resultan de particular interés para el estudio de la relación entre las proteínas y la curvatura membranar, pues cuentan con dos módulos funcionales relacionados a la curvatura membranar, un efector y un sensor de curvatura.

### **Curvatura membranar en procesos patológicos**

El mal de Parkinson se caracteriza por la presencia de agregados en neuronas conocidos como cuerpos de Lewy. Estos agregados, se sabe, incluyen proteínas tales como glutatión transferasa, derivada de la mitocondria<sup>43</sup>, ubiquitina<sup>44</sup> y alfa sinucleína<sup>45</sup>. También incluyen lípidos, como esfingomielina y fosfolípidos<sup>46</sup>. La presencia de lípidos en estos agregados así como la afinidad de alfa sinucleína por lípidos de carga negativa<sup>47</sup>, han llevado a la formulación del planteamiento de que esta patología tenga su inicio en la actividad descontrolada de la alfa sinucleína, la cual se ha demostrado es capaz de vesicular liposomas de lípidos de carga negativa<sup>48</sup>. Esta actividad sin control, se propone, lleva a la ruptura de organelos y a la liberación de metabolitos nocivos, provocando lesiones neuronales<sup>48</sup>.

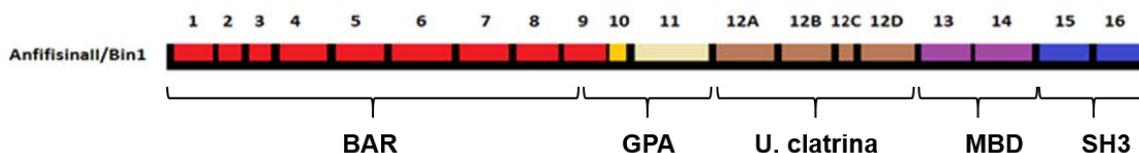
Por otro lado, se han reportado inserciones y ablaciones en la secuencia del dominio BAR de la proteína oligofrenina<sup>49,50</sup>. Esta proteína tiene un patrón de expresión ubicuo, con mayores niveles de expresión en tejido neuronal y se ha asociado al retraso mental ligado al cromosoma X<sup>51</sup>. La generación de una isoforma que carece de 37 residuos de aminoácidos del dominio BAR de oligofrenina se detectó en una familia con retraso mental ligado al cromosoma X y se observó que esta ablación lleva a una morfología anormal del hipocampo<sup>50</sup>. Se propuso que esta ablación en el dominio BAR inhibe la capacidad de Oligofrenina de interactuar con la membrana y, por lo tanto, con otras proteínas de la maquinaria endocítica, sujetas a su control de proteína RhoGAP<sup>50</sup>.

### **Bin1/Anfifisina II**

Bin1 o Anfifisina II fue la primera proteína descrita de la superfamilia BAR. Como se mencionó, en 1997 se aisló y reportó la secuencia de Anfifisina II como una isoforma de la proteína Anfifisina I<sup>52</sup>, involucrada en el reciclaje de vesículas postsinápticas<sup>53</sup>. También, se reportó el hallazgo de diferentes proteínas, como SH3P9<sup>54</sup>, Amphiphysin-Like-Protein, ALP-1<sup>55</sup>, Anfifisina II<sup>56</sup> o Bin1<sup>34</sup>; sin embargo, se demostró que estos trabajos reportaban isoformas de un gen diferente a Anfifisina I, localizado en el cromosoma 2q14 en humano<sup>35</sup>.

Anfifisina II/Bin1 cuenta con 5 dominios estructurales, cuyas secuencias sufren modificaciones por edición de intrones tejida específica (**Fig.6**)<sup>34</sup>. Los dominios estructurales de Bin1/Anfifisina II son el dominio BAR, el dominio GPA, el dominio de unión a clatrina, el dominio de unión a c-Myc y el dominio de interacción de proteptinas, SH3. La única modificación por edición de intrones que sufre la secuencia del dominio BAR es la inserción de una porción del intrón 6<sup>38,52,55-57</sup>. El dominio GPA es exclusivo de la familia de las anfifisinas, comprende los exones 9 a 11, de los cuales el exón 10 únicamente es observado en tejido muscular, confiriéndole afinidad y especificidad hacia PI(4,5)P<sub>2</sub> a Anfifisina II<sup>34</sup>. El dominio de unión a clatrina es codificado por el exón 12, que tiene versiones de la A a D, de los cuales, el exón 12A se detecta tanto en tejido neuronal como en líneas celulares tumorales y los exones 12B-12D se detectan exclusivamente en tejido neuronal. El dominio de unión a MYC, MBD (por sus siglas en inglés, MYC Binding Domain) está conformado por los exones 13 y 14, de éstos, el exón 13 sufre corte y empalme alternativo aparentemente desregulado, ya que se observan en misma proporción isoformas

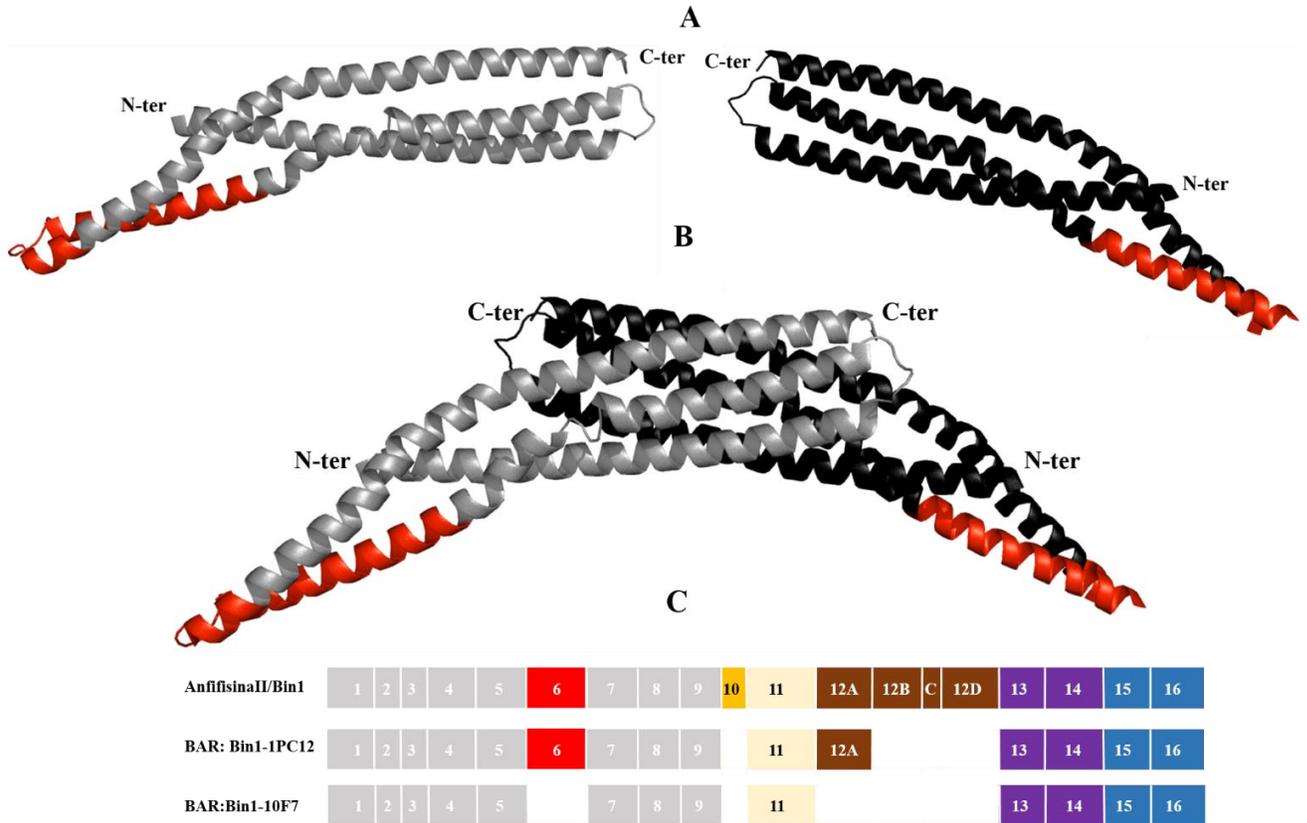
con su presencia o ausencia. El dominio de interacción SH3 está conformado por los exones 15-16 y no sufre ediciones postranscripcionales<sup>34</sup>. La generación de isoformas de Bin1/Anfifisina II resulta en una gama de proteínas involucradas en diferentes procesos pues sus interacciones con la membrana y con otras proteínas se modifican por la edición de intrones.



**Figura 6. Composición exónica de Anfifisina II/Bin1:** Se muestran los exones de Anfifisina II/Bin1 y los dominios estructurales que conforman. La región comprendida por los exones 1-9 es el dominio de dimerización e interacción membranal BAR, el exón 10 le confiere afinidad a fosfatidil inositol (4,5) bifosfato, PIP2(4,5), el exón 11 comprende una secuencia única de anfifisinas, los exones 12A a 12D se localizan en tejido neuronal y participan en la interacción con clatrina, los exones 13 y 14 conforman el dominio de unión a c-Myc, MBD, y los dominios 15 y 16 conforman el dominio de interacción SH3.

La identificación de este gen que comparte una región con proteínas relacionadas a la endocitosis y, a su vez, contiene un dominio de unión al oncogén c-Myc representa un punto de conexión importante entre estos dos procesos. Su participación en el control del ciclo celular a través de la inhibición del factor transcripcional c-Myc es evidente pues la expresión de Bin1 se abate en líneas celulares tumorales así como en tumores y su expresión en células transformadas revierte su fenotipo canceroso, confirmando su papel como gen supresor de tumores. La alta similitud con Anfifisina I llevó a postular a este gen como participante en la endocitosis. Sin embargo, experimentos en los que a través de ingeniería genética se abatió su expresión, no presentaron fenotipos de endocitosis aberrante. A pesar de esto, su participación en la regulación de la estructura membranal es claro pues existen isoformas que regulan la morfología de membranas internas de tejido muscular para formar los túbulos T<sup>58</sup>. Por otro lado, la sobreexpresión de Anfifisina II como Anfifisina en células COS-7 llevó a niveles disminuidos de endocitosis de transferrina que se reestablecían cuando se sobreexpresaban ambas proteínas<sup>57</sup>. De manera que en Anfifisina II participa en la endocitosis actuando en conjunto con Anfifisina I, a través de su dominio BAR, con el cual, se postula detecta curvatura membranal en el cuello de la vesícula endocítica.

Nuestro equipo de trabajo aisló dos isoformas de Bin1/Anfifisina II, la isoforma Bin1-1PC12 fue aislada de células PC12 de feocromocitoma de rata, que como isoforma de tejido canceroso incluye la inserción aberrante del exón 12A y la isoforma Bin1-10F7, que se obtuvo de la línea celular de ovario de hámster chino transfectada con el receptor pepenador, CHO-F7, que resulta novedosa pues posee la configuración exónica de isoformas de expresión ubicua, pero carece del exón 6<sup>59</sup> (**Fig.7C**). El exón 6 codifica una región con alta concentración de residuos de carga positiva que une las hélices 2 y 3 del dominio (**Fig.7A,B**). De hecho, esta región comprende uno de los parches de carga positiva con los que el dominio BAR interacciona con las cargas negativas de la membrana. La hélice 3 del dominio BAR es importante para la estructura y función del dominio BAR, pues estudios en los que se han eliminado los 13 residuos del extremo carboxilo de esta hélice han resultado en la pérdida de la capacidad de dimerización del dominio<sup>60</sup>. De manera similar, estudios en los que se ha introducido un giro de hélice alfa más entre las hélices 2 y 3 ha resultado en dominios BAR que retienen su estructura y su capacidad de unión a liposomas pero que son deficientes en la formación de túbulos. Más aún, el estudio del dominio BAR de Anfifisina de *D. melanogaster* en el que se realizaron mutaciones en los residuos positivos del asa entre las hélices 2 y 3 produjeron dominios BAR incapaces de formar túbulos<sup>33</sup>. Considerando que el dominio BAR de la isoforma Bin1-10 F7 contiene la hélice 0, la cual se ha demostrado es capaz de vesicular liposomas y que también retiene el exón 7, que contiene residuos de aminoácidos críticos para la formación de dímeros, nuestro equipo de trabajo ha formulado la siguiente hipótesis:



**Figura 7. Isoformas de Anffisina II/Bin1:** **A)** Se muestra la estructura cristalográfica de los monómeros del dominio N-BAR de Anffisina II/Bin1 de humano. En gris y negro se muestran los monómeros del dominio, en rojo se indica la porción de los monómeros codificada por la secuencia del exón 6 y se indican los extremos amino terminal, **N-ter** y carboxilo terminal, **C-ter**. **B)** Se muestra el homodímero del dominio N-BAR de Anffisina II/Bin1. **C)** Se muestran todos los exones del gen de Anffisina II/Bin1 así como de las isoformas Bin1-10F7 y Bin1-1PC12, en gris se indican los exones codificantes para la secuencia del dominio BAR, en amarillo se indica el exón 10, en rosado el exón 11, en café los exones codificantes para la secuencia del dominio de unión a clatrina, en morado el dominio MBD y en azul el dominio SH3.

## **Hipótesis**

**La ausencia del exón 6 en el dominio BAR resultará en un dominio deficiente en su capacidad de generación de estructuras tubulares a partir de arreglos lipídicos.**

## **Objetivo**

- ❖ Llevar a cabo la comparación estructural y funcional de los dominios BAR de las isoformas Bin1-1PC12 y Bin1-10F7.

## **Objetivos particulares**

- ❖ La sobreexpresión de los dominios BAR de las isoformas Bin1-1PC12 y Bin1-10F7.
- ❖ El aislamiento de los dominios BAR de las isoformas Bin1-1PC12 y Bin1-10F7.
- ❖ El análisis de la capacidad de reorganización de vesículas por ambos dominios BAR.

## Metodología

Las secuencias de los dominios BAR obtenidas en el laboratorio se clonaron para su sobreexpresión en cepas de la bacteria *Escherichia coli*, *E. coli* aptas para la expresión de proteínas recombinantes. Se prosiguió a obtener protocolos de purificación de las proteínas recombinantes empleando métodos cromatográficos. Las proteínas purificadas fueron utilizadas para analizar su capacidad de interacción y deformación de vesículas lipídicas a través de ensayos de absorbancia y microscopía electrónica; así como su capacidad de estructuración en presencia de lípidos negativos.

## Biología Molecular

### Diseño de construcciones

Se utilizaron las secuencias de los exones 1-9 de Anfifisina II de rata. A pesar de que los transcritos Bin1-1PC12 y Bin1-10F7 fueron aislados en tejidos de rata y hámster, respectivamente, las secuencias codifican proteínas con dominios BAR cuya única diferencia es la ausencia del exón 6 en el caso de Bin1-10F7 (Figs. 8,9)

```
Bin1PC12      ATGGCAGAGATGGGGAGCAAGGGGGTGACGGCGGGGAAGATCGCAAGCAATGTTTCAGAAG 60
Bin1CHOF7    ATGGCAGAGATGGGGAGCAAGGGGGTGACGGCGGGGAAGATCGCCAGCAACGTACAGAAG 60
*****

Bin1PC12      AAGCTGACTCGAGCTCAGGAGAAGGTCTGCAGAACTGGGGAAGGCGGATGAAACGAAG 120
Bin1CHOF7    AAGCTGACCCGAGCGCAGGAGAAGGTCTGCAGAACTGGGGAAGGCGGATGAGACTAAG 120
*****

Bin1PC12      GATGAGCAGTTTGAACAGTGCCTCCAGAATTTCAATAAGCAGCTGACAGAGGGCACCCGG 180
Bin1CHOF7    GATGAGCAGTTTGAAGCAGTGTGTCCAGAACTTCAATAAGCAGCTGACAGAGGGCACCCGG 180
*****

Bin1PC12      CTGCAGAAGGATCTTCGGACCTACCTGGCTTCTGTTAAAGCCATGCACGAAGCCTCCAAG 240
Bin1CHOF7    CTGCAGAAGGATCTCCGCACCTACCTGGCTTCTGTTAAAGCCATGCACGAAGCCTCCAAG 240
*****

Bin1PC12      AAGCTGAGTGAGTGTCTCCAGGAGGTATATGAGCCCGAGTGGCCTGGCAGGGATGAAGCG 300
Bin1CHOF7    AAGCTGAGTGAGTGTCTCCAGGAGGTATATGAGCCCGAGTGGCCTGGCAGGGATGAAGCA 300
*****

Bin1PC12      AACAGATAGCAGAGAACCAATGACCTGCTATGGATGGACTATCACCAGAAGCTGGTGGAC 360
Bin1CHOF7    AACAGATTGCAGAGAACCAATGACCTACTATGGATGGACTACCACCAGAAGCTGGTGGAT 360
*****

Bin1PC12      CAGGCTCTGCTGACCATGGATACCTACCTGGGCCAGTCCCTGATATCAAGTCACGCATT 420
Bin1CHOF7    CAGGCTCTGCTGACCATGGACACCTACCTGGGCCAGTCCCTGACATTAAG----- 411
*****

Bin1PC12      GCCAAGCGGGGGCGAAGCTGGTGGACTACGACAGCGCCCGGCACCACTATGAGTCTCTT 480
Bin1CHOF7    -----

Bin1PC12      CAAACCGCCAAAAGAAGGATGAAGCCAAATTGCCAAGGCAGAAGAGGAGCTCATCAA 540
Bin1CHOF7    -----GCAGAGGAGGAGCTCATCAA 432
*****
```

```

Bin1PC12      GCCCAGAAGGTGTTTCGAGGAGATGAATGTGGACCTGCAGGAGGAGCTGCCATCCCTGTGG 600
Bin1CHOF7     GCCCAGAAGGTGTTTTCGAGGAGATGAATGTGGACCTACAGGAGGAGCTGCCATCCCTGTGG 492
*****

Bin1PC12      AACAGCCGTGTGGGTTTCTATGTCAACACGTTCCAGAGCATCGCGGGTCTGGAGGAAAAC 660
Bin1CHOF7     AACAGCCGTGTAGGTTTCTATGTCAACACGTTCCAGAGCATCGCGGGTCTGGAGGAAAAC 552
*****

Bin1PC12      TTCCATAAAGAGATGAGTAAGCTCAATCAGAACCTCAATGATGTCCTGGTCAGCCTAGAG 720
Bin1CHOF7     TTCCATAAAGAGATGAGTAAGCTCAATCAGAACCTCAATGATGTCCTGGTCAGCCTAGAG 612
*****

Bin1PC12      AAGCAACACGGGAGCAACACCTTCACAGTCAAGGCCAGCCAGTGCAGCGCCCTGAA 780
Bin1CHOF7     AAGCAACATGGGAGCAACACCTTCACAGTCAAGGCCAGCCAGTGCAGCGCCCTGAA 672
*****

Bin1PC12      AAAGGGAACAAGAGCCCTTCACCTCCTCCAGATGGTTCCCCTGCTGCTACCCCTGAGATC 840
Bin1CHOF7     AAAGGGAACAAGAGCCCTTCACCTCCTCCAGATGGTTCCCCTGCTGCTACCCCTGAGATC 732
*****

Bin1PC12      AGAGTGAACCATGAGCCAGAGCCGGCCAGTGGGGCATCGCCTGGGGCTACCATCCCCAAG 900
Bin1CHOF7     AGAGTGAACCATGAGCCAGAGCCGGCCAGTGGGGCCATCGCCTGGGGCTACCATCCCCAAG 792
*****

Bin1PC12      TCCCCATCTCAGCTCCGAAAGGCCACCGGTCCCTCCGCCTCCCAAACACACCCCATCC 960
Bin1CHOF7     TCCCCATCCCAG-----AGCTCTCTTCCCGCCGTGGTGGTGGAG 804
*****

Bin1PC12      AAGGAGATGAAGCAGGAGCAGATTCTCAGCCTTTTTGATGACGCATTTGTCCCTGAGATC 1020
Bin1CHOF7     -----

Bin1PC12      AGCGTGACCACCCCCTCCCAGCCAGCAGAGGCCCTCCGAGGTGGTGGTGGAAACCCAGGAG 1080
Bin1CHOF7     -----

Bin1PC12      CCAGGGGAGACAGCAGCCAGTGAAGCGACCTCCAGCTCTCTCCCGGCTGTGGTGGTGGAG 1140
Bin1CHOF7     -----AGCTCTCTTCCCGCCGTGGTGGTGGAG 831
*****

Bin1PC12      ACCTTCTCAGCAACTGTGAATGGCGCCGTGGAGGGCAGCACTACGACTGGAACGCTTGGAT 1200
Bin1CHOF7     ACCTTCTCAGCAACTGTGAATGGCGCCGTGGAGGGCAGCAGTGGGACTGGCGCTTGGAC 891
*****

Bin1PC12      CTGCCCCCGGGATTTCATGTTCAAGGTGCAAGCCCAGCATGATTACCGCCACTGACACT 1260
Bin1CHOF7     ATGCCCCCGGGCTTTCATGTTCAAGGTGCAAGCCCAGCAGATTATACCGCCACTGACACT 951
*****

Bin1PC12      GACGAGCTGCAACTCAAAGCTGGCGATGTGGTACTGGTATCCCTTCCAGAACCCAGAG 1320
Bin1CHOF7     GATGAACTTCAAACTCAAAGCTGGGTGATGTGGTGTGGTATCCCTTCCAGAACCCAGAG 1011
** * * *

Bin1PC12      GAGCAGGATGAAGGCTGGCTCATGGGTGTGAAGGAGAGCGACTGGAATCGGCACAAAGAA 1380
Bin1CHOF7     GAGCAGGATGAAGGCTGGCTCATGGGAGTGAAGGAGAGCGACTGGAACCCAGCACAAGAA 1071
*****

Bin1PC12      CTGGAGAAATGCCGCGCGTCTTCCCGGAGAAATTCACAGAGCGGGTG 1428
Bin1CHOF7     CTGGAGAAATGCCGCGCGTCTTCCCGGAGAAATTCACAGAGCGGGTG 1119
*****

```

**Figura 8: Alineamiento de secuencias nucleotídicas:** Se muestra el alineamiento obtenido por el programa ClustalW de las secuencias nucleotídicas de Bin1-1PC12 y Bin1-10F7. En verde se muestran los nucleótidos C, T y G, y en rojo se muestran el nucleótido A. La identidad entre los nucleótidos se indica con un asterisco \*.



**Figura 9: Alineamiento de secuencias proteicas.** Se muestra el alineamiento obtenido por el programa ClustalW de las secuencias de las proteínas de Bin1-IPC12 y Bin1-10F7. En gris se resalta la secuencia de la hélice 0 y en amarillo se indica el resto de la secuencia del dominio BAR. La identidad se muestra con un asterisco \*.

Las secuencias correspondientes a los aminoácidos se enviaron a la compañía Genscript para el diseño de secuencias nucleotídicas modificadas de manera que estas puedan ser traducidas de manera más eficiente en *E. coli*. (Fig.10). La optimización de codones se realizó cambiando codones utilizados comúnmente en células eucariontes por codones más utilizados por *E. coli*.

```

N-BAR completo
>NBARcomp
ATGGCAGAGATGGGGAGCAAGGGGGTGACGGCGGGGAAGATCGCAAGCAATGTTTCAGAAGAAGCTGA
CTCGAGCTCAGGAGAAGGTCTCGCAGAACTGGGGAAGGCGGATGAAACGAAGGATGAGCAGTTCGA
ACAGTGCGTCCAGAATTTCAATAAGCAGCTGACAGAGGGCACCCGGCTGCAGAAGGATCTTCGGACC
TACCTGGCTTCTGTAAAGCCATGCACGAAGCCTCCAAGAAGCTGAGTGAGTGTCTCCAGGAGGTGT
ATGAGCCTGAGTGGCCTGGCAGGGATGAAGCGAACAAGATAGCAGAGAACAATGACCTGCTATGGAT
GGACTATCACCAGAAGCTGGTGGACCAGGCTCTGCTGACCATGGATACCTACCTGGGCCAGTTCCTT
GATATCAAGTCACGCATTGCCAAGCGGGGGCGGAAGCTGGTGGACTACGACAGCGCCCGGCACCACT
ATGAGTCTCTTCAAACCGCCAAAAAGAAGGATGAAGCCAAAATTGCCAAGGCAGAAGAGGAGCTCAT
CAAAGCCCAGAAGGTGTTTCGAGGAGATGAATGTGGACCTGCAGGAGGAGCTGCCATCCCTGTGGAAC
AGCCGTGTGGGTTTCTATGTCAACACGTTCCAGAGCATCGCGGGTCTGGAGGAAAACCTCCATAAAG
AGATGAGTAAGCTCAATCAGAACCTCAATGATGTCCTGGTCAGCCTAGAGAAGCAACACGGGAGCAA
CACCTTACAGTCAAGGCCAGCCCTGA
>NBARcomp
MAEMGSKGVTAGKIASNVQKKLTRAQEKVLQKLGKADETKDEQFEQCVQNFNKQLTEGTR
LQKDLRITYLASVKAMHEASKKLSECLQEVYEPWPGRDEANKIAENNDLLWMDYHQKLV
QALLTMDTYLGQFPDIKSRIAKRGRKLVVDYSARHHYESLQTAKKKDEAKIAKAEELIK
AQKVFEE MNVDLQEELPSLWNSRVGFYVNTFQSIAGLEENFHKEMSKLNQNLNDVLSLE
KQHGSNTFTVKAQP-

```

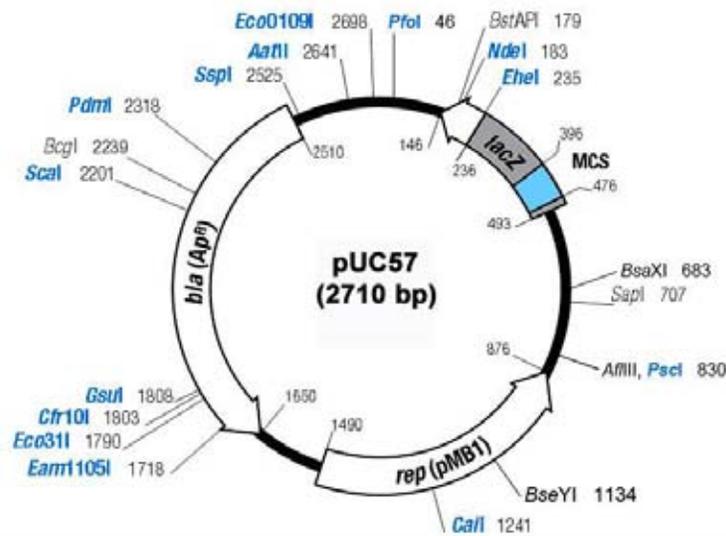
```

N-BAR-6
>NBAR-6
ATGGCAGAGATGGGGAGCAAGGGGGTGACGGCGGGGAAGATCGCCAGCAACGTACAGAAGAAGCTGA
CCCAGAGCGCAGGAGAAGGTCCTGCAGAAACTGGGGAAGGCGGATGAGACTAAGGATGAGCAGTTTGA
GCAGTGTGTCCAGAACTTCAATAAGCAGCTGACAGAGGGGCACCCGGCTGCAGAAGGATCTCCGCACC
TACCTGGCTTCTGTAAAGCCATGCACGAAGCCTCCAAGAAGCTGAGTGAGTGTCTCCAGGAGGTAT
ATGAGCCCGAGTGGCCTGGCAGGGATGAAGCAAACAAGATTGCAGAGAACAATGACCTACTATGGAT
GGACTACCACCAGAAGCTGGTGGATCAGGCTCTGCTGACCATGGACACCTACCTGGGCCAGTTCCTT
GACATTAAGGCAGAGGAGGAGCTCATCAAAGCCAGAAGGTGTTTGAGGAGATGAATGTGGACCTAC
AGGAGGAGCTGCCATCCCTGTGGAACAGCCGTGTAGGTTTCTATGTCAACACGTTCCAGAGCATCGC
GGGTCTGGAGGAGAAGCTCCATAAAGAGATGAGTAAGCTCAATCAGAACCTCAATGACGTCCTGGTC
AGCCTAGAGAAGCAACACGGGAGCAACACCTTCACAGTCAAGGCCAGCCCTGA
>NBAR-6
MAEMGSKGVTAGKIASNVQKKLTRAQEKVLQKLGKADETKDEQFEQCVQNFNKQLTEGTR
LQKDLRITYLASVKAMHEASKKLSECLQEVYEPWPGRDEANKIAENNDLLWMDYHQKLVD
QALLTMDTYLGQFPDIKAEELIKAQKVFEEMNVDLQEELPSLWNSRVGFYVNTFQSIAG
LEENFHKEMSKLNQNLNDVLSLEKQHGSNTFTVKAQP-

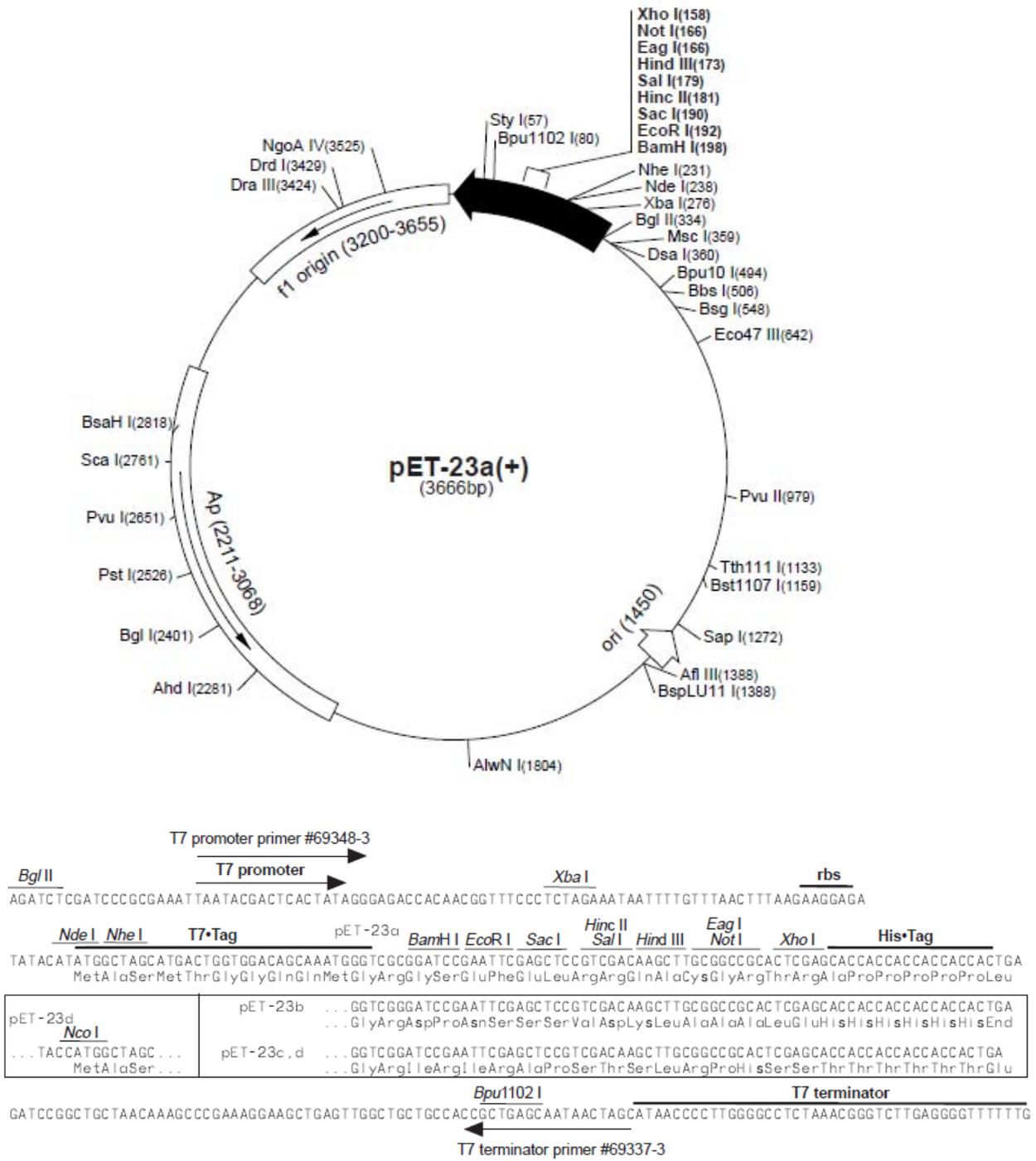
```

**Figura 10: Secuencias de los genes sintéticos obtenidos de la compañía Genscript.** Se muestran las secuencias nucleotídicas enviadas por la compañía Genscript y su traducción, *in silico*.

La compañía Genscript envió las construcciones en el vector de clonación pUC57 (**Fig.11**). Las secuencias codificantes para los dominios BAR y BAR  $\Delta 6$  se liberaron de este vector utilizando las enzimas de restricción BamHI y HindIII, para ser clonadas en el vector de expresión pET23 procesado con las mismas enzimas de restricción. El vector pET23 cuenta con un promotor dependiente de la RNA polimerasa del fago T7 (**Fig.12**).



**Figura 11: Vector de clonación pUC57.** Se muestran los sitios de restricción del vector, en azul se indica el sitio de clonación múltiple, MCS.



**pET-23a-d(+) cloning/expression region**

Figura 12: Vector de expresión pET23. Se muestran los sitios de restricción del vector.

### **Preparación de bacterias competentes.**

Se inocularon 5 mL de medio SOB con cepas de *E. coli* conservadas en glicerol al 50 % a -70 ° C, se incubaron 16 h en agitación y a 37 ° C. El medio "súperóptimo", SOB contiene magnesio, cuya presencia en cultivos incrementa su competencia, capacidad de las bacterias de internalizar plásmidos<sup>61</sup>. Se utilizaron 200 µL del cultivo saturado para inocular 10 mL de medio SOB, que se incubaron a 37 ° C en agitación hasta alcanzar una absorbancia de 0.5 a una longitud de onda de 550 nm. Los cultivos se incubaron en hielo por 10 min, y se centrifugaron a 2300 revoluciones por minuto (rpm) por 12 min a 4 ° C. Las pastillas de bacterias obtenidas por centrifugación se resuspendieron en 800 µL de amortiguador de transformación I, TFBI frío (acetato de potasio 30 mM, cloruro de rubidio 100 mM, cloruro de calcio 10 mM, cloruro de magnesio 50 mM, glicerol 15%, ajustado a pH de 6.5 y esterilizado por filtración) e incubadas en hielo por 15 min. Las bacterias se centrifugaron nuevamente a 2300 rpm durante 12 min a 4 ° C, las pastillas se resuspendieron en 800 µL de amortiguador de transformación II, TFBII frío (cloruro de rubidio 10 mM, cloruro de calcio 75 mM, ácido 3(n-morfolino)-propanosulfónico, MOPS 10 mM, glicerol 15%, ajustado a pH de 6.5 y esterilizado por filtración), y se incubaron en hielo por 15 min. Finalmente, la suspensión de bacterias se distribuyó en alícuotas de 50 µL que se almacenaron a -70 ° C.

### **Transformación de bacterias competentes.**

Se agregaron 100 ng de ácido desoxirribonucleico (DNA) plasmídico a 50 µL de bacterias competentes, se incubaron 30 min en hielo, posteriormente 90 s a 42 ° C y finalmente 5 min en hielo. Se inoculó 1 mL de medio SOB con las bacterias previamente sometidas a choque térmico, y se incubaron a 37 ° C en agitación por una hora. El medio con bacterias recuperadas se centrifugó a 13,000 rpm por 15 s y la pastilla se esparció en placas de LB con ampicilina a 100 µg/mL y cloranfenicol a 34 µg/mL que se incubaron 16 h a 37 ° C.

### **Extracción de DNA plasmídico.**

Los plásmidos utilizados se extrajeron utilizando el método de lisis alcalina. Este método de extracción de ácidos nucleicos está basado en la propiedad del ADN circular de doble cadena de resistir tratamientos alcalinos, específicamente pH 12, seguidos de neutralización, contrario al DNA genómico o DNA circular con incisiones que precipitan<sup>62,63</sup>.

Se inocularon 5 mL de medio SOB adicionado con antibióticos selectivos, con una colonia transformante de la cepa XL1-Blue de *E. coli*, y se incubaron 16 h a 37 °C en agitación. Después de la incubación, el cultivo se centrifugó a 13,000 rpm, a 4 °C por 10 min, y el sobrenadante se removió. La pastilla se resuspendió en 300 µL de solución I (Tris 50 mM a pH 8, EDTA 10 mM, RNAsa 100 µg/mL) y se agregaron 300 µL de solución II (NaOH 200 mM, dodecilsulfato de sodio, SDS 1 %). La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 400 µL de solución III (KCH<sub>3</sub>COO 1 M pH 5.0) para neutralizar el NaOH y se incubó nuevamente 5 min a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le agregó 1 mL de etanol frío. La mezcla con etanol se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 4 °C. Después de centrifugar la mezcla, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50 µL de agua. La pastilla reconstituida se incubó con 400 µL de amortiguador para RNAasa y dos unidades de RNAasa RNase One (Promega ® Madison, WI, EUA), durante 30 min a 37 °C. Se agregaron 450 µL de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción 25:24:1) y se agitaron en un mezclador de vórtice por 2 min. Se prosiguió a centrifugar la mezcla a 12,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, la fase acuosa se recuperó, y se le agregó un volumen equivalente de isopropanol frío al 70%, para después ser incubada a -80 °C durante 1 h. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se retiró. La pastilla se resuspendió en 50 µL de agua.

### **Análisis por electroforesis en geles de agarosa**

Los productos de digestiones de DNA se analizaron en geles de Tris-Acetato-EDTA (TAE) agarosa al 2%. Las muestras se cargaron en el gel con un amortiguador de carga y se corrieron a 100 V durante 1 h en amortiguador TAE 1X. Los geles se teñieron posteriormente en una solución de bromuro de etidio 0.5 mg/mL por 10 min y se lavaron en H<sub>2</sub>O destilada dos veces por 5 min. Una vez teñidos los geles, se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

### **Purificación de DNA a partir de geles de agarosa**

Se digirieron dos vectores con el mismo par de enzimas de restricción. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1%. El gel se teñió con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Los fragmentos

de interés se cortaron del gel con una navaja. El DNA digerido se extrajo de los geles de agarosa utilizando el kit comercial QIAEX II. Se prosiguió a pesar los fragmentos de agarosa y dependiendo del peso obtenido se agregaron 3 volúmenes del amortiguador QXI. Dependiendo de la cantidad de DNA en la muestra, previamente determinada en un espectrofotómetro a través de la absorbencia a longitud de onda de 280 nm, se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de amortiguador con perlas, QIAEXII. La mezcla se incubó a 50 °C por 10 min mientras se agitaba cada 2 min. La mezcla se centrifugó 30 s en una micro-centrífuga a 13,000 rpm. El sobrenadante se retiró y la pastilla se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador QXI, se agitó en un mezclador tipo vórtice, se centrifugó por 30 s a 13,000 rpm y el sobrenadante se retiró. Se repitió dos veces el lavado pero con amortiguador PE. La pastilla se secó durante 15 min. El DNA se eluyó de las perlas agregando 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y se agitó la muestra. La muestra se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó por 30 s, el sobrenadante se recolectó.

#### **Desfosforilación por fosfatasa alcalina**

Los plásmidos digeridos se prepararon para llevar a cabo reacciones de ligación. Para esto, se desfosforilaron los plásmidos en los que se subclonarían los insertos correspondientes a las secuencias de los dominios BAR con la finalidad de evitar la religación de los plásmidos. Se incubó 1  $\mu\text{g}$  de plásmido digerido con 1 unidad de fosfatasa alcalina de camarón (Roche) a una concentración 1X de amortiguador de la enzima en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  durante 15 min a 37 °C. La enzima se inactivó incubando 15 min a 65 °C.

#### **Ligación de DNA**

Para llevar a cabo las reacciones de ligación de DNA se utilizó la ligasa del fago T4. Se incubaron 3  $\mu\text{g}$  de DNA liberado del vector de clonación con 1  $\mu\text{g}$  de vector linearizado y desfosforilado en presencia de 400 unidades de ligasa, a una concentración 1X de amortiguador enzimático, en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  de reacción, durante 16 h a 16 °C.

La reacción se utilizó para transformar bacterias competentes y seleccionar clonas.

## Producción de proteínas recombinantes

### Pruebas de expresión

Se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli* para determinar las condiciones idóneas para la sobreexpresión de las proteínas recombinantes:

- ❖ Origami (DE3) pLysS
- ❖ BL21 Codon Plus pLysS
- ❖ BL21 (DE3) pLysS

Estas cepas se han derivado de la cepa BL21 (DE3), que cuenta con dos mecanismos para la eficiente producción de proteínas con alta especificidad<sup>64</sup>. Esta cepa cuenta con un promotor Lac mutante, conocido como LacUV5, que se puede inducir por lactosa o análogos y es insensible a la represión catabólica, esto es, por la presencia de fuentes de carbono, como glucosa<sup>65</sup>. La sobreexpresión de proteínas necesita de una maquinaria que utilice la mayor cantidad posible de recursos del organismo en el que se expresen. La transcripción de genes por la RNA polimerasa bacteriana representaría niveles de transcripción insuficientes, dado que estaría transcribiendo múltiples RNAm de la bacteria. La RNA polimerasa del fago T7 bajo control del operador LacUV5 fue clonada en el cromosoma de *E. coli* a través de la infección por el fago  $\lambda$ D69<sup>64</sup>. La T7-RNA polimerasa es específica para sus promotores, de los cuales, no se encuentra ninguno en el genoma de *E. coli* y produce cadenas de RNA 5 veces más rápido que la RNA polimerasa de *E. coli*<sup>66</sup>. Además de esto, las cepas utilizadas también cuentan con el plásmido pLysS, que confiere resistencia a cloranfenicol e incluye la secuencia codificante del inhibidor natural de la RNA-polimerasa del bacteriófago T7, la lisozima del bacteriófago T7. De esta manera, la transcripción basal de genes clonados en vectores con promotores T7 es inhibida por la lisozima. Al agregar un agente inductor, los niveles de expresión de la RNA polimerasa aumentan, de manera que se acumulan niveles de esta proteína suficientemente altos para escapar el control por la lisozima<sup>67</sup>.

Estas cepas de bacterias se sometieron al protocolo para inducir competencia química y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se transformaron estas bacterias con 100 ng de los plásmidos deseados, se plaquearon en medio LB-agar con antibióticos selectivos en cajas de Petri y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. Se utilizaron colonias de las bacterias transformantes para

inocular 3 mL de medio SOB con antibióticos selectivos y se incubaron 16 h a 37 °C en agitación. Se tomaron 500 µL de éstos cultivos para inocular 100 mL de medio SOB con antibióticos selectivos en matraces de 250 mL y se incubaron a 37 °C en agitación hasta que los cultivos alcanzaron una densidad óptica, DO de 0.8. Una vez alcanzada ésta DO, se agregaron 10 µL de IPTG 1 M para alcanzar una [IPTG] de 100 µM. Posteriormente, se incubaron los cultivos a 30 °C durante 4 h. Posteriormente a la incubación, los cultivos se centrifugaron en un rotor JA-14 utilizando una centrífuga J-26XP (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, Indiana, EUA) a 6000 rpm durante 30 min a 4 °C. Las pastillas de bacterias se resuspendieron en un amortiguador Tris 20 mM, Hepes 20 mM, pH 7.4 con concentraciones variables de NaCl. La suspensión se sonicó en hielo con un sonicador Vibrasonics en ciclos de 1 min a 40 % de potencia con pulsos de 1 s. Las pastillas sonicadas se centrifugaron a 15000 rpm durante 1 h a 4 °C en un rotor JA-25.50 utilizando una centrífuga J-26XP. Se recolectó el sobrenadante, se filtró con una membrana de 0.22 µm y se utilizó para la determinación de la sobreexpresión de la proteína de interés.

### **Cuantificación de proteína por reducción de ácido bicinonínico**

La concentración de proteína en los diferentes pasos de purificación utilizados se determinó utilizando el kit comercial MicroBCA basado en el método de determinación de proteína por ácido bicinonínico y cobre<sup>68</sup> (Thermo Scientific®, Rockford, Illinois, E.U.A.). Este kit utiliza el ácido bicinonínico para detectar enlaces peptídicos mediante la reducción del ión cúprico, Cu<sup>2+</sup>, a ión cuproso, Cu<sup>1+</sup> por proteínas en un ambiente alcalino. El ácido bicinonínico quela iones cuprosos en un complejo de dos moléculas por ion y éste absorbe luz a una longitud de onda de 562 nm. La formación de este complejo es dependiente del número de enlaces peptídicos, la presencia de cisteína, cistina, triptófano y tirosina. Este kit detecta concentraciones de proteína en un rango lineal de 2 a 40 µg/mL. Para determinar la concentración de proteína de las fracciones obtenidas se realizó una curva estándar de la siguiente manera:

Se preparó una solución concentrada de 200 µg/mL de albúmina sérica bovina, BSA, de la cual se tomaron los siguientes volúmenes para obtener las siguientes concentraciones en un volumen final de 75 µL (**Tabla 1.**):

Concentración - µg/mL	Vol. BSA 200 µg/mL - µL
80	30
40	15
30	11.25
20	7.5
15	5.625
10	3.75
5	1.875
0	0

**Tabla 1: Curva de calibración para determinación de concentración de proteína por método de ácido bicinónico.** Se muestran las concentraciones utilizadas en la curva de calibración y los volúmenes de BSA utilizados.

Se tomaron 5 µL de las muestras cuya concentración de proteína era desconocida y se llevaron a un volumen final de 75 µL con agua destilada, diluyendo la muestra con un factor de 15. Posteriormente, se agregaron 75 µL de una solución de cobre compuesta por los reactivos A, B y C en proporción 25:24:1, tanto a las muestras como a los pozos con las soluciones de curva de calibración y se incubaron durante 30 min a 65 °C. Se determinó la absorbencia de la curva de BSA y de la muestra a con el filtro de 570 nm en un lector de placas modelo 550 (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) y se determinó la linealidad de la curva con un tratamiento de regresión lineal. Habiendo determinado la linealidad de la curva estándar, se extrapolaron las lecturas de las muestras y se determinó la concentración de proteína.

### **Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE**

Las muestras de proteína fueron visualizadas en geles de poliacrilamida-SDS para determinar la presencia de las proteínas recombinantes. Dependiendo de la proteína de interés se prepararon geles de poliacrilamida-SDS al 10 o al 12 %. Las muestras se cargaron en los geles con un amortiguador de carga (Tris 50 mM, DTT 100 mM, SDS 2 %, azul de bromofenol 0.1 %, glicerol 10 %). Los geles se sumergieron en una solución de Tris 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1 % y se sometieron a un voltaje de 130 V durante 1:30 h.

### **Escalamiento de sobreexpresión**

Habiendo determinado las condiciones idóneas de sobreexpresión de la proteína de interés, se realizaron experimentos de expresión en volúmenes de cultivo de 3 L. Para esto, se inocularon 30 mL de medio SOB con antibióticos selectivos con una colonia transformada con el plásmido de interés y se incubaron en agitación 16 h a 37 ° C. Posteriormente, se inocularon 6 matraces de 2 L con 500 mL de medio SOB y antibióticos con 5 mL del cultivo saturado. Los cultivos se incubaron en agitación a 37 ° C hasta que alcanzaron una DO de 0.6. Una vez que estos cultivos alcanzaron la DO deseada, a cada matraz con 500 mL de cultivo se le agregaron 500 µL de IPTG 100 mM para llegar a una concentración final de IPTG de 100 µM. Habiendo agregado el IPTG a los cultivos, éstos se incubaron en agitación durante 4 h a 20 ° C. Una vez finalizado el tiempo de sobreexpresión, se recolectaron los cultivos y se centrifugaron en un rotor JA-10 utilizando una centrífuga J-26XP (Beckman-Coulter) a 4 ° C durante 30 min a 6000 rpm. Las pastillas celulares obtenidas se procesaron como se describió previamente.

### **Purificación de proteínas**

#### **Purificación por precipitación con sulfato de amonio**

Se utilizó como primer paso de purificación la precipitación de proteínas con sulfato de amonio. Se agregó sulfato de amonio al extracto de proteínas hasta llegar a las concentraciones de 20, 40 y 60 % (peso/volumen). El sulfato de amonio se agregó lentamente a la solución en agitación y a 4 °C. Habiendo agregado todo el sulfato de amonio para alcanzar un porcentaje de saturación, se centrifugó la suspensión 15 min a 12,000 g y a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 2 mL de amortiguador de lisis y el sobrenadante se utilizó para precipitar proteínas con la siguiente concentración de sulfato de amonio.

#### **Sistema de cromatografía líquida de desempeño rápido (FPLC)**

Todos los métodos cromatográficos utilizados para la purificación de proteínas realizados en este trabajo se llevaron a cabo en un sistema de cromatografía de desempeño rápido, FPLC (Pharmacia, ahora, General Electric, Uppsala, Suecia).

### **Purificación por cromatografía de intercambio aniónico**

En el caso de los cultivos de sobreexpresión en los que la lisis se llevó a cabo en amortiguadores de acoplamiento a columna de intercambio aniónico, (Tris 20 mM, fosfatos 20 mM pH 8.0, o Tris 20 mM pH 8.0) el extracto fue inyectado directamente a las columnas HiTrapQ o Source15Q. En los casos en los que las proteínas se encontraban en amortiguadores con NaCl, se dializaron contra amortiguadores sin sal. Las diálisis se realizaron vertiendo las fracciones de proteínas de interés en una bolsa con porosidades impermeables a moléculas de peso mayor a 10 kDa (Cellusep), la cual se sumergió en un volumen 1000 veces mayor y se incubó en agitación, a 4 ° C durante 16 h.

Se utilizaron dos columnas de intercambio aniónico. Las columnas utilizadas se conservaron a 4 ° C en una solución de etanol al 20 %. La primera columna en utilizarse fue la columna HiTrap FF(5 mL) (General Electric, Uppsala, Suecia). Esta columna está compuesta de una matriz de agarosa entrecruzada con dextrán al 6 % con porosidades de 45 a 165  $\mu\text{m}$  y con una capacidad de unión de proteína de alrededor de 130 mg/mL de medio. Previo al inicio de las purificaciones realizadas, la columna se lavó durante 10 min con agua destilada con un flujo de 5 mL/min. Posteriormente, se lavó de la misma manera pero con amortiguador de elución (Se utilizaron 2 amortiguadores de elución, Tris 20 mM, fosfatos 20 mM, NaCl 1M pH8.0 y Tris 20 mM, NaCl 1M pH8.0), para después repetir éste paso de lavado con amortiguador de acoplamiento. Las muestras se inyectaron a un flujo de 5 mL/min, después de lo cual, se prosiguió a lavar la columna con amortiguador de acoplamiento al mismo flujo y hasta que la señal de absorbencia a 280 nm alcanzara la línea basal. Posteriormente, se inició la elución de proteínas acopladas a la matriz de la columna con un programa de 90 min en el que la concentración del amortiguador de elución aumentó de 0 a 100 % mientras el equipo de FPLC recolectaba fracciones cada minuto.

La segunda columna utilizada fue la columna Source 15 Q (General Electric, Uppsala, Suecia). Esta columna está compuesta de perlas de poliestireno y divinil benceno de 15  $\mu\text{m}$ . La columna se lavó con agua destilada como se describió previamente, utilizando un flujo de 2 mL/min. Las muestras se inyectaron a un flujo de 2 mL/min, después de lo cual se realizó un lavado con amortiguador de acoplamiento, como se describió previamente. Posteriormente, se realizó un gradiente de elución a un flujo de 2 mL/min de 0 a 30 % de

amortiguador de elución durante 1 h mientras el equipo de FPLC recolectó fracciones cada minuto.

### **Purificación por cromatografía de filtración en gel**

Para la purificación por exclusión de peso molecular se utilizó la columna Superdex 200 10/300GL (General Electric, Uppsala, Suecia). Esta columna está compuesta de una matriz de perlas de 13  $\mu\text{m}$  de agarosa y dextrán entrecruzados. La columna se lavó con agua destilada durante 1 h a un flujo de 0.5 mL/min, después se equilibró con el amortiguador deseado a un flujo de 0.5 mL/min. Las muestras se inyectaron en un volumen menor a los 500  $\mu\text{L}$  y se mantuvo un flujo de 0.5 mL/min durante 1 h mientras el sistema FPLC recolectó fracciones cada minuto.

### **Inmunoensayo tipo western**

Para confirmar la presencia de las proteínas recombinantes en los ensayos de expresión, se realizaron inmunoensayos tipo western. Se cargaron 40  $\mu\text{g}$  de proteína en geles de poliacrilamida y SDS al 12 %. Los geles se sometieron a un voltaje de 120 V durante 1:30 h. Posteriormente se transfirieron las proteínas separadas en los geles a membranas de fluoruro de polivinilideno previamente incubadas en metanol durante 5 min sometiéndoles a un amperaje constante de 400 mA durante 1 h a 4 °C. Las membranas de PVDF con proteína se incubaron con agitación a 4 °C durante 12 h en una solución de bloqueo, consistente en amortiguador salino (NaCl, KCl, pH 7.4), Tween 20 al 0.1 % y leche descremada al 5 %. Posteriormente las membranas se incubaron en solución de bloqueo con el anticuerpo policlonal anti-Anfifisina II N-19 sc-8534 (Santa Cruz Biotechnologies Inc., Dallas, Texas, EUA) diluido en una proporción de volumen 1:500, con agitación durante 24 h a 4 °C. Terminado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min a temperatura ambiente en solución de bloqueo durante 15 min. Posteriormente, las membranas se incubaron en solución de bloqueo con el anticuerpo secundario anticabra acoplado a peroxidasa de rábano sc-2033 (Santa Cruz Biotechnologies Inc., Dallas, Texas, EUA) diluido en una proporción de volumen 1:500 durante 12 h a 4 °C y en agitación. Habiendo finalizado la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces en una solución de TBS y Tween 20 al 1 % durante 15 min. Finalmente las membranas se utilizaron para llevar a cabo la reacción de

quimioluminiscencia agregando 1 mL de sustrato de peroxidasa de rábano con luminol (Merck-Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) en oscuridad. Se permitió que la reacción procediera durante 1 min, después de lo cual se expusieron placas autoradiográficas (Kodak, Rochester, NY, EUA) a las membranas durante 2 s. Las placas se incubaron durante 30 s en solución de revelador, posteriormente se lavaron en agua destilada y finalmente se incubaron durante 30 s en solución de fijador.

## **Análisis de remodelado de vesículas lipídicas**

### **Preparación de vesículas gigantes**

Se disolvieron 50 mg de palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol, POPG (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA) en 1 mL de cloroformo. De ésta solución se tomaron 24.65  $\mu\text{L}$  y se diluyeron en 2 mL de cloroformo. Para las preparaciones de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina, POPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA) se tomaron 54  $\mu\text{L}$  de una solución a 25 mg/mL en cloroformo. Estas soluciones se secaron bajo un flujo constante de nitrógeno durante 4 h en un vial de vidrio previamente lavado con cloroformo. Una vez que la mayoría del cloroformo se evaporó, los viales se incubaron en una cámara al vacío durante 16 h para eliminar trazas de cloroformo restante. Habiendo secado las preparaciones de lípido, se resuspendieron en 2 mL de amortiguador para tener una concentración de POPG de 900  $\mu\text{M}$ . Los lípidos rehidratados se incubaron 16 h a 37 °C.

### **Caracterización de liposomas mediante ensayos de turbidez.**

Para determinar si las proteínas obtenidas son capaces de modificar el tamaño de vesículas gigantes, se analizaron las muestras de vesículas lipídicas en ausencia y presencia del dominio BAR a través de determinaciones de turbidez; estos ensayos han sido utilizados para la caracterización del tamaño y forma de liposomas. Se ha determinado que la absorbancia de una muestra de liposomas es proporcional a su radio y lamelaridad<sup>69</sup>. Esto, sin embargo es aplicable a muestras de partículas de diámetros homogéneos. No obstante, el objetivo de este trabajo no es determinar el tamaño exacto de las vesículas estudiadas, sino evaluar el efecto de los dominios BAR y BAR6 sobre poblaciones de vesículas de lípidos de diferentes características. Se realizaron experimentos en cajas transparentes de 96 pozos (Corning, Tewksbury, Massachusetts, EUA). A cada pozo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de POPG 900  $\mu\text{M}$ , en el caso de los pozos control, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador y en los pozos

experimentales se agregaba el volumen necesario para obtener concentraciones de proteína de 5, 15 y 30  $\mu\text{M}$ , el volumen restante se alcanzaba agregando la cantidad necesaria de amortiguador. Habiendo preparado todos los pozos, la placa se insertó en un espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek, Winooski, Vermont, EUA). El fluorómetro leyó la absorbancia de los pozos a 500 nm cada 2 min durante 1 h a 37 ° C.

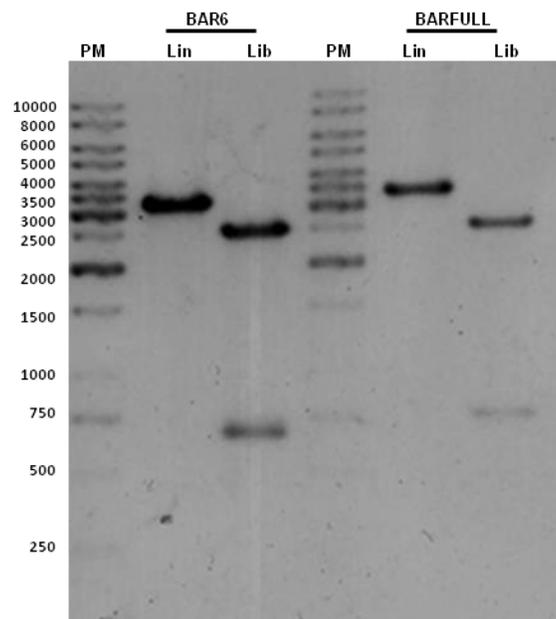
### **Microscopía electrónica de transmisión.**

Para determinar los cambios de morfología que ejerce el dominio BAR sobre vesículas de lípidos polares las muestras obtenidas se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión, utilizando la técnica de tinción negativa. Las preparaciones de lípidos polares en presencia y en ausencia del dominio BAR se incubaron 1 h a 37 °C. Después de esto, se tomaron 8  $\mu\text{L}$  y se depositaron sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 8  $\mu\text{L}$  de acetato de uranilo a las muestras y se incubaron durante 10 min. Las mezclas de muestras y acetato de uranilo se retiraron con papel filtro Whatman. Finalmente se secaron las muestras bajo una lámpara de Tungsteno durante 20 min. Las rejillas se visualizaron en un microscopio electrónico JEM 12000 EII (JEOL, Tokio, Japón) a 80 kV en la unidad de microscopía del Instituto de Fisiología Celular.

## Resultados

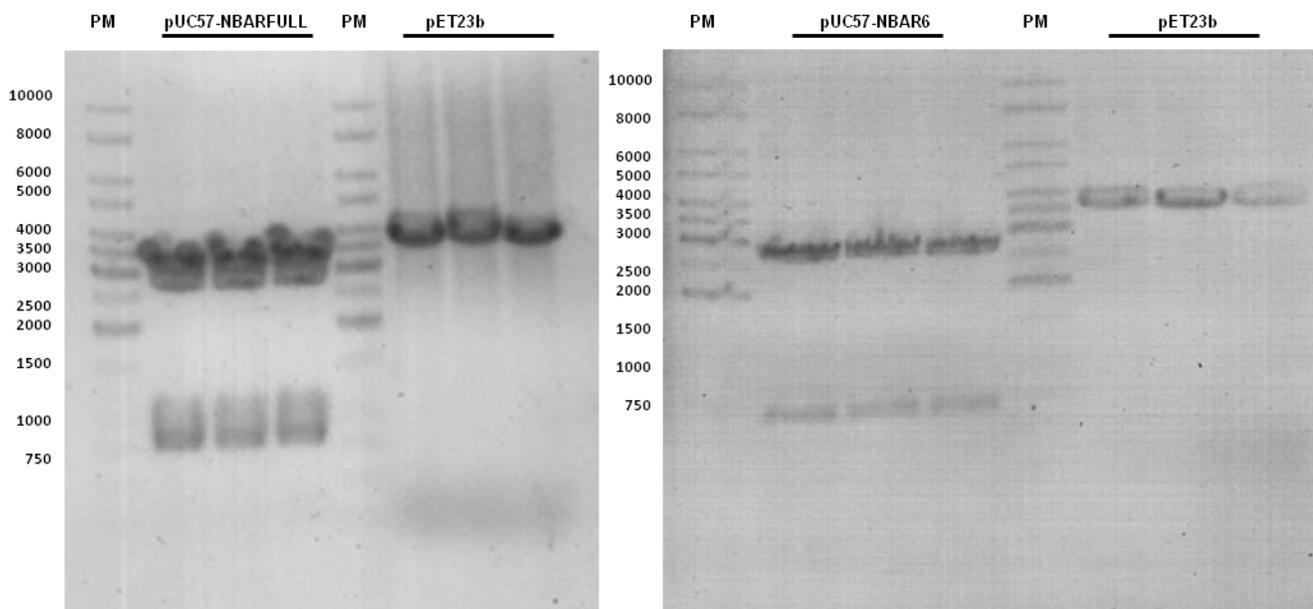
### Generación de construcciones

Las construcciones sintetizadas por la compañía Genscript fueron analizadas a través de digestiones con enzimas de restricción para verificar el correcto peso molecular de los insertos NBARFULL y NBAR6. Al diseñar las construcciones, se incluyeron sitios de corte de las enzimas de restricción BamHI y HindIII, flanqueando en 5' y 3' respectivamente la secuencia de los dominios N-BAR. Al digerir con sólo la enzima EcoRI es posible observar las bandas de los plásmidos linearizados pUC57NBAR6 y pUC57NBARFULL con pesos de 3379 pb y 3487 pb, respectivamente. Se confirmó el peso de los insertos NBARFULL y NBAR6, 777 y 669 pares de bases al digerir las construcciones con las enzimas BamHI y HindIII, además del fragmento de 2710 pb, correspondiente al vector pUC57 (**Fig.13**).



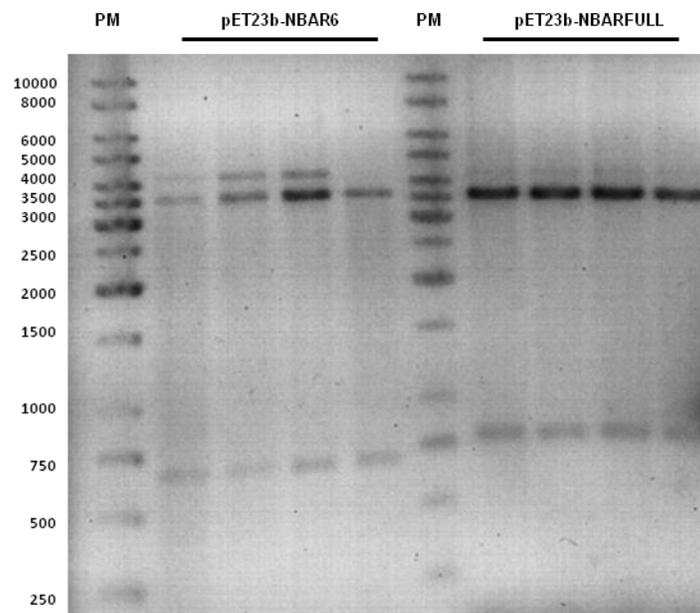
**Figura 13. Digestiones diagnóstico de construcciones:** Se muestran las digestiones de las construcciones pUC57-NBAR6 **BAR6** y pUC57-NBARFULL **BARFULL**. Los plásmidos se digirieron con la enzima EcoRI, que linearizó los plásmidos, **Lin** y también se digirieron con las enzimas BamHI y HindIII que liberaron los insertos de los plásmidos, **Lib**. Se indican los marcadores de peso molecular **PM**.

Para poder obtener resultados adecuados en las reacciones de ligación de DNA, es necesario obtener altas cantidades de DNA. Se logró digerir 3  $\mu\text{g}$  de las construcciones pUC57-NBARFULL y pUC57-NBAR6 con las enzimas BamHI y HindIII para liberar su inserto (Fig.14). Asimismo se logró digerir 1  $\mu\text{g}$  del vector de expresión pET23b con las mismas enzimas de restricción (Fig.14). Los fragmentos de las digestiones se separaron por electroforesis en geles de agarosa. Se cortaron los fragmentos y se utilizaron para la reacción de ligación.



**Figura 14. Liberación de insertos para subsecuente ligación:** Se muestran las digestiones con las enzimas BamHI y HindIII de los plásmidos pUC57-NBARFULL, pUC57NBAR6 y pET23b, y los marcadores de peso molecular PM.

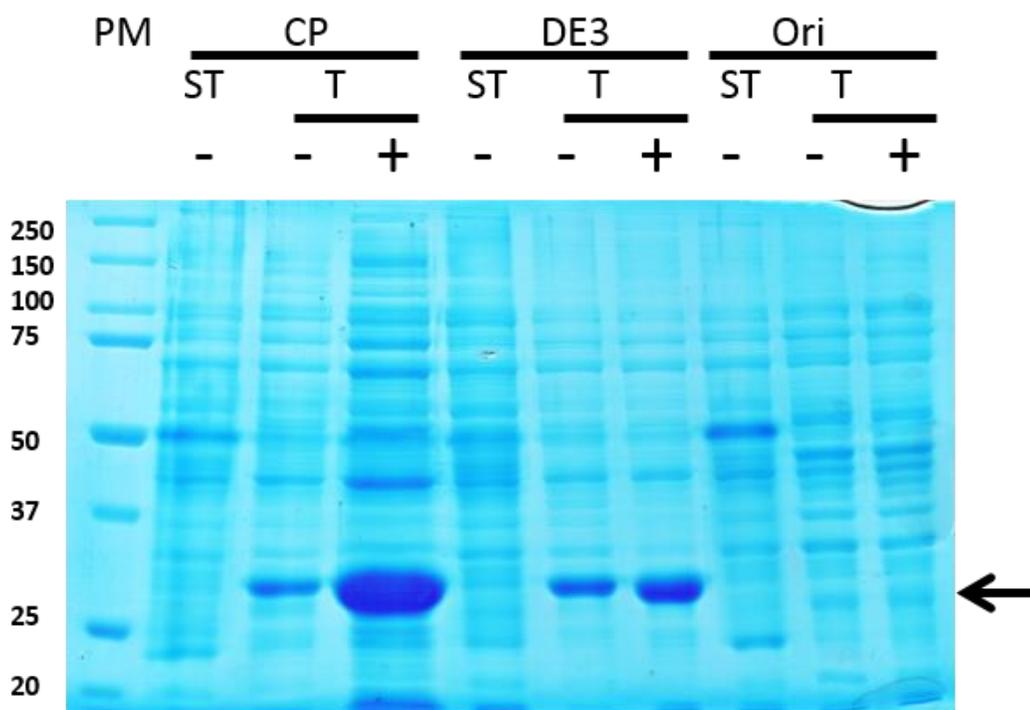
Los fragmentos separados por electroforesis fueron purificados con un kit de extracción de ácidos nucleicos a partir de agarosa. Con los fragmentos de DNA purificados se llevaron a cabo las reacciones de ligación. Los productos de las reacciones de ligación. Las colonias resistentes se utilizaron para extraer plásmido. Los plásmidos obtenidos de las colonias transformantes se analizaron por digestiones con enzimas de restricción. Se obtuvieron múltiples colonias que incorporaron los insertos BARFULL y BAR6 al vector de expresión pET23b, de 3665 pb (**Fig.15**)



**Figura 15. Digestiones diagnóstico de nuevas construcciones:** Se muestran las digestiones con las enzimas BamHI y HindIII de los plásmidos pET23b-NBAR6 y pET23b-NBARFULL obtenidos por reacciones de ligación. Se indican los marcadores de peso molecular, PM.

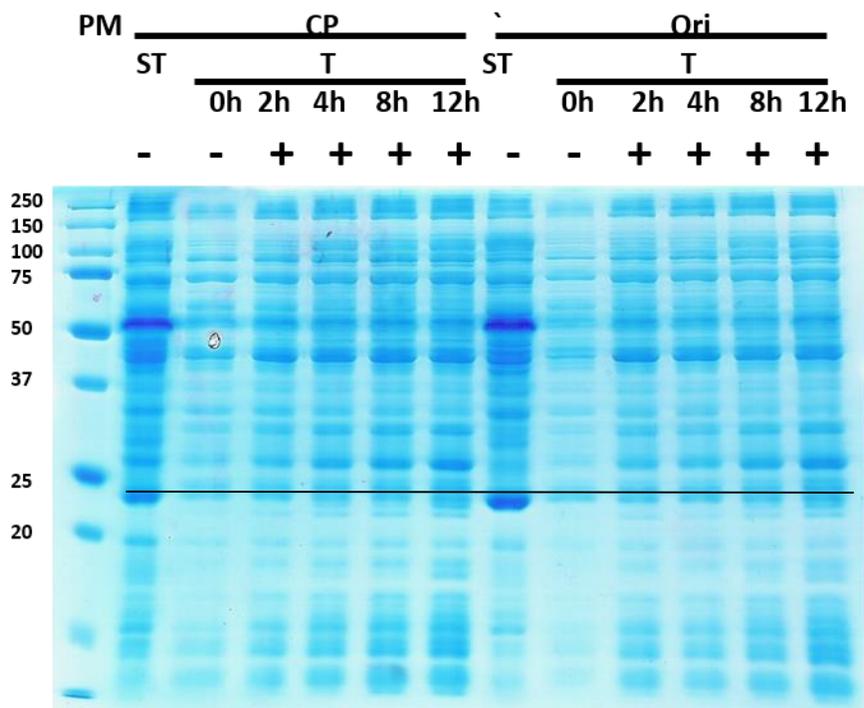
### Pruebas de sobreexpresión

Se utilizó la construcción pET23BARFull en pruebas de expresión las cepas de *E. coli* BL21 CodonPlus, BL21(DE3) y OrigamiB. La presencia de bandas de alrededor de 28 kDa se observó en los extractos de proteína de cultivos transformados con la construcción pET23BARFull (**Fig.16**). La inducción de la expresión de la proteína recombinante fue evidente en los extractos de proteína de cultivos inducidos con IPTG. La cepa en la que se observó una mejor inducción de la expresión de la proteína recombinante fue la cepa BL21 Codon Plus (**Fig.16**).



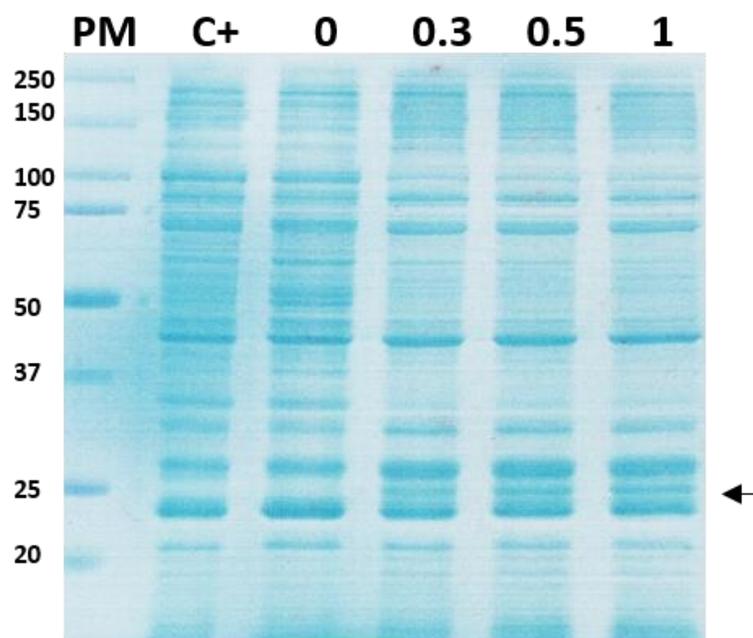
**Figura 16: Sobreexpresión de proteína recombinante BARFULL.** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, las cepas de bacterias *E. coli*, BL21 Codon Plus, **CP**, BL21 (DE3), **DE3**, Origami B, **Ori**. También se indica si las bacterias no fueron transformadas, **ST**, o transformadas con el vector pET23BARF, **T**. De igual manera, se indica la ausencia, -, o presencia, +, de IPTG a una concentración de 100 μM.

La expresión de la proteína recombinante BAR6 se evaluó en las cepas BL21 Codon Plus y Origami B. Los niveles de expresión fueron menores en comparación a los obtenidos para la proteína BARFull. Se evaluaron diferentes tiempos de inducción (**Fig.17**). La expresión de la proteína recombinante aumentó en los cultivos conforme al tiempo de inducción de estos, se obtuvo el mayor nivel de expresión en ambas cepas a las 12 h de inducción (**Fig.17**).



**Figura 17: Optimización de la expresión de proteína recombinante BAR6.** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS (12 %). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, las cepas de bacterias *E. coli*, BL21 Codon Plus, **CP** y Origami B, **Ori**. También se indica si las bacterias no fueron transformadas, **ST**, o transformadas con el vector *pET23BAR6*, **T**. De igual manera, se indica la ausencia, -, o presencia, +, de IPTG a una concentración de 100  $\mu$ M; y el tiempo de incubación de los cultivos, **0, 2, 4, 8 o 12 h**. La inducción de la proteína **BAR6** se indica con una raya negra.

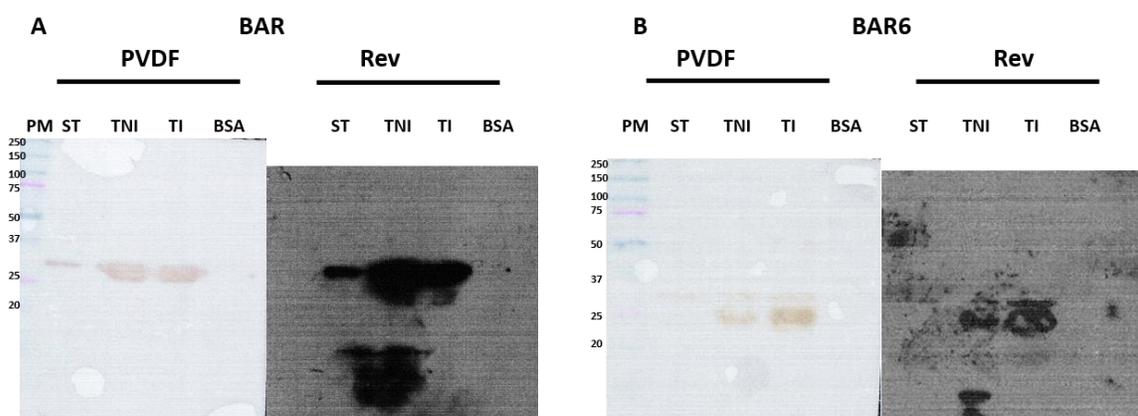
Debido a que los niveles de expresión de la proteína BAR6 no incrementaron en las condiciones mencionadas, se buscó la concentración de IPTG en la que se pudiera aumentar el nivel de expresión de la proteína. Se utilizaron cuatro concentraciones de IPTG en los cultivos de bacterias transformadas con el plásmido pET23BAR6, 0, 0.3, 0.5 y 1 mM. El efecto del IPTG fue evidente, desde la concentración de 0.3 mM se observa una banda de peso molecular aparente de 26 KDa; sin embargo, este efecto no es proporcional a la concentración de IPTG (**Fig.18**).



**Figura 18: Optimización de la expresión de proteína recombinante BAR6.** Se indican los marcadores de peso molecular, PM, bacterias BL21 Codon Plus sin transformar C<sup>+</sup> y las concentraciones de IPTG utilizadas en mM.

### Detección de dominios BAR en ensayos de expresión.

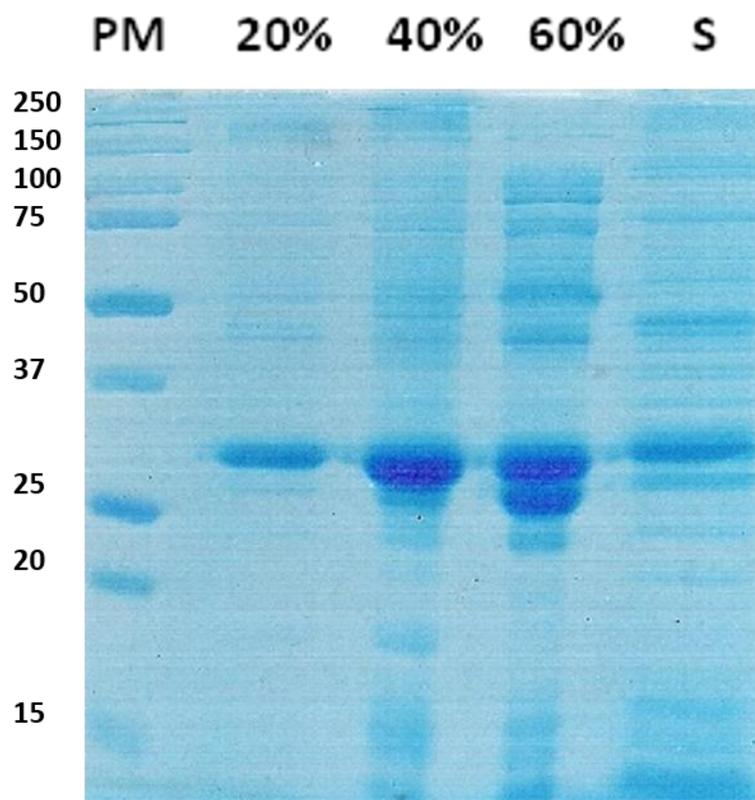
Para confirmar la presencia de los dominios BAR en los sistemas de expresión utilizados, se realizaron inmunoensayos tipo western. Ambos dominios BAR, el dominio BAR de configuración exónica completa (**Fig.19A**) así como el dominio BAR carente del exón 6 (**Fig.19B**) se detectaron en los extractos de bacterias transformadas sin inducir, sin embargo, su presencia resultó más clara en los extractos de bacterias transformadas e inducidas (**Fig.19**). Resulta evidente la detección de dos proteínas de pesos moleculares diferentes, el dominio BAR, con un peso molecular aparente superior a los 25 kDa (**Fig.19A**), así como el dominio BAR6, con un peso aparente de 25 kDa (**Fig.19B**).



**Figura 19: Inmunodetección de los dominios BAR en ensayos de expresión.** Se muestran los inmunoensayos tipo western realizados para detectar los dominios BAR, **A** y BAR6, **B**. Se muestran las membranas de **PVDF** a las que se transfirieron los marcadores de peso molecular, **PM**, así como los extractos de proteínas de las bacterias BL21 Codon Plus, **ST**, las bacterias transformadas con los vectores, **TNI**, las bacterias transformadas con los vectores e incubadas en presencia de IPTG, **TI** y albúmina sérica bovina, **BSA**. También se muestran las placas reveladas en presencia de las reacciones de quimioluminiscencia, **Rev**, en las que se detectaron las señales de las proteínas de interés.

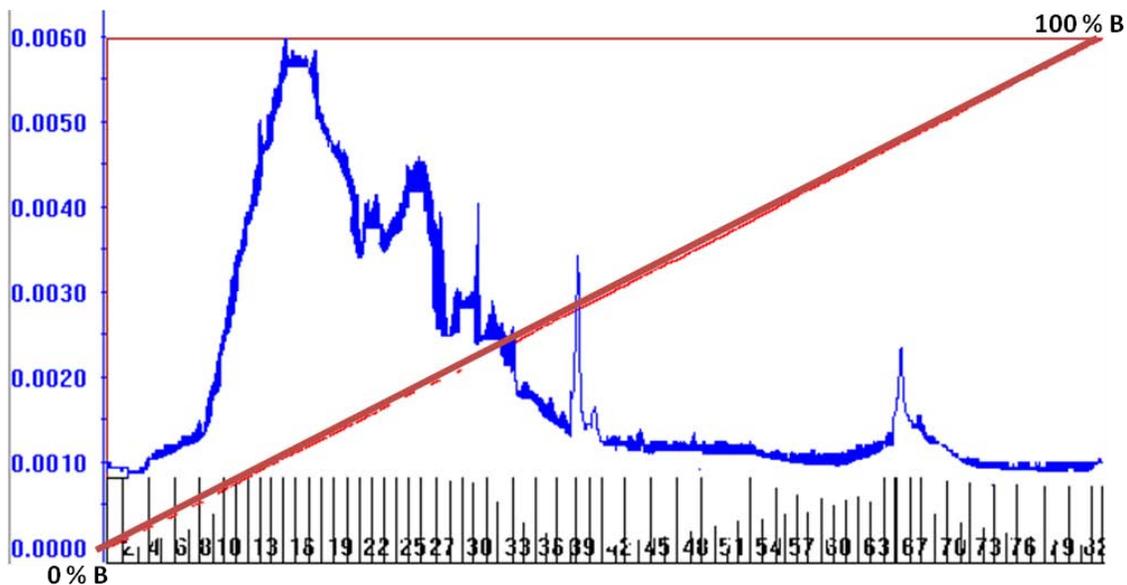
### Purificación del dominio BAR

Se escaló la sobreexpresión de la proteína BAR a cultivos de 1 L y se utilizó como primer paso de purificación la precipitación con sulfato de amonio. Se utilizaron 3 diferentes concentraciones de sulfato de amonio, 20, 40 y 60 % (peso/volumen). Se observó la separación de la población de proteínas y la concentración de la proteína recombinante BARF en las fracciones saturadas al 40 y 60 % de sulfato de amonio; sin embargo, se observó la presencia de una proteína de menor peso molecular, alrededor de 25 kDa, en la fracción precipitada con 60 % de sulfato de amonio (**Fig.20**).



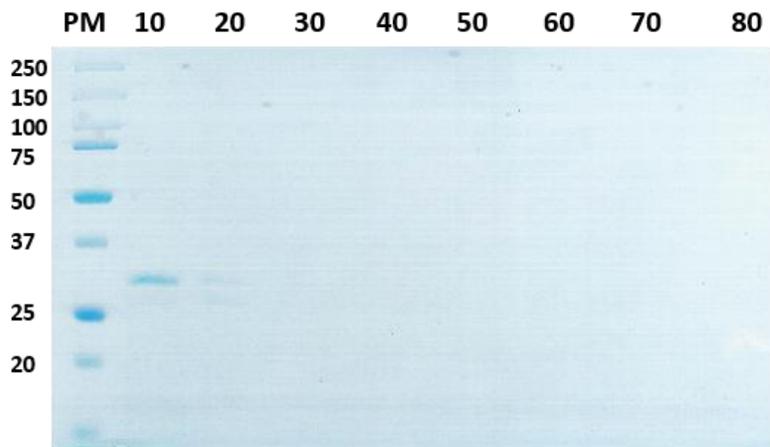
**Figura 20: Precipitación con sulfato de amonio de la proteína BAR.** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS (12%). Se indican los marcadores de peso molecular, PM, el porcentaje de saturación de sulfato de amonio y las proteínas solubles después de las precipitaciones, S.

La fracción de proteínas precipitada con 40 % de saturación de sulfato de amonio se utilizó para una subsecuente purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico. En el perfil de elución de la columna de intercambio aniónico se observaron dos señales de absorbancia de luz UV sobrepuestas entre las fracciones 8 y 30, que corresponden a eluciones a concentraciones de NaCl entre 100 y 200 mM. La señal de mayor intensidad se obtuvo en la fracción 14 (**Fig.21**).



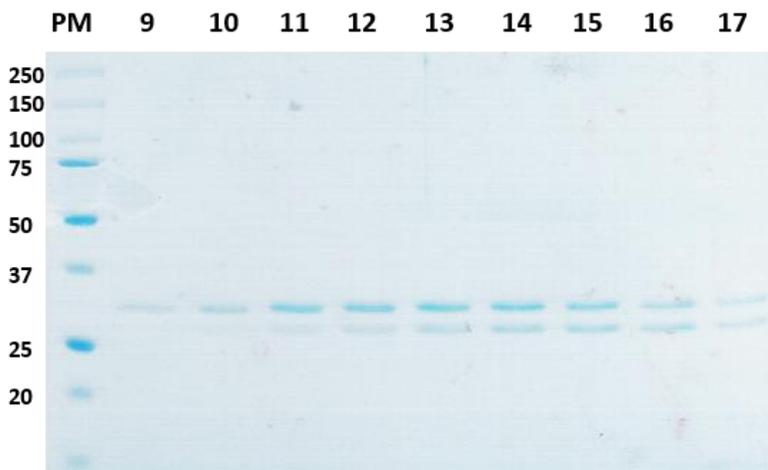
**Figura 21: Purificación por cromatografía de intercambio aniónico.** Cromatograma de FPLC. Se indican las Unidades de Absorbancia AU, las fracciones colectadas, en azul la absorbancia de luz UV ( $\lambda=280\text{nm}$ ) y en rojo la concentración del amortiguador de elución con 1 M de NaCl.

El análisis por electroforesis desnaturante de las fracciones obtenidas en el gradiente reveló que las señales de absorbencia corresponden a la elución de la proteína BARFULLy una proteína de menor peso molecular (**Fig.22**). Se observa una mayor cantidad de la proteína BARFULL en la fracción 10 respecto a la fracción 20.



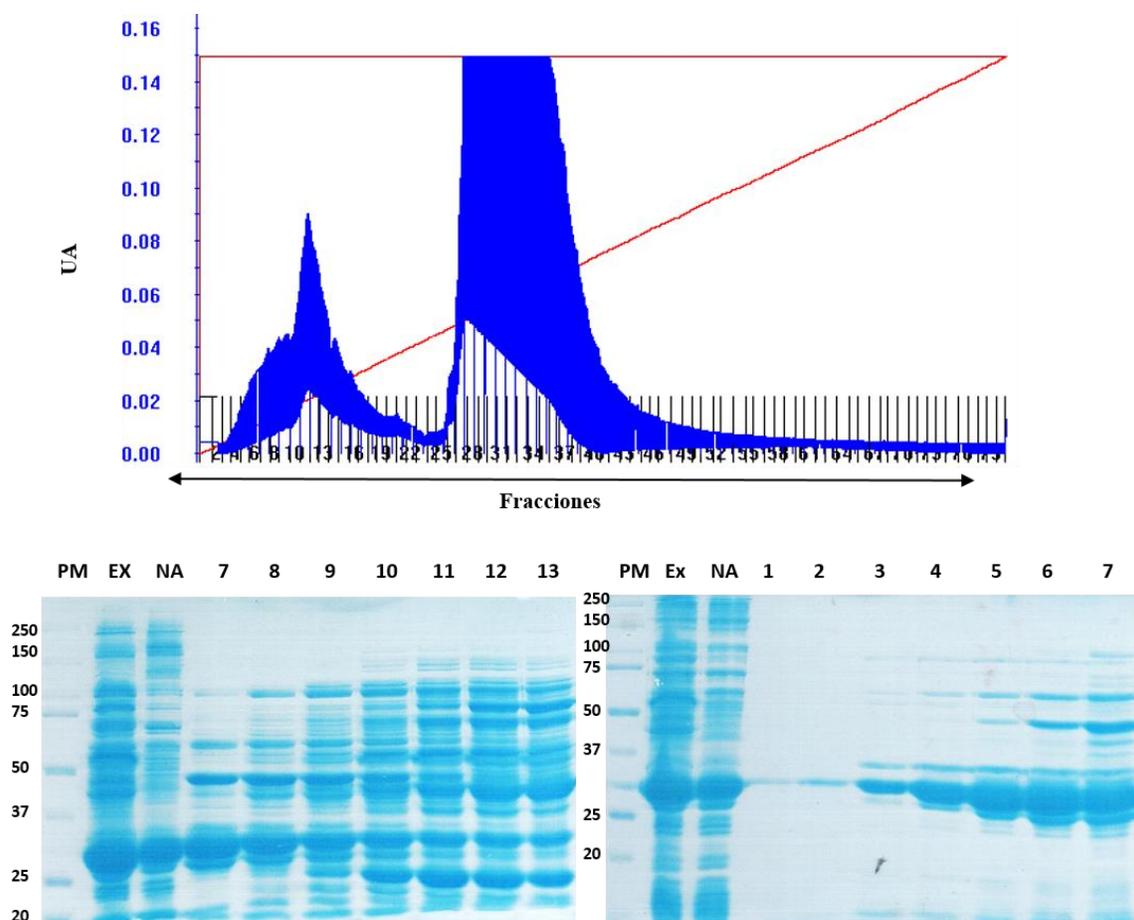
**Figura 22: Purificación por intercambio aniónico de la proteína BAR.** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida SDS (12%). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, y las fracciones obtenidas en el gradiente de elución de la columna HiTrap Q (5mL).

Al observar las fracciones 9 a la 17 mediante electroforesis desnaturante se observó un enriquecimiento de la proteína BARFULL en las fracciones 12 y 13; mientras que en las fracciones 15 y 16 se observó el enriquecimiento de la proteína de menor peso molecular (**Fig.23**).



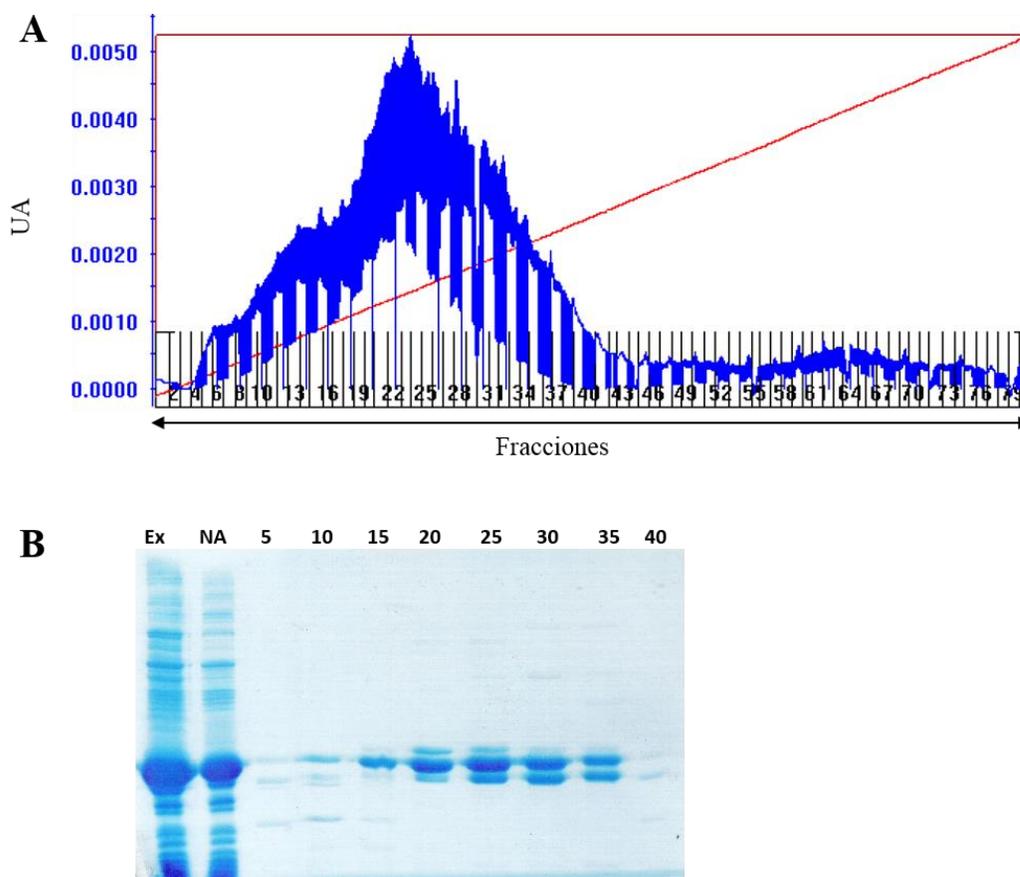
**Figura 23: Purificación por intercambio aniónico de la proteína BAR.** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida SDS (12%). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, y las fracciones obtenidas en el gradiente de elución de la columna HiTrap Q (5mL).

Se realizó la sobreexpresión de la proteína BAR en 3 L de cultivos y se prosiguió a purificar la proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico. Se obtuvo un perfil de elución con dos picos de absorbancia (**Fig.24A**). Al analizar las fracciones obtenidas en el gradiente de elución, se observó un enriquecimiento en las primeras fracciones del gradiente (**Fig.24B**). Sin embargo, se observaba la presencia del dominio BAR en la fracción no unida a la columna.



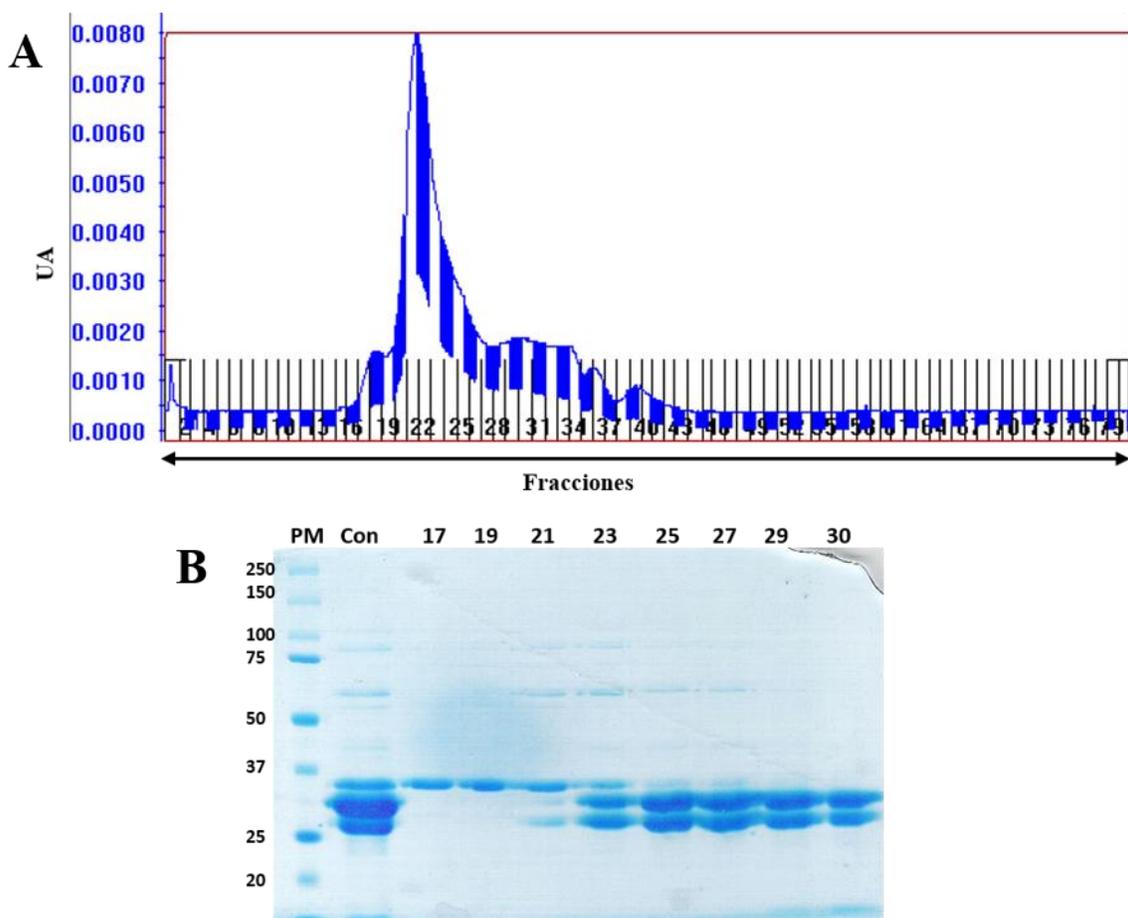
**Figura 24: Purificación por cromatografía de intercambio aniónico de la proteína BAR- Expresión escalada. A:** Se muestra el perfil de elución obtenido con una columna de intercambio aniónico HiTrap Q. En azul se muestra la señal de absorbancia y en rojo la concentración del amortiguador de elución. Se indican las unidades de absorbancia UA y las **fracciones** obtenidas por el FPLC. **B:** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida SDS (12%). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, el extracto de proteínas, **Ex**, la fracción de proteínas no adherida a la columna, **NA** y las primeras fracciones obtenidas en el gradiente de elución de la columna HiTrap Q (5mL). **C:** Se muestran las fracciones obtenidas a lo largo del gradiente de elución.

Se intentó recuperar la proteína BAR de la fracción no retenida en la columna. Para esto, se dializó la fracción no acoplada contra un amortiguador de Tris y 5 mM de fosfatos. Al inyectar esta fracción dializada a la columna de intercambio aniónico, HiTrapQ, se obtuvo un perfil de elución con una señal de absorbencia con un hombro en las primeras fracciones de elución (**Fig.25A**). Al analizar las fracciones obtenidas por esta purificación mediante electroforesis desnaturalizante, se observó la retención de proteínas de pesos menores del dominio BAR entre las fracciones 5 y 10; así como fracciones enriquecidas con el dominio BAR a partir de la fracción 20 (**Fig.25B**). Sin embargo, no todo el dominio BAR se unió a la columna, como se observó en la fracción de proteínas del lavado de la columna (**Fig.25B**).



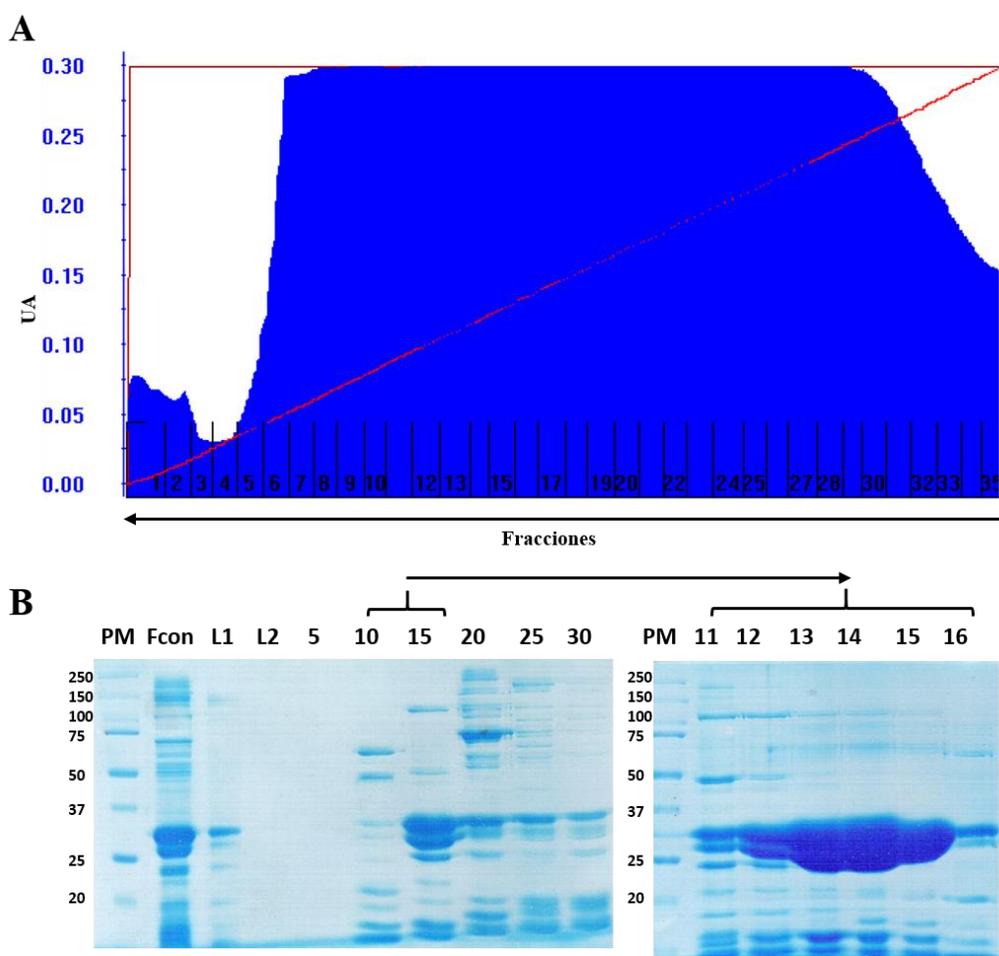
**Figura 25: Purificación por intercambio aniónico de la proteína BAR- fracción no-acoplada. A:** Se muestra el perfil de elución obtenido al inyectar la fracción no unida a la columna. Se indican las unidades de absorbencia UA y las fracciones obtenidas por el FPLC. **B:** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida SDS (12%). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, el extracto de proteínas, **Ex**, la fracción de proteínas no unidas a la columna, **NA** y las primeras fracciones obtenidas en el gradiente de elución de la columna HiTrap Q (5mL).

Se analizó si las proteínas en las fracciones obtenidas mediante intercambio aniónico podrían separarse mediante un subsecuente paso de purificación por cromatografía de filtración en gel. Las fracciones 20 a 40 obtenidas en el gradiente de elución de intercambio aniónico se concentraron y se inyectaron a una columna Superdex200. En el perfil de elución obtenido se observa una señal de absorbancia importante entre las fracciones 20 y 25, rodeada de hombros de menor absorbancia (**Fig.26A**). Al analizar estas fracciones mediante electroforesis desnaturalizante, se observó cómo una proteína de peso molecular aparente menor a 37 kDa eluyó en las primeras fracciones y cómo el dominio BAR se retuvo hasta las fracciones posteriores a la 23 (**Fig.26B**).



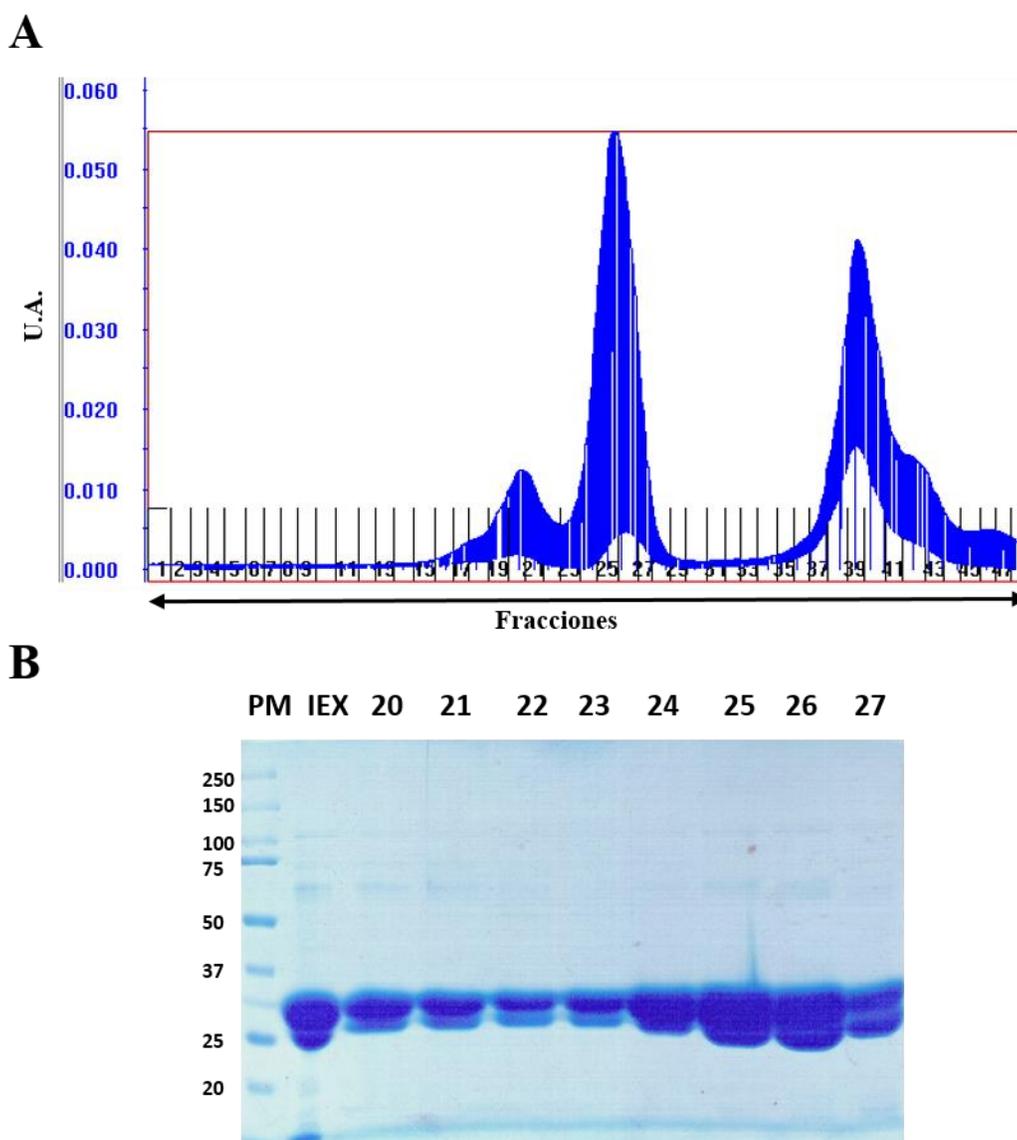
**Figura 26: Purificación por filtración en gel de la proteína BARF.** Se muestra el perfil de elución obtenido al utilizar la columna Superdex 200. En azul se muestra la señal de absorbancia. Se indican las unidades de absorbancia **UA** y las **fracciones** obtenidas por el FPLC. **B**: Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida SDS (12%). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, las fracciones concentradas, **Con** y las fracciones obtenidas a través de la filtración en gel.

Dado que no toda la proteína BAR se retuvo en la columna HiTrapQ, se realizó una purificación con las fracciones obtenidas previamente y dializadas contra un amortiguador libre de sales de fosfatos y con una columna de intercambio aniónico Source15Q. Se obtuvo un perfil de elución que demostró una alta concentración de proteínas unidas a la columna a partir de la fracción 7 (**Fig.27A**). La electroforesis desnaturalizante de las fracciones obtenidas reveló la elución del dominio BAR a partir de la fracción 15, así como la elución de proteínas de pesos moleculares superiores a los 150 kDa en las fracciones 20 a 25 (**Fig.27B**). La mayor cantidad del dominio BAR se obtuvo en la fracción 14, sin embargo, esta fracción y las fracciones 12 a 15, a pesar de estar enriquecidas en el dominio BAR, demostraron una elución junto con proteínas de menor peso molecular (**Fig.27B**).



**Figura 27: Purificación por intercambio aniónico de la proteína BARFULL.** **A:** Se muestra el perfil de elución obtenido con una columna de intercambio aniónico Source15 Q. En azul se muestra la señal de absorbancia y en rojo la concentración del amortiguador de elución. Se indican las unidades de absorbancia UA y las **fracciones** obtenidas por el FPLC. **B:** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida SDS (12%). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, la muestra concentrada e inyectada a la columna, **Fcon**, los lavados de la columna con amortiguador de acoplamiento, **L1** y **L2**, así como las fracciones obtenidas a lo largo del gradiente de elución.

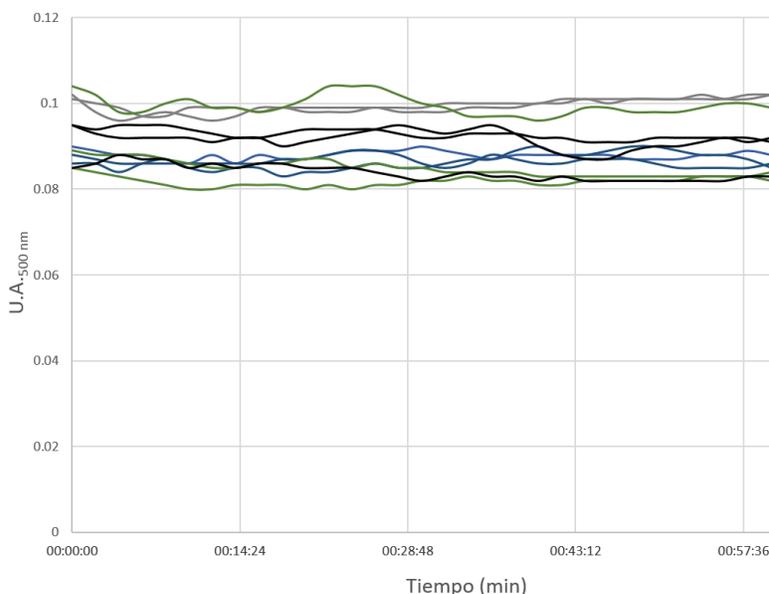
Las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico se concentraron y se separaron mediante cromatografía de filtración en gel. El perfil de elución reveló tres picos de absorbancia (**Fig.28A**). Al analizar las fracciones obtenidas mediante electroforesis desnaturalizante se observó que las primeras dos señales de absorbancia correspondían a poblaciones con la proteína BAR enriquecida (**Fig.28B**).



**Figura 28: Purificación por filtración en gel de la proteína BARF.** Se muestra el perfil de elución obtenido al utilizar la columna Superdex 200. En azul se muestra la señal de absorbancia. Se indican las unidades de absorbancia UA y las **fracciones** obtenidas por el FPLC. **B:** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida SDS (12%). Se indican los marcadores de peso molecular, **PM**, las fracciones previamente obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico y las fracciones obtenidas a través de la filtración en gel.

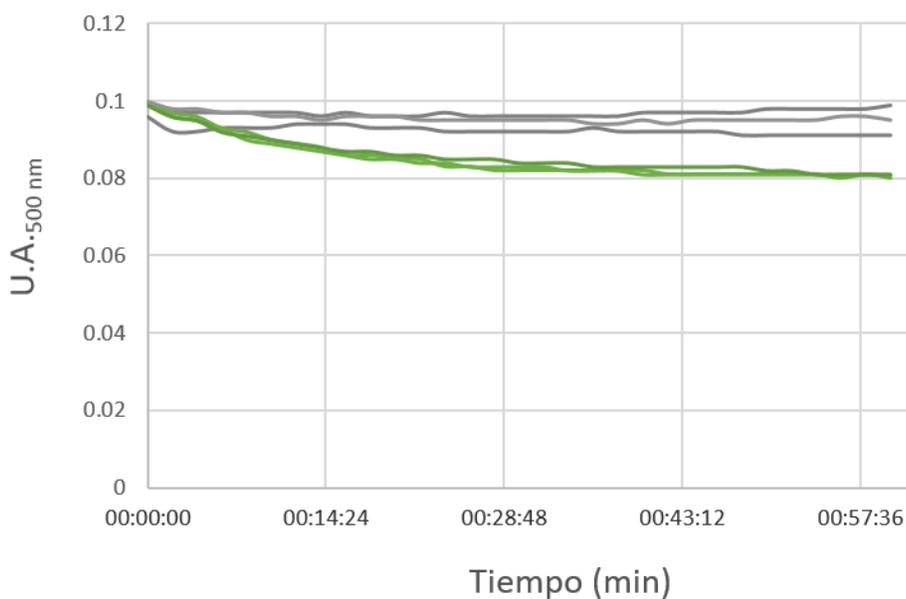
### Análisis funcional del dominio BAR

Las fracciones 24 a 27, obtenidas en la purificación del dominio BAR se utilizaron para determinar su capacidad de deformación de vesículas gigantes de lípidos aniónicos mediante ensayos de turbidez, propiedad relacionada al diámetro de partículas en una solución y que se ha utilizado previamente para evaluar el efecto de proteínas sobre el tamaño de vesículas de diferentes clases de lípidos<sup>48,70,71</sup>. Se observó cómo la concentración de sal afecta la capacidad del dominio BAR de alterar vesículas de lípidos catiónicos. A una concentración de 150 mM de NaCl se observaron señales de absorbencia de las muestras con el dominio BAR menores que las señales de las vesículas de POPG, sin embargo, estas señales resultaron bastante similares entre sí, independientemente de la concentración de proteína (**Fig.29**).



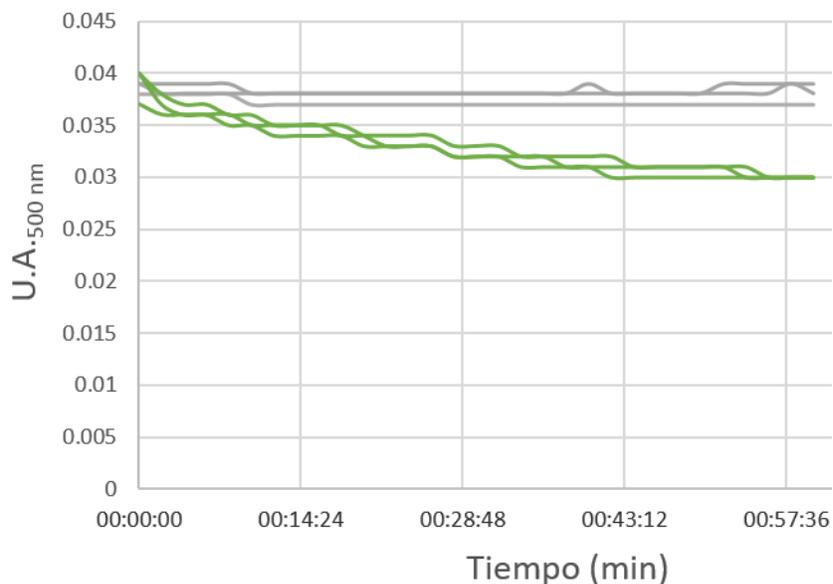
**Figura 29: Modificación de vesículas de POPG por BAR a 150 mM de NaCl.** Se muestran las señales de absorbencia a 500 nm de POPG (Gris), POPG+BAR 5 µM (verde), POPG+BAR 15 µM (azul), POPG+BAR 30 µM (negro).

Se determinó la capacidad del dominio BAR de modificar la estructura de vesículas lipídicas a menor concentración de sal, a 75 mM de NaCl. Se observó un claro efecto del dominio BAR sobre las vesículas de POPG, pues disminuyó la absorbancia de estas vesículas (Fig.30). La absorbancia de las muestras de las vesículas y de las vesículas incubadas con el dominio BAR tuvieron menor variación entre sí y el efecto de la incubación con el dominio BAR fue más evidente.



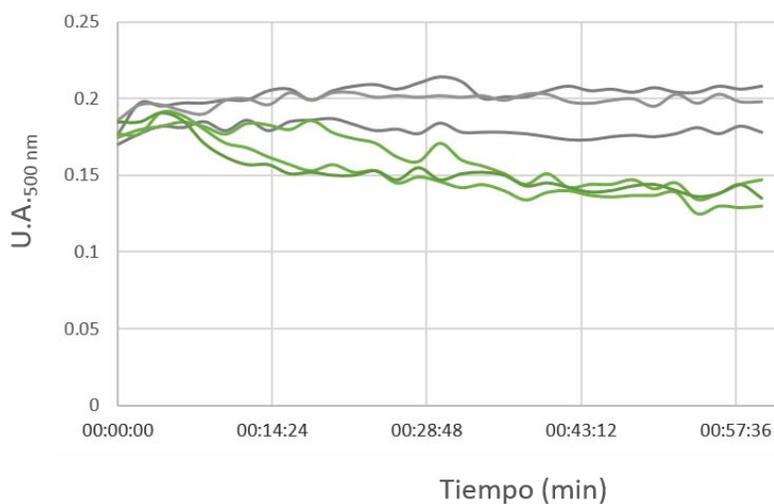
**Figura 30: Modificación de vesículas de POPG por BAR a 75 mM de NaCl.** Se muestran las señales de absorbancia a 500 nm de POPG (Gris), POPG+BAR 15 μM (verde).

Al llevar a cabo los experimentos en ausencia de sal, se observó el mismo efecto del dominio BAR sobre las vesículas de POPG. Sin embargo, este efecto fue más marcado en comparación con los experimentos llevados a cabo a 75 mM de NaCl (**Fig.31**).



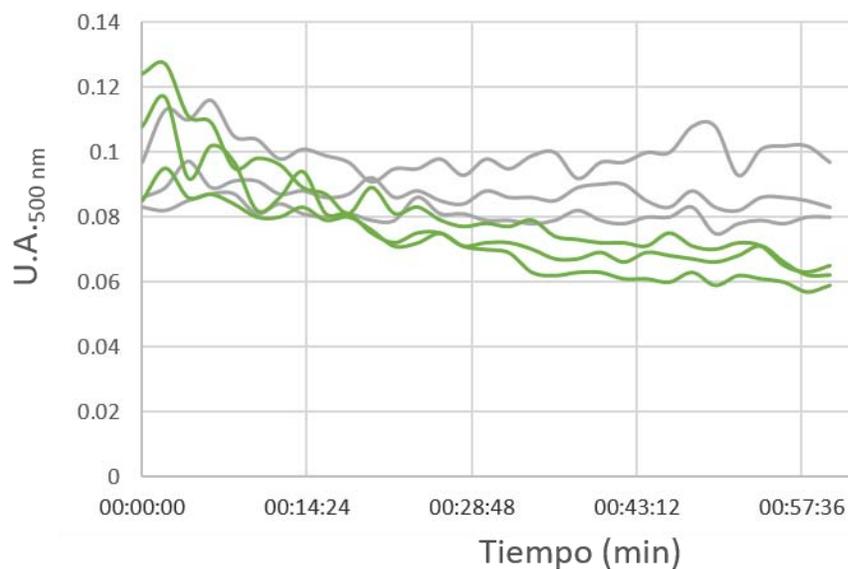
**Figura 31: Modificación de vesículas de POPG por BAR en ausencia de sal.** Se muestran las señales de absorbencia a 500 nm de POPG (Gris), POPG+BAR 15 μM (verde).

También, se determinó la capacidad del dominio BAR de alterar el tamaño de vesículas del lípido catiónico, POPC. El dominio BAR también logró disminuir la absorbancia de las vesículas de éste lípido a una concentración de NaCl de 75 mM (**Fig.32**). En comparación con las vesículas de POPG, las vesículas de POPC alcanzaron valores mayores de absorbancia y con mayor varianza.



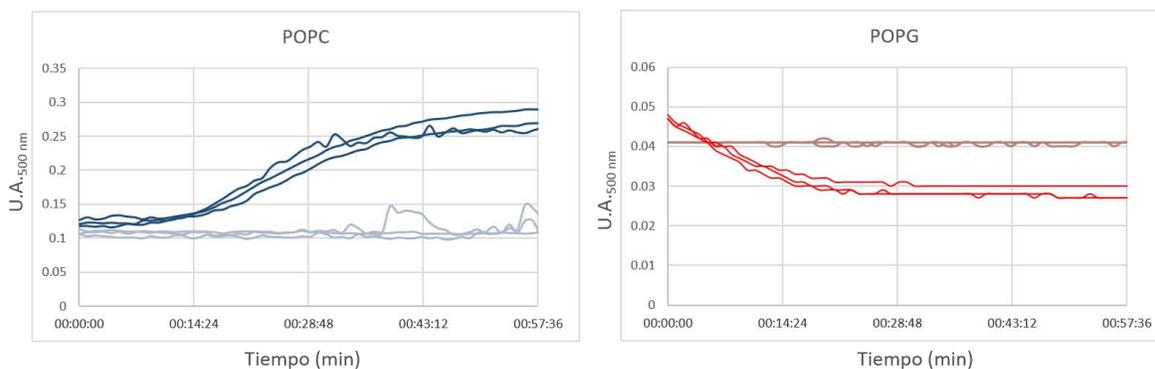
**Figura 32: Modificación de vesículas de POPC por BAR a 75 mM de NaCl.** Se muestran las señales de absorbancia a 500 nm de POPC (Gris), POPC+BAR 15 μM (verde).

De manera similar a lo observado con las vesículas de POPG en ausencia de sal, el dominio BAR también ejerció efectos de remodelación de las vesículas del lípido catiónico POPC, como se observó por su efecto de disminución de la absorbencia de las muestras de vesículas de este lípido (**Fig.33**).



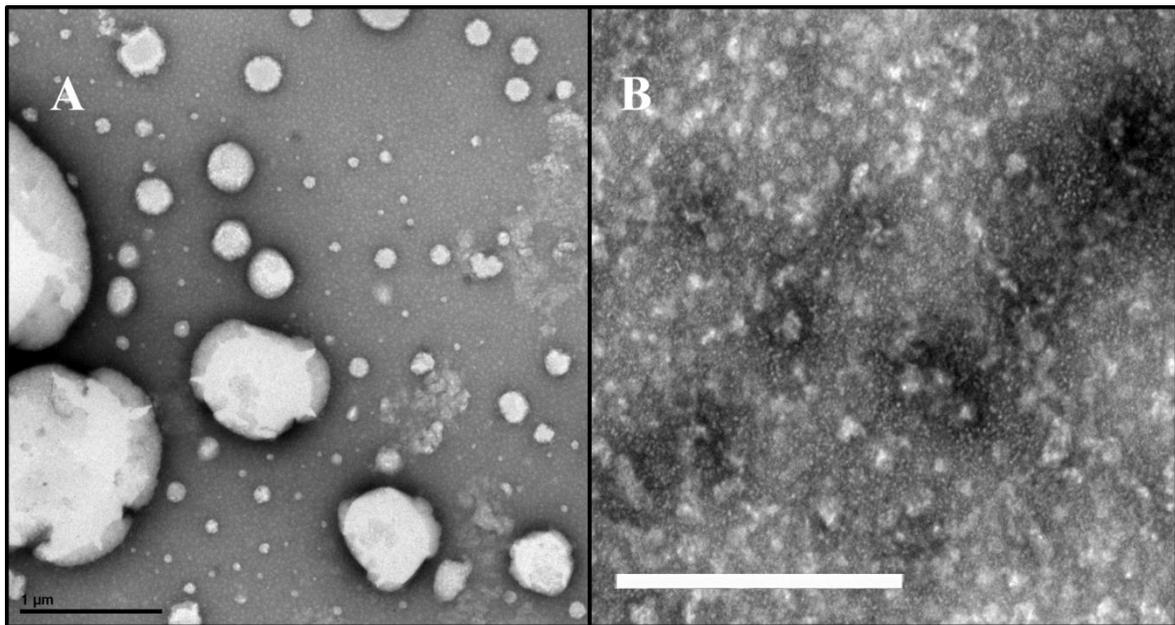
**Figura 33: Modificación de vesículas de POPC por BAR en ausencia de sal.** Se muestran las señales de absorbencia a 500 nm de POPC (Gris), POPC+BAR 15 μM (verde).

Posteriormente, se analizó el comportamiento del dominio BAR a una mayor concentración de lípidos, 1.2 mM utilizando la misma concentración de proteína en ausencia de sal. Al estudiar el comportamiento de dominio BAR en presencia de POPC, se observó un efecto que no se había obtenido en los experimentos previos, la absorbencia de las muestras con POPC y con el dominio BAR aumentó con el tiempo. En el caso de POPG, observamos la misma tendencia de experimentos anteriores, la disminución de la absorbencia de muestras con el dominio BAR (**Fig.34**).



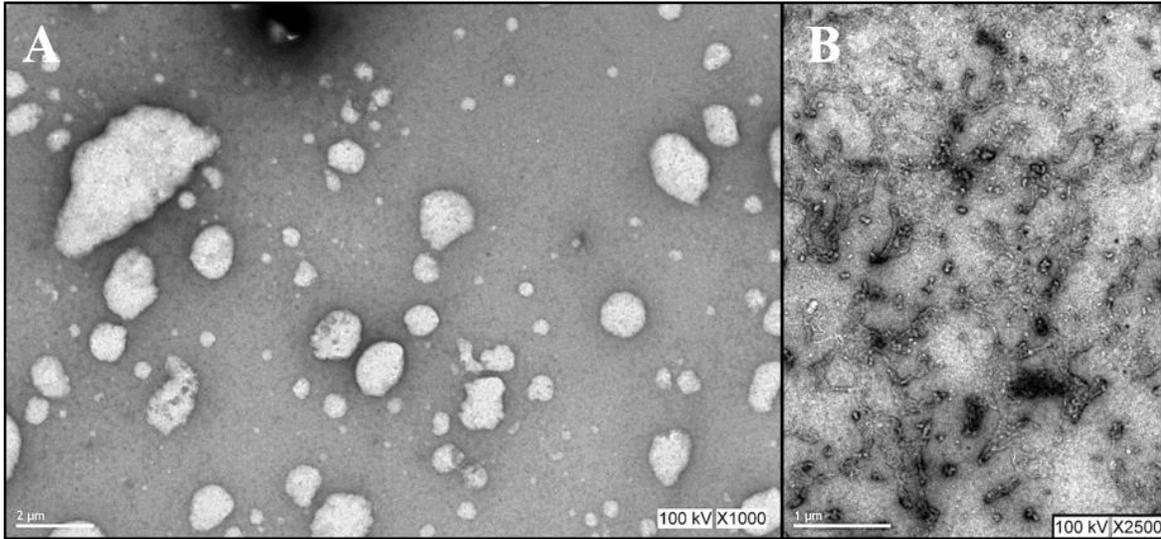
**Figura 34: Modificación de vesículas de lípidos polares a 1.2 mM por el dominio BAR.** Se muestran las señales de absorbencia a 500 nm de POPG (Azul claro), POPG+BAR 15  $\mu$ M (Azul oscuro), de POPC (Rojo claro), POPC+BAR 15  $\mu$ M (Rojo oscuro).

Se analizaron las muestras de vesículas de POPG sin sal mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando la técnica de tinción negativa. En las muestras de vesículas de POPG se observaron vesículas de diferentes diámetros, de alrededor de 300 a 1200 nm (**Fig.35A**) mientras que en las muestras de vesículas incubadas con el dominio BAR se observaron vesículas de diámetros del orden de los 30 nm (**Fig.35B**).



**Figura 35: Modificación de vesículas de POPG por el dominio BAR.:** Se muestran imágenes de muestras teñidas negativamente obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de: **A** Vesículas de POPG y **B** Vesículas de POPG incubadas con el dominio BAR (la barra de escala es de 500 nm).

Al analizar las muestras del lípido catiónico POPC se observó un claro efecto de generación de estructuras tubulares sobre estas vesículas por el dominio BAR (**Fig.36**). Las muestras de vesículas de POPC contenían estructuras de diferentes morfologías y diámetros que variaban entre los 400 y 1000 nm (**Fig.36A**). El dominio BAR no sólo redujo el tamaño de estas vesículas, sino que también generó estructuras tubulares de diámetros de alrededor de 20 nm (**Fig.36B**)



**Figura 36: Modificación de vesículas de POPC por el dominio BAR.** **A:** Se muestran imágenes de muestras teñidas negativamente obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de vesículas de POPC. **B:** Se muestran imágenes de muestras teñidas negativamente obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de vesículas de POPC incubadas con el dominio BAR. Se indica la escala, el voltaje y el aumento de las imágenes.

## **Discusión:**

El estudio del gen Anfifisina II inició por su asociación con el control del ciclo celular<sup>34</sup> y posteriormente, se observó su participación en procesos de endocitosis. Desde su aislamiento, se observó la presencia de un dominio en el extremo amino, conservado en diferentes proteínas de organismos eucariontes denominado BAR. Poco tiempo después, se observó la capacidad de este dominio de generar estructuras tubulares a partir de vesículas lipídicas *in vitro*. La participación de Anfifisina II en la endocitosis se ha cuestionado, pues estudios de ingeniería genética en los que la expresión de este gen se abatió, demostraron que la ausencia del gen no afectó la capacidad de endocitosis. A pesar de esto, los dominios BAR se han estudiado extensamente *in vitro*, y su capacidad de unión a estructuras lipídicas y la deformación de éstas ha sido consistente. Más aún, el estudio de los dominios BAR cobró relevancia pues se describió su capacidad de detectar curvatura membranal.

La diversidad de funciones atribuidas a Anfifisina II se debe a la generación de isoformas específicas a diferentes tejidos. El control de la generación de diferentes isoformas ha demostrado ser importante, pues su desregulación resulta en patologías como el cáncer, en las que factores de transcripción favorecen la generación de isoformas de Bin1 que carecen de su capacidad supresora de tumores<sup>72</sup>.

El estudio *in vitro* de proteínas periféricas de membrana ha permitido describir los factores involucrados en su unión a estructuras lipídicas. Las proteínas de la familia BAR se han estudiado extensamente *in vitro* y en el caso de los dominios N-BAR se ha observado la contribución a la unión y modificación de estructuras lipídicas de sus dos módulos estructurales, la hélice 0 y el dominio BAR canónico. La conclusión recurrente de los trabajos que han analizado los dominios N-BAR ha sido que éstos se adhieren a la membrana a través de su interfaz cóncava, en la que se localizan residuos de aminoácidos de carga positiva y que delimita su interacción a membranas con lípidos polares de carga negativa. Asimismo, el otro módulo funcional con que cuentan estos dominios, la hélice 0, se ha propuesto que funge como un módulo de anclaje a la membrana, ya que ésta adquiere una estructura alfa helicoidal en presencia de lípidos de carga negativa y se inserta de manera parcial en la monocapa citosólica de la membrana plasmática. En este trabajo se presentó la oportunidad de evaluar la contribución a la unión a membranas de uno de los parches de residuos positivos

del dominio BAR a través del estudio comparativo entre el dominio BAR y el dominio BAR carente del exón 6, rico en residuos positivos.

Al iniciar el estudio de la comparación estructural entre el dominio BAR de configuración exónica completa y el dominio BAR de la isoforma carente del exón 6 se han encontrado dificultades para la sobreexpresión de este último. Por otro lado, el análisis de la interacción entre el dominio BAR y vesículas de lípidos polares arrojó resultados contrastantes con las propiedades de la interacción entre estos dominios y lípidos polares, previamente descritas en la literatura.

El estudio de las propiedades del dominio BAR6 no se llevó a cabo pues las condiciones exploradas en sistemas bacterianos no resultaron en niveles óptimos de expresión. La producción de proteínas recombinantes utilizando sistemas bacterianos ha resultado un sistema eficiente para la producción y el estudio de éstas. Sin embargo, las características de la secuencia y estructura terciaria de la proteína de interés dictarán la eficiencia con que esta podrá expresarse en bacterias. El hecho de que la proteína BAR6 no se produjera a niveles suficientes resultó inesperado pues se ha reportado que los niveles de producción de una proteína disminuirán conforme el tamaño de estas incrementa<sup>73</sup>. Otros factores que se ha reportado afectan los niveles de expresión en sistemas bacterianos son la presencia de porciones transmembranales y la presencia de estructura secundaria en el RNAm<sup>74</sup>. El dominio BAR6 se expresó a bajos niveles en las cepas utilizadas y en diferentes concentraciones del agente inductor IPTG. Esto indica que la limitación de la traducción por codones raros en bacteria, y la hidrofobicidad de la proteína BAR6 no fueron los factores limitantes en su producción, por lo que se plantea buscar otros sistemas de expresión, ya que nuestro equipo de trabajo ha observado que en células CHO, la isoforma Bin1-10F7, que posee el dominio BAR6 tiene mayores niveles de expresión respecto a otras isoformas con dominios BAR completos<sup>75</sup>.

En este trabajo se realizaron dos protocolos de purificación del dominio BAR, el primero consistente en un primer paso de precipitación por sulfato de amonio seguido de purificación por intercambio aniónico; y el segundo consistente en una purificación por intercambio aniónico utilizando la columna HiTrap Q, seguida de una purificación por intercambio aniónico en ausencia de sales de fosfato utilizando la columna Source15Q y seguida,

finalmente por una purificación mediante filtración en gel con una columna Superdex200. La elaboración de este protocolo de purificación permitió realizar experimentos para analizar la función del dominio BAR.

Se ha propuesto que el dominio BAR deforma membranas intracelulares a través de dos mecanismos, actuando como un molde que impone su curvatura a la membrana y a través de la inserción de una hélice anfipática en la membrana. En este trabajo la asociación del dominio BAR a vesículas de lípidos polares se analizó mediante ensayos de turbidez y visualización a través de microscopía electrónica. Los ensayos de turbidez permitieron confirmar que el dominio BAR reduce el tamaño de vesículas de lípidos con carga negativa de manera dependiente de la fuerza iónica del medio. Sin embargo, estos ensayos arrojaron resultados contrastantes con la selectividad del dominio BAR por vesículas de lípidos de carga negativa descrita en la literatura<sup>33,36,48</sup>, ya que se observó que el dominio BAR también es capaz de reducir los tamaños de vesículas de lípidos con carga positiva. Aunado a esto, al aumentar la concentración de lípidos en ausencia de sal se observó un resultado inesperado, el dominio BAR provocó un aumento en la absorbancia de las muestras de vesículas de POPC. El efecto del dominio BAR sobre la morfología de vesículas de POPG y POPC en ausencia de sal se visualizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Se observó que el dominio BAR disminuyó el tamaño de vesículas de POPG a diámetros de decenas de nanómetros, y deformó las vesículas de POPC a estructuras tubulares.

En este trabajo se obtuvieron resultados que indican una interacción entre el dominio BAR y POPC, así como un efecto de generación de estructuras tubulares a partir de éstas, contrario a la selectividad por carga de estos dominios previamente reportada. Los ensayos de turbidez han sido utilizados previamente para determinar el efecto de proteínas y otras moléculas sobre el tamaño de vesículas multilamelares. Proteínas tales como ApoAI<sup>71</sup>, ApoE<sup>70</sup> y alfa sinucleína<sup>48</sup> han producido efectos similares a los observados en las muestras de vesículas de POPG incubadas con el dominio BAR. Por otro lado, los resultados obtenidos al incubar vesículas de POPC con el dominio BAR asemejan a los obtenidos en estudios con la proteína Pex-11, asociada a la biogénesis de peroxisomas. En estos estudios se ha observado la asociación de péptidos anfipáticos derivados de esta proteína a vesículas de composición lipídica similar a la de membranas de peroxisomas mediante microscopía electrónica así

como por ensayos de turbidez, en los que se observó una disminución en la transmitancia de las vesículas incubadas con el péptido pex11, esto es un aumento en la absorbencia<sup>76</sup>. Este resultado fue interpretado como un indicio de interacción entre el péptido y las vesículas. Si bien, en la literatura existen estudios en los que se demuestra la asociación de proteínas periféricas o péptidos a vesículas o arreglos lipídicos compuestos de lípidos con carga negativa, también existen casos reportados de proteínas capaces de unir y alterar la morfología de membranas de lípidos positivos. Tal es el caso de péptidos derivados del extremo carboxilo de la cinasa del receptor acoplado a proteína G, GPCRK5<sup>77</sup>, así como de péptidos antimicrobianos conocidos como magaininas; estos últimos unen membranas de POPC con una orientación casi paralela en relación al plano de la membrana, a diferencia de cuando unen membranas de POPG, utilizadas como modelos de membranas de bacterias Gram-negativas en las que se insertan en un ángulo prácticamente perpendicular<sup>78</sup>.

Nuestro equipo de trabajo aisló una isoforma no descrita previamente, en este trabajo se intentaron dilucidar las diferencias estructurales y funcionales que genera la ablación de una porción del dominio BAR de Anfifisina II. La escasa producción de esta proteína en sistemas bacterianos probablemente signifique que esta proteína es inestable. Resta encontrar las condiciones de producción óptima de esta proteína.

Como se ha mencionado, el dominio BAR fue capaz de disminuir la absorbencia de vesículas de lípidos catiónicos, lo que podría indicar que la inserción de la hélice anfipática en la membrana es la principal manera con la que este dominio moldea membranas. Para confirmar esto, serán necesarios experimentos con lípidos de grupos polares de mayor tamaño pues cabe la posibilidad de que el grupo polar de POPG sea pequeño y este dominio necesite grupos polares de mayor tamaño para poder ejercer el efecto óptimo de moldeo sobre la membrana.

## **Conclusiones:**

- ❖ La metodología utilizada para la obtención del dominio BAR6 resultó en niveles de expresión mínimos de éste, por lo que no se pudo elaborar un protocolo de purificación de proteína.
- ❖ El efecto sobre la señal de absorbancia de vesículas gigantes de POPG y la generación de vesículas de diámetros de decenas de nanómetros confirmaron que el dominio BAR deforma vesículas del lípido aniónico POPG.
- ❖ El dominio BAR también es capaz de deformar vesículas del lípido catiónico POPC, como se observó a través de su efecto sobre la señal de absorbancia y la generación de estructuras tubulares visualizadas a través de microscopía electrónica.

## **Perspectivas**

- ❖ Obtención de las condiciones apropiadas para la expresión eficiente del dominio BAR carente del exón 6.
- ❖ Aislamiento del dominio BAR carente del exón 6.
- ❖ Análisis experimental de la capacidad de unión a y deformación de vesículas de lípidos polares del dominio BAR carente del exón 6.
- ❖ Determinación de estado oligomérico del dominio BAR6 a través de cromatografía de exclusión de peso molecular.
- ❖ Determinación de estructura secundaria del dominio BAR6 en ausencia y presencia de lípidos polares.
- ❖ Determinación de estructura secundaria del dominio BAR en presencia de POPC.

## Participación en artículos sometidos a publicación

- ❖ Relationship between amphiphysin II/Bin1 and c-Myc in receptor-mediated endocytosis of modified lipoproteins. Damián-Zamacona S, García-González V, Avila-Barrientos LP, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. *Biochemical and biophysical Research Communications* (2014).
- ❖ A novel Amphiphysin II isoform – Implications for membrane-protein electrostatic binding models. Damián-Zamacona S, Avila-Barrientos LP, Mas-Oliva J. *Artículo en preparación.*

## Referencias

1. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–31 (1972).
2. Reynwar, B. J. & Deserno, M. Membrane composition-mediated protein-protein interactions. *Biointerphases* **3**, FA117 (2008).
3. Piggot, T. J., Holdbrook, D. a & Khalid, S. Conformational dynamics and membrane interactions of the E. coli outer membrane protein FecA: a molecular dynamics simulation study. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 284–93 (2013).
4. Saffman, G. & Delbrück, M. Brownian motion in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3111–3113 (1975).
5. Shimshick, E. J. & McConnell, H. M. Lateral phase separation in phospholipid membranes. *Biochemistry* **12**, 2351–60 (1973).
6. Wolf, D. E. Overcoming random diffusion in polarized cells--corralling the drunken beggar. *Bioessays* **6**, 116–21 (1987).
7. Karnovsky, M. J., Kleinfeld, a M., Hoover, R. L. & Klausner, R. D. The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.* **94**, 1–6 (1982).
8. Bagatolli, L. a & Mouritsen, O. G. Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front. Plant Sci.* **4**, 457 (2013).
9. Kleinzeller, a. William Hewson's studies of red blood corpuscles and the evolving concept of a cell membrane. *Am. J. Physiol.* **271**, C1–8 (1996).
10. Helfrich, W. Elastic Properties of Lipid Bilayers—Theory and Possible Experiments. *Z. Naturforsch. C* **28**, 693–703 (1973).
11. Zimmerberg, J. & Kozlov, M. M. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 9–19 (2006).
12. Lipowsky, R. The morphology of lipid membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 531–40 (1995).
13. Van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–24 (2008).

14. Janmey, P. a & Kinnunen, P. K. J. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* **16**, 538–46 (2006).
15. Baumgart, T., Hess, S. T. & Webb, W. W. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* **425**, 821–4 (2003).
16. Sheetz, M. P., Painter, R. G. & Singer, S. J. Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes. *J. Cell Biol.* **70**, 193–203 (1976).
17. Tsafrir, I., Caspi, Y., Guedeau-Boudeville, M.-A., Arzi, T. & Stavans, J. Budding and Tubulation in Highly Oblate Vesicles by Anchored Amphiphilic Molecules. *Phys. Rev. Lett.* **91**, 138102 (2003).
18. Mouritsen, O. G. & Bloom, M. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys. J.* **46**, 141–53 (1984).
19. Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M. M. & Rapoport, T. a. Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 329–54 (2009).
20. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Angstroms resolution. *Nature* **318**, 618–624 (1985).
21. Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D. & Kühlbrandt, W. Structure of the yeast F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13602–7 (2012).
22. Hu, J. *et al.* Membrane Proteins of the Endoplasmic Reticulum induce high-curvature tubules. *Science (80- )*. **319**, 1247–1250 (2014).
23. Kirchhausen, T. Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* 699–727 (2000).
24. Itoh, T. & Takenawa, T. Mechanisms of membrane deformation by lipid-binding domains. *Prog. Lipid Res.* **48**, 298–305 (2009).
25. Segrest, J. P., Jackson, R. L., Morrisett, J. D. & Gotto, a M. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.* **38**, 247–58 (1974).
26. Segrest, J. P., De Loof, H., Dohlman, J. G., Brouillette, C. G. & Anantharamaiah, G. M. Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins* **8**, 103–17 (1990).

27. Itoh, T. & De Camilli, P. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 897–912 (2006).
28. Málková, S. *et al.* X-ray reflectivity studies of cPLA2{alpha}-C2 domains adsorbed onto Langmuir monolayers of SOPC. *Biophys. J.* **89**, 1861–73 (2005).
29. Stowell, M. H. B., Marks, B., Wigge, P. & McMahon, H. T. Nucleotide-dependent changes in dynamin : evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* **1**, 27–32 (1999).
30. Pucadyil, T. J. & Schmid, S. L. Real-time visualization of dynamin-catalyzed membrane fission and vesicle release. *Cell* **135**, 1263–75 (2008).
31. Moravcevic, K., Oxley, C. L. & Lemmon, M. a. Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity. *Structure* **20**, 15–27 (2012).
32. Beschiaschvili, G. & Seelig, J. Peptide binding to lipid bilayers. Nonclassical hydrophobic effect and membrane-induced pK shifts. *Biochemistry* **31**, 10044–53 (1992).
33. Peter, B. J. *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495–9 (2004).
34. Sakamuro, D., Elliot, K. J., Wechsler-Reya, R. & Prendergast, G. C. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nature* **14**, 69–77 (1996).
35. Negorev, D. *et al.* The Bin1 gene localizes to human chromosome 2q14 by PCR analysis of somatic cell hybrids and fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **33**, 329–31 (1996).
36. Suetsugu, S., Toyooka, K. & Senju, Y. Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 340–9 (2010).
37. Qualmann, B., Koch, D. & Kessels, M. M. Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J.* **30**, 3501–15 (2011).
38. Tsutsui, K., Maeda, Y., Seki, S. & Tokunaga, a. cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue-specific expression of its multiple splice variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 178–83 (1997).

39. Löw, C. *et al.* Structure and dynamics of helix-0 of the N-BAR domain in lipid micelles and bilayers. *Biophys. J.* **95**, 4315–23 (2008).
40. Boucrot, E. *et al.* Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell* **149**, 124–36 (2012).
41. Bhatia, V. K. *et al.* Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *EMBO J.* **28**, 3303–14 (2009).
42. Galic, M. *et al.* External push and internal pull forces recruit curvature-sensing N-BAR domain proteins to the plasma membrane. *Nat. Cell Biol.* **14**, 874–81 (2012).
43. Issidorides, M., Mytilineou, C., Panayotacopoulou, M. & Yahr, M. Lewy bodies in parkinsonism share components with intraneuronal protein bodies of normal brains. *J. Neural Transm.* **3**, 49–61 (1991).
44. Gai, W. P. *et al.* In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies. *Exp. Neurol.* **166**, 324–33 (2000).
45. Spillantini, M. *et al.* Alpha Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
46. Den Hartog Jager, W. Sphingomyelin in Lewy Inclusion Bodies in Parkinson's Disease. *Arch. Neurol.* **21**, 615–619 (1969).
47. Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. & George, J. Stabilization of alpha - Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes. *J. Biol. Chem.* **273**, 9443–9449 (1998).
48. Varkey, J. *et al.* Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* **285**, 32486–93 (2010).
49. Pirozzi, F. *et al.* Insertion of 16 amino acids in the BAR domain of the oligophrenin 1 protein causes mental retardation and cerebellar hypoplasia in an Italian family. *Hum. Mutat.* **32**, E2294–307 (2011).
50. Santos-Rebouças, C. B. *et al.* A novel in-frame deletion affecting the BAR domain of OPHN1 in a family with intellectual disability and hippocampal alterations. *Eur. J. Hum. Genet.* 1–8 (2013). doi:10.1038/ejhg.2013.216
51. Billuart, P. *et al.* Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* **392**, 923–6 (1998).

52. Ramjaun, a R., Micheva, K. D., Bouchelet, I. & McPherson, P. S. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J. Biol. Chem.* **272**, 16700–6 (1997).
53. Lichte, B., Veh, R. W., Meyer, H. E. & Kilimann, M. W. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J.* **11**, 2521–2530 (1992).
54. Sparks, A., Hoffman, N., McConnell, S., Fowlkes, D. & Kay, B. Cloning of ligand targets: Systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat. Biotechnol.* **14**, 741–744 (1996).
55. Kadlec, L. & Pendergast, a M. The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase and may play a role in cytoskeletal regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12390–5 (1997).
56. Butler, M. H. *et al.* Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **137**, 1355–67 (1997).
57. Wigge, P. *et al.* Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2003–15 (1997).
58. Lee, E. *et al.* Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193–6 (2002).
59. Damián Zamacona, S. Expresión de isoformas de amfifisina II/BIN1 como moléculas adaptadoras en el proceso de endocitosis mediada por receptor. (2005).
60. Childress, C., Lin, Q. & Yang, W. Dimerization is required for SH3PX1 tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor signalling and interaction with ACK2. *Biochem. J.* **394**, 693–8 (2006).
61. Hanahan, D. Studies o n Transformation of Escherichia coli with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580 (1983).
62. Birnboim, H. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979).
63. Pouwels, P., Rotterdam, J. & Cohen, J. Structure of the Replicative Form of Bacteriophage  $\phi$ X174. *J. Mol. Biol.* **40**, 379–390 (1969).
64. Studier, F. W. & Moffatt, B. a. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–30 (1986).

65. Silverstone, a E., Arditti, R. R. & Magasanik, B. Catabolite-insensitive revertants of lac promoter mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **66**, 773–9 (1970).
66. Chamberlin, M., McGrath, J. & Waskell, L. New RNA Polymerase from Escherichia coli infected with bacteriophage T7. *Nature* **228**, 227.231 (1970).
67. Studier, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* **219**, 37–44 (1991).
68. Smith, P. K. *et al.* Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
69. Matsuzaki, K. *et al.* Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1467**, 219–226 (2000).
70. Segall, M. L. Influence of apoE domain structure and polymorphism on the kinetics of phospholipid vesicle solubilization. *J. Lipid Res.* **43**, 1688–1700 (2002).
71. Pownall, H. J., Massey, J. B., Kusserow, S. K. & Gotto, A. M. Kinetics of lipid-protein interactions: interaction of apolipoprotein A-I from human plasma high density lipoproteins with phosphatidylcholines. *Biochemistry* **17**, 1183–1188 (1978).
72. Anczuków, O. *et al.* The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 220–8 (2012).
73. Francis, D. M. & Page, R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. *Curr. Protoc. protein Sci.* **Chapter 5**, Unit 5.24.1–29 (2010).
74. Hatfield, G. & Roth, D. Optimizing scaleup yield for protein production: Computational Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering TM. *Biotechnol. Annu. Rev.* **13**, 27–42 (2007).
75. Damián-Zamacona, S., González-García, V., Avila-Barrientos, L. P., Delgado-Coello, B. A. & Mas-Oliva, J. Relationship between amphiphysin II/Bin1 and c-Myc in receptor-mediated endocytosis of modified lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Enviado.*
76. Opaliński, Ł., Kiel, J. a K. W., Williams, C., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. Membrane curvature during peroxisome fission requires Pex11. *EMBO J.* **30**, 5–16 (2011).

77. Ding, B. *et al.* Unveiling the membrane-binding properties of N-terminal and C-terminal regions of G protein-coupled receptor kinase 5 by combined optical spectroscopies. *Langmuir* **30**, 823–31 (2014).
78. Nguyen, K. T., Le Clair, S. V, Ye, S. & Chen, Z. Molecular interactions between magainin 2 and model membranes in situ. *J. Phys. Chem. B* **113**, 12358–63 (2009).