

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ELASTICIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE
LEVADURAS MEDIANTE ESTUDIOS DE RETRACCIÓN
DE NANOTUBOS**

Tesinista: Bischof, Andrea Alejandra

Firma:.....

Directora: Dra. Wilke, Natalia

Firma:.....

**Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto- Facultad de
Ciencias Químicas**

CIQUBIC – CONICET – UNC

**ELASTICIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE LEVADURAS MEDIANTE
ESTUDIOS DE RETRACCIÓN DE NANOTUBOS**

Tribunal examinador:

Nombre y apellido:.....Firma:.....
Prof. Dra. María Gabriela Paraje
Profesora Titular

Nombre y apellido:.....Firma:.....
Anahi V. Turina

Nombre y apellido:.....Firma:.....
Benjamín Caruso

Calificación: 10 (diez).....

Fecha: 15 de diciembre del 2021.....

índice

Introducción	1
Materiales	5
Métodos	6
Resultados y Discusión	9
Conclusión	18
Bibliografía	20



Resumen

Las membranas biológicas constituyen la estructura celular más común en la materia viva, pudiendo ser consideradas como un ejemplo de alta tecnología natural de microencapsulación. Las membranas se comportan como barreras mecánicas semipermeables, regulando el tránsito y la señalización de los compartimentos celulares con el exterior. A su vez, son extremadamente dinámicas tanto de manera global como a pequeña escala espacial. Las interacciones de los lípidos entre sí y con otras moléculas presentes en las membranas (principalmente proteínas) son determinantes para muchas funciones, como la señalización, los procesos de fusión y fisión o la adhesión celular. La forma física de una estructura membranosa está determinada básicamente por su grado de curvatura intrínseca. De igual manera, esta propiedad evidencia la tendencia que tienen los lípidos a formar fases no lamelares. La disposición de los lípidos en la bicapa está directamente relacionada con su forma intrínseca o geométrica, que también condiciona el modo en que estas moléculas se empaquetan e interaccionan entre sí. En este trabajo de tesina se puso foco en la capacidad que tiene la membrana plasmática de cambiar localmente su curvatura. Para realizar estos estudios, deformamos la membrana plasmática localmente, generando tubos de membrana de diámetro nanométrico mediante el empleo de pinzas ópticas. El trabajo se realizó sobre membranas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa BY4741. Estudios previos han demostrado que cuando una bicapa lipídica es sometida a un cambio local de curvatura presenta un comportamiento elástico, mientras que las membranas celulares de mamíferos son marcadamente viscoelásticas. Por otro lado, no se han reportado estudios de deformaciones locales de curvatura en membranas de organismos de otros reinos, que no contienen colesterol sino otros esteroides u hopanoides. Mediante estos experimentos se pretendió poner a punto la metodología a fin de estudiar cómo es la energética de deformación fuera del plano de membrana plasmática de levaduras *S. cerevisiae* cepa BY4741, la cual contiene un alto porcentaje del esteroide ergosterol, en comparación con el comportamiento ya conocido de membrana plasmática de células de mamífero. En este trabajo se encontró que la relajación de nanotubos de membranas plasmáticas de levaduras *S. cerevisiae* cepa BY4741 ocurre con tiempos característicos τ en el intervalo 0,02-0,5 s, y si promediamos todos los valores encontrados, obtenemos un valor promedio de $0,2 \text{ s} \pm 0,1 \text{ s}$. Este valor es similar a lo informado para eritrocitos, así como para células tumorales cerebrales en humanos y células de ovario de hámster chino. Hasta donde sabemos, no hay estudios de este tipo reportados en microorganismos eucariotas.

Abstract

Biological membranes are the most common cell structures in living material, being a formidable example of natural high technology micro-encapsulation. They behave like mechanical semi-permeable barriers, regulating cellular compartment signaling and transit. They are extremely dynamic on global and local scales.

Many cell functions, such as signaling, fusion, fission and cellular adhesion, are determined by lipid-lipid, as well as lipid-protein interactions, and of the lipid with the environment. The intrinsic curvature determines the membrane structure and the lipid tendency to form non-lamellar phases.

The focus of this thesis was to study the process of a local change in curvature in plasma membranes using membrane nanotethers formed with optical tweezers. The retraction process of the nanotubes generated on the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain BY4741 was analyzed. Previous studies on lipid bilayers have shown that local changes of curvature behave elastically, while mammal cellular membrane shows a viscoelastic behavior. As far as we know, there is no evidence of local membrane curvature deformations on organisms of other kingdoms, which are cholesterol-free, but contain other sterols or hopanoid.

The aim of the thesis was to set up the methodology for studying out-of-plane deformations in the plasma membrane of *S. cerevisiae* BY4741 strain, which contains high ergosterol proportions. Values for the characteristic time of relaxation of nanotubes in the range of 0.02-0.5s were found, with an average of $0.2s \pm 0.1s$. This value is similar to those reported for erythrocytes, human brain tumor cells and Chinese hamster ovary cells.

Palabras claves

Nanotubos de membrana, pinzas ópticas, flexibilidad, curvatura, biomembranas, levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Introducción

Las membranas biológicas constituyen la estructura celular más común en la materia viva, pudiendo ser consideradas un ejemplo de alta tecnología natural de microencapsulación. Innumerables procesos fisiológicos de vital importancia para la homeostasis celular ocurren o son mediados por las membranas, ya sea protagonizando un rol de carácter mecánico, como en los procesos de movilidad y la fagocitosis en organismos unicelulares, o llevando a cabo funciones esenciales, como su rol en la producción de energía y el inmunoreconocimiento en organismos altamente organizados [1]. Las membranas se comportan como barreras mecánicas semipermeables, regulando el tránsito y la señalización de los compartimentos celulares con el exterior. A su vez, son extremadamente dinámicas tanto de manera global como a pequeña escala espacial [2]. Tal y como las conocemos hoy en día, pueden definirse principalmente como la consecuencia del efecto hidrofóbico. Éste fenómeno que gobierna el comportamiento de las moléculas de lípido en medio acuoso es el principal responsable de la estabilidad de la bicapa lipídica, componente estructural de las membranas biológicas.

El modelo estructural de membrana plasmática más aceptado es el conocido como mosaico fluido, propuesto en 1972 por Seymour J. Singer y Garth L. Nicolson [3], que hereda la idea de bicapa lipídica contenida en el modelo propuesto por Danielli y Davson en 1935 [4] pero modifica la localización de las proteínas. El modelo se basa en principios termodinámicos y evidencias experimentales que apoyan la movilidad lateral de proteínas dentro de la matriz membranosa, cuya base estructural es una bicapa de lípidos inmersa en el medio acuoso. Este modelo representa a la membrana como una matriz lipídica viscosa de dos dimensiones, en la que las proteínas difunden libremente e interactúan con los lípidos mediante fuerzas hidrofóbicas.

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

Las bicapas lipídicas, dada su composición y arquitectura, exhiben una serie de propiedades que condicionan su interacción con otras biomoléculas, especialmente con las proteínas. Algunas de estas propiedades son su espesor, la curvatura intrínseca de los lípidos, su compresibilidad elástica o su heterogeneidad lateral. Se ha postulado que tales propiedades materiales tienen la capacidad de modular la interacción entre las proteínas embebidas en su matriz, ya que la propia membrana es capaz de ejercer como un regulador alostérico de la interacción proteína-proteína. Hallazgos bioquímicos y biofísicos revelan la existencia de distintos niveles de organización dinámica, tanto en la dirección transversal de la bicapa lipídica (asimetría lipídica) como en la dimensión lateral (dominios lipídicos) [5]. A medida que se han desarrollado distintos métodos de investigación, se han ido descubriendo nuevos e interesantes aspectos de la estructura y la organización de las membranas lipídicas.

Las interacciones de los lípidos entre sí y con otras moléculas presentes en las membranas (principalmente proteínas) son determinantes para muchas funciones, como la señalización, los procesos de fusión y fisión o la adhesión celular. Por ello, uno de los fenómenos físico-químicos más ampliamente estudiados de las membranas biológicas es la separación en dominios. Un dominio puede considerarse como un reordenamiento espacial de la membrana, como resultado de la segregación lateral espontánea de sus componentes, que a su vez cuenta con una composición, estructura, estabilidad, dinámica y, por ende, función biológica distintas con respecto a la membrana circundante. Hoy en día se acepta este modelo que considera a la membrana como un mosaico con zonas de mayor orden, denominados balsas lipídicas (*rafts*), que conviven con zonas más desordenadas y cuya dinámica estaría influenciada por la actividad celular e interacciones lípido-proteína [6; 7]. En células vivas, se propone que la segregación lateral de los componentes de la membrana es importante para generar barreras con distinta composición y por tanto con funciones diferentes.

Los principales lípidos estructurales que encontramos en las membranas eucariotas son los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los esteroides. Los primeros son más abundantes y sus representantes mayoritarios son: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y cardiolipina (CL). Todos ellos pueden presentar insaturaciones de tipo *cis* en sus cadenas acílicas, cualidad esta que confiere fluidez a la membrana. Los esfingolípidos, por su parte, tienen un núcleo hidrofóbico compuesto por ceramida, la cual puede aparecer como glucosil- o galactosilceramida en el caso particular de los glicosfingolípidos, y también pueden contener insaturaciones tipo *trans*. Los representantes mayoritarios de esta familia de lípidos en organismos superiores son la esfingomielina (SM), los glicosfingolípidos (GSL) y los gangliósidos, estos últimos son glicosfingolípidos con ácidos siálicos terminales [8]. En relación a los esteroides, el más estudiado es sin duda el colesterol (chol), el cual es el esteroide mayoritario en mamíferos. A partir de los estudios de las propiedades de membranas con colesterol se ha propuesto la existencia de membranas en estado líquido-ordenado, que es un estado de fase fluido pero compacto [9]. Este mismo estado de fase es inducido por esteroides de otros reinos: fitoesteroides en plantas y ergosterol en hongos [10], y se acepta que los esteroides de cada reino son responsables de dotar a las membranas plasmáticas de sus particulares propiedades mecánicas [11].

La forma física de una estructura está determinada básicamente por su grado de curvatura intrínseca. De igual manera, esta propiedad evidencia la tendencia que tienen los lípidos a formar fases no lamelares [12]. Su carácter dinámico se ve influenciado por varios factores, entre los que se incluyen la composición lipídica, la oligomerización de las proteínas de membrana y otras variantes físico-ambientales. En un contexto puramente biológico, dicha propiedad tiene la capacidad de controlar la forma que adquiere la membrana bajo determinadas condiciones, la cual es vital en procesos como la fisión, la fusión o el tráfico vesicular mediado por endocitosis o fagocitosis.

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

de formas curvadas. Si partimos de la presencia de vesículas en fase lamelar fluida, como ocurre en la mayoría de las estructuras biológicas, pero gradualmente aumentamos el contenido de lípidos con curvatura intrínseca, la membrana intentará mantener el empaquetamiento lamelar inicial, forzando a las moléculas de geometría diferente a empaquetarse en dicha estructura. Esto genera un estrés debido a la presión lateral. Cuando dicho estrés es máximo, se favorece la transición a un reordenamiento lipídico de tipo no lamelar [13]. Por ejemplo, los lípidos que favorecen la curvatura negativa, como CL y chol, son responsables de la formación de estructuras no lamelares en membranas biológicas.

Cuando hablamos de “propiedades mecánicas de biomembranas” nos referimos a la respuesta de la membrana frente a compresión y a deformaciones en el plano o fuera del plano de la misma. Los tres tipos de estrés mecánicos mencionados son de gran importancia en los diversos procesos fisiológicos que involucran membranas: las especies que se incorporan a la membrana deben comprimirla al ingresar, las que están insertas deben deformarla para difundir en ella, y los procesos de fusión involucran fuertes cambios en la curvatura local [14].

En este trabajo de tesina se puso foco en la capacidad que tiene la membrana plasmática de cambiar localmente su curvatura. Para realizar este tipo de estudios se han utilizado varios tipos de experimentos. La metodología principal empleada en esta tesina consistió en deformar la membrana plasmática mediante pinzas ópticas generando tubos de membrana de diámetro nanométrico [15]. Este tipo de experimentos se reportaron tanto en membranas artificiales [15-16] como en membrana plasmática de diferentes células de mamíferos [8,12]. En el laboratorio de Biofísica de membranas biológicas dirigido por la Dra. Wilke (CIQUIBIC-CONICET, Dpto. de Química Biológica Ranwel Caputto, FCQ, UNC), en donde se desarrolló la presente tesina, se han realizado estudios de retracción de nanotubos formados a partir de vesículas lipídicas de diferente composición [17,18], y para el desarrollo de esta tesina fue interesante avanzar ahora en el estudio de organismos in vivo, lo cual implica un nuevo desafío.

En esta tesina se utilizaron levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa BY4741 (MATa his3DELTA1 leu2DELTA0 ura3DELTA0 met15DELTA0) debido a que está muy estudiada y se conoce su lipidómica en detalle [32]. El objetivo fue analizar el comportamiento ante cambios de curvatura de la membrana plasmática de dicho organismo, para lo cual fue necesario digerir la pared de la levadura generando así esferoplastos. De esta manera es posible analizar la rigidez de la membrana plasmática. El esferoplasto puede regenerar su pared y multiplicarse, pero es osmóticamente frágil debido a la ausencia de la barrera correspondiente a la pared celular, la cual ya no contrarresta las fuerzas de presión osmótica existentes en medios hipotónicos o hipertónicos. El nombre “esferoplasto” está relacionado a la forma circular que adoptan los esferoplastos bacterianos después de retirarle su pared celular. Esta forma circular ayuda a su supervivencia en ambientes duros. Como ya se mencionó, a pesar de este cambio estructural, estas células son extremadamente susceptibles a las tensiones ambientales, tales como las provocadas por fuerzas electrostáticas, osmóticas o mecánicas. Por ello, en primer lugar, fue necesario conocer las condiciones del medio que generan menor estrés osmótico sobre el esferoplasto de levadura *S. cerevisiae* en nuestro caso.

Estudios previos han demostrado que cuando una bicapa lipídica es sometida a un cambio local de curvatura presenta un comportamiento elástico [16,20], mientras que las membranas celulares de mamíferos son marcadamente viscoelásticas [8,12,14,21,22]. No se han reportado estudios de deformaciones locales de curvatura

en membranas de organismos de otros reinos, que no contienen colesterol sino otros esteroides u hopanoides.

Para estudiar la dinámica de deformaciones fuera del plano analizamos el comportamiento de relajación de esferoplastos que fueron fuertemente deformados mediante pinzas ópticas. Las pinzas o trampas ópticas consisten en el uso de la presión de la radiación para la manipulación mecánica. Luego de la invención de la luz láser, Arthur Ashkin y sus colaboradores aprovecharon las fuerzas débiles producidas por esta radiación electromagnética sobre esferas micrométricas para impulsarlas en un medio acuoso [23], así como para atraparlas y manipularlas utilizando dos haces enfrentados [23]. Fue en 1978 que se demostró por primera vez la posibilidad de manipular objetos pequeños con un solo haz láser, enfocándolo en un punto del espacio, lo cual sentó las bases de lo que hoy conocemos como manipulación óptica [24], y se demostró que la presión de radiación es idónea para la manipulación de objetos microscópicos sin dañarlos. Fue Ashkin también el primer investigador en manipular bacterias y organelas en el interior celular utilizando pinzas ópticas [25]. Dadas las capacidades de atrapar y manipular micropartículas en distancias del orden del micrómetro, así como de ejercer y medir fuerzas del orden de los picoNewton sin dañar a la muestra, las pinzas ópticas se convirtieron en el centro de atención de muchos campos de investigación, principalmente de las ciencias biológicas, los sistemas coloidales, la micro y nanotecnología, entre otras. Es por ello que, en las últimas décadas, científicos de varios países desarrollaron diversas aplicaciones en torno al empleo de un haz de luz como pinza o trampa para manipular elementos a nivel microscópico [26, 27,28].

El funcionamiento de esta metodología se basa en que el momento es una cantidad conservada, lo que se traduce en que un objeto esférico de menor constante dieléctrica que el medio soportará fuerzas restaurativas que lo anclan en un sitio cercano al de mayor intensidad de radiación [25]. El sitio de mayor intensidad corresponde al punto en el que se enfoca el haz láser, que es el foco del objetivo del microscopio óptico que se utiliza también para observar el experimento. Las partículas atrapadas pueden ser manipuladas en la escala nanométrica mediante movimientos de la platina del objetivo o de espejos, y si se calibra el equipo, es posible determinar las fuerzas restaurativas que soporta la partícula atrapada, las cuales son del orden del picoNewton. Dado que los sistemas biológicos se organizan con una precisión espacial nanométrica mediante fuerzas de interacción del orden de los picoNewtons, la metodología mencionada permite interrumpir o imitar procesos biológicos y así comprender los mecanismos y los principios que los rigen.

En este trabajo empleamos pinzas ópticas para formar nanotubos de membrana plasmática de esferoplastos utilizando una microesfera. Mediante estos ensayos se pretendió poner a punto la metodología a fin de estudiar cómo es la energética de deformación fuera del plano de membrana plasmática de levaduras, la cual contiene un alto porcentaje del esteroide ergosterol, en comparación con el comportamiento ya conocido de membrana plasmática de células de mamíferos [29,30].

OBJETIVO GENERAL:

Poner a punto la técnica de retracción de nanotubos formados mediante una trampa óptica para estudiar las deformaciones fuera del plano de membrana plasmática de levaduras *S. cerevisiae* de la cepa BY4741 (MATa his3DELTA1 leu2DELTA0 ura3DELTA0 met15DELTA0).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Implementar la técnica de esferoplastización de levaduras *S. cerevisiae* cepa BY4741 en el laboratorio y lograr que se mantengan esferoplastizadas (sin regenerar la pared) durante el experimento.
- 2) Analizar las condiciones ambientales óptimas, en donde no hay lisis, expansiones o contracciones por tensiones osmóticas, para realizar los estudios de retracción de nanotubos utilizando esferoplastos de las levaduras mencionadas.
- 3) Lograr una buena adherencia entre el esferoplasto y la microesfera, así como entre el esferoplasto y el cubreobjeto de forma tal de poder generar un nanotubo moviendo la posición de la microesfera adherida a la membrana respecto a la de la célula levaduriforme.
- 4) Determinar qué cantidad de imágenes y a qué frecuencia es necesario tomarlas para obtener las curvas de relajación de nanotubos de esferoplastos de *S. cerevisiae* cepa BY4741 que permitan ser ajustadas con un modelo.
- 5) Determinar la relajación viscoelástica de la membrana plasmática de esferoplastos y ajustar la cinética con el modelo que resulte más adecuado.

Materiales

Todas las soluciones fueron preparadas en agua ultrapura de calidad Milli Q y esterilizadas en una autoclave. Cada ciclo de esterilización tuvo una duración de 20 minutos a una temperatura de 120 °C.

Se utilizaron dos lípidos biotinilados: dipalmitoil fosfatidil etanol amina-biotina, sal de sodio (DPPE-biotina) y dipalmitoil fosfatidil etanol amina-cap-biotina, sal de sodio (DPPE-cap-biotina). Ambos lípidos fueron adquiridos en Avanti polar lipids, al igual que el lípido fluorescente dipalmitoil fosfatidil etanol amina-rodamina, sal de sodio (RhoPE). La estructura química de los lípidos se muestra en la Figura 1.

Las microesferas de sílica de 2 µm de diámetro (SS04N) fueron adquiridas en Bands Laboratory.

Como cubas de observación se utilizaron Lab-tecks de 8 wells a las cuales se les retiró el vidrio y se les pegó un nuevo vidrio cubreobjetos (Marienfeld Gmbh & co) cada día de medida. La calidad del vidrio utilizado es de suma importancia ya que si el espesor del vidrio no es homogéneo la trampa óptica no funciona correctamente [17,18]. Los vidrios fueron tratados con D- polilisina o avidina, dependiendo del experimento.

La composición de cada una de las soluciones utilizadas fue:

TSD: Tris Sulfato de Sodio 100 mM (pH= 9,1) + 10 mM DTT.

TRIS: 20 mM, pH= 7,4.

Sorbitol: 1M, pH= 6,5.

La composición de los medios de cultivo utilizados fue:

YPD: 20 g/L de triptéina bacteriológica (marca BRITANIA) y 10 g/L de extracto de levadura (marca BRITANIA) + 20 g/L de dextrosa, pH= 7.

YMD: 3g de extracto de levadura (marca BRITANIA), 3 g de extracto de malta (marca BRITANIA), 5 g de peptona, 20 g de glucosa, URA (uracilo), TRIS 1 M, pH= 6,5

ME (Medio para esferoplastización): TRIS 20 mM, sorbitol 1M, medio de cultivo YMD y Zymoleaza 20T (10mg/mL en PBS glicerol 50%). La cantidad de Zymoliasa 20T agregada depende de la cantidad de células en cada muestra, determinada de acuerdo a la densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) a 600 nm.

Métodos

1) Esferoplastización de las levaduras *S. cerevisiae* cepa BY4741:

Los esferoplastos fueron preparados utilizando un protocolo de esferoplastización modificado de Rafael Ovalle [32]. Se cultivaron levaduras en medio YPD por 24 h a 30 °C hasta 1-1,5 OD (en fase exponencial) [31]. Un valor de OD de 0,1 a 600 nm equivale a 2×10^6 células/mL.

Se tomaron alícuotas de los cultivos de volúmenes tales que contengan 2×10^8 células y se centrifugaron 5 minutos a 4000 g. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en buffer TSD y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se repitió el procedimiento de centrifugación, separación y resuspensión en TSD 2 veces.

Finalmente, el pellet se suspendió a $4-6 \times 10^8$ células/mL en YMD con sorbitol. De esta solución se tomaron 10 μ L y se diluyeron con 990 μ L de agua mili Q, midiendo la OD.

Para lograr la esferoplastización de las células de levadura, éstas fueron cultivadas en YMD con sorbitol, y se le agregó zymoleaza 20T (2,5 μ L por cada 2×10^7 células).

Se incubaron a 30 °C por 45 minutos. Luego de la incubación, se tomaron 10 μ L y se diluyeron en 990 μ L de agua mili Q para determinar la OD. Si la esferoplastización fue efectiva (la mayoría de las levaduras perdieron su pared), las células se lisan en contacto con la solución hipotónica, por lo que la OD deberían ser un 10% respecto al valor medido con anterioridad.

Posteriormente fueron centrifugadas a 1500 g durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en medio de cultivo YMD sin sorbitol dos veces. Todos los descartes realizados se colocaron en hipoclorito de sodio durante media hora, y los materiales de vidrio se colocaron en el sector de residuos de materiales patógenos.

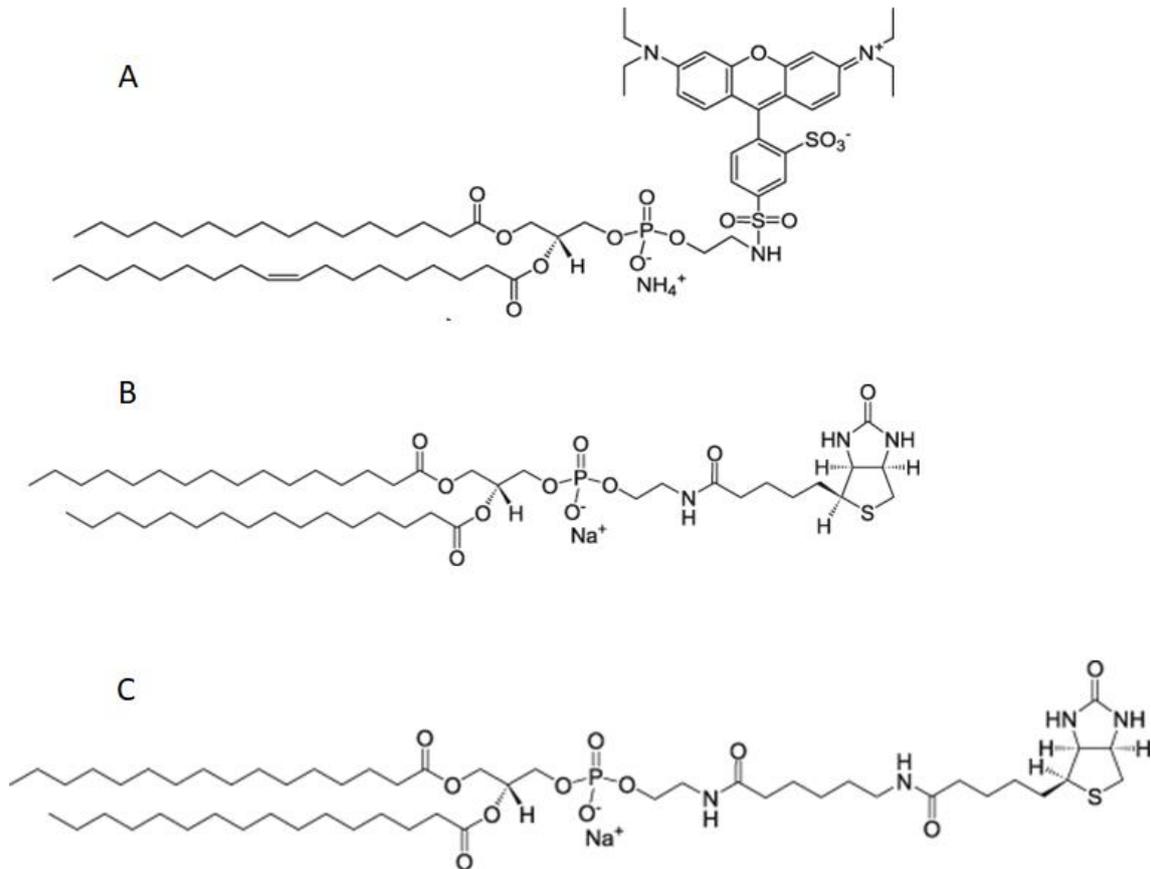


Figura 1: A: RhoPE (L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)); B: DPPE-biotina (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(biotinyl)); C: DPPE-cap-biotina (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap biotinyl)).

2) Adición de lípidos biotinilados a la membrana plasmática.

Con el fin de generar interacciones vidrio-membrana fuertes y específicas, y así adherir al esferoplasto sobre el vidrio cubreobjeto, incubamos esferoplastos en presencia de lípidos biotinilados. Utilizamos DPPE-biotina y DPPE-cap-biotina. Este segundo lípido se utilizó con el fin de separar la biotina de la membrana, alejando la biotina del grupo polar del lípido, y de esta manera potenciar la interacción de la biotina en la membrana con la avidina en el vidrio cubreobjetos. Como control, hicimos experimentos con RhoPE a fin de conocer si los tiempos y condiciones de incubación permitían la incorporación del lípido exógeno. Esta molécula es un lípido, por lo que se inserta en estructuras membranosas. Al ser fluorescente, se puede observar mediante microscopía de fluorescencia, y de esta manera podemos saber si la incorporación ha sido exitosa [33,35].

Para lograr introducir estos lípidos en la membrana plasmática del esferoplasto, se incubaron 0,5 mL de una suspensión de levaduras esferoplastizadas de 6×10^7 célula/mL con 6% de etanol (control) o 6% de una solución etanólica de cada lípido (DPPE-biotina, DPPE-cap-biotina o RhoPE) a una concentración 0,5 mg/mL [33].

3) Preparación de las muestras para experimentos de retracción de nanotubos.

Los pocillos o *Wells* de las cubas de observación fueron recubiertos con D- polilisina, o bien con avidina. En el caso de D- polilisina, se utilizó una solución 1 mg/mL en buffer de borato (ácido bórico 3,1 g/L, borax 4,8 g/L en agua milli Q) desde el día anterior al día de medida. En el caso de avidina, los pocillos se trataron con una solución de 0.5 mg/mL por 30 min.

Antes de agregar los esferoplastos, se quitó la polilisina excedente, se enjuagaron diez veces con medio YPD y se dejaron secar por media hora. Luego se colocaron 200 μ L de suspensión de esferoplastos en cada pocillo de la cuba.

Debido a que el esferoplasto regenera su pared en unas horas, y a que los experimentos a realizar demoran esos tiempos, los esferoplastos se mantuvieron en presencia de zymoleasa (1 μ L de zymoleasa 20T en 200 μ L de solución) evitando así la regeneración de la pared.

Además, se agregó 1 μ L de una suspensión de microesferas previamente lavadas utilizando 6 ciclos de agitación en mezclador vortex, centrifugación a 13400 rpm durante 5 minutos, remoción de sobrenadante y resuspensión en 1 mL de agua milli Q [17,18].

4) Imágenes por microscopía óptica y generación de nanotubos de membrana

Se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert 200, Carl Zeiss, (Oberkochen, Alemania) con una cámara de vídeo CCD Andor (Ixon EM+ 897 modelo DU-897, Andor Technology, Abingdon, Oxfordshire, Inglaterra) que permite realizar toma de imágenes rápida para así poder seguir la cinética de retracción del nanotubo de membrana. La trampa óptica se encuentra montada en el microscopio, y utiliza un láser de ND:YVO4 de hasta 3 W de potencia (Spectra-Physics, Santa Clara, CA, USA) y un objetivo de inmersión 100x en agua de apertura numérica de 1 (Zeiss). La platina del microscopio ha sido cambiada por una platina motorizada (Beijing Winner Optical Ins. CO., LTD, Lang-459 fang, Hebei, China), que permite mover la muestra en relación a la trampa de forma controlada a través de un software con resolución nanométrica. El objetivo se utiliza para generar la trampa y también para observar a la muestra mediante Microscopía de Contraste Diferencial interferencial (DIC, por sus siglas en inglés) o mediante microscopía de fluorescencia utilizando un segundo láser para la excitación (TEM00, 532 nm, hasta 200 mW, Roithner Lasertech), en el caso de experimentos con la sonda lipídica fluorescente RhoPE incorporada a la membrana plasmática exógenamente.

El láser se utilizó como trampa óptica para estirar las membranas de las levaduras y así formar un nanotubo, el cual no se observa en los videos por la resolución de la técnica. Una vez que se apaga la trampa óptica, la levadura y la microesfera vuelven a su separación mínima. De cada muestra se realizaron vídeos de 250-500 imágenes con intervalos de 0.0822 segundos [17,18].

5) Análisis de las imágenes

Los vídeos registrados fueron analizados mediante el software libre Image J FIJI. Los videos de 250-500 imágenes fueron cortados, generando videos más cortos que contengan las imágenes de interés, es decir, en donde se observe el comienzo del estiramiento hasta que finaliza el mismo. Se obtuvieron de cada imagen la posición (x,y) de la microesfera y de la levadura. Luego se realizó un gráfico de la posición de ambas (distancia entre centro en μ m) a lo largo del tiempo (segundos).

Estos datos fueron analizados teniendo en cuenta el comportamiento viscoelástico de la membrana, como se detalla en la próxima sección.

Resultados y Discusión

1) Esferoplastización de levaduras y optimización del medio de suspensión

Con el fin de conocer en qué medio los esferoplastos se encontraban con menor estrés osmótico, los mismos fueron suspendidos en medios con diferentes concentraciones de sorbitol (que suele utilizarse para resuspender esferoplastos de levaduras)[32] y se cuantificó el tamaño.

Para ello, se colocaron distintos tubos con ME a distintas concentraciones de sorbitol, colocando 50 μ L de esferoplastos y resuspendiendo a volumen final de 100 μ L. Observamos que algunas levaduras *S. cerevisiae* eran de color gris opaco y estaban ovaladas (aún tenían pared), mientras que la mayoría eran redondas y más transparentes (levaduras esferoplastizadas), como se muestra en la Figura 2.

Se tomaron 6 imágenes de una muestra de cada tubo con distintas concentraciones de sorbitol (0% a 0,5 % v/v de Sorbitol 1M), se realizó un conteo total de las células observadas en cada imagen, y se analizaron aproximadamente un 25 % de ellas, seleccionadas al azar. Se determinó el diámetro de estas levaduras esferoplastizadas, y se encontró que los valores obtenidos para las distintas concentraciones de sorbitol no presentaron diferencias significativas (test ANOVA $p < 0,05$) en comparación con los valores obtenidos sin sorbitol (Figura 3). Por ello, se podría afirmar entonces que el sorbitol no modificó el diámetro de las levaduras esferoplastizadas. No lo agregamos durante el desarrollo de este trabajo ya que lo consideramos dispensable.

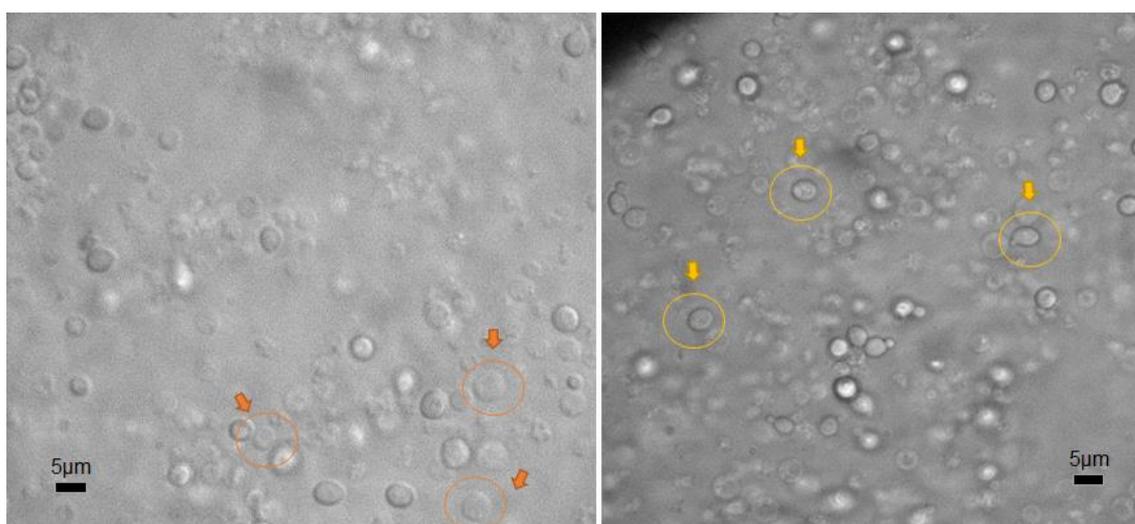


Figura 2: Imagen representativa de un ensayo donde se observan levaduras esferoplastizadas (izquierda) y levaduras no esferoplastizadas (derecha) utilizando microscopía DIC. Total de imágenes analizadas: 36.

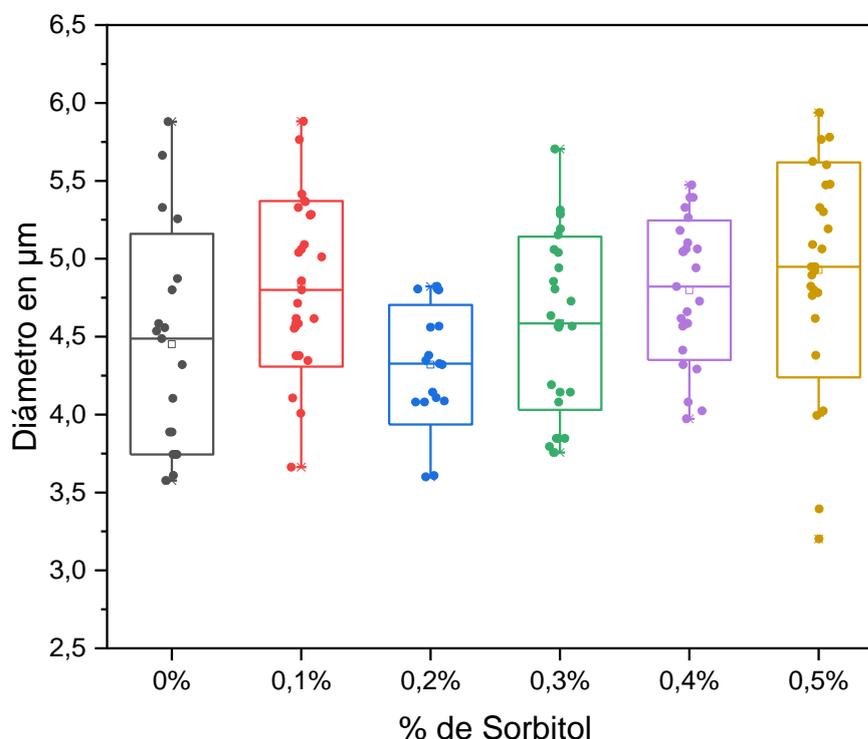


Figura 3: Diámetro de las levaduras esferoplastizadas en medios con diferentes porcentajes de sorbitol v/v. Se analizaron entre 17 y 27 células para cada condición. Un test de ANOVA ($p < 0.05$) indicó que no existen diferencias significativas entre los tamaños celulares en medios de 0% de sorbitol y las demás condiciones.

2) Adhesión del esferoplasto al vidrio cubreobjetos

Para lograr la generación de un nanotubo de membrana como teníamos planeado, era necesario anclar al esferoplasto al vidrio cubreobjetos. En un primer lugar intentamos utilizar las fuerzas de interacción existentes entre el vidrio recubierto por polilisina (catiónico) y la membrana (aniónica) como suele hacerse con células de mamíferos o bacterias. También se ha utilizado este método para fijar esferoplastos de levaduras e inhibir su movimiento browniano y lograr determinaciones de difusión lateral de componentes de membrana [33]. Se observó que los esferoplastos se adherían, ya que perdían el movimiento Browniano característico cuando están en suspensión. Sin embargo, la adhesión no ocurrió con una fuerza suficiente, ya que, si la trampa óptica se encendía cerca del esferoplasto, el mismo se despegaba del vidrio y quedaba atrapado.

Por ello, decidimos utilizar otra estrategia, aprovechando la alta afinidad existente entre biotina y avidina. Esta estrategia se ha utilizado para fijar bicapas lipídicas a vidrios [17,18]. Para ello recubrimos el vidrio con avidina e incubamos al esferoplasto con lípidos biotinilados. En primer lugar, utilizamos RhoPE para evaluar la incorporación de lípidos exógenos a la membrana con el método de incubación empleado. Se pudo observar que hay una buena incorporación de lípidos fluorescentes a la membrana

(Figura 4), por lo que suponemos que los lípidos biotinilados también pudieron ser incorporados exitosamente. Sin embargo, no se logró anclar al esferoplasto a la avidina del vidrio con suficiente fuerza de adhesión, ya que nuevamente al encenderse la trampa óptica cerca del esferoplasto lo despegaba. Se probó incrementar la cantidad de DPPE-biotina en el medio de incubación, pero igualmente no logramos una buena adhesión de la célula al vidrio biotinilado.

Pensamos que tal vez la biotina, al estar directamente unida al grupo polar de la DPPE, no estaba suficientemente expuesta para interactuar con el vidrio debido a la presencia de proteínas y de lípidos con grupos polares voluminosos. Por ello, utilizamos DPPE-cap-biotina, pero aun así no logramos buenos resultados. Es posible que ocurra *flip-flop* o bien una rápida internalización de estos lípidos, quedando sin exponerse al vidrio. No hemos encontrado en bibliografía información al respecto, ni tampoco alguna otra estrategia de adhesión del esferoplasto al vidrio. Es importante recalcar aquí que el objetivo de la tesina fue poner a punto la técnica para estudiar nanotubos de membrana plasmática de esferoplastos de levaduras ya que, hasta donde sabemos, estos estudios no han sido realizados aún.

En conclusión, ninguno de los métodos probados para anclar el esferoplasto al vidrio dio resultado. Sin embargo, durante los primeros experimentos realizados, observamos que algunas microesferas se adherían fuertemente al vidrio recubierto por polilisina, y que algunos esferoplastos se adherían a las microesferas. Esto permitió realizar los experimentos atrapando con la trampa óptica un esferoplasto que tuviera adherida una microesfera anclada al vidrio (Figura 5). Luego, movimos la platina a fin de separar la microesfera del esferoplasto y generar el nanotubo de membrana (Figura 6). Fue de esta manera que finalmente realizamos todos los experimentos.

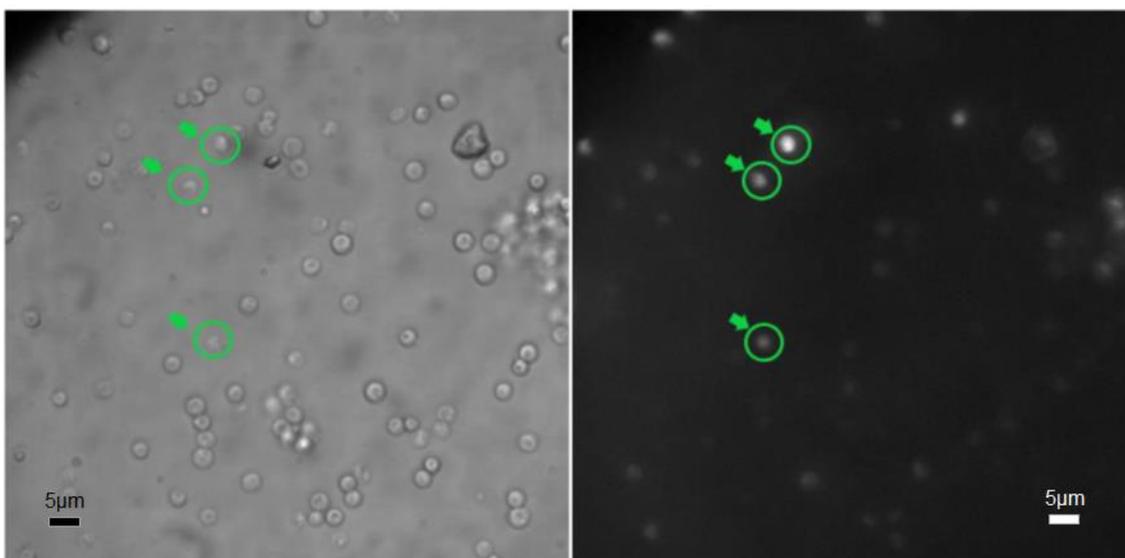


Figura 4: Imagen representativa de un ensayo con células de levaduras esferoplastizadas incubadas con RhoPE observadas mediante DIC (izquierda) o microscopía de fluorescencia (derecha). Total de ensayos: 2.

3) Nanotubos de membrana de esferoplasto

En general notamos que era muy difícil lograr la generación de nanotubos, observándose en reiteradas ocasiones que la levadura se escapaba de la trampa. Además, cuando logramos generar nanotubos, no podíamos elongarlos más de $1\ \mu\text{m}$ debido a que el esferoplasto se escapaba de la trampa y ocurría el proceso de retracción. Esto implica que a medida que se alarga el nanotubo es necesaria una mayor fuerza para seguir elongándolo, hasta que llega un punto en donde la fuerza necesaria es mayor a la que ejerce la trampa ($30\ \text{pN}$) por lo que ocurre el escape del esferoplasto. En la Figura 5 se muestra un ejemplo representativo de este experimento.

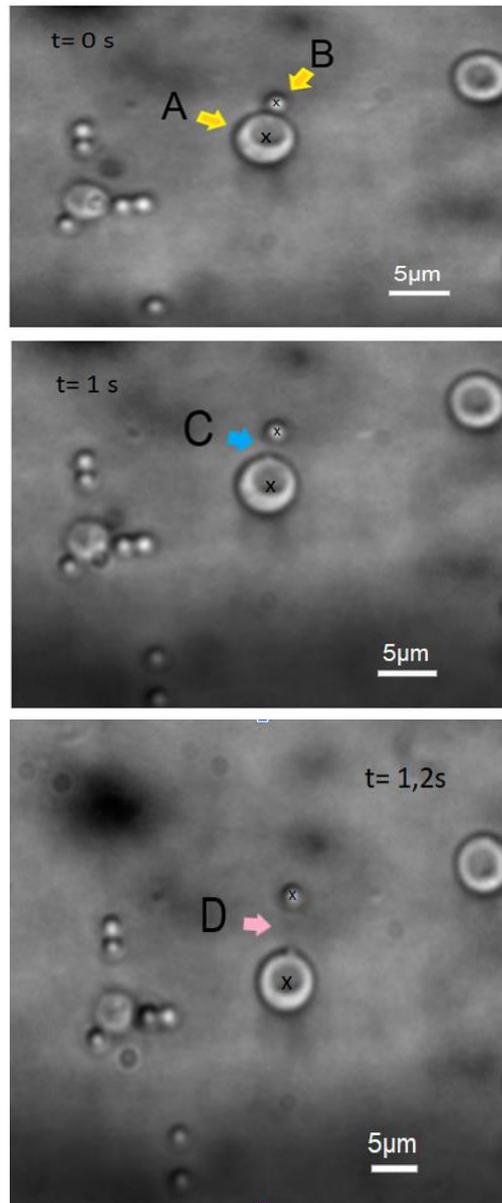


Figura 5: Imágenes representativas de un experimento. A $t=0\ \text{s}$ el esferoplasto y la microesfera se encuentran adheridas y no hay nanotubo entre ellas. A: levadura esferoplastizada; B: microesfera anclada al vidrio. Las cruces indican las posiciones de los centros. A $t=1\ \text{s}$ se ha separado la microesfera del esferoplasto atrapado con la trampa óptica mediante el movimiento de la platina. En C se encuentra el nanotubo formado. A $t=1,2\ \text{s}$ se ha elongado el nanotubo (D).

Para conocer la longitud del nanotubo a cada tiempo, en primer lugar, determinamos las posiciones X e Y de la microesfera y del esferoplasto (cruces en la Figura 5) mediante el programa ImageJ FIJI. Para ello se encierra el esferoplasto y la microesfera con un círculo que lo contenga a cada tiempo y se determina el centro del círculo. Luego calculamos la distancia entre ambos centros a lo largo del tiempo, según:

$$d = \sqrt{(X_{microesfera} - X_{esferoplasto})^2 + (Y_{microesfera} - Y_{esferoplasto})^2}$$

La Figura 6 muestra un resultado representativo de un experimento de un total de 18. Esta distancia es igual a la suma de los radios de la microesfera y del esferoplasto y de la longitud del nanotubo. A partir de estos datos podemos conocer la longitud del nanotubo a lo largo del tiempo.

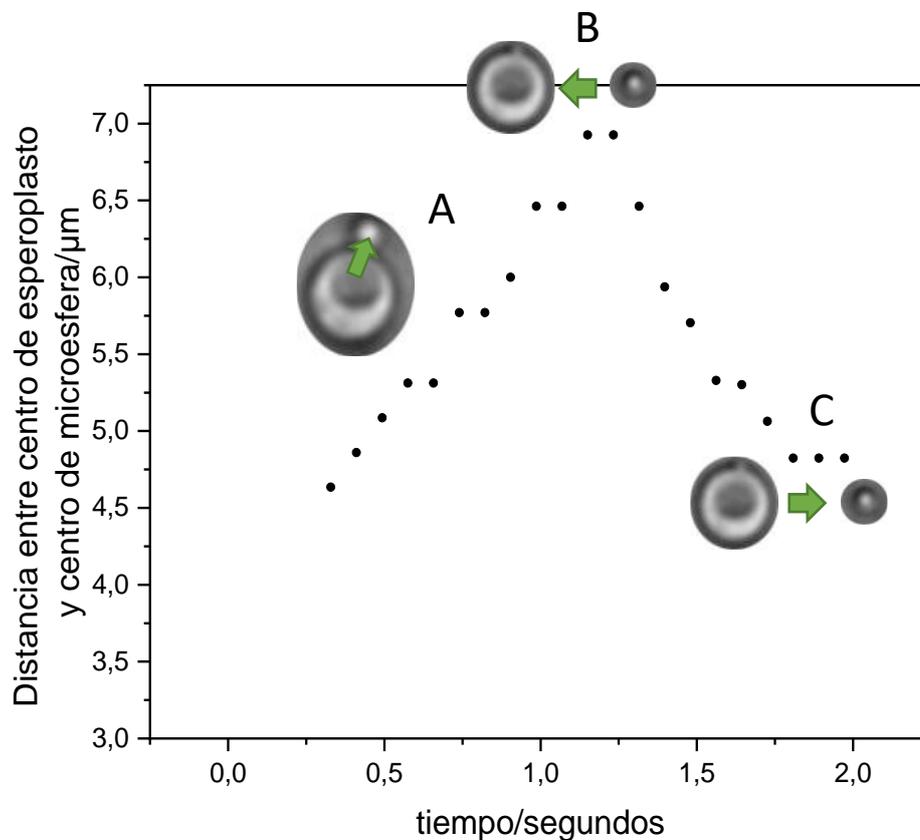


Figura 6: Distancia entre los centros de la microesfera y el esferoplasto a lo largo del tiempo. En la región A se está generando el nanotubo, el cual se elonga hasta llegar a una distancia de $7\mu\text{m}$, a la velocidad a la que se está moviendo la platina y que se puede determinar a partir de la pendiente de esta región del gráfico. En B (a los 1,2 s) el esferoplasto se soltó de la trampa debido a que la fuerza que genera el nanotubo de $7\mu\text{m}$ hacia la membrana es mayor que la fuerza de la trampa. Una vez que el esferoplasto se suelta de la trampa, el nanotubo comienza a retraerse hacia la microesfera (C).

4) Análisis de la cinética de retracción de nanotubos

El movimiento de la levadura hacia la microesfera se analizó considerando la ecuación de movimiento de Newton:

$$F_{\text{trap}} = F_{\gamma} + F_{\text{in}} + F_{\text{el}} \quad \text{ec. 1}$$

En donde F_{γ} es la fuerza viscosa, F_{in} la fuerza inercial y F_{el} la elástica. La fuerza viscosa F_{γ} se opone al movimiento y es proporcional a la velocidad de retracción con un coeficiente de proporcionalidad γ . Esta fuerza tiene aportes de la viscosidad de la membrana y de la disipación generada por el movimiento del esferoplasto en un medio viscoso, por lo que γ es la suma del coeficiente viscoso de la membrana (γ_m) y el del medio (γ_{esf}).

El coeficiente viscoso del medio esta dado por la ley de Stokes: $\gamma_{\text{esf}} = 6\pi\eta R_{\text{esf}} \sim 45 \text{ nNs/m}^2$ (η es la viscosidad del medio acuoso y R_{esf} es el radio del esferoplasto).

En relación al término vinculado a la viscosidad de la membrana, se ha estimado para bicapas lipídicas que es del orden de 1–100 nN s/m. Es esperable que para membranas celulares sea mayor debido a la presencia de proteínas y del citoesqueleto, por lo que el término relacionado a la viscosidad de la membrana no es despreciable en relación al término de Stokes.

El término de fuerza inercial puede escribirse como $F_{\text{in}} = m \frac{dL}{dt}$, y es despreciable para sistemas pequeños [36].

Finalmente, el término elástico es el que promueve la retracción y puede escribirse como: $F_{\text{el}} = \kappa L$

Cuando el esferoplasto escapa de la trampa, la fuerza total es nula, por lo que $F_{\gamma} = -F_{\text{el}}$, lo que lleva a:

$$L = L_0 \exp\left(\frac{-\kappa t}{\gamma}\right) \quad \text{ec. 2}$$

En esta ecuación, L_0 es la longitud inicial del nanotubo. Esta ecuación no permite separar γ de κ , por lo que para el ajuste de las curvas utilizamos la ecuación:

$$L(t) = L_0 \exp(-t/\tau) \quad \text{ec. 3}$$

En donde τ es el tiempo característico: $\tau = \gamma/\kappa$.

El ajuste fue realizado utilizando el software Microcal Origin y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 1. En la Figura 7 se muestran ejemplos de dicho ajuste. En general encontramos buenos ajustes (valores de R^2 de 0,8-0,9) salvo en 4 estiramientos, indicando que el modelo empleado es adecuado.

LEVADURA N°	Nº de estiramiento	Tiempo de decaimiento(s)	L0 (µm)	R²	Velocidad (µm/s)	Radio levadura (µm)
1	1	0,02 ± 0,04	0,87	0,57	12,2 ± 0,2	2,6 ± 0,1
1	2	0,10 ± 0,03	1,20	0,91	33 ± 3	2,6 ± 0,1
1	3	0,13 ± 0,02	0,73	0,92	41 ± 1	2,6 ± 0,1
1	4	0,20 ± 0,04	4,09	0,88	37 ± 1	2,6 ± 0,1
1	7	0,24 ± 0,02	2,10	0,98	30 ± 1	2,6 ± 0,1
1	8	0,20 ± 0,04	1,39	0,88	29 ± 1	2,6 ± 0,1
1	9	0,20 ± 0,04	1,72	0,87	92 ± 3	2,6 ± 0,1
2	1	0,29 ± 0,03	0,42	0,88	22 ± 3	2,6 ± 0,2
2	2	0,32 ± 0,04	0,72	0,88	23 ± 4	2,6 ± 0,2
2	4	0,17 ± 0,03	0,86	0,90	18 ± 1	2,6 ± 0,2
2	5	0,11 ± 0,01	0,96	0,94	14 ± 2	2,6 ± 0,2
2	8	0,50 ± 0,10	0,67	0,83	23 ± 1	2,6 ± 0,2
2	9	0,20 ± 0,10	0,83	0,2	22 ± 1	2,6 ± 0,2
3	1	0,24 ± 0,09	0,96	0,40	31 ± 2	2,4 ± 0,2
4	1	0,41 ± 0,09	0,39	0,71	23 ± 2	2,7 ± 0,2
4	2	0,08 ± 0,01	0,46	0,99	24 ± 2	2,7 ± 0,2

Tabla 1: Tabla con todos los experimentos cuyo análisis fue posible. Los datos fueron obtenidos a partir del ajuste de curvas como las mostradas en la figura 7, utilizando la ecuación 3. Cada número de levadura es una célula diferente, la cual es estirada la cantidad de veces indicada en la segunda columna.

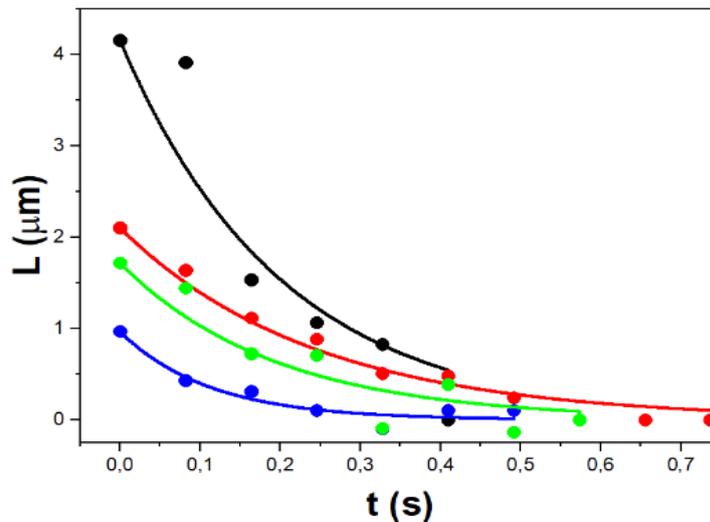


Figura 7: Curvas representativas en donde se muestra el valor de L a distintos tiempos durante el proceso de retracción de nanotubos y sus respectivos ajustes utilizando la ecuación 3. Cada curva corresponde a un experimento de retracción de nanotubo de una célula individual.

5) Viscoelasticidad de la membrana plasmática de esferoplastos de levadura

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos del ajuste de los experimentos que pudieron ser analizados. Se descartaron 29 retracciones que no pudieron ser ajustados correctamente debido a que el nanotubo tuvo un largo inicial muy corto, o bien, debido al ruido experimental que no permitió detectar las posiciones correctamente durante toda la retracción.

Si bien no podemos hacer un análisis exhaustivo debido a la baja cantidad de datos, con los valores encontrados buscamos las posibles tendencias de los tiempos característicos para la relajación con las variables del sistema. En primer lugar, graficamos τ en función del número de estiramiento (Figura 8), y no encontramos una tendencia clara. Para el esferoplasto 1 hay un aumento de τ pero para los otros dos esferoplastos no se observa la misma tendencia. Esto difiere de los resultados encontrados para membranas de fibroblastos [37].

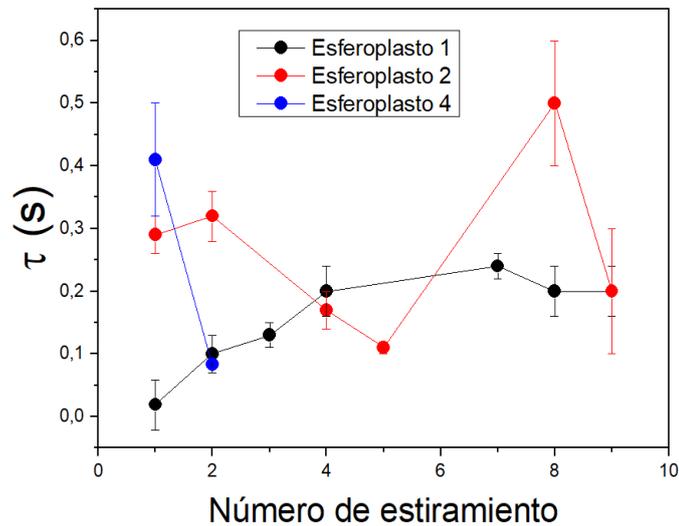


Figura 8: Tiempo característico para la relajación de nanotubos (τ) en función del número de estiramientos.

Por otro lado, tampoco encontramos una tendencia definida entre τ y el valor de longitud inicial del nanotubo (Figura 9), como se encontró para células embrionarias de riñón humano [12].

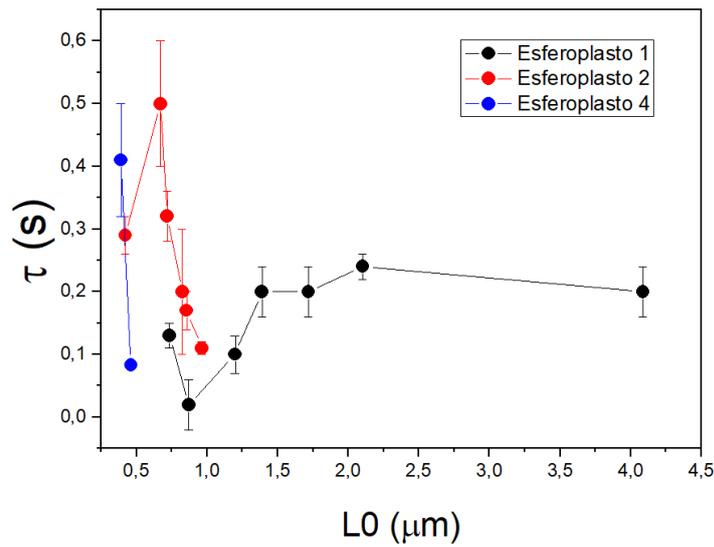


Figura 9: Tiempo característico para la relajación de nanotubos (τ) en función de la longitud inicial (L_0) en μm .

En cuanto a la dependencia de la velocidad de relajación con la velocidad de generación del nanotubo, la Figura 10 muestra un aumento de τ con la velocidad de elongación. Esto es esperable para membranas viscoelásticas y fue observado previamente en fibroblastos [37], en células cerebrales de tumor humano y en células de ovario de hámster chino [21].

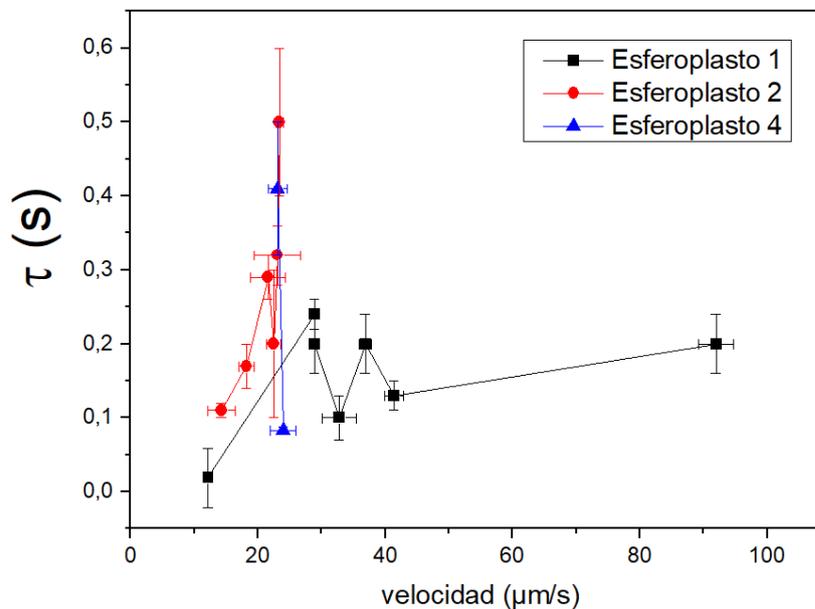


Figura 10: Tiempo característico para la relajación de nanotubos (τ) en función de la velocidad de elongación del nanotubo.

Finalmente, analizamos las posibles diferencias de τ entre las levaduras estudiadas, despreciando dependencias con el número de estiramiento, la longitud inicial y la velocidad de elongación. Utilizando un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.05$, no encontramos diferencias significativas (Figura 11).

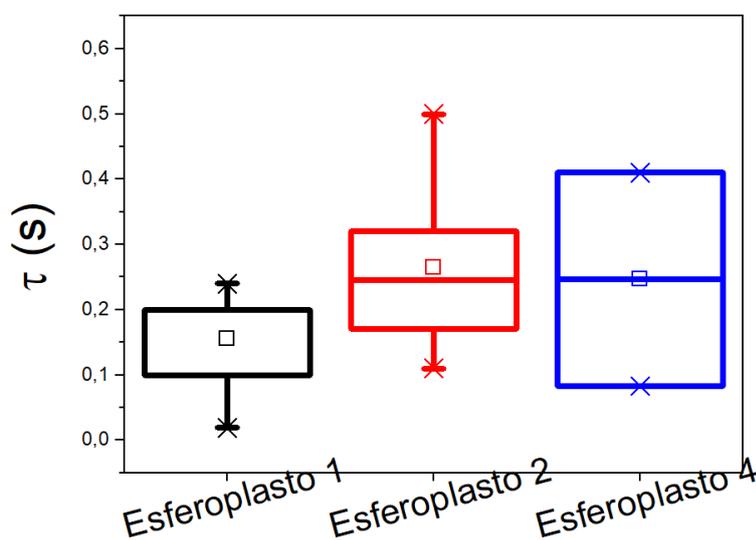


Figura 11: Gráficos de caja que muestra el valor de τ para cada una de las levaduras analizadas.

En resumen, solamente encontramos una posible correlación entre τ y la velocidad de elongación, que habría que confirmar con más esferoplastos y utilizando el mismo intervalo de velocidades para cada uno. Los valores de τ se encontraron en el intervalo de 0,02-0,5 s, y si promediamos todos los valores encontrados, obtenemos un valor promedio de $0,2 \text{ s} \pm 0,1\text{s}$. Este valor es similar a lo informado para eritrocitos [14] así como para células de tumor humano y células de ovario de hámster chino [21]. Hasta donde sabemos, no hay estudios de este tipo reportados en microorganismos eucariotas.

Conclusión

En base a los objetivos específicos propuestos, concluimos que hemos logrado poner a punto un método que permite conocer las propiedades viscoelásticas de membranas de esferoplastos relacionadas a estrés por curvatura mediante el empleo de pinzas ópticas. Para ello, en primer lugar, generamos esferoplastos que se mantuvieron estables durante la aplicación del método, sin romperse ni regenerar su pared. Se tuvo que modificar la especie atrapada por las pinzas ópticas, moviendo el esferoplasto en relación a la microesfera y no al revés. Esta situación no es óptima debido a que la trampa utiliza luz IR (radiación infrarroja), que, si bien corresponde a una región de baja absorbancia por parte de la levadura, seguramente en tiempos prolongados se genera un aumento local de temperatura. Sin embargo, no observamos lisis de los esferoplastos atrapados por la trampa óptica.

Por otra parte, encontramos resultados preliminares que indican que la generación de nanotubos de membrana plasmática de esferoplastos requiere más fuerza que la generación de los mismos en membrana plasmática de mamíferos, ya que no resultó fácil generarlos y siempre se utilizó la máxima fuerza capaz de ejercer la trampa (30 pN). Además, no fue posible generar nanotubos largos, ya que el esferoplasto se escapa de la trampa, debido a que la fuerza ejercida por el nanotubo superaba a la de la trampa óptica al incrementarse el largo del nanotubo. Esto indica que la fuerza necesaria para elongar el nanotubo crece con el largo del nanotubo, lo cual no ocurre en bicapas lipídicas, en donde el proceso es activado, pero una vez que se generó el nanotubo, la fuerza necesaria para elongarlo es constante [16]. Resultados similares se encontraron para células de mamíferos, que son en las únicas células en las que se han reportado este tipo de experimentos [20,21]. No hay reportes realizados en microorganismos, y es por ello que en esta tesina se puso a punto la metodología planteada y se presentan resultados preliminares originales. Por lo tanto, los resultados preliminares sugieren que la membrana plasmática de levaduras es más rígida y menos propensa al estiramiento que la de mamíferos. Debido a que el tiempo característico de las membranas de los dos tipos de células es similar, la viscosidad del esferoplasto debería ser también mayor que para membranas de mamíferos.

Sería interesante continuar el estudio con cepas de células *S. cerevisiae* ergDELTA6 (BY4741; MATa his3DELTA1 leu2DELTA0 met15DELTA0 ura3DELTA0 YML008c:kanMX4) que son deficientes de ergosterol, ya que se propone que este lípido es clave para regular las propiedades viscoelásticas de la membrana. Además, sería interesante también trabajar con levaduras a las que se le ha desacoplado el citoesqueleto a fin de analizar si la interacción membrana- citoesqueleto es clave para la plasticidad fuera del plano de la membrana plasmática de este microorganismo como lo es para las células de mamíferos [38] y como también lo es para la difusión lateral en levaduras *S. cerevisiae* [33].

Bibliografía

- 1) Israelachvili, J. N., Marčelja S., Horn R. G., (1980). Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys* 13:121–200.
- 2) Yeagle, P. L., (2016). Chapter 7 - Structures of Lipid Assemblies. In: *The Membranes of Cells (Third Edition)*, Academic Press, Boston 115–154.
- 3) Singer, S. J., Nicolson G. L., (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.
- 4) Danielli, J. F., Davson H., (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Physiol* 5:495–508.
- 5) van Meer, G., Voelker D. R., Feigenson, W., (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124.
- 6) Rosetti, C.M., Mangiarotti, A., Wilke, N., (2017). Sizes of lipids domains: what do we know from artificial lipid membranes? What are the possible shared features with membrane rafts in cells? *Biochimica et biophysica acta-Biomem* 1859: 789-802.
- 7) Mouritsen, O. G., (2011). Model Answers to Lipid Membrane Questions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004622.
- 8) Hochmuth, F., Shao, J.Y., Dai, J., Sheetz, M., (1996). Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophysical journal* 70: 358-69.
- 9) Demel, R.A.J., Jansen, J.W.C.M., Dijck, P., Deenen, L.L.M., (1977). The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. *Biochimica et biophysica acta* 465: 1-10.
- 10) Mangiarotti, A., Galassi, V., Puentes, E. N., Oliveira, R. G, y del Popolo, M. G., (2019). Hopanoids like sterols form compact but fluid films. *Langmuir* 35: 9848-9857.
- 11) Heimburg, T., (2007). Chapter 3 -The Composition of Biological Membranes. In: *Thermal Biophysics of Membranes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA. Alemania 29 -40.
- 12) Pascoal, P., Kosanic, D., Gjoni, M., Vogel, H., (2010). Membrane nanotubes drawn by optical tweezers transmit electrical signals between mammalian cells over long distances. *Lab on a chip* 10: 2235-41.
- 13) Israelachvili, J. N., (2015). Intermolecular and surface forces. Academic press. 3er. ed. Charper 20- Soft and Biological Structures 535-569.
- 14) Evans, E., (1989). Structure and deformation properties of red blood cells: Concepts and quantitative methods. *Methods in enzymology* 173: 3-35.
- 15) Dimova, A., (2014) Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Adv Colloid and Interface Sci* 208: 225–234.
- 16) Derényi, I., Koster, G., Duijn, M.M., Czövek, A., Dogterom, M., Prost, J., (2007). Chapter 7 - Membrane Nanotubes. In: *Controlled Nanoscale Motion. Lecture Notes in Physics*, Springer, Berlin, Heidelberg 141-159.

- 17) Crosio, M., Via, M., Cámara, C., Mangiarotti, A., Pópolo, M., Wilke, N., (2019). Interaction of a Polyarginine Peptide with Membranes of Different Mechanical Properties. *Biomolecules* 9: 625.
- 18) Alvares, D., Monti, M., Ruggero Neto, J., Wilke, N., (2021). Regulation of the activity of an antimicrobial peptide by sterols or hopanoids: possible role in cell recognition. *Biochimica et biophysica acta - Advances* 1: 100002.
- 19) Ejsing, C. S., Sampaio, J. L., Surendranath, V., Duchoslav, E., Ekroos, K., Klemm, R. W., Shevchenko, A., (2009). Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2136-2141.
- 20) Evans, E., Yeung, A., (1994). Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape. *Chemistry and Physics of Lipids* 73: 39-56.
- 21) Hosu, B., Sun, M., Marga, F., Grandbois, M., Forgacs, G., (2007). Eukaryotic membrane tethers revisited using magnetic tweezers. *Physical biology* 4: 67-78.
- 22) Sun, M., Graham, J., Hegedus, B., Marga, F., Zhang, Y., Forgacs, G., Grandbois, M., (2006). Multiple Membrane Tethers Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical journal* 89: 4320-9.
- 23) Ashkin, A., (1970). Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Physical Review Letters* 24: 156-159.
- 24) Ashkin, A., (1978). Trapping of Atoms by Resonance Radiation Pressure. *Physical Review Letters* 40: 729-733.
- 25) Ashkin, A., (2000). History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of Chemistry* 6: 841 - 856.
- 26) Bustamante, C., Alexander, L., Maciuba, K., & Kaiser, C. M., (2020). Single-molecule studies of protein folding with optical tweezers. *Annual review of biochemistry* 89: 443-470.
- 27) Avsievich, T., Zhu, R., Popov, A., Bykov, A., Meglinski, I., (2020). The advancement of blood cell research by optical tweezers. *Reviews in Physics* 5: 100043.
- 28) Zaltron, A., Merano, M., Mistura, G., Sada, C., Seno, F., (2020). Optical tweezers in single-molecule experiments. *The European Physical Journal Plus* 135: 1-33.
- 29) Thompson L., Bahman A., (2020). Characterization of the viscoelastic properties of Ovarian Cancer cells membranes by optical tweezers and quantitative phase imaging. *Frontiers in physics* 8: 582956.
- 30) Arbore, J., Perego, C., Sergides, L., Capitanio, M., (2019). Probing force in living cells with optical tweezers: from single-molecule mechanics to cell mechanotransduction. *Biophysical reviews* 11: 765 - 782.
- 31) Teixeira, M. C., Sá-Correia, I., (2002). *Saccharomyces cerevisiae* resistance to chlorinated phenoxyacetic acid herbicides involves Pdr1p-mediated transcriptional activation of TPO1 and PDR5 genes. *Biochemical and biophysical research communications* 292: 530-537.

- 32) Ovalle, R., Seung, T., (1998). A Spheroplast Rate Assay for Determination of Cell Wall Integrity in Yeast. *Yeast* 14: 1159–1166.
- 33) Greenberg, M.L., Axelrod, D., (1993). Anomalously Slow Mobility of Fluorescent Lipid Probes in the Plasma Membrane of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Membrane Biology* 131: 115-127.
- 34) Khmelinskaia A., Marques J.M.T., Bastos A.E., (2020). Liquid-Ordered Phase Formation by Mammalian and Yeast Sterols: A Common Feature With Organizational Differences. *Frontiers in cells and Developmental biology*. 8: 337.
- 35) Henriksen, J., Rowat, A. C., Ipsen, J. H., (2004). Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity. *European Biophysics Journal* 33: 732-741.
- 36) Capitano, M., (2017). Chapter 5 - Optical tweezers. In: *An Introduction of Single Molecule biophysics*, CRC Press - Taylor/Francis Group, Boca Raton 159: 141–234.
- 37) Raucher, D., Sheetz, M. P., (1999). Characteristics of a Membrane Reservoir Buffering Membrane Tension. *Biophysical Journal* 77:1992- 2002.
- 38) Yeagle, P. L., (2016). Chapter 7 - Structures of Lipid Assemblies. In: *The Membranes of Cells (Third Edition)*, Academic Press, Boston 115–154.
- 39) van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W., (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124.
- 40) Kaiser, H.J., Lingwood, D., Levental, I., Sampaio, J. L., Kalvodova, L., Rajendran, L., Simons, K., (2009). Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16645–16650.
- 41) Stöckl, M., Plazzo, A. P., Korte, T., Herrmann, A., (2008). Detection of Lipid Domains in Model and Cell Membranes by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy of Fluorescent Lipid Analogues. *J Biol Chem* 283: 30828–30837.