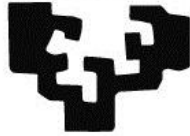


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Dinaminas en la remodelación de la doble membrana mitocondrial: desarrollo de nuevos enfoques experimentales

Juan Manuel Martínez Gálvez

Leioa, 2021

Tesis Doctoral

Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Fdo: Juan Manuel Martínez Gálvez

Vº Bº Directora de Tesis

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'AS' or similar initials, positioned centrally on the page.

Fdo. Anna Shnyrova Zhadan

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que han hecho de estos cuatro años algo inolvidable. A Anna por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto. A mis compañeros de laboratorio y del Instituto por hacer de este viaje algo más placentero.

Gracias a Lourdes Basabe por los días en su laboratorio.

Gracias a Isaac Santos (plataforma de microscopía electrónica de bioGUNE).

Gracias a los amigos que se han hecho aquí, y a los que han seguido allí.

Gracias a mi familia.

Gracias a Ana M.

**A todas las personas que despertaron
en mí la curiosidad por conocer**

PREFACIO

La realización de esta Tesis ha sido financiada por el programa “Personal Investigador en Formación (PIF)” de la UPV/EHU, y llevada a cabo en el Instituto de Biofísica, Leioa (Vizcaya).

La realización de esta Tesis Doctoral ha contribuido a la publicación de los siguientes artículos:

GTP and lipids control self-assembly and functional promiscuity of Dynamin2 molecular machinery. Javier Espadas^{1,2}, Rebeca Bocanegra³, Juan Manuel Martínez-Galvez^{1,2}, Eneko Largo^{1,4}, Soledad Baños-Mateos⁵, Pedro Arrasate^{1,2}, Julene Ormaetxea Guisasola^{1,2}, Ariana Velasco-Olmo^{1,2}, Javier Vera Lillo^{1,2}, Borja Ibarra³, Anna V. Shnyrova^{1,2*} & Vadim A. Frolov^{1,2,6*}. Submitted, pending publication, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.03.15.435402>

¹Biofísica Institute (CSIC, UPV/EHU), 48940 Leioa, Spain

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country, 48940 Leioa, Spain

³Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia, IMDEA Nanociencia. 28049 Madrid, Spain.

⁴Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Medicine and Odontology Faculty, University of Basque Country (UPV/EHU), PO Box 644, 48080 Bilbao, Spain. 5 CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, Derio, Spain 6 Basque Foundation of Science, IKERBASQUE, Bilbao, Spain

NMR identification of a conserved Drp1 cardiolipin-binding motif essential for stress-induced mitochondrial fission. Mukesh Mahajan^{1*}, Nikhil Bharambe^{1*}, Yutong Shang^{1*}, Bin Lu^{1*}, Abhishek Mandal^{4,3*}, Pooja Madan Mohan¹, Rihua Wang¹, Jennifer C. Boatz⁴, Juan Manuel Martínez Galvez⁵, Anna V. Shnyrova⁵, Xin Qi^{1,3}, Matthias Buck^{1,2}, Patrick C.A. van der Wel^{4,6}, and Rajesh Ramachandran^{1,2}. PNAS, 2021. Pending publication online.

¹Department of Physiology & Biophysics,

²Cleveland Center for Membrane and Structural Biology,

³Center for Mitochondrial Diseases, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland,

⁴Department of Structural Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh

⁵Biofísica Institute (CSIC, UPV/EHU) and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country, Leioa, Spain

⁶Zernike Institute for Advanced Materials, University of Groningen, The Netherlands

*Equal contributions

Microfluidic chip with pillar arrays for controlled production and observation of lipid membrane nanotubes. Juan Manuel Martínez Gálvez¹, Maite García-Hernando^{2,3}, Fernando Benito-Lopez³, Lourdes Basabe-Desmonts^{3,4}, and Anna V. Shnyrova¹. Lab on a Chip, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0LC00451K>.

¹Biofisika Institute (CSIC, UPV/EHU) and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country, Leioa, Spain

²BIOMICs-microfluidics, Microfluidics Cluster UPV/EHU, University of the Basque Country UPV/EHU, Spain

³Analytical Microsystems & Materials for Lab-on-a-Chip (AMMa-LOAC) Group, Microfluidics Cluster UPV/EHU, Analytical Chemistry Department, University of the Basque Country UPV/EHU, Spain

⁴KERBASQUE, Basque Foundation for Science, Spain

Combining patch-clamping and fluorescence microscopy for quantitative reconstitution of cellular membrane processes with Giant Suspended Bilayers. Ariana Velasco-Olmo¹, Julene Ormaetxea Gisasola¹, Juan Manuel Martinez Galvez¹, Javier Vera Lillo & Anna V. Shnyrova¹. Scientific Reports, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-43561-4

¹Biofisika Institute (CSIC, UPV/EHU) and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country, Leioa, Spain

Esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente comunicada en los siguientes Congresos internacionales:

- EBSA Satellite Meeting 2019: Protein-Lipid nanostructures. Bilbao. Presentación de póster.
- 12th EBSA-10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress, 2019. Presentación de póster. Madrid.
- 6th Iberian / 10th Iberoamerican Biophysics Congress, 2018. Presentación de póster. Castellón.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Remodelación de membranas celulares	1
1.2. Las dinaminas: remodeladoras universales de membranas	2
1.3. Dinámica de la red mitocondrial	5
1.3.1. Etapas de la división mitocondrial	8
1.3.1.1. La pre-constricción mitocondrial.....	9
1.3.1.2. La constricción y fisión mitocondrial.....	11
1.3.2. Dinaminas en la fisión mitocondrial: características estructurales y de auto-ensamblaje	16
1.3.3. Remodelación de la membrana durante la fisión mitocondrial.....	20
1.4. Modelos lipídicos para el estudio de remodelación de membranas durante su fisión	23
1.5. Hipótesis y objetivos	29
2. GENERACIÓN DE MODELOS IN VITRO PARA LA RECONSTITUCIÓN DE PROCESOS DE REMODELACIÓN LIPÍDICA	31
2.1. Diseño de un sistema microfluídico para la generación de NTs y su observación por microscopía de fluorescencia de gran resolución.....	31
2.2. Análisis de la geometría de los NTs producidos en el sistema microfluídico.....	35
2.3. Análisis de la topología de los NTs producidos en el sistema microfluídico	39
2.4. Caracterización de la distancia intermembrana de los dNTs mediante crioEM	44
2.5. Análisis de la geometría de los dNTs producidos en el sistema microfluídico	45
2.6. Prueba de concepto: estudio de la remodelación de membrana en dNTs generados sobre micropilares de SU-8	48
3. APLICACIÓN DEL NUEVO MÉTODO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA REMODELACIÓN DE MEMBRANA POR LA MAQUINARIA DE FISIÓN MITOCONDRIAL.....	51
3.1. Reconstitución de la actividad de remodelación de membrana mediada por la Drp1	51
3.1.1. Efecto de la composición lipídica en la remodelación de NTs mediada por la Drp1	51
3.1.2. La CL y el PE afectan al ensamblaje de la Drp1	55
3.1.3. El etiquetado de la Drp1 altera su funcionalidad <i>in vitro</i>	56
3.2. Caracterización de la remodelación de dNTs mediada por la Dyn2	60
3.3. Sinergia entre Drp1-Dyn2 en la remodelación de membrana	68
4. CONCLUSIONES	71
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73

5.3.	Materiales y equipamiento	73
5.3.1.	Fabricación de micropilares y del chip de PDMS	73
5.3.2.	Formación de moldes lipídicos.....	74
5.3.3.	Proteínas	76
5.3.4.	Tampones y soluciones de trabajo.....	78
5.3.5.	Disolventes orgánicos y detergentes	80
5.3.6.	Marcaje de la Drp1	80
5.3.7.	Nucleótidos	81
5.3.8.	Microscopía	81
5.3.9.	Softwares de uso general.....	84
5.3.10.	Otro equipamiento.....	84
5.3.11.	Software	85
5.4.	Métodos.....	86
5.4.1.	Fabricación del sistema microfluídico	86
5.4.1.1.	Fabricación de los micropilares de SU-8	86
5.4.1.2.	Fabricación de la cubierta de PDMS.....	88
5.4.1.3.	Montaje y preparación final del chip microfluídico	88
5.4.2.	Generación de membranas modelo.....	89
5.4.2.1.	Formación de Vesículas Multilamelares.....	89
5.4.2.2.	Formación de LUVs.....	92
5.4.2.3.	Formación de GSBs.....	92
5.4.2.4.	Formación de parches lipídicos soportados.....	94
5.4.2.5.	Generación de NTs soportados entre micropilares	95
5.4.2.6.	Generación de NTs para su visualización por crioEM	96
5.4.3.	Proteínas	98
5.4.3.1.	Purificación de proteínasa.....	98
5.4.3.2.	Medida de la concentración de proteína	98
5.4.3.3.	Determinación de la actividad GTPasa.....	98
5.4.3.4.	Marcaje químico de la Drp1	99
5.4.3.5.	Generación del modelo de la estructura de Drp1-tagA y Drp1-tagB	100
5.4.4.	Microscopía de fluorescencia.....	100
5.4.4.1.	Adquisición de imágenes.....	100
5.4.4.2.	Visualización de NTs y ensayos de constricción-fisión	101
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	102

ABREVIACIONES

BAR	Bin, Anfifisina y Rvs
BCL-2	Proteína de linfoma 2, célula B (<i>del inglés, B-Cell Lymphoma 2</i>)
BSA	Albúmina de Suero Bovino (<i>del inglés Bovine Serum Albumin</i>)
BSE	Elemento de señalización (<i>Del inglés, Bundle Signaling Element</i>)
Chol	Colesterol
CJs	Uniones en hendidura (<i>del inglés, Cristae Junctio</i>)
CL	Cardiolipina
COP	Coatámero de Proteínas
CrioEM	Criomicroscopía Electrónica
DI	Distancia Intermembrana
dNTs	Nanotubos Lipídicos de doble membrana
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPS	1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina
Drp1	Dynamamin-related Protein 1
Dyn1	Dinamina 1
Dyn2	Dinamina 2
Ec	Ecuación
EM	Microscopía Electrónica (<i>del inglés, Electron Microscopy</i>)
EMC	Endocitosis mediada por Clatrina
FIS1	Proteína de Fisión Mitocondrial 1 (<i>del inglés, Mitochondrial Fisión protein 1</i>)
GC	Galactocerebrósidos
GDP	Guanosina difosfato
GED	Dominio Efecto de GTPasa (<i>del inglés, GTPase Effector Domain</i>)
GFP	Proteína Fluorescente Verde (<i>del inglés, Green Fluorescent Protein</i>)
GMP-PCP	Guanosin trifosfato no hidrolizable
GSBs	Bicapas Suspendidas Gigantes (<i>del inglés, Giant Suspended Bilayer</i>)
GTP	Guanosin trifosfato

GUVs	Vesículas Gigantes Unilamelares (del inglés <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>)
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico
HF	Hemifisión
INF2	Interferón alfa 2
KCl	Cloruro de Potasio
KO	<i>Knock Out</i>
LUVs	Vesículas Unilamelares Grandes (del inglés, <i>Large Unilamellar Vesicles</i>)
MD	Dominio Medio (del inglés, <i>Middle Domain</i>)
mEGFP	GFP monomérica
MEM	Membrana Externa Mitocondrial
MFF	Factor de Fisión Mitocondrial (del inglés, <i>Mitochondrial Fission Factor</i>)
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MiD	Proteína Dinámica (del inglés, <i>Dynamic Protein</i>)
MIM	Membrana Interna Mitocondrial
NMM-2	Miosina no muscular-2 (del inglés, <i>Non Muscular Myosin-2</i>)
NTs	Nanotubos Lipídicos
OPA1	Autrofia Óptica tipo 1 (del inglés, <i>Optic Atrophy type</i>)
PA	Ácido Fosfatídico
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenglicol
PG	Fosfatidilglicerol
PH	Dominio de homología de Pleckstrina (del inglés <i>Pleckstrin Homology domain</i>)
PI(4,5)P ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PRD	Dominio Enriquecido de Prolina-Arginina (del inglés, <i>Prolin-Arginin Rich Domain</i>)
PS	Fosfatidilserina
RE	Retículo Endoplasmático
Re	Radio Externo
Rh	Rodamina
RhPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Lisamina rodamina B sulfonil)
Ri	Radio interno
Rt	Radio total

SH3	Dominio de Homología de Src 3 (del inglés, <i>Src Homology</i>)
SLBs	Parches Lipídicos Soportados (del inglés <i>Supported Lipid Bilayers</i>)
UV	Ultra Violeta
VL1	Lazo variable 1 (del inglés, <i>Variable Loop 1</i>)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Remodelación de membranas celulares

Las células eucariotas se caracterizan por un amplio y complejo sistema de compartimentos membranosos que les permiten la organización del espacio intracelular en diferentes orgánulos, como son el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi y la mitocondria, entre otros¹. Debido a su naturaleza lipídica, las membranas celulares son capaces de flexionarse, adoptando multitud de formas para adaptarse a los requerimientos celulares^{2,3}. Por lo general, los cambios de forma en las membranas están asociados a determinadas funciones⁴, como la comunicación entre orgánulos para llevar a cabo procesos tan vitales como el tráfico de metabolitos o la propia división celular^{5,6}. Un clásico ejemplo es la formación de vesículas en el proceso de endocitosis mediada por clatrina (EMC). Aquí, las membranas madre son capaces de flexionarse hasta formar un cuello que se hace cada vez más pequeño, hasta un punto en el que se produce su separación de la membrana, dando lugar a una vesícula⁷. Otro ejemplo es el tráfico en el aparato de Golgi, donde además de la formación y fusión de vesículas entre cisternas, existe el tráfico de metabolitos a través de túbulos membranosos⁸. Es decir, los cambios de forma y topología de las membranas ocurren continuamente a lo largo de todo el sistema membranoso, y son fundamentales para mantener el correcto funcionamiento celular.

Uno de los pilares de la dinámica del sistema membranoso celular reside en su capacidad de remodelación topológica controlada⁴. Es decir, las membranas celulares pueden dividirse en dos o fusionarse con otras sin perder su función de barrera semipermeable, una característica vital para el correcto funcionamiento celular. Por ejemplo, en el caso de la formación del cuello de vesículas endocíticas y su posterior fisión, el mantenimiento de esa barrera semipermeable evita una pérdida del contenido de la vesícula, permitiendo una correcta EMC⁹. Otro ejemplo más drástico es el de la división mitocondrial, donde la pérdida de contenidos durante la remodelación puede

ocasionar la muerte celular¹⁰. Por ello, la remodelación es un proceso transitorio rápido y localizado, estrictamente controlado por la maquinaria proteica especializada.

Aunque son muchas las proteínas que participan en los procesos de remodelación de membranas, normalmente trabajan de forma pasiva, imponiendo su forma molecular (por ejemplo, las de dominio BAR) o la forma de sus formaciones poliméricas (proteínas de capa, como las COP-I y COP-II (del inglés, *Coat Complex Protein*))¹¹, en la realización de esta tesis nos hemos centrado en una superfamilia de proteínas muy especial, las dinaminas. Las dinaminas son remodeladoras activas de membrana, especializadas en la transducción de energía obtenida de la hidrólisis de GTP en energía mecánica, necesaria para la remodelación de la membrana¹². Estas grandes GTPasas se localizan a lo largo del interior celular, participando tanto en procesos de fusión como de fisión de las membranas intracelulares¹³.

1.2. Las dinaminas: remodeladoras universales de membranas

Los muchos y diversos miembros de la familia de las dinaminas se encuentran en todo tipo de células, desde procariotas hasta los eucariotas. La localización y función de algunas dinaminas se puede observar en la Figura 1.1. Las dinaminas se diferencian de las GTPasas pequeñas por su gran tamaño (>70 kDa), su estructura multidominio, una baja afinidad por el GTP, así como por su capacidad de auto-ensamblaje en patrones poliméricos que se regulan mediante la hidrólisis de GTP^{14,15}.

Las dinaminas se suelen clasificar en dos tipos de proteínas: las llamadas dinaminas clásicas, que son los miembros más recientes de la superfamilia, y las “proteínas relacionadas con las dinaminas”, que, curiosamente son los miembros más antiguos¹⁶. Otra posible clasificación de las dinaminas se puede hacer atendiendo a su función de remodelación de membrana: principalmente fusión o fisión. Entre las dinaminas que median la fusión podemos destacar a la OPA1 (del inglés, *Optic Atrophy type 1*), asociada a la membrana interna mitocondrial (MIM) y relacionada con la fusión de membranas de este orgánulo¹⁷; las mitofusinas, localizadas en la cara citosólica de la membrana externa mitocondrial (MEM), desde donde participan en la fusión de diferentes

mitocóndrias¹⁸; o la atlastina, involucrada en la fusión homotípica de los túbulos del RE¹⁹. Todas estas dinaminas de fusión están normalmente ancladas a la membrana mediante un dominio transmembrana.

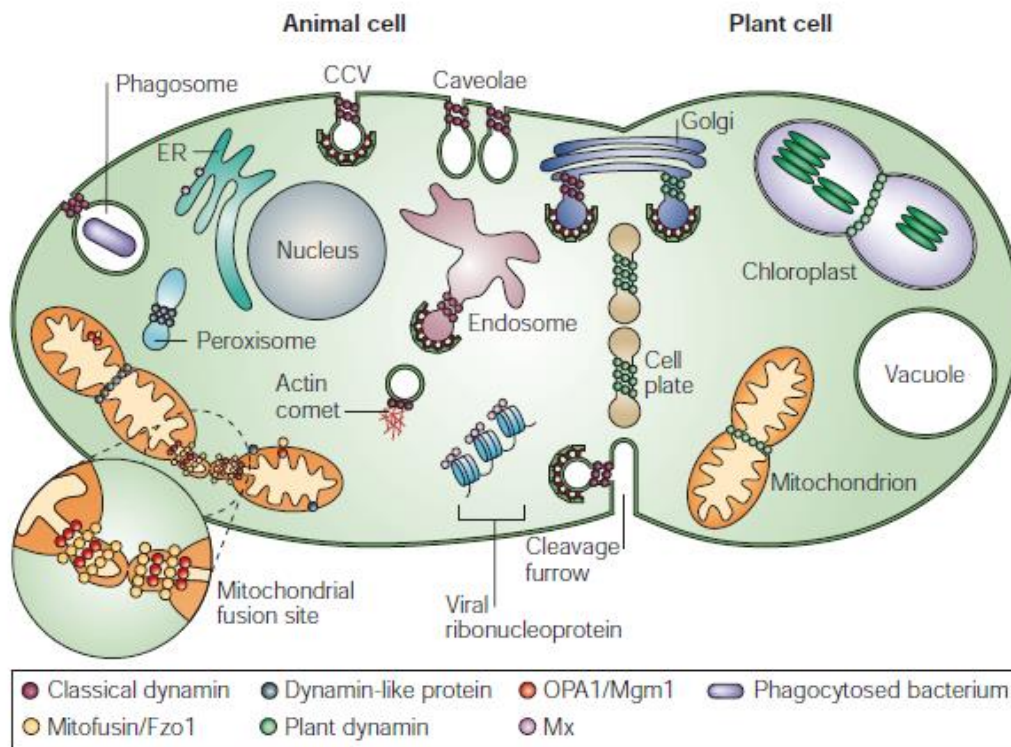


Figura 1.1 Funciones de proteínas de la superfamilia de las dinaminas en la célula animal y vegetal. Extraída con permiso de Springer, Nature, “ The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?”¹³, Gerrit J. K. Praefcke & Harvey T. McMahon, 2005, Copyright (2005).

Las dinaminas centradas en la fisión, a su vez, son proteínas periféricas e interactúan de forma reversible con las membranas. Ejemplo de proteínas de fisión son las tres “dinaminas clásicas”, es decir, las dinaminas 1 (Dyn1), 2 (Dyn2) y 3 (Dyn3). La Dyn1 se expresa específicamente en los tejidos neuronales, la Dyn3 se encuentra en los testículos y post-mitóticamente en el cerebro, mientras que la Dyn2 se expresa

ubicuamente^{20,21}. Las tres dinaminas clásicas están involucradas principalmente en la fisión del cuello de las vesículas endocíticas. Son capaces de auto-ensamblarse alrededor de un cuello lipídico y producir su constricción, llevándolo a la desestabilización y consecuente fisión²² (Fig. 1.2).

Otro ejemplo de dinamina de fisión es la Drp1 (del inglés, *Dynamamin-related protein 1*), expresada ubicuamente e involucrada en la fisión mitocondrial²³.

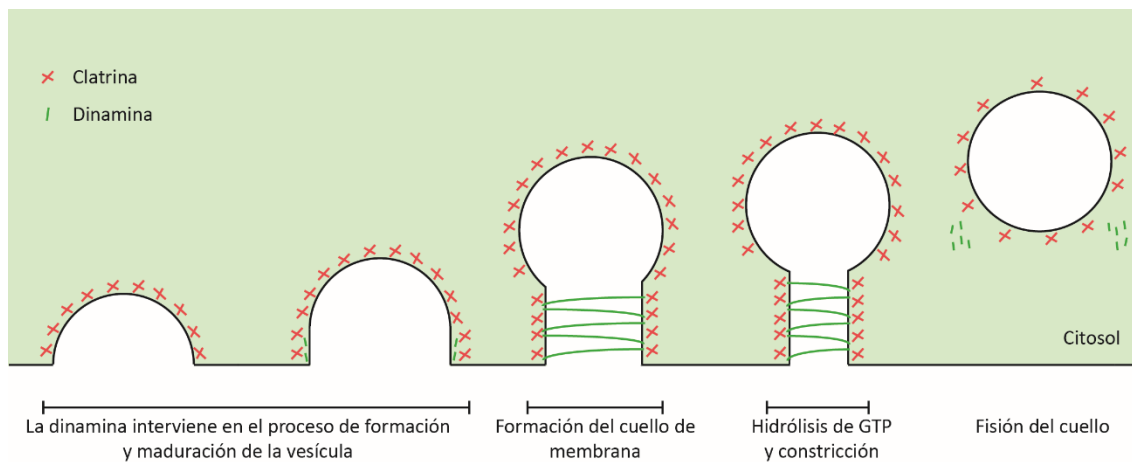


Figura 1.2. Etapas del proceso de endocitosis mediada por clatrina. Las dinaminas clásicas intervienen en la formación y en la maduración de la vesícula endocítica junto con la clatrina. Una vez formada la vesícula, la dinamina se ensambla formando una hélice alrededor del cuello lipídico que une la vesícula a la membrana madre. La hidrólisis de GTP produce la constricción de la hélice y, en consecuencia, la del cuello lipídico, que fisiona, dando lugar a una vesícula independiente.

La dinámica intrínseca a la remodelación de las membranas celulares está basada en la omnipresencia de dinaminas y las interacciones entre ¹³. Un lugar donde se localizan muchos de los miembros de esta superfamilia de proteínas es la mitocondria. Además de las dinaminas de fusión OPA1 y la mitofusina, localizadas en la MIM y MEM de este orgánulo, respectivamente, la Drp1 citosólica forma la maquinaria de fisión mitocondrial²⁴. Recientemente, la dinamina clásica Dyn2²⁵, normalmente implicada en

la fisión de los cuellos de las vesículas endocíticas durante la EMC²⁶, la endocitosis rápida mediada por endofilina (ERME)²⁷, o la internalización de las uniones en hendidura (del inglés, *gap junctions*)^{28,29}, también se ha localizado en el sitio de fisión mitocondrial. La presencia de todo este abanico de dinaminas en la mitocondria nos hace intuir que éste es un orgánulo en continua transformación, cuyas membranas se dividen y fusionan constantemente.

1.3. Dinámica de la red mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos con una doble membrana lipídica. La MEM delimita al orgánulo con el citoplasma, mientras que la MIM engloba al compartimento acuoso del interior, llamado matriz (Fig. 1.3). Ambas están separadas por el espacio intermembrana. En la MIM, plegada en forma de crestas con el objetivo de aumentar la superficie por área, se produce la fosforilación oxidativa que da lugar a la mayoría del ATP celular, molécula que proporciona energía para innumerables procesos. En la MIM se pueden distinguir además dos sub-compartimentos topológica y funcionalmente distintos, los cuales están asociados a proteínas específicas: aquellas zonas que se encuentran próximas a la MEM y las crestas, invaginaciones de la propia membrana interna que sobresalen hacia la matriz mitocondrial³⁰. Ambos dominios se separan por estructuras tubulares de unos 15-35 nm de diámetro interno, conocidas como uniones de crestas (del inglés, *crisetae junctions (CJs)*). Se cree que una de las funciones de las CJs es formar una barrera que controla el movimiento de proteínas y metabolitos entre las crestas y las zonas de la MIM más próximas a la MEM^{30,31}.

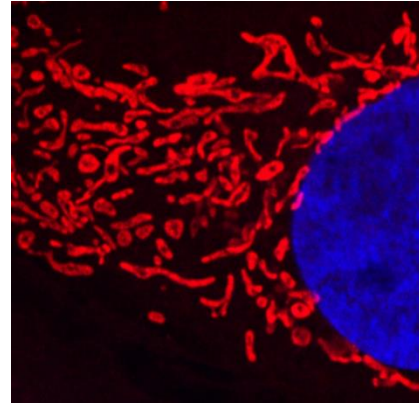
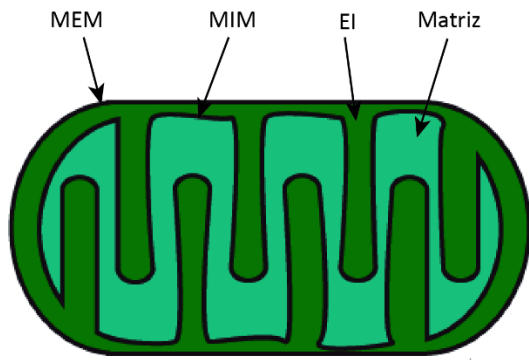


Figura 1.3. Izquierda. Representación esquemática de una mitocondria, mostrando sus membranas y compartimentos de una mitocondria. La membrana externa mitocondrial delimita el orgánulo con el citoplasma, mientras que la interna engloba a la matriz. Ambas están separadas por el espacio intermembrana (EI). **Derecha.** Imagen de fluorescencia que muestra la red mitocondrial (marcada con MitoTracker en rojo) a lo largo del citoplasma de una célula. Extraído con permiso de “.Mitochondrial Network and Biogenesis in Response to Short and Long-Term Exposure of Human BEAS-2B Cells to Aerosol Extracts from the Tobacco Heating System 2”³², Walczak y colaboradores, 2020.

Gracias al desarrollo de la microscopía, de la observación de super-resolución en tiempo real y de los análisis ultraestructurales, se ha visto que las mitocondrias no son meras unidades individuales, sino que forman una red a lo largo del citoplasma³³ (Fig. 1.3). De hecho, dependiendo del tipo de célula, la matriz mitocondrial puede ocupar hasta el 35% del volumen celular³⁴. Pero, además, la red mitocondrial es dinámica, pudiendo llegar a explorar el 80% del citoplasma en tan solo 15 minutos³⁵. Los responsables de la movilidad mitocondrial son elementos del citoesqueleto como los microtúbulos o los filamentos de actina³⁶, los cuales funcionan como “railes” por los que las mitocondrias discurren gracias a la acción de proteínas conocidas como motores moleculares, las dineínas y las kinesinas³⁷. Además de por la movilidad de la red mitocondrial, su dinámica también está definida por la continua fusión y fisión de sus unidades individuales, procesos que controlan la morfología y el número de mitocondrias constitutivas de la red³³.

La fusión mitocondrial está relacionada con el intercambio de proteínas y metabolitos entre mitocondrias, mientras que la fisión es llevada a cabo para un control

de calidad de las mitocondrias (eliminación de mitocondrias dañadas mediante la mitofagia)³⁸ o la distribución de la propia red mitocondrial durante la división celular^{39,40}. El balance entre la fisión y fusión mitocondrial mantiene una cantidad estable de mitocondrias en cada célula, lo que contribuye a la homeostasis celular⁴⁰. Dado que estos orgánulos están implicados en numerosos procesos celulares, la pérdida del balance entre fusión y fisión puede originar innumerables patologías humanas. Así, un incremento incontrolado de la fisión mitocondrial resulta en un fenotipo mitocondrial fragmentado, mientras que la sobre-estimulación de la fusión de la red mitocondrial (o en su defecto una disminución de la fisión) lleva a un fenotipo híper-fusionado. Ambos fenotipos están estrechamente asociados a patologías humanas⁴¹ (Fig. 1.4).

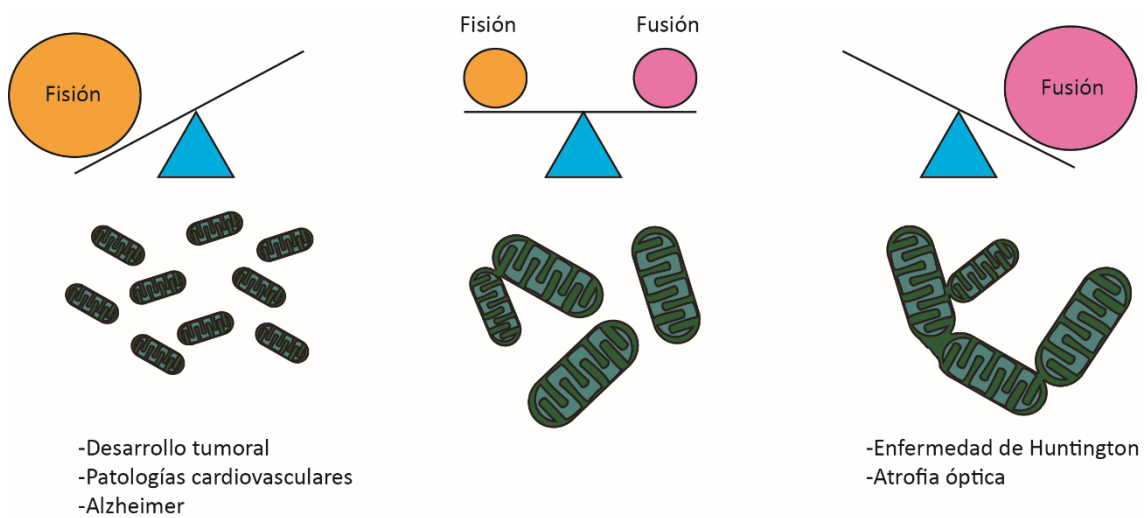


Figura 1.4. El balance entre la fusión y la fisión mitocondrial mantiene la homeostasis celular. Su pérdida conlleva la alteración del fenotipo mitocondrial, aflorando diversas patologías.

En 1981, Gottfried Schatz, investigador de este campo, ya decía⁴²:

"Hoy en día, casi todas las enfermedades parecen tener alguna relación con la mitocondria, ya sea diabetes, sordera, ceguera, distrofia muscular, cáncer, envejecimiento prematuro, demencia, infertilidad masculina o incluso algunas infecciones bacterianas".

Y lo cierto es que Schatz llevaba razón. Si nos centramos tan sólo en el proceso de la división mitocondrial, un aumento incontrolado de la misma está relacionado con la proliferación de células cancerosas, la metástasis y la resistencia a tratamientos farmacológicos de dichas células, lo que contribuye en su conjunto al desarrollo de tumoral⁴³. Ejemplos de ello son el cáncer de pulmón, cáncer de ovario^{44,45}, los tumores cerebrales⁴⁶ o el cáncer de próstata⁴⁷. Por el contrario, la inhibición de la fisión mitocondrial en células cancerosas produce un descenso en su ritmo de crecimiento, lo que contribuye a la remisión del tumor⁴⁸. La desregulación de la fisión mitocondrial también está estrechamente ligada a varias enfermedades neurodegenerativas, como la atrofia óptica⁴⁹, Parkinson⁵⁰, esclerosis lateral amiotrófica⁵¹, enfermedad de Huntington⁵² o Alzheimer⁵³. En enfermedades de tipo metabólico, como la diabetes, se ha visto que los pacientes presentan una alteración de la fisión mitocondrial⁵⁴, mismo patrón observado en aquellos con otras patologías de tipo cardiovascular⁵⁵. Es decir, el correcto funcionamiento del proceso de la división mitocondrial es crucial para la viabilidad celular. Por ello, la división mitocondrial es un proceso estrechamente controlado por numerosos factores proteicos y lipídicos, como veremos a continuación.

1.3.1. Etapas de la división mitocondrial

Para que la mitocondria lleve a cabo su división, se ha de producir la fisión de su doble bicapa lipídica. Para ello, su diámetro debe reducirse considerablemente – dependiendo del tipo y estado celular, las mitocondrias pueden alcanzar la micra de diámetro—. Durante este proceso, la función de barrera de las membranas ha de mantenerse, ya que de lo contrario podría ocurrir una fuga del contenido mitocondrial hacia el exterior⁵⁶. Esta fuga puede exponer al citosol el citocromo C al citosol. La

exposición de esta proteína normalmente localizada en la cara externa de las crestas mitocondriales, está relacionada con una señal apoptótica celular, a través de la activación indirecta de la cascada de caspasas. En condiciones normales, BCL-2 (del inglés, *B-Cell Lymphoma 2*), proteína localizada en la MEM, bloquea la liberación hacia el exterior del citocromo C⁵⁷, pero un fallo durante el proceso de fisión podría favorecer su salida. Por ello, la fisión mitocondrial es un proceso muy localizado que puede proceder de formas diferentes, dependiendo del tipo y estado celular⁴⁰, e implica tres etapas: la pre-constricción, la constricción final y la fisión. Veamos cada una de estas etapas con más detalle.

1.3.1.1. La pre-constricción mitocondrial

El proceso de división mitocondrial comienza con otro orgánulo, el RE⁵⁸. EL RE marca los sitios donde posteriormente se llevará a cabo la fisión, rodeando a la mitocondria y produciendo una primera constricción de sus membranas⁵⁸, lo cual se hace posible gracias a varios mecanismos, que pueden ser independientes entre sí. Está consensuado que los filamentos de actina y el calcio juegan un papel fundamental en esta etapa. Durante este proceso se forman los sitios de contacto entre el RE y la mitocondria, lo que permite un intercambio lipídico, así como la transferencia de calcio entre ambos orgánulos^{59,60}. Se ha demostrado que el aumento de la concentración de calcio en el citosol aumenta la polimerización de la actina, gracias a la acción de la proteína interferón alfa 2 (INF2)⁶¹. Así, el INF2 inicia la polimerización de filamentos de actina desde el RE hacia la mitocondria, donde forma un haz en distintas direcciones^{62,63}, en un proceso que podría a su vez estar regulado por la proteína de localización mitocondrial Spire1C⁶⁴. La formación de la red de actina alrededor del sitio de fisión mitocondrial está a su vez acompañada de la formación de la red de miosina no muscular (NMM-II, del inglés *Non-Muscular Myosin II*) y de microtúbulos⁶⁵. Mediante la técnica de la microscopia electrónica de réplica de platino se ha podido observar que la actividad contráctil de la NMM-II causa deformaciones estocásticas no homogéneas en la red que forman la actina, los microtúbulos y la propia NMM-II, lo que probablemente sea fundamental para que se inicie la constricción mitocondrial⁶⁵. Más allá de que este sea

un mero proceso iniciador o facilitador de la constricción, otros estudios sugieren que la primera constricción mitocondrial se debe al reclutamiento de NMM-II a la red de actina. La NMM-II induce una contracción de la red de actina en el plano paralelo o perpendicular al del lugar donde se producirá la fisión mitocondrial, dando lugar a la primera disminución del radio de la mitocondria⁶⁶ (Fig. 1.5).

Así, la pre-constricción mitocondrial mediada por el contacto con el RE lleva a una reducción del diámetro externo de la mitocondria desde 1000-500 nm hasta unos 138-215 nm de diámetro⁵⁸. El diámetro que se alcanza tras esta primera pre-constricción puede estar influenciado tanto por factores mecánicos, como la tensión lateral, intrínsecos de la propia membrana mitocondrial⁶⁷, como por la intervención de factores proteicos^{66,63}.

Tras esta etapa de pre-constricción, se necesita la intervención de al menos un factor más para completar la fisión mitocondrial: la dinamina Drp1.

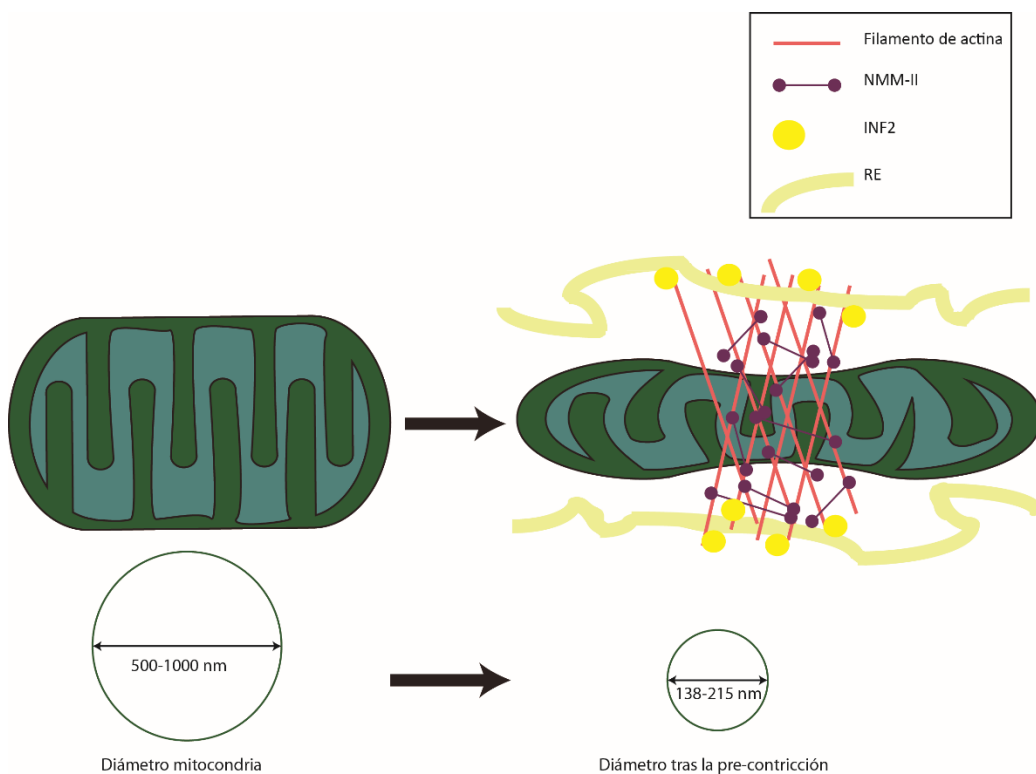


Figura 1.5. Pre-constricción de la mitocondria. El RE, junto a la red de filamentos de actina y de NMM-II, provocan la primera constricción de la mitocondria, reduciendo su diámetro.

1.3.1.2. La constricción y fisión mitocondrial

La Drp1 tiene la capacidad de unirse a las membranas, auto-ensamblarse sobre ellas formando un polímero en forma de hélice, y producir la constricción de la membrana que rodea, gracias a la energía obtenida de la hidrólisis de GTP⁶⁸. Pero para que la Drp1 pueda llevar a cabo estas acciones, la membrana ha de tener dos características: tener un punto de anclaje lipídico (como los lípidos aniónicos cardiolipina (CL), ácido fosfatídico (PA) o diacilglicerol (DAG)) o proteico (adaptadores de Drp1) y poseer un diámetro inferior al de la hélice contráctil de Drp1 (es decir, menos a los ~200 nm alcanzados en la etapa de pre-constricción mitocondrial⁵⁸).

El ensamblaje de la hélice de Drp1 sobre la MEM induce una disminución del diámetro mitocondrial hasta los 109 ± 24 nm *in vivo*, mismo valor que forma su espiral sobre liposomas artificiales⁶⁹. Sin embargo, *in vitro*, este radio puede ser sustancialmente menor, dependiendo de la composición lipídica. Así, cuando la Drp1 se ha ensamblado sobre liposomas sintéticos compuestos de DOPS, se observó la formación de túbulos de membrana (proceso llamado tubulación) cuyos diámetros eran de ~ 65 nm en presencia de GMPPCP (análogo no hidrolizable de la GTP para el estado de unión protien-GTP) y tan sólo de 30 nm en presencia de GTP⁷⁰. Sin embargo, en condiciones de composición lipídica más fisiológica, los valores de constricción alcanzados coinciden con los observados *in vivo*⁶⁹. Notablemente, los ~100 nm de diámetro tras el ensamblaje de la Drp1 sobre la mitocondria, no serían suficientes para la desestabilización y fisión de la doble membrana mitocondrial, que debe ocurrir a curvaturas de membrana mayores.

Entonces, ¿cómo se llega a fisionar la mitocondria? Una de las posibles explicaciones implica a los adaptadores de Drp1 presentes en la MEM, como el MiD 49/51 (del inglés, *Mitochondrial Dynamics protein*, de 49 y 51KDa, respectivamente), Mff (*Mitochondrial Fission Factor*) y Fis1 (*Mitochondrial Fission 1*). Experimentos *in vitro* han demostrado que el polímero conjunto que forman MiD 49 y Drp1 en solución tiene un diámetro inferior al que forma la Drp1 sola –15 y 34 nm de diámetro, respectivamente–70. Aunque los autores sugieren que los 15 nm bastarían para iniciar la fisión –teniendo en

cuenta que una bicapa tiene unos 5 nm de diámetro, y que el cuello donde se produce la constricción de la mitocondria aún preserva las dos membranas mitocondriales— lo cierto es que estos experimentos se llevaron a cabo sin la presencia de membranas, o usando liposomas artificiales de composiciones no fisiológicas (con 100% del lípido aniónico fosfatidilserina (PS)). Otros resultados han mostrado que la actividad GTPasa de la Drp1 se ve inhibida en presencia de las MiDs, lo que favorecería su ensamblaje en la MEM⁷¹, donde la mantendrían en un estado inactivo hasta que una señal celular la active⁷².

También se le otorga a Mff un rol en mediar en la constricción de Drp1, ya que su ausencia, junto con la MiDs, altera el fenotipo mitocondrial en algunos tipos celulares⁷¹. Sin embargo, no se ha podido establecer con certeza si juega un papel determinante en la fisión mitocondrial. Algo parecido ocurre con el adaptador Fis1, dispensable para la fisión mitocondrial, y cuya función parece limitarse a facilitar el reclutamiento de la Drp1 a la MEM^{71,73}. Se ha observado también que otros elementos celulares pueden sustituir el papel de las proteínas accesorias, como es el caso de la actina⁷⁴. Además, hay que tener en cuenta que la Drp1 puede sufrir diferentes modificaciones postransduccionales —sumoilación, fosforilación, nitrosilación y ubiquitinación⁷⁵—, que podrían alterar el funcionamiento de la propia Drp1. Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido determinar si dichas modificaciones o los adaptadores juegan un papel crucial en la fisión mitocondrial, en parte debido a extensa interactoma presente en el sitio de la fisión mitocondrial, como veremos más adelante.

Otro factor fundamental en el proceso de la constricción de membrana por la Drp1 es la composición lipídica de la MEM. Su papel es doble. Por una parte, los lípidos dictan el nivel de resistencia a la flexión de la membrana, y por tanto, la cantidad de energía que se necesita aportar para aumentar su curvatura. Por otro lado, los lípidos condicionan la interacción de las proteínas con la membrana. Por ejemplo, se ha demostrado que la Drp1 interacciona específicamente con la CL⁷⁶. Esta interacción tiene un efecto directo sobre la función de la proteína, pues la actividad GTPasa de Drp1 es dependiente de la concentración de CL en la membrana^{76,77}. Teniendo en cuenta que la función constrictora está ligada a la hidrólisis del GTP, la concentración de CL en la MEM afectará a la capacidad de Drp1 para producir su constricción. Sin embargo, la CL no es un lípido que normalmente esté presente en la MEM, ya que se localiza principalmente

en la MIM⁷⁸, siendo su porcentaje muy pequeño en la MEM (~ 0.3% del lípido total)^{79,80}. En situaciones de estrés celular hay una externalización de CL desde la MIM hacia la MEM a través de la enzima escramblasa fosfolipídica. Este fenómeno ocurre, por ejemplo, durante la mitofagia, donde la fisión mitocondrial aumenta¹¹⁸, presumiblemente debido a un aumento en el reclutamiento de la Drp1 hacia la MEM. La relación entre la externalización de la CL hacia la MEM y las señales apoptóticas que conducen a la célula a su muerte por apoptosis están bien documentadas⁸¹⁻⁸⁴. Por tanto, el hecho de que la Drp1 presente una afinidad específica por la CL abre la puerta a la posible existencia de varios mecanismos de división mitocondrial. La elección entre uno u otro estaría dictada por los requisitos de la célula en cada momento concreto.

De hecho, se ha visto que existen mecanismos de fisión mitocondrial independientes de Drp1, como es el caso de la infección de células epiteliales por la bacteria *Listeria monocytogenes*, donde la fisión mitocondrial estaría mediada principalmente por el RE y los filamentos de actina⁸⁵, o en el caso de la formación de las vesículas mitocondriales que se generan en condiciones de estrés oxidativo relacionado con las proteínas Parkin y Pink1, asociadas con el desarrollo de Parkinson⁸⁶. Otro posible escenario para la fisión mitocondrial en condiciones normales ha sido propuesto recientemente, tras la localización de otra dinamina junto a la Drp1 durante la última etapa de la fisión mitocondrial²⁵. Se trata de la dinamina clásica Dyn2 (Fig.1.6).

La implicación de la Dyn2 en la fisión mitocondrial se apoya en varias observaciones. En células HeLa con Knock Out (KO) de Dyn2, las mitocondrias aparecen hiper-fusionadas, signo de una inhibición de la fisión mitocondrial²⁵. Este no es debido a un efecto secundario del bloqueo de la EMC, en el que participa la Dyn2, ya que en células en las que se eliminó el adaptador AP-2, necesario para la EMC⁸⁷, las mitocondrias se mostraban con un fenotipo normal²⁵. Por otro lado, el tiempo de asociación entre la Dyn2 y la mitocondria antes de que ocurra su fisión es de 27 ± 5 s²⁵. Este tiempo es similar al de la asociación de la Dyn2 a los cuellos lipídicos de las vesículas en la EMC antes de producirse su fisión⁸⁸, lo que además sugiere mecanismos de fisión similares.

Al igual que la Drp1, la citosólica Dyn2 es capaz de unirse a las membranas, auto-ensamblarse sobre ellas en forma de hélice y producir su constricción⁸⁹⁻⁹¹. Al igual que

la Drp1, esta proteína sólo se ensambla sobre membranas que posean una gran curvatura. De hecho, la curvatura creada por la Drp1 es ideal para promover el autoensamblaje de la Dyn2. Además, mientras que la Drp1 permanece asociada a la mitocondria independientemente de si fisiona o no, la Dyn2 se une de manera transitoria, tras la unión de la Drp1, en el momento previo a la fisión²⁵. Estos datos, junto al hecho de que el anillo de Drp1 no sea capaz de mediar la fisión de liposomas *in vitro*, apoyan la hipótesis de que la Dyn2 sea uno de los factores que intervienen en los últimos instantes de la fisión mitocondrial. El mecanismo que se ha llegado a proponer al respecto consiste en el reclutamiento de la Dyn2 al sitio de fisión mitocondrial tras el ensamblaje de la Drp1 y la consecuente constricción de la membrana²⁵ (Fig. 1.7). Tras el reclutamiento de la Dyn2 al sitio de fisión se produce la fisión mitocondrial y la disociación de la Dyn2 de la MEM.

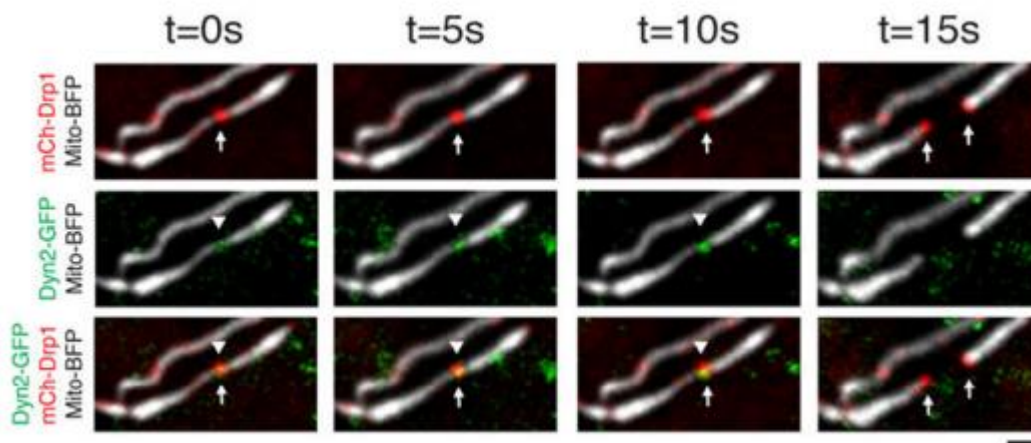


Figura 1.6. Imagen tomada *in vivo* de una división mitocondrial en células Cos-7 expresando mito-BFP (gris), mCh-Drp1 (rojo) y Dyn2-mNeon (verde). La Drp1 y la Dyn2 llevan a cabo la división mitocondrial. Barra de escala 1 μ m. Imagen extraída con permiso de Springer, Nature, “Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division”²⁵ J. Lee y colaboradores, 2016, Copyright (2016).

En contra de este mecanismo, se alza un estudio publicado recientemente, en el que los autores han mostrado que en fibroblastos con triple KO de Dyn1, Dyn2, y Dyn3, el

fenotipo mitocondrial no se ve alterado, concluyendo que la Drp1 es capaz de llevar a cabo la fisión mitocondrial sin la presencia de Dyn2⁹². Aunque serían necesarios más experimentos para verificarlo, esto podría ser debido a que la eficiencia del triple KO no fuese completa, o a que es un hecho que podría estar ligado a un tipo celular específico, pudiendo obtenerse resultados diferentes en los más de 200 tipos celulares presentes en mamíferos⁹³. Otros estudios soportan un papel relevante de la Dyn2 en el proceso⁹⁴.

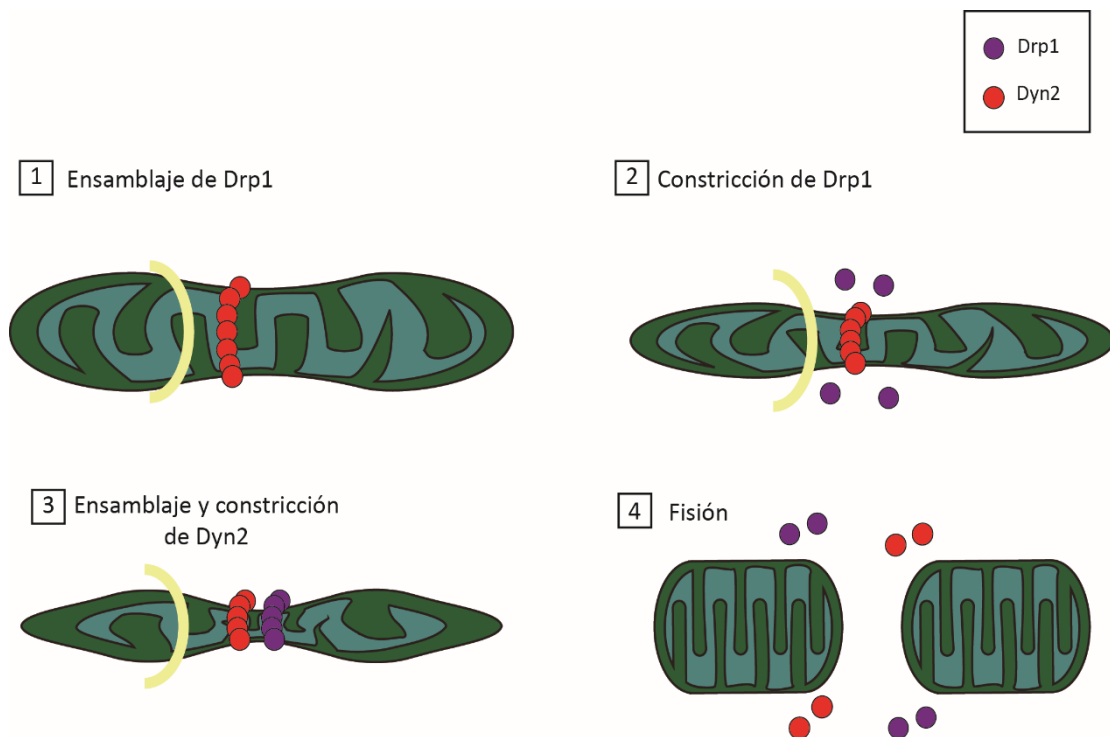


Figura 1.7. Etapas del proceso de la fisión mitocondrial mediada por las dinaminas. El RE y elementos del citoesqueleto reducen el radio de la mitocondria para que la Drp1 pueda ensamblarse sobre ella (1). Drp1 produce una constricción de la mitocondria, reduciendo su radio (2). Se produce el ensamblaje de Dyn2 sobre el cuello de membrana del sitio de constricción, resultando en una constricción más acusada (3), que se resuelve mediante la fisión mitocondrial (4).

Aunque las dos proteínas, Drp1 y Dyn2, pertenecen a la misma superfamilia y comparten muchas características estructurales, también tienen grandes diferencias que influyen en su funcionamiento durante la remodelación de membranas. A

continuación, vamos a revisar cuáles son las características que unen y distinguen a estas dos GTPasas.

1.3.2. Dinaminas en la fisión mitocondrial: características estructurales y de auto-ensamblaje

Todas las proteínas de la superfamilia de las dinaminas comparten tres dominios estructurales. El dominio GTPasa (dominio G), conservado entre los miembros de la familia y encargado de la unión e hidrólisis del GTP⁹⁵, y el tronco o tallo (*stalk*) formado por el dominio efector GTPasa (GED, *GTPase Effector Domain*) y el dominio medio (MD, *Middle Domain*), la parte de la proteína que le da su capacidad de autoensamblaje^{96,97}. El tronco se une a la cabeza G a través de un elemento de señalización (BSE, *bundle signaling element*), que controla la efectividad de la transducción de energía entre la cabeza y el resto de la estructura de la proteína⁹⁸ (Fig. 1.8). El resto de la estructura varía mucho entre las dinaminas. Así, las dinaminas clásicas o modernas, como la Dyn2, presentan un Dominio Enriquecido de Prolina-Arginina (PRD, del inglés *Prolin-Arginin Rich Domain*), que les permite interactuar con los dominios de Homología de Src 3 (SH3, del inglés *Src Homology 3*) de proteínas accesorias¹³. Esta interacción parece ser necesaria para la endocitosis dependiente de dinamina⁹⁹. Otra característica particular de las dinaminas clásicas es el dominio de homología de Pleckstrina (Dominio PH, del inglés *Pleckstrin Homology*), que forma el "pie" de estas proteínas. Este dominio presenta una gran afinidad por los fosfoinosítidos¹⁰⁰⁻¹⁰² de la membranas celulares, y posee en su estructura un bucle variable hidrofóbico (VL1, del inglés *Variable Loop 1*) cuya inserción estable en la membrana es esencial para la generación de curvatura y la subsecuente fisión de la membrana¹⁰³ (Fig. 1.8).

La Drp1 carece del dominio PRD y además el en vez del dominio PH posee el Dominio Variable (VD, del inglés *Variable Domain*). Dependiendo de la isoforma de Drp1, el VD puede presentar diferentes regiones o insertos. Uno de ellos es el Inserto B, el cual interactúa específicamente con el lípido cardiolipina (CL) a través de un módulo de cuatro lisinas⁷⁶ (Fig. 1. 8). Otro posible inserto es el Inserto A, llamado igualmente loop-80, debido a su localización alrededor del residuo 80 de la estructura primaria¹⁰⁴. Estos

insertos, conocidos como “regiones polipeptídicas intrínsecamente desordenadas”, ejercen un papel regulador de la actividad de la proteína, ya que afectan a factores como el auto-ensamblaje o la actividad GTPasa^{16,105}.

Hemos comentado anteriormente que ambas proteínas pueden ser reclutadas a la membrana a través de factores lipídicos específicos. Así, el dominio PH de la Dyn2 tiene preferencia de unión por los lípidos con carga negativa, como la PS y los fosfoinosítidos, especialmente por el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂)^{101,102}, lípido presente en los cuellos de las vesículas endocíticas, donde la Dyn2 media la fisión^{106,107}. Curiosamente, este lípido también se encuentra en la MEM^{79,108}. Se ha comprobado cómo la eliminación o el enmascaramiento de PI(4,5)P₂ produce fragmentación mitocondrial y autofagia¹⁰⁹, lo que sugiere la necesidad de la existencia de un reservorio de este lípido para el transcurso normal de la fisión mitocondrial. Por tanto, la presencia del PI(4,5)P₂ podría favorecer el reclutamiento de la ubiqua Dyn2 desde el citosol al sitio de la fisión mitocondrial²⁵.

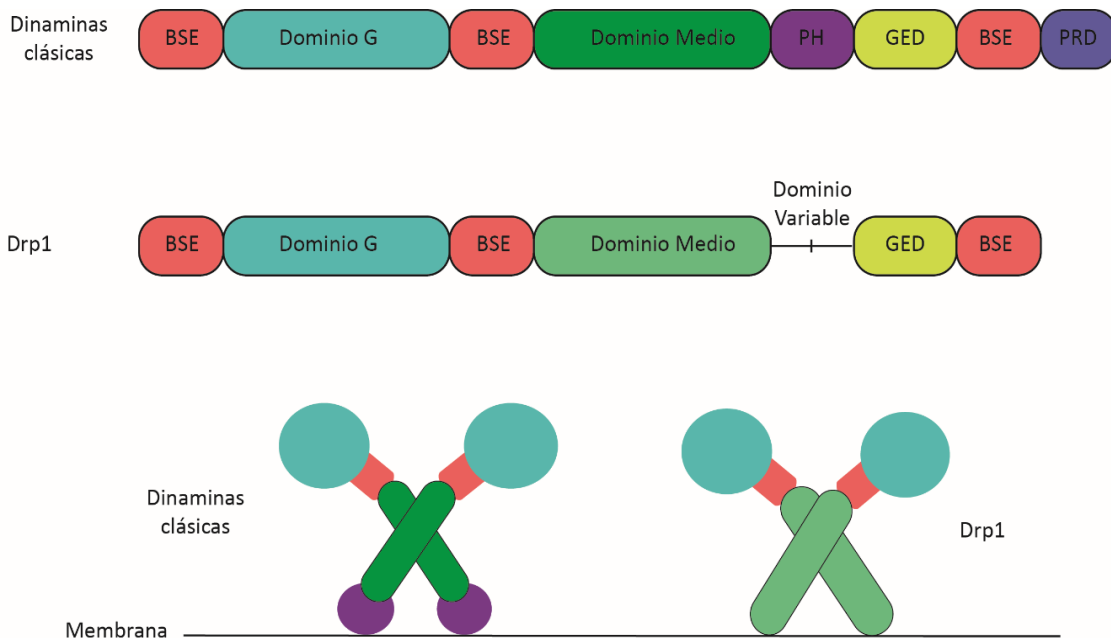


Figura 1.8. Comparación de la secuencia y estructura de las dinaminas clásicas y la Drp1 sobre la membrana lipídica. Ambas proteínas se encuentran en forma de dímeros en solución y se ensamblan en estructuras poliméricas helicoidales sobre las membranas¹⁶.

Por su parte, la unión de Drp1 a la membrana puede darse de manera directa, como se ha observado en numerosos estudios *in vitro*, o indirecta, a través de alguno de los adaptadores presentes en la MEM^{70,71,110}. Hay evidencias que respaldan que la interacción de la Drp1 con la MEM se da a través de su dominio específico VD. Este dominio presenta una preferencia por la CL, aunque también lo hace por otros lípidos, como el PA –precursor de la CL– o el DAG^{77,111}. Otros estudios confieren al VD un papel de regulador negativo del auto-ensamblaje de la proteína, ya que su eliminación lleva a la formación de grandes oligómeros en el citosol, antes de que la Drp1 se una a la MEM¹¹². Curiosamente, se ha visto que la eliminación del dominio PH de la Dyn2 tiene un papel similar en la oligomerización de la proteína en solución¹¹³. En resumen, el PH de la Dyn2 y el VD de la Drp1 tienen un papel homólogo en la regulación de la interacción proteína-proteína y proteína-membrana, aunque la estimulación de la unión a la membrana se media por factores lipídicos o proteicos diferentes.

Una vez unidas a los cuellos de membrana, las dinaminas comienzan su auto-ensamblaje a través de sus dominios medios, formando polímeros en forma de anillos o hélices contráctiles⁸⁷ (Fig. 1.9). Esta polimerización sitúa a los dominios GTPasa de las dinaminas en la posición de hidrólisis, que se produce entre parejas de cabezas G de anillos adyacentes. Aunque la polimerización, tanto de la Drp1 como de la Dyn2, depende sobre todo de su dominio medio o tallo, para la Dyn2 se ha visto que además el dominio PRD puede tener un papel regulador en el proceso^{97,114}.

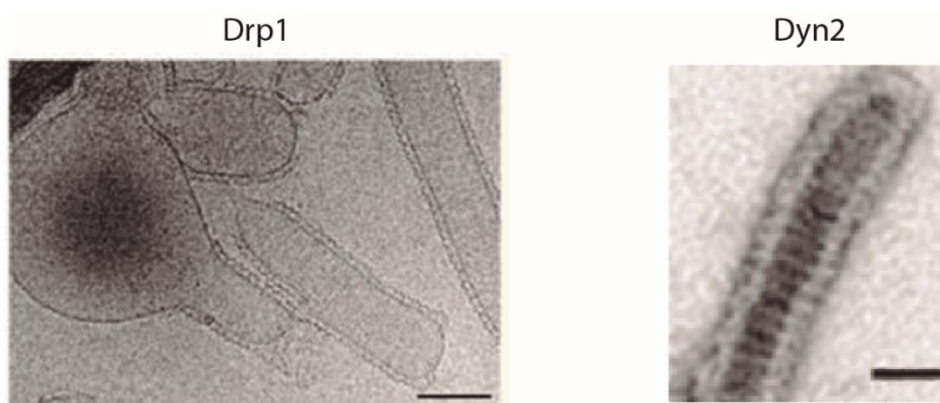


Figura 1.9. Ensamblaje de Drp1 (izquierda) y Dyn2 (derecha) sobre liposomas artificiales. Barras de escala 100 y 50 nm. Imágenes extraídas y modificadas con Licencia de PNAS, “Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation”⁹⁰, Ya-Wen Liu y colaboradores, 2011, y con permiso de Journal of Cell Biology, “Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria”, E. Ingeman y colaboradores, 2005.

Aunque el auto-ensamblaje de ambas proteínas sobre las membranas conlleva la generación de curvatura alta ($\sim 0.1\text{nm}^{-1}$) de membrana, la Drp1 sólo lleva a cabo este proceso en presencia de GTP^{115,68}, a diferencia de las dinaminas clásicas. Las dinaminas clásicas pueden generar alta curvatura de membrana en ausencia de nucleótido¹¹⁶⁻¹¹⁸, sin embargo necesitan la hidrólisis de GTP para alcanzar el llamado estado de superconstricción ($> 0.1\text{nm}^{-1}$), necesario para producir fisión de la membrana.

En cualquier caso, el grado de curvatura que la membrana llega alcanzar bajo el andamio proteico depende de la rigidez a la flexión de la membrana, la cual, a su vez, depende de la composición lipídica^{119,120}. Se ha mostrado cómo la presencia en la membrana de los llamados lípidos de no-bicapa, como la fosfatidiletanolamina (PE), reduce sustancialmente la rigidez a la flexión¹²¹ de las membranas, lo que facilitara el trabajo mecánico de las dinaminas. Además, este tipo de lípidos generan defectos en la membrana que pueden ser aprovechados por las dinaminas para su unión¹²². Así, la cantidad de PE puede regular el grado de inserción en la membrana de alguno de los dominios hidrofóbicos de estas proteínas, lo que va a afectar al grado de curvatura que se pueda alcanzar^{121,123}.

Es importante notar que la curvatura de membranas también regula el proceso de hidrólisis por parte de la Drp1 y Dyn2. Así, una vez que estas dinaminas se ensamblan formando un polímero helicoidal alrededor de la membrana con curvatura, sus cabezas G quedan orientadas de par en par entre hélices adyacentes, proceso necesario para la unión del GTP²². Es decir, la curvatura de la membrana controla la correcta localización de las cabezas G para el inicio de la hidrólisis. Así que los lípidos vuelven a jugar un papel fundamental en este proceso.

La actividad GTPasa de Drp1 es dependiente de la concentración de CL^{76,77}, siendo un 10% mol la cantidad mínima de CL en la membrana para que haya estimulación⁷⁷. Otros lípidos con carga como el PA o el PG, que favorecen la unión de la proteína a la membrana, también favorecen la hidrólisis de GTP, aunque la correlación no es tan lineal como en el caso de la CL⁷⁷. Para la Dyn2, los lípidos que favorecen su unión también favorecerán su capacidad de hidrólisis de GTP¹¹⁴. Además, la actividad GTPasa de Dyn2

es directamente proporcional a la curvatura de membrana⁹⁰. A su vez, la Dyn2 es capaz de producir la fisión de moldes lipídicos con gran curvatura en presencia de GTP^{12,116,124-127}.

El caso de la Drp1 es distinto, ya que existe una contradicción sobre la capacidad que tiene esta proteína de producir fisión de membrana *in vitro*^{115,94}. Aunque la presencia de GTP es necesaria para producir la constricción de la membrana^{115,68}, sólo hay un trabajo que propone que esta constricción es suficiente para producir fisión⁹⁴. Curiosamente, en el trabajo que demuestra la efectividad de la Drp1 en la fisión de membranas *in vitro*, la Drp1 está etiquetada en el terminal C de la proteína. El etiquetado en el terminal C puede afectar a la funcionalidad de la proteína, como ha sido demostrado para varias proteínas con anterioridad¹²⁸. Sorprendentemente, en el mismo artículo, los autores usan otro constructo para demostrar la funcionalidad de la Drp1 *in vivo*. Por tanto, queda por determinar si el etiquetado de la Drp1 influye en su función de fisión de membranas.

1.3.3. Remodelación de la membrana durante la fisión mitocondrial

La última etapa de la división mitocondrial es la fisión de su doble membrana. Como hemos mencionado antes, uno de los hitos de la fisión de membranas celulares es que esta remodelación no puede comprometer la función de barrera de la membrana. Para ello, las membranas celulares utilizan el polimorfismo lipídico para evitar pérdidas de contenido de los compartimentos durante la remodelación topológica. En particular, los lípidos de “no bicapa”, que poseen una curvatura intrínseca, favorecen la formación de los intermedios de remodelación. En el caso de la fisión, el intermedio mejor caracterizado es el de hemifisión (HF) (Fig. 1. 10), que se ha confirmado experimentalmente en parte gracias al trabajo de investigación sobre la fisión de membrana mediado por al Dyn1 realizado con anterioridad por miembros de nuestro grupo^{126,127}. El intermedio de HF se forma cuando un cuello lipídico se constriñe hasta alcanzar un punto de desestabilización de la bicapa interna. Este punto corresponde a unos 3 nm de diámetro luminal¹²⁷. Alcanzada esta curvatura, el agua que se localiza en el interior del cuello o tubo lipídico se expele y las colas de la monocapa interna del tubo

salen hacia el exterior, provocando la autofusión de la monocapa interna. Este intermediario se conoce con el nombre del tallo de HF. La HF es un estado metaestable y se resuelve estocásticamente mediante la fisión de la membrana^{126,127} (Fig. 1. 10).

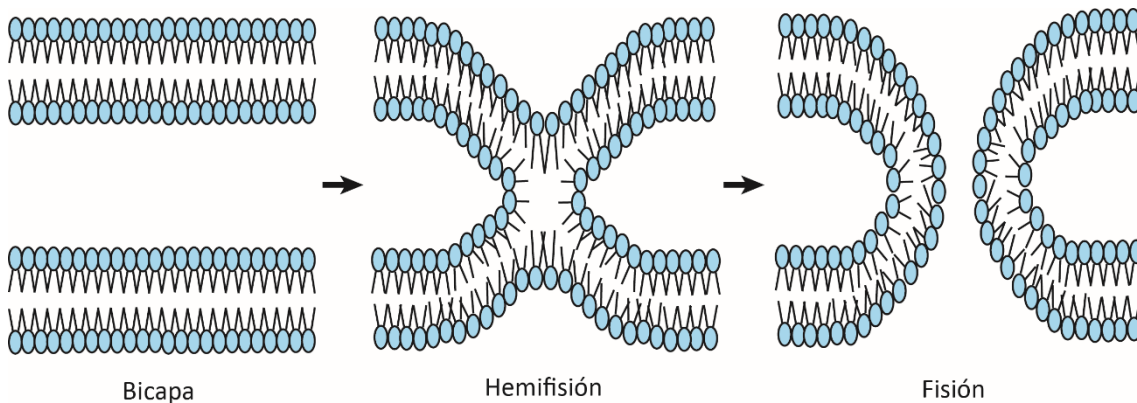


Figura 1.10. Fisión de una bicapa lipídica a través del intermediario lipídico de hemifisión.

La energía necesaria para que se forme el HF varía en función de la composición lipídica de la membrana¹²⁹. Así, la presencia de lípidos cónicos, como el PE o la CL, baja la barrera energética para la formación de este intermediario¹³⁰.

Cabe destacar que mientras que los procesos de fisión de membranas de una bicapa lipídica están bien documentados¹³⁰⁻¹³³, no es el caso de la remodelación de sistemas que contienen varias membranas, como son las mitocondrias. Es decir, la vía de remodelación que lleva al proceso de fisión mitocondrial permanece desconocida. Por otro lado, es evidente que una doble bicapa ejercerá una resistencia al doblamiento mayor que una sola membrana. Por ello, los requerimientos energéticos para producir su fisión podrían variar con respecto a los necesarios para la fisión de una sólo bicapa, dando lugar a una amplia gama de posibilidades en cuanto a sus vías de remodelación. Una posibilidad sería la fisión secuencial. La membrana interna, contenida en la membrana externa, llegaría antes al valor crítico, produciéndose la HF, y a su posterior fisión. Secuencialmente, ocurriría el mismo proceso con la membrana externa, lo que completaría la fisión de la doble bicapa (Fig. 1.11). Sin embargo, esta vía de la fisión

secuencial no es la única posibilidad, ya que los factores –lipídicos y proteicos– que intervienen en el proceso son numerosos, lo que puede dar lugar a situaciones intermedias en las que se produzca la formación de micelas¹⁶⁰, una fusión entre monocapas de bicapas diferentes, etc.

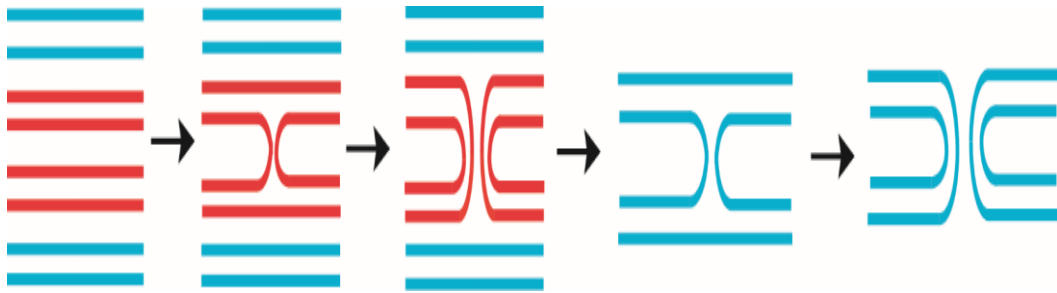


Figura 1.11. Posible vía de remodelación secuencial de una doble membrana. Azul denota la MEM, rojo denota la MIM.

La inherente complejidad de la maquinaria proteica que interviene en la fisión mitocondrial, junto con el extenso interactoma en el sitio de fisión, ha desviado las investigaciones del estudio del mecanismo(s) de remodelación de la membrana durante la fisión mitocondrial. Sin embargo, la determinación de tales mecanismos a través de una cuidadosa reconstitución funcional *in vitro* ha sido fundamental para comprender tanto la fusión como la fisión en sistemas de una sola membrana, incluidos los mediados por dinaminas²². Sin embargo, no se han realizado estudios similares para la fisión mitocondrial, principalmente debido a la falta de sistemas *in vitro* adecuados que permitan la reconstitución de la dinámica de la remodelación del cuello de doble membrana. Por ello, uno de los objetivos de esta tesis ha sido el desarrollo de un sistema *in vitro* para el estudio de la remodelación de la doble membrana durante su fisión.

1.4. Modelos lipídicos para el estudio de remodelación de membranas durante su fisión

Una característica básica que deben cumplir los modelos de membrana para poder ser usados en el estudio del proceso de fisión es la de poseer una alta curvatura similar al del cuello lipídico que se forma previo a la fisión¹³⁴. Un ejemplo de plantilla lipídica que cumpla con este requisito son las vesículas unilamelares grandes (LUVs, del inglés *Large Unilamellar Vesicles*). Sin embargo, las LUVs son sistemas de membrana cerrados cuya remodelación se ve comprometida por la restricción que impone la relación de su área con su volumen¹³⁵. Es decir, este sustrato es más difícil de remodelar que el cuello lipídico que se presenta en el contexto celular. Además, los LUVs son objetos nanométricos que se encuentran por debajo del límite de resolución de la microscopía óptica, por lo que su remodelación no puede ser caracterizada en tiempo real, teniendo que recurrir a ensayos masivos (que enmascaran eventos aislados) o ensayos de microscopía electrónica (EM) (que ofrecen imágenes estáticas representativas de puntos discretos del proceso).

Los nanotubos lipídicos (NTs) son modelos lipídicos con una curvatura que abarca desde los $1/5$ hasta $1/125$ nm^{-1} , dependiendo de la composición lipídica y método de formación¹³⁶⁻¹⁴¹. Han mostrado ser un modelo útil y versátil para el estudio de las propiedades elásticas de la membrana¹⁴⁰⁻¹⁴⁴, así como para la reconstitución *in vitro* de procesos de remodelación de membrana llevados a cabo por mecanoenzimas^{115,126,127,144-146}, debido a su similar curvatura con los cuellos lipídicos formados durante, por ejemplo, la endo y exocitosis^{147,148}. La gran ventaja que ofrecen estos modelos reside en que, a pesar de poseer curvaturas en el rango nanométrico, su longitud puede alcanzar varios micrómetros, lo cual facilita su observación y manejo en tiempo real mediante microscopía óptica.

Los NTs se generan aplicando localmente una fuerza de estiramiento sobre una membrana madre¹⁴¹(Fig. 1. 12). Este tipo de molde lipídico fue obtenido por primera vez en 1973, a partir de glóbulos rojos, lo que sirvió para determinar las propiedades elásticas de su membrana¹⁴⁹.

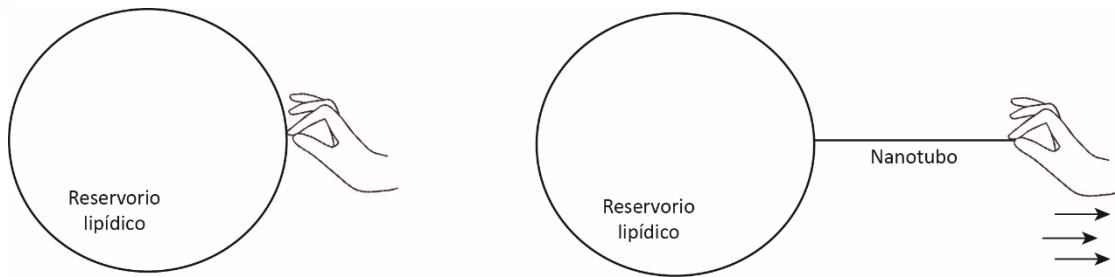


Figura 1.12. La aplicación de una fuerza de estiramiento sobre una membrana madre (reservorio lipídico) da lugar a la formación de un NT.

El radio del NT está dictado por la tensión de la membrana (σ) y del módulo de la rigidez a la flexión de esta (k), a través de la ecuación¹⁵⁰:

$$r = \sqrt{k/2\sigma} \quad \text{Eq. (1)}$$

Hay que tener en cuenta que la k está determinada por la composición lipídica^{119,120}, por lo que este factor influirá en el radio final del NT. Sin embargo, la longitud del NT no influye en su radio.

Desde que se obtuvieron por primera vez, los métodos para aplicar la fuerza local que derive en la generación de NTs han ido cambiando. En 1989, Bo y Waugh obtuvieron NTs a partir de una vesícula, la cual era mantenida por un sistema de sujeción basado en su aspiración a través de una pipeta de cristal. La fuerza local de estiramiento se aplicaba mediante la retracción de una microesfera —mediante cambios en la presión de la pipeta de aspiración— unida a la cara externa de la vesícula, lo que generaba un NT sostenido entre la vesícula y la microesfera¹⁵¹. Más tarde se introdujeron cambios en los que, aunque la fuerza local también era ejercida por una microesfera, esta era controlada por pinzas magnéticas y ópticas¹⁵² (Fig. 1.13.A). Estos métodos permiten además el control del radio del NT mediante la regulación de la presión que se ejerce en el reservorio lipídico del que se extrae el NT¹⁵³.

Otros enfoques se distancian del uso de microesferas como el elemento que ejecuta la fuerza local. Así, se han usado micropipetas de *patch clamp* dirigidas con micro-manipuladores para estirar el NT^{127,115,141,143,154} (Fig. 1.13B). La combinación de este

método de formación en un cubreobjetos con un patrón de micro-estructuras, resulta en la formación de un NT dispuesto entre dicho patrón, lo que se conoce como “técnica de pintado con micropipeta”^{138,155,156}. La resina fotoresistente basada en epoxi SU-8 se muestra como un material biocompatible idóneo para la formación del patrón de micro-estructuras sobre el que se forma el NT^{139,157}. Sin embargo, el uso de trampas ópticas o pipetas micromanipuladas para la generación de los NTs¹⁵⁸ conlleva el uso de un equipamiento caro cuyo manejo requiere de gran laboriosidad y experiencia. Además, los métodos de formación de NTs anteriormente mencionados sólo permiten la obtención de un solo NT, por lo que la obtención de una muestra estadísticamente representativa resulta una tarea tediosa.

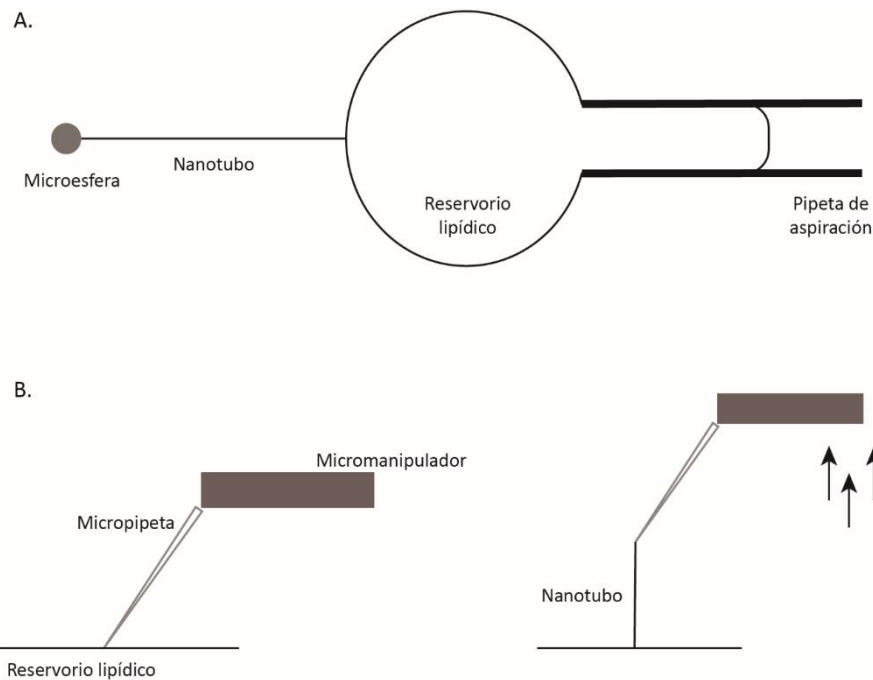


Figura 1.13. Formación de NTs a partir de un reservorio lipídico. La fuerza local de estiramiento es aplicada por una microesfera controlada por unas pinzas ópticas, sobre una vesícula atrapada gracias a una pipeta de aspiración (A), o por una micropipeta, a través de un micromanipulador (B).

Un método que ha supuesto un avance para la generación de NTs es el introducido por T. Pucadyil y colaboradores¹⁴⁶. En él, tras una pasivación con polietilenglicol (PEG) de una parte de la superficie de una cámara microfluídica FCS2® (del inglés, *Focht*

Chamber System 2), se añade una mezcla lipídica que se seca sobre el fondo de la cámara. La hidratación con una solución fisiológica lleva a la producción de vesículas, que se extruden a lo largo de la cámara microfluídica, lo que lleva a la generación de multitud de NTs de longitud variable. Los NTs se depositan y quedan adheridos en determinados puntos a la superficie, debido a pequeños defectos en la superficie con PEG^{159,160} (Fig.1. 14 y 1.15).

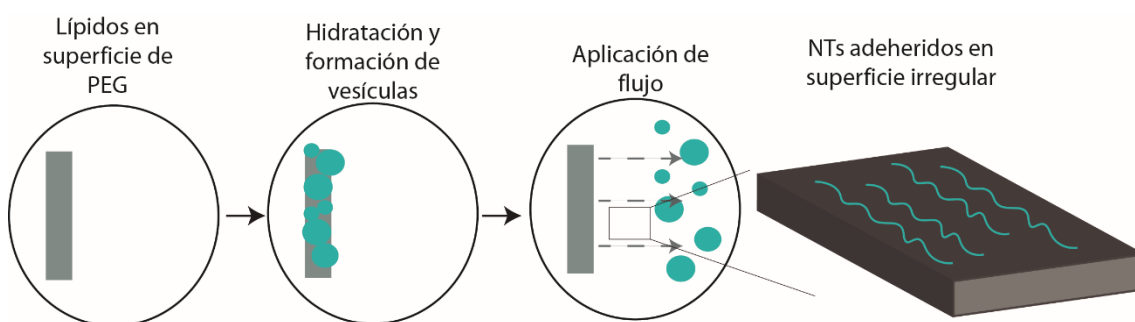


Figura 1.14. Sistema de generación de NTs usado por T. Pucadyil y colaboradores. La superficie de una celda fluídica es pasivada con PEG. Tras la adición de los lípidos, se produce la hidratación, lo que da lugar a la formación de vesículas. Estas son arrastradas a través de la celda gracias a la aplicación de un flujo de búfer, lo que da lugar a la formación de NTs. Los NTs quedan adheridos a las irregularidades de la superficie.

Los NTs generados con este método han sido usados para caracterizar la constricción y la fisión producida por las dinaminas, ya que la curvatura del molde lipídico se asemeja a la de los cuellos lipídicos donde estas se auto-ensamblan *in vivo*^{94,159-161}. Aunque la formación simultánea de multitud de NTs permite la obtención de una muestra estadísticamente significativa, aboliendo una de los problemas de los métodos usados hasta entonces, este método presenta algunas carencias. En primer lugar, la geometría (el radio y la longitud) de los NTs obtenidos por este método es incontrolable. La longitud de estos NTs puede alcanzar varias decenas de micrómetros, por lo que los objetivos de microscopía óptica de gran resolución no pueden abarcar la longitud total del molde lipídico. Por tanto, solo se obtienen imágenes de una porción de los NTs, obviando el comportamiento del total del NT. Además, la proximidad de los NTs a la superficie del cubreobjetos puede provocar interacciones inespecíficas tanto de membranas de los NTs como de las proteínas de ensayo.

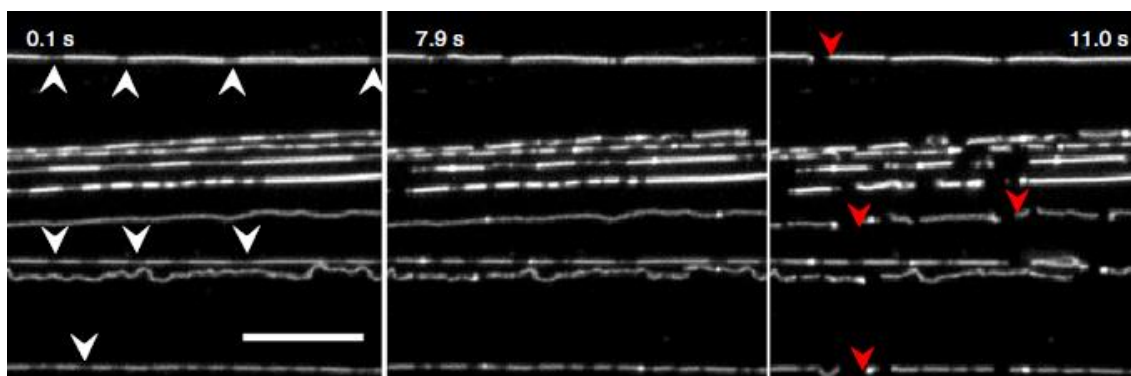


Figura 1.15. Imágenes de fluorescencia que muestran a NTs (gris) con constricciones y provocadas por dinamina en presencia de GTP. Debido a la menor concentración de fluoróforo por área debajo del andamiaje proteico, estas se observan como un descenso de la fluorescencia con respecto al resto del NT. Las flechas rojas indican las fisiones observadas tras la hidrólisis de GTP. Imagen extraída con permiso de Springer, Nature, “Use of the supported membrane tube assay system for real-time analysis of membrane fission reactions”¹⁶⁰ Srishti Dar y colaboradores, 2017, Copyright (2017).

Todos los modelos de NTs que hemos citado aquí suponen la unilamellaridad de la membrana. Hasta el momento, no se han realizado estudios de caracterización de la lamellaridad de los NTs ni se han propuesto ensayos de remodelación usando modelos de membrana multilamelares, los cuales reflejarían la realidad de un orgánulo como la mitocondria.

Aunque la observación en tiempo real aporta mucha información sobre la dinámica de la remodelación lipídica, para poder resolver los detalles moleculares del proceso se hace necesario el uso de otras metodologías diferentes a la microscopía óptica. Así, tal y como hemos mencionado antes, la microscopía electrónica (ME) permite resolver detalles finos de las estructuras de las proteínas y de los intermedios de membranas haciendo micrografías estáticas de los diferentes momentos de la reacción. Desafortunadamente, hasta la fecha, no se ha podido realizar este tipo de observaciones haciendo uso de NTs preformados sobre las rejillas de ME por falta de metodología adecuada para su obtención. En vez de ello, normalmente se recurre a dos enfoques diferentes. El primero es la tubulación de otros moldes lipídicos de tipo vesicular, como los LUVs. Como hemos mencionado, las proteínas como las dinaminas necesitan un

molde de una cierta curvatura para poder autoensamblarse. Esta curvatura no siempre se puede alcanzar con los LUVs. Además, los LUVs presentan una mayor resistencia a la remodelación que los NTs, debido a su restricción volumen-área. Así, la tubulación de LUVs puede ser un efecto de "crowding" protéico que puede no estar directamente relacionado con la acción de la proteína *in vivo*.

Otro enfoque ha sido el uso de NTs rígidos obtenidos con la ayuda de galactocerebrósido (GC), que se auto-ensamblan en una estructura tubular rígida¹⁶². Estos moldes se han usado para estudiar los mecanismos de ensamblaje de algunas proteínas, como la Drp1^{94,115,136}. Sin embargo, el hecho de que su formación está condicionada al uso de una gran cantidad de GC (>40 %mol, aunque para su formación se han usado usualmente composiciones con más del 80% mol de este lípido) hace imposible usar composiciones más fisiológicas, distando bastante de la composición real de una membrana lipídica. Además, los GC inducen la formación de NTs con un radio definido y fijo, el cual no puede ser deformado debido a la rigidez de su estructura. Esto hace que no sean aptos para el estudio de los procesos de remodelación de membrana. La lamelalidad de estos NTs también está definida, siendo unilamelares, por lo que tampoco se permite el estudio de estructuras con más bicapas lipídicas.

Como hemos visto, ambos métodos de observación de la actividad de las proteínas remodeladoras mediante ME presentan bastantes carencias. Por tanto, *se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos de formación de NTs para su observación por EM.*

1.5. Hipótesis y objetivos

Atendiendo a las cuestiones que hemos planteado en las secciones anteriores, las hipótesis que planteamos para el presente proyecto de tesis doctoral fueron:

1. Tanto la geometría como la topología inicial de la membrana puede afectar el proceso de remodelación de las membranas mitocondrial durante su fisión.
2. La Drp1 no forma un aparato de fisión de membrana autosuficiente para producir la fisión mitocondrial.
3. Dyn2 y Drp1 juntas constituyen una maquinaria mínima de fisión mitocondrial.

Teniendo en cuenta estas hipótesis, los objetivos específicos propuestos para este proyecto de tesis doctoral han sido:

1. Desarrollar métodos de formación de modelos lipídicos de doble membrana que reflejen la geometría y la topología mitocondrial antes de su fisión y que permitan el estudio de su remodelación por microscopía óptica y electrónica.
2. Haciendo uso de los modelos lipídicos generados (1), estudiar su remodelación mediada por la Drp1 y Dyn2.
3. Estudiar la cooperación entre la Drp1 y la Dyn2 durante la fisión de membrana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.GENERACIÓN DE MODELOS IN VITRO PARA LA RECONSTITUCIÓN DE PROCESOS DE REMODELACIÓN LIPÍDICA

2.1. Diseño de un sistema microfluídico para la generación de NTs y su observación por microscopía de fluorescencia de gran resolución

El primer objetivo propuesto para este trabajo de tesis fue el desarrollo de un nuevo método para la obtención de modelos lipídicos que permitan el estudio de la remodelación de la membrana doble durante su fisión. Para ello nos basamos en los NTs, que como hemos visto son uno de los mejores modelos para estudiar procesos de fisión de membrana. Nos propusimos diseñar un sistema versátil que permitiese la obtención masiva de NTs y de NTs con dos o más membranas concéntricas de forma sencilla, y a la vez, controlando su geometría (longitud y radio).

Para poder estudiar la remodelación de los NTs en tiempo real es necesario el uso de objetivos de gran poder de resolución de un microscopio óptico invertido. Estos objetivos se caracterizan por tener una distancia de trabajo muy limitada. Por ello, los NTs tenían que localizarse al ras de la superficie de un cubreobjetos de cuarzo fino (0.13-0.16 mm de espesor), pero sin llegar a estar en contacto con el cristal. Es decir, contamos con unos pocos micrómetros de margen para formar los NTs. Para solventar este obstáculo, recurrimos a la fotolitografía, que permite la formación de patrones de polímeros directamente sobre la superficie del cubreobjetos utilizando la luz UV y una máscara patrón (ver Materiales y Métodos). En nuestro caso, nos decantamos por la fabricación de micropilares cilíndricos de polímero SU-8 con 15 μm de diámetro y 5 μm de altura. La biocompatibilidad del SU-8 con las membranas biológicas hace de este material un soporte perfecto para el reservorio lipídico necesario para la formación de los NTs^{157,163,164}. Además, este polímero permite la obtención de estructuras bidimensionales directamente sobre el cubreobjetos mediante su polimerización por luz

ultravioleta¹⁶⁵. El diseño y la producción de los micropilares se llevó a cabo en el clúster de Microfluídica del campus de Vitoria (UPV/EHU), en colaboración con el grupo de la Dra. Lourdes Basabe. La correcta geometría de las microestructuras obtenidas sobre el cristal del cubreobjetos fue confirmada por microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) y perfilometría óptica (Fig. 2.1B).

Para minimizar los volúmenes de líquidos que son empleados en el sistema, así como para tener un control fino sobre el flujo de los líquidos durante perfusiones, completamos nuestro sistema con un canal microfluídico fabricado con el polímero PDMS (ver Materiales y Métodos). Este canal se posiciona encima del patrón de micropilares sobre el cubreobjetos (Fig. 2.1). El PDMS forma un sello hermético con el cristal del cubreobjetos, asegurando una completa separación de cada patrón de SU-8. En su configuración final, el sistema consiste en 3 canales de PDMS alineados con los 3 patrones de micropilares de SU-8, tal y como se puede observar en la Figura 2.1C.

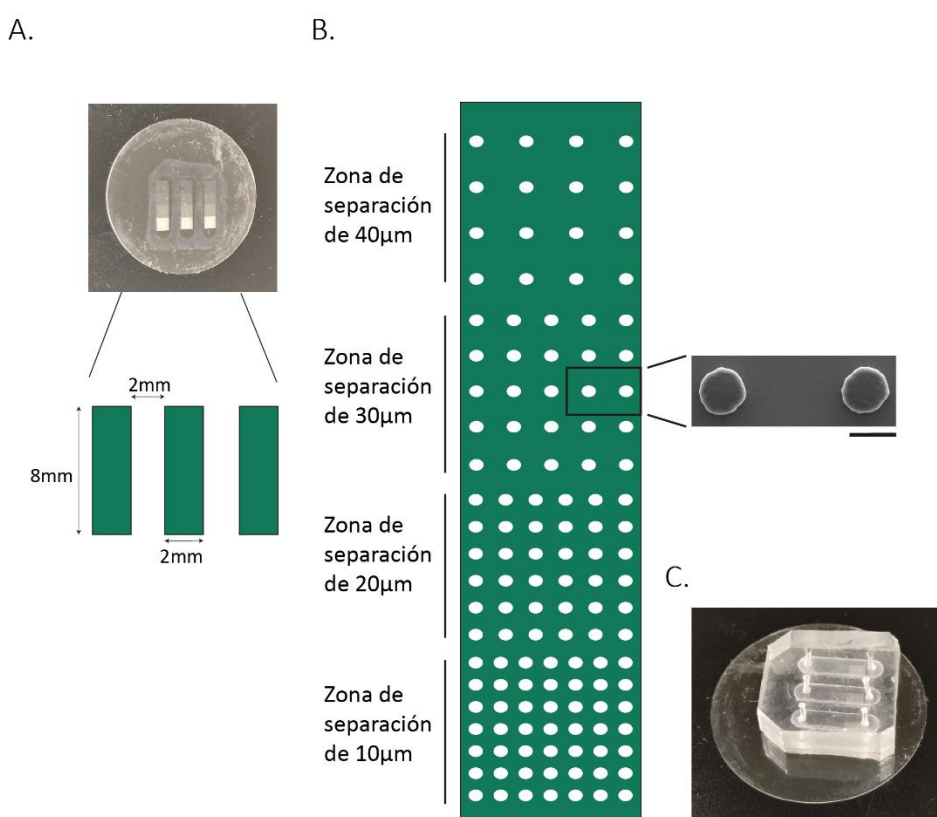


Figura 2.1. Representación esquemática del sistema microfluídico diseñado. **A.** La fotografía muestra un cubreobjetos redondo de 25 mm de diámetro con los tres patrones de micropilares de SU-8. Las dimensiones de los patrones se indican en el esquema inferior. **B.** Disposición de los micropilares dentro de un patrón. A la derecha se muestra una imagen de SEM de dos micropilares en una región correspondiente a 30 µm de separación. Barra de escala 15 µm. **C.**

Montaje final del dispositivo, con los canales microfluídicos de PDMS formando un sello hermético con la superficie del cubreobjetos.

Para producir los NTs sobre los pilares de SU-8 recurrimos a un sistema previamente desarrollado en el laboratorio: las bicapas suspendidas gigantes (GSBs, del inglés *Giant Suspended Bilayers*)¹⁶⁶. Las GSBs son membranas lipídicas soportadas sobre microesferas de sílice que se han usado como modelo para reconstituir procesos de remodelación lipídica^{126,127,145,166}. Por lo general, el protocolo de formación de las GSBs resulta en la hidratación de muchas bicapas lipídicas sobre la superficie de las microesferas. Es decir, se trata de unas microesferas con un gran reservorio lipídico que se puede manipular fácilmente gracias a su dimensión micrométrica. Aprovechando esta característica, las GSBs fueron introducidas al sistema microfluídico, previamente perfusionado con la solución de trabajo, a través del orificio de entrada del canal de PDMS (ver Materiales y Métodos). Al aplicar una presión negativa en el puerto de salida del canal con una bomba de jeringa, las microesferas se arrastraron por el canal microfluídico guiadas por el flujo laminar generado. Al moverse por el canal, las microesferas fueron rozando las puntas de los pilares de SU-8, depositando sobre ellos pequeños reservorios lipídicos unidos entre sí por NTs suspendidos entre los pilares (Fig. 2.2). Además, el flujo laminar unidireccional aseguraba la formación de NTs alineados de forma paralela entre sí (Fig. 2.2B, izquierda).

La distancia entre micropilares contiguos influye en la velocidad de las microesferas, siendo esta mayor cuando hay más separación entre micropilares, debido a una menor resistencia al rodamiento. Así, en la región donde los pilares estaban a una distancia de 40 μm , las microesferas se desplazaban a 21 ± 10 y $397 \pm 81 \mu\text{m s}^{-1}$ cuando las velocidades de flujo aplicadas con la bomba de jeringa eran de 20 y 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ respectivamente. Velocidades aplicadas por debajo de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ no fueron suficientes para inducir el movimiento de las microesferas sobre los micropilares, por lo que fijamos esta velocidad como el límite mínimo para la generación de NTs mediante flujo laminar. Este parámetro cambiará dependiendo del tamaño de las esferas y de su densidad, por lo que dicha velocidad debe ser establecida experimentalmente si se usa un material diferente como soporte del reservorio lipídico.

Aunque la generación de NTs mediante flujo laminar presenta ventajas como la alineación paralela de los NTs en el canal microfluídico, decidimos buscar métodos alternativos al uso de la bomba de jeringa. Así, observamos que el volcado manual del sistema microfluídico, provoca movimientos aleatorios de las microesferas sobre los micropilares, lo que genera una red de NTs multidireccional (Fig. 2.2B, derecha). Este método sería muy sencillo de implementar en cualquier laboratorio que no disponga de equipamiento especializado para microfluídica. De hecho, se podría emplear para formar NTs incluso en ausencia de micropilares y canal de PDMS, por lo que su mayor ventaja es su versatilidad.

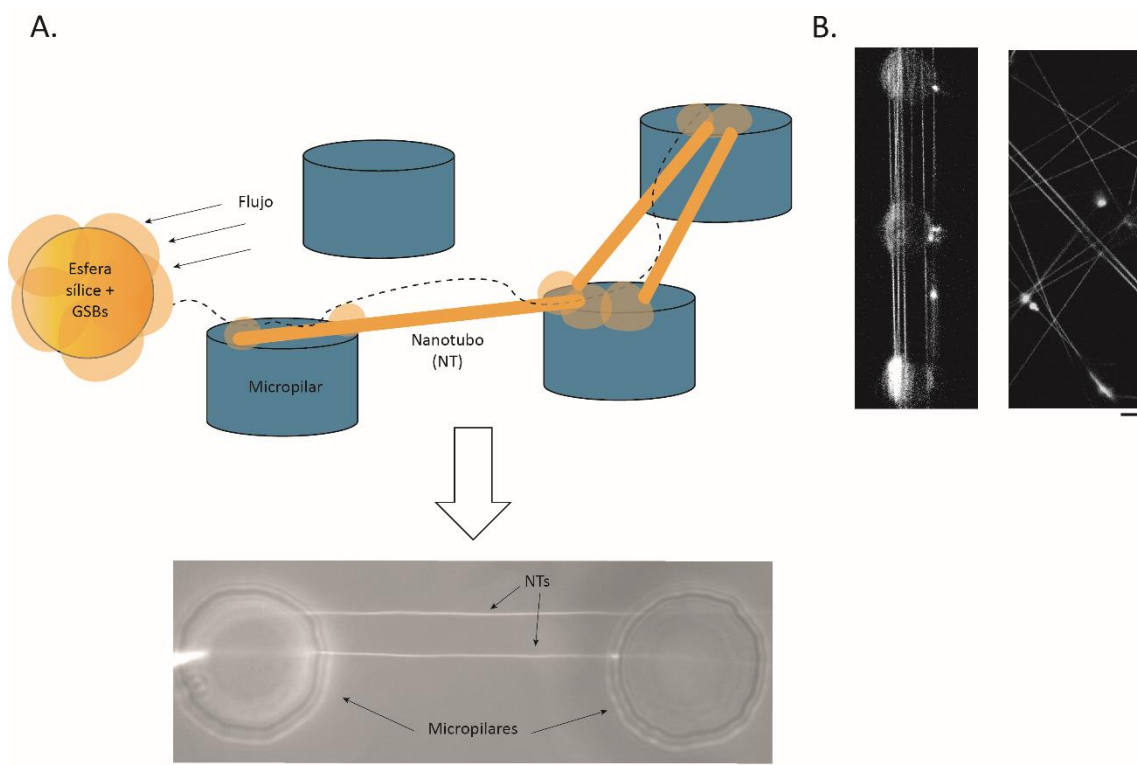


Figura 2.2 Generación de NTs en el sistema microfluídico. **A.** Arriba: Representación esquemática de la generación de NTs sobre los micropilares. Las microesferas de sílice con las GSBs se desplazan por el canal microfluídico debido al flujo laminar generado con una bomba de jeringa. Debajo: Imagen de campo claro y de fluorescencia mostrando dos NTs sostenidos entre los micropilares de SU-8. **B.** Comparación de los dos métodos usados para la formación de NTs. A la izquierda se muestra una imagen de microscopía de fluorescencia en la que se observan NTs generados gracias al flujo laminar. A la derecha, el movimiento aleatorio de las microesferas, causado por la inclinación manual del sistema, genera una red de NTs dispuestos aleatoriamente sobre los micropilares. Barra de escala 4 μm .

2.2. Análisis de la geometría de los NTs producidos en el sistema microfluídico

La geometría de un NT cilíndrico unilamelar viene definida por su longitud y su radio. La longitud puede ser controlada en nuestro sistema por la distancia entre los pilares adyacentes, ya que la mayoría de los NTs se forman entre ellos, como se muestra en la Fig. 2B. En cuanto al radio (r_{NT}), este se define por los parámetros elásticos de la membrana del NT, como se ha descrito en la Ec.1 (Capítulo 1). De esta ecuación se deduce que uno de los aspectos a tener en cuenta en los NTs generados en nuestro sistema es el reservorio lipídico, el cual va a definir la tensión del NT. La disponibilidad del reservorio depende de la adhesión de la membrana a los micropilares. Sin embargo, en trabajos anteriores se observó que las membranas lipídicas no se adhieren a las microestructuras de SU-8¹³⁹. Para resolver esta posible contradicción, procedimos a comprobar el nivel de adhesión de los aparentes reservorios lipídicos a los micropilares de SU-8. Para ello, formamos los NTs y perfusionamos el sistema con Dinamina 1 (Dyn1), una de las dinaminas clásicas mejor estudiadas hasta el momento que usa la energía de la hidrólisis del GTP para producir la fisión de las membranas durante la endocitosis sináptica¹⁵. *In vitro*, la Dyn 1 se auto-ensambla sobre los NTs formando un andamiaje para más tarde producir la fisión de estos en presencia de GTP. Así, se añadió una solución con Dyn1 0.5 μ M al canal microfluídico en el que había 1 mM de GTP en buffer de trabajo. Tras una casi instantánea fisión de los NTs, se detectó una rápida retracción de los dos extremos del NT hacia los pilares (Fig. 2.3). Esta retracción indica que en los micropilares hay un reservorio de membrana conectado con el NT, determinante en la tensión lateral y radio del NT (Ec. 1).

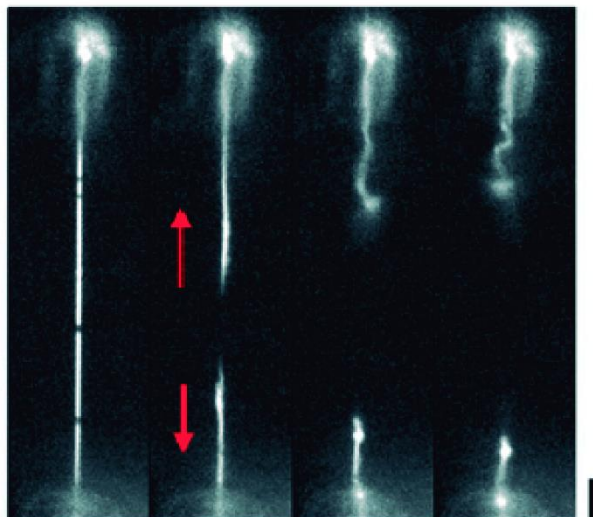


Figura 2.3. Caracterización y control del reservorio de la membrana en los micropilares. La adición a los NTs de 0.5 μM de Dyn1 en presencia de 1 mM de GTP resulta en la fisión y posterior retracción de la membrana (flechas rojas) hacia el reservorio lipídico en los micropilares adyacentes. La composición de la membrana de los NTs es DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4, 5) P_2 :RhPE 46:30:10:10:3:1 % mol. Barra de escala 4 μM . Imagen extraída de ref.¹³⁴ con permiso de la *Royal Society of Chemistry*.

El límite de la resolución de la microscopía óptica se sitúa por encima de los 200 nm debido al criterio de Rayleigh. Por ello, el radio de un NT difícilmente se puede medir de forma directa empleando un fluoróforo como marcador de membrana. Sin embargo, si suponemos que el NT mantiene su forma cilíndrica a lo largo del eje longitudinal, podemos estimar su radio a partir de la intensidad de fluorescencia del perfil transversal del NT, basándonos en una calibración previa que relacione el área de la membrana (A) con su fluorescencia integral (I). Esta calibración se puede hacer empleando una membrana soportada formada sobre un cubreobjetos (Fig. 2.4) (ver Materiales y Métodos).

Tomando una región de interés (RDI) de longitud L alineada longitudinalmente con el eje del NT, el radio del NT (r_{NT}) se puede estimar usando del área de un cilindro hueco como:

$$A = 2 \pi r_{NT} L \quad (\text{Ec. 2})$$

Al mismo tiempo, la fluorescencia integral correspondiente al área de la membrana del es:

$$I = KA \quad (\text{Ec. 3})$$

, donde I es la fluorescencia integral del RDI tras la sustracción de señal de fondo, A es el área de la membrana del NT y K es el coeficiente de calibración obtenido según se explica en la Figura 2.4.

Por tanto,

$$r_{NT} = I/K2\pi L \quad (\text{Ec. 4})$$

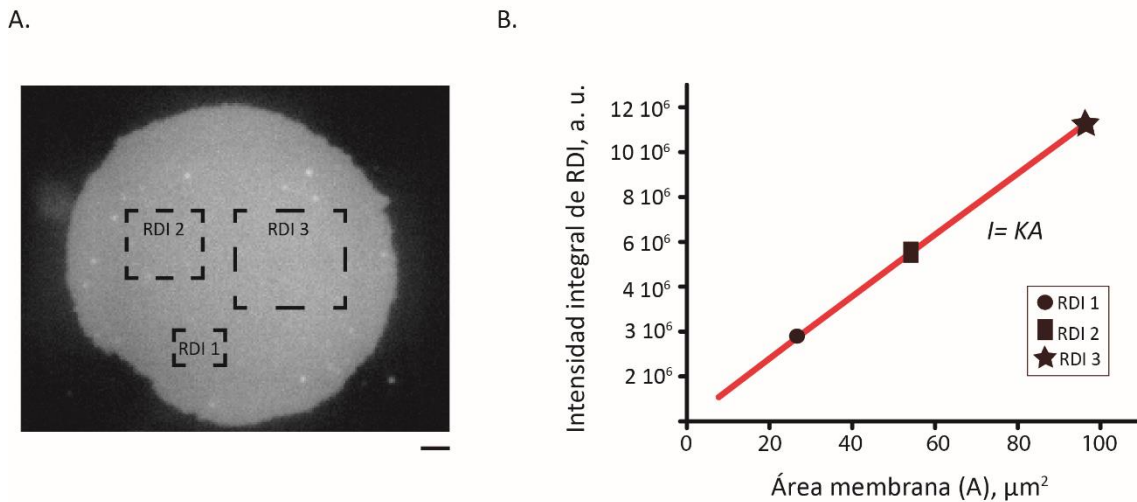


Figura 2.4. Método para obtener la constante de calibración (K) que relaciona el área de la membrana (A) con la intensidad integral de fluorescencia de la membrana (I). **A.** Imagen de fluorescencia que muestra un parche lipídico formado sobre la superficie de un cubreobjetos (Materiales y Métodos). Escala 2 μm . **B.** Gráfica donde se representa la intensidad de fluorescencia integral en función del área de RDIs representadas en A. La pendiente de la recta corresponde al coeficiente K .

Teniendo en cuenta que la rigidez a la flexión de membranas de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) a 23°C es de $10.8 \pm 1.0 \cdot 10^{-20} \text{ J}^{167}$, y que el radio de este tipo de NTs en nuestro sistema es de $14 \pm 6 \text{ nm}$ ($n = 57$), a través de la Ec. 1 se llega a

que la tensión lateral que actúa en los NTs formados en los micropilares de SU-8 es de $0.3 \pm 0.2 \text{ mN m}^{-2}$. La fuerza de tracción (F) que actúa a lo largo del eje longitudinal del NT y que conduce a la retracción de este hacia el reservorio en los micropilares puede ser calculada como:

$$F = \sigma 2\pi r_{NT} \quad (\text{Ec. 5})$$

Siguiendo la Ec. 5 calculamos una fuerza de tracción de $24 \pm 10 \text{ pN}$ en los NTs obtenidos en nuestro sistema (Fig. 2.5A). Así, podemos concluir que los NTs que generamos en nuestro sistema microfluídico tienen un rango de tensiones fisiológicas, similares a los $18.6 \pm 2.8 \text{ pN}$ que se han medido en la red tubular que forma el RE¹⁶⁸.

Además, pensamos que existiría una relación entre la cantidad de lípido usado y la tensión de los NTs. Para comprobar esta hipótesis, generamos NTs con doble cantidad de lípido sobre las esferas de sílice. Como esperábamos, la tensión de estos NTs disminuyó, lo que resultó en un incremento de su radio desde los $14 \pm 6 \text{ nm}$ ($n = 57$) a los $33 \pm 16 \text{ nm}$ ($n = 63$) (Fig. 2.5B).

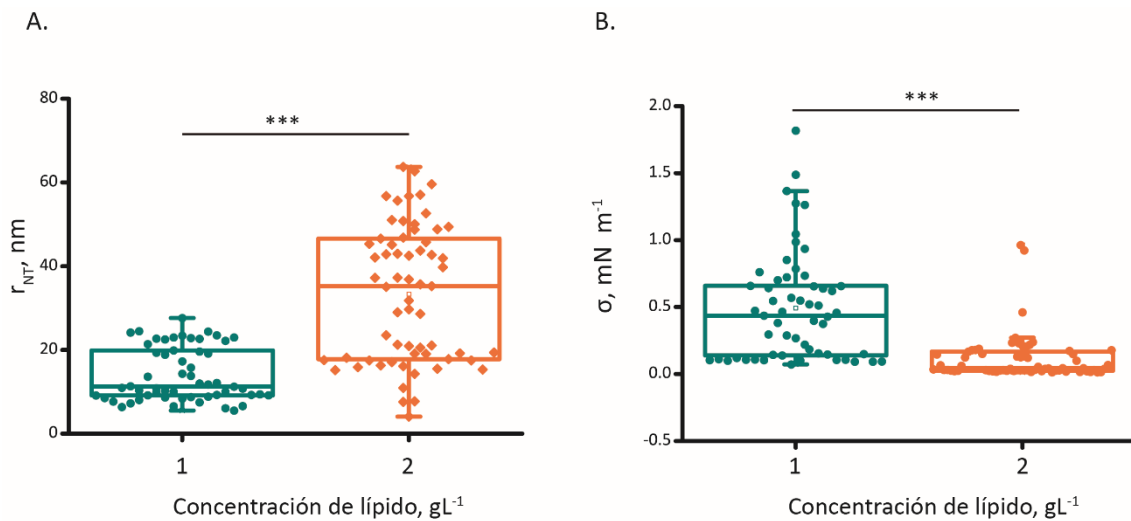


Figura 2.5. A. Cambios de σ (A) y r_{NT} (B) obtenidos en los NTs en función de la concentración inicial de lípidos depositados en las microesferas de sílice. La composición de la membrana de los NTs es DOPC:RhPE 99:1 % mol. Los valores del radio se incrementan de $14 \pm 6 \text{ nm}$ ($n = 57$) a $33 \pm 16 \text{ nm}$ ($n = 63$) al duplicar la cantidad de lípido inicialmente depositada en las esferas, mientras que la tensión lateral disminuye de 0.5 ± 0.4 a $0.10 \pm 0.1 \text{ nM m}^{-1}$ para 1 y 2 gL^{-1} ,

respectivamente. Las barras de errores son DE. ***Estadísticamente diferentes para un nivel de significancia de 0.001 (t-test desemparejado, igualdad de varianzas no asumida).

Estos datos sugieren que podemos manipular la geometría de los NTs en nuestro sistema. Por un lado, variando la cantidad de lípido depositado sobre los micropilares de SU-8 podemos cambiar la tensión lateral de la membrana, lo que resulta en el cambio del radio del NT. Por otro lado, variando la distancia a la que están situados los micropilares dentro del patrón se controla la longitud de los NTs. Además, el hecho de que los NTs formados tengan un rango de tensiones fisiológicas hace que sean idóneos para reconstituir procesos de remodelación de membranas celulares. Ventajas adicionales del nuestro sistema son la minimización del uso de reactivos o proteínas, gracias a que la capacidad de los canales no sobrepasa los 7 μL . Asimismo, los NTs se puedan generar de forma masiva, lo que facilita obtener una muestra significativa sin grandes esfuerzos. Cabe destacar que los NTs generados en este sistema están suspendidos entre micropilares, evitando el contacto físico con el cubreobjetos. Este hecho es importante a la hora de realizar ensayos con proteínas que interactúan con las membranas, ya que se evitan interacciones inespecíficas que puedan existir entre las propias proteínas y la superficie del cubreobjetos.

2.3. Análisis de la topología de los NTs producidos en el sistema microfluídico

Teniendo en cuenta que un NT con doble bicapa lipídica (dNT) tendrá más cantidad de fluoróforo por área que un NT con una sola bicapa, basta con analizar sus perfiles de fluorescencia transversales para establecer la topología de los NTs.

A la hora de hacer la comparación entre las intensidades de fluorescencia de los NTs, se pueden tomar dos medidas. Una es el valor del máximo de intensidad de fluorescencia del perfil y otro es el valor de fluorescencia integral correspondiente al área bajo la curva del pico de fluorescencia. La Figura 2.6 muestra como la fluorescencia integral es menos sensible a posibles variaciones en el plano focal durante la toma de

las imágenes, mientras que el valor máximo del pico de fluorescencia varía de forma considerable. Por ello, usamos el área bajo la curva del perfil transversal de fluorescencia de los NTs para analizar su lamelaridad.

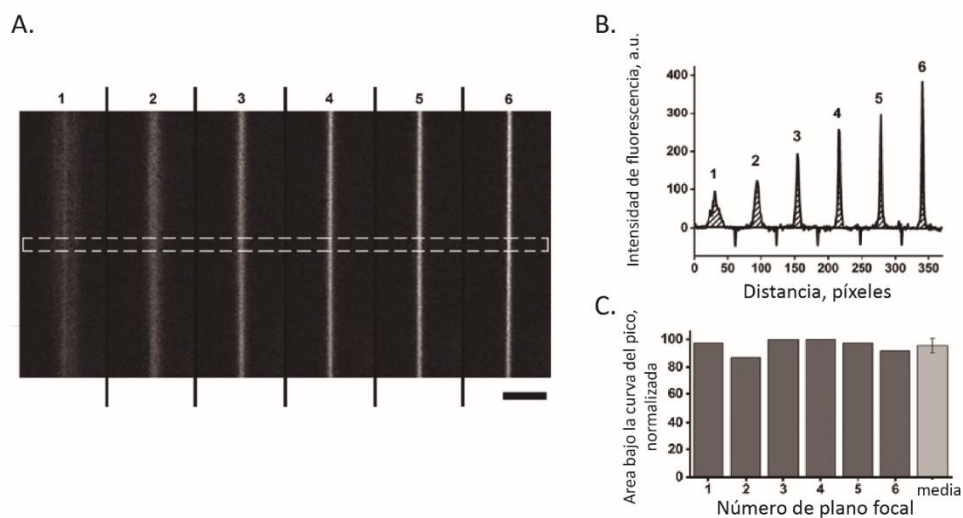


Figura 2.6. Influencia de las variaciones en el plano focal de la imagen en la señal de fluorescencia. **A.** Imágenes de fluorescencia que muestran distintos planos focales de un mismo NT. **B.** Gráfica que muestra la variación de los máximos de los picos de fluorescencia de los perfiles correspondientes a la RDIs señaladas en (A). **C.** Gráfica que muestra la fluorescencia total, correspondiente al área bajo la curva del pico de fluorescencia en (B). La última columna muestra la variación entre los valores de fluorescencia. Imagen extraída de ref.¹³⁴ con permiso de la *Royal Society of Chemistry*.

Para los NTs obtenidos con una velocidad de flujo laminar baja ($20 \mu\text{L min}^{-1}$), el análisis de la fluorescencia integrada de los perfiles transversales muestra dos poblaciones diferenciables, presumiblemente correspondientes a NTs de una y de dos bicapas lipídicas (dNTs, Fig. 2.7A). Para comprobar la naturaleza unilamelar de los NTs de la primera población, los canales del sistema microfluídico se perfusionaron con una solución que contenía 5 mM de ditionita de sodio, un desactivador de la fluorescencia que actúa bloqueando la emisión del fluoróforo con el que esté en contacto, en este caso la RhPE¹⁶⁹. Como se observa en la Figura 2.7B, tras la adición de la ditionita a los NTs de la primera población, su intensidad de fluorescencia cayó en un 50%. Esto confirma la estructura unilamelar de este tipo de NTs, debido a que la ditionita sólo entra en contacto con la monocapa externa del NTs¹⁶⁹.

Para una velocidad de flujo laminar más rápida ($100 \mu\text{L min}^{-1}$), así como para los NTs obtenidos por el volcado del sistema, las distribuciones de las intensidades de fluorescencia fueron más amplias. En este tipo de experimentos se detectaron al menos tres poblaciones de NTs, la última correspondiendo presuntamente a NTs con tres o más bicapas lipídicas (Fig. 2.7A). Esta diferencia se puede deber al rápido desplazamiento de las esferas de sílice. Este desplazamiento genera una fuerza significativa en la superficie de la esfera, lo que provoca un mayor desprendimiento de lamelas lipídicas. En el caso de la aplicación de flujo laminar a altas velocidades, un efecto adicional observado en el sistema fue el de la ruptura de los NTs debido a la reducción de su radio. La ruptura se pudo constatar mediante la observación de numerosas estructuras tubulares flotando en el sistema (datos no mostrados). Todo ello hace que la distribución de las intensidades de fluorescencia se desplace claramente hacia la izquierda, dando lugar a una distribución más amplia de la población (Fig. 2.7A).

Debido a factores intrínsecos al método, la ruptura de NTs formados por volcado del sistema no se pudo monitorizar. Sin embargo, haciendo uso de una cámara de video externa, se midió la velocidad a la que circulan las esferas durante el volcado, estableciéndose en $667 \pm 83 \mu\text{m min}^{-1}$ ($n=3$), una velocidad incluso más alta que la medida con el flujo laminar más alto (alto ($397 \pm 81 \mu\text{m s}^{-1}$). Por ello la ruptura de algunos NTs con este método de formación es esperable. Debido a que el protocolo de formación de NTs con la velocidad de flujo más bajo da lugar a poblaciones de NTs más definidas, este fue seleccionado para analizar la geometría de los NTs. Sin embargo, la generación de NTs haciendo uso de los otros dos métodos (formación por flujo rápido e inclinación del sistema) pueden ser de interés para reconstituir procesos de remodelación de membrana. Cabe destacar que el método de formación de NTs por inclinación del sistema no requiere de ninguna bomba o jeringa, dando lugar a resultados similares donde se pueden obtener numerosos NTs y dNTs limitados longitudinalmente. Esto podría ser una ventaja para laboratorios que no cuenten con equipamiento microfluídico.

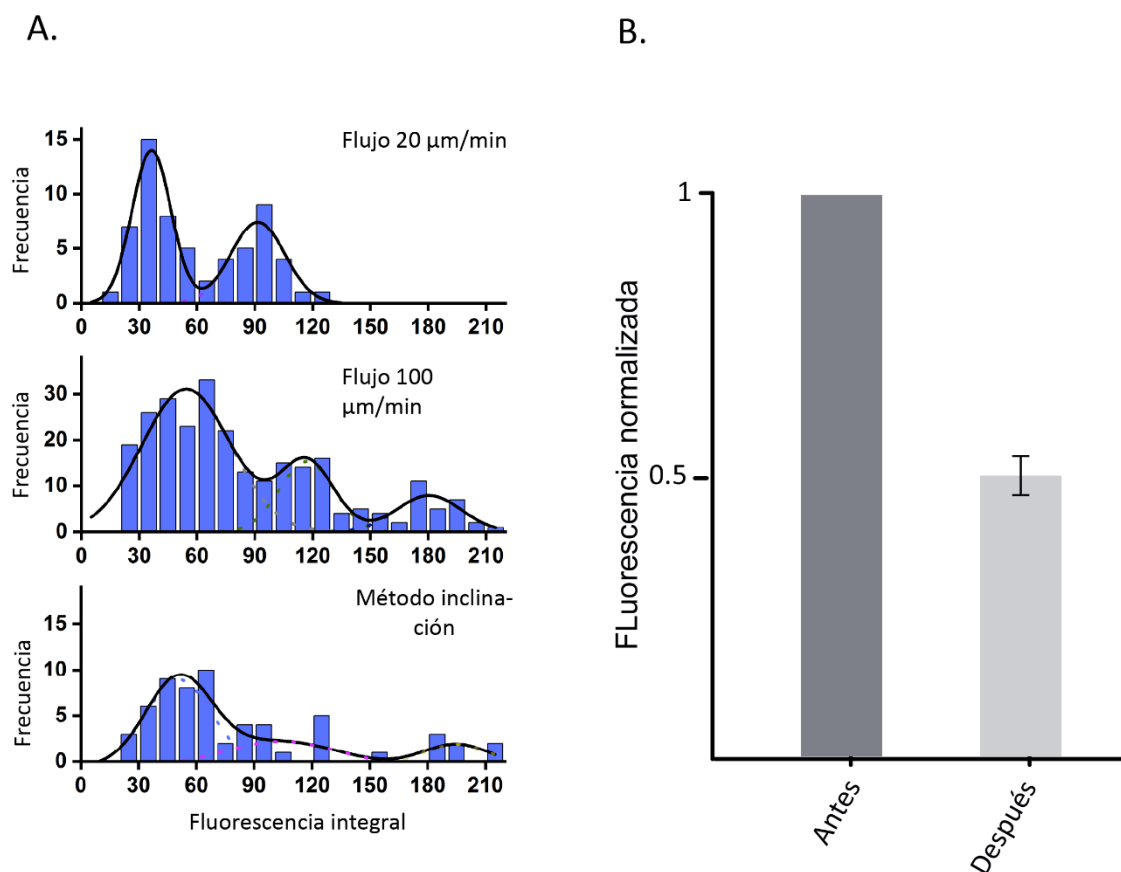


Figura 2.7. Lamellaridad de los NTs en los diferentes regímenes de producción. **A.** Las gráficas muestran las poblaciones de NTs según la intensidad total de fluorescencia de los perfiles transversales para un flujo aplicado con la bomba de jeringa de $20 \mu\text{L min}^{-1}$, $100 \mu\text{L min}^{-1}$ o por por el volcado del sistema (de arriba abajo, respectivamente). **B.** Gráfica que muestra que la fluorescencia de los NTs identificados como unilamelares en (A) cae a la mitad tras la adición de ditionita de sodio (5 de 5 NTs). Imagen adaptada de Ref.¹³⁴ con permiso de la *Royal Society of Chemistry*.

Si suponemos que los NTs que hemos generado en el sistema microfluídico de micropilares se forman a partir de reservorios lipídicos con la misma tensión lateral, las dos bicapas que componen un dNT tenderán a tener la misma curvatura que la membrana de un NT unilamelar. No obstante, esta curvatura no podrá alcanzarse en ninguna de las dos bicapas debido a la repulsión de hidratación, así como a la repulsión electrostática por la existencia de lípidos cargados. La repulsión de hidratación se debe a las moléculas de agua que solvatan a las cabezas hidrófilas de los lípidos de la membrana. Esta repulsión tiene un rango de $0.9 \pm 0.5 \text{ \AA}^{170}$. La repulsión electrostática, por otro lado, viene determinada por la distancia de apantallamiento de Debye, que

depende de las condiciones salinas. En condiciones salinas fisiológicas, como en las que se han llevado a cabo los experimentos de esta tesis, la distancia de Debye se sitúa en torno a 1 nm^{171,172}. Así, para un dNT la repulsión electrostática entre sus membranas con lípidos aniónicos y condiciones salinas utilizadas estaría presente en torno a los 2 nm de separación intermembrana (Fig. 2.8).

Por tanto, las fuerzas de repulsión situarían a la membrana interna a una curvatura mayor que la óptima, mientras que la membrana externa tendría una curvatura menor, ya que su expansión sería menos costosa energéticamente que la constricción aún mayor de la membrana interna, que tendrá una mayor rigidez al doblamiento al estar bajo un mayor estrés de flexión.

Para facilitar los cálculos de los valores de los radios de las membranas del dNT, vamos a definir el término distancia intermembrana (DI) como la distancia entre los planos medios de las dos membranas del dNT. Si tomamos 2 nm como el espesor de una monocapa de la membrana y 2 nm de separación intermembrana, el valor de DI correspondiente será de 6 nm (Fig. 2.8).

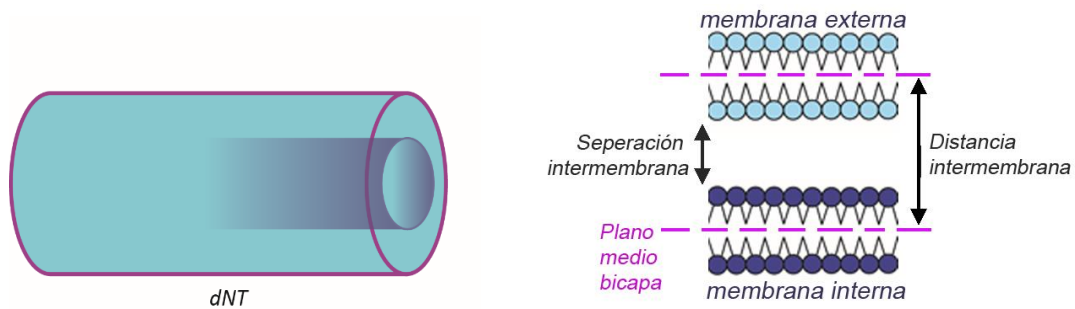


Figura 2.8. Representación de las dos bicapas de una doble membrana lipídica, indicando la separación intermembrana debida a la repulsión electrostática y la DI desde los planos medios de ambas bicapas.

Este valor de DI ha sido deducido basándonos en datos previos existentes en la literatura. Sin embargo, hemos querido asegurarnos experimentalmente de que este valor se corresponde con el valor de la DI en nuestros dNTs.

2.4. Caracterización de la distancia intermembrana de los dNTs mediante crioEM

La DI no puede ser establecida mediante microscopía óptica debido al límite de resolución óptica. Por ello, decidimos desarrollar un método para visualizar NTs y dNTs por crioEM, lo que nos permitiría conocer la DI de nuestros tubos con exactitud. Ya que habíamos conseguido obtener NTs lipídicos sostenidos entre micropilares de SU-8, decidimos adaptar el método para conseguir congelar los tubos sobre una rejilla de microscopía electrónica y poder observarlos por EM. Para ello, usamos unas rejillas de crioEM cubiertas con una capa atómica de carbono perforado (*holey grids*, ver Materiales y Métodos). Para la formación de los NTs, hicimos rodar las microesferas cubiertas de lamelas lipídicas sobre la rejilla, previamente cubierta por una gota de la solución salina de trabajo (ver Materiales y Métodos). El reservorio lipídico en este caso se formaba en los bordes de los agujeros de la capa de carbono que cubre la rejilla. Finalmente, el contacto de la rejilla con una gota de la misma solución salina, facilitó la expulsión de las microesferas de sílice, de manera que sobre la rejilla sólo quedaba el material lipídico. En este punto se procedió a la congelación de las muestras en etano líquido y su posterior observación con un microscopio electrónico (ver Materiales y Métodos).

Como se puede observar en la Figura 2.9A y 2.9B, este método nos permitió la obtención de NTs y de dNTs preformados, con un diámetro externo de 23 nm (DE= 5 nm, n=13) y 47 nm (DE=11 nm, n=6), respectivamente. Además, se pudo observar que en los dNTs las dos membranas se encuentran muy juntas, con una separación de tan sólo 2 ± 1 nm (Fig. 2.9C), confirmando así el valor que obtuvimos previamente a partir de datos de la bibliografía. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se han fabricado NTs y dNTs lipídicos preformados directamente sobre las rejillas de EM.

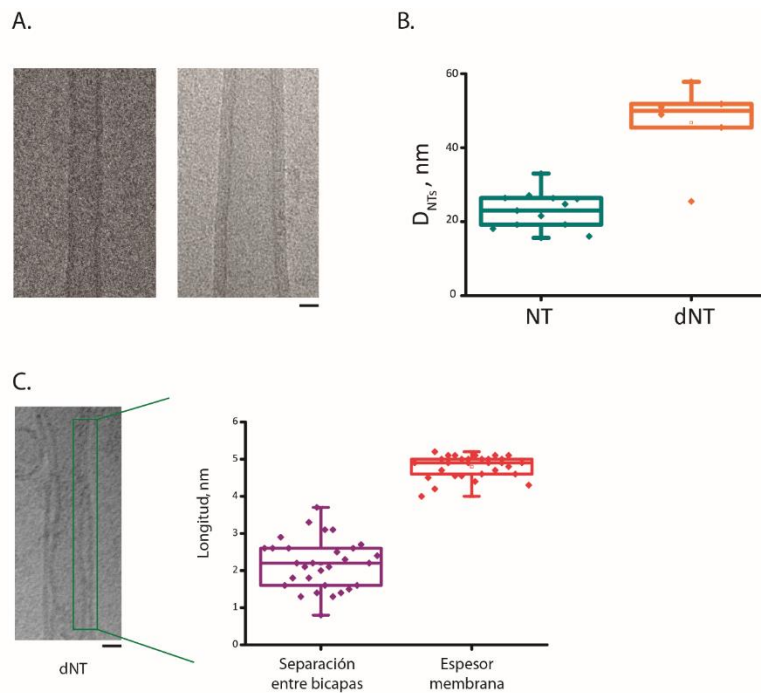


Figura 2.9. Generación de NTs para su visualización mediante CrioEM. **A.** Imágenes de Cryo-EM que muestran un NT de una bicapa (izquierda) y a un dNT (derecha). Barra de escala 15 μm . **B.** Diagrama que representa el diámetro de los NTs obtenidos, siendo este de 23 nm (DE= 5 nm, n=13) y 47 nm (DE=11 nm, n=6) para NTs de una y de dos bicapas lipídicas, respectivamente. **C.** Imagen de crioEM que muestra un dNT en el que se distinguen las dos bicapas lipídicas separadas por la distancia intermembrana (DI). Barra de escala 10 nm. Los diagramas muestran la distribución de los valores de la separación entre bicapas (color morado) y el espesor de las bicapas (color rojo), siendo estos de 2 nm (DE 1=nm, n=30) y 5 nm (DE =0.3 nm, n=30), respectivamente. El correspondiente valor de DI calculado como $DI = 2 * (\text{espesor bicapa} / 2) + \text{separación intermembrana}$, corresponde a 7 ± 1 nm.

2.5. Análisis de la geometría de los dNTs producidos en el sistema microfluídico

Una vez establecido el valor de la DI, procedemos a realizar un análisis más preciso de la geometría de los dNT obtenidos en el sistema microfluídico. El método de observación de dNTs por microscopía de fluorescencia de alta resolución nos permite medir el radio total (r_T) del dNT, que corresponde a la suma del radio de su membrana

externa (r_E) y de la interna (r_I) (ambas correspondientes a la distancia entre el centro del dNT hasta el plano medio de cada bicapa). El r_T del dNT está relacionado con la intensidad de fluorescencia a través de la Ec. 3. Sustituyendo el valor de r_T en la Ec. 4 queda:

$$r_E + r_I = \frac{I}{2\pi KL} \quad (\text{Ec. 6})$$

Teniendo en cuenta que ha de haber una distancia entre las dos bicapas (DI), podemos conocer el radio de la bicapa externa o interna, de manera que,

$$r_E = r_I + DI; \quad (\text{Ec. 7})$$

$$r_I = r_E - DI; \quad (\text{Ec. 8})$$

$$r_E = \frac{r_T + DI}{2}; \quad (\text{Ec. 9})$$

Basándonos en nuestras medidas experimentales y en datos bibliográficos, tomamos el valor de 6 nm como la DI .

Para estudiar de forma cuantitativa los procesos de remodelación de membrana en los NTs, procedimos a la elaboración de un algoritmo de análisis, resumido en la Figura 10 y consistente en los siguientes pasos:

1. Empezamos abriendo una secuencia temporal de imágenes del NT cuya remodelación queremos estudiar usando la distribución Fiji del software ImageJ¹⁷³ y sustraemos el fondo usando la herramienta "*SubtractBackground*".
2. A continuación, centramos todas las imágenes del NT en la secuencia temporal haciendo uso de la herramienta "*Aligment*".

3. Trazamos una línea de longitud y anchura conocida a lo largo del eje longitudinal del NT, de modo que la anchura de la línea coincida o sobrepase un poco la anchura del NT.
4. Usando el plugin "KymoReslizeWide" de la distribución Fiji del software ImageJ¹⁷³, generamos un quimógrafo, es decir, una gráfica tiempo-espacio que muestra los valores de la media de intensidades de fluorescencia a lo ancho de la línea seleccionada en el tiempo.
5. El siguiente paso es la obtención de la intensidad total del NT en cada punto longitudinal a lo largo del tiempo. Para ello, multiplicamos el quimógrafo por el valor de los píxeles correspondiente a la anchura de la línea seleccionada.
6. La caída de fluorescencia en el tiempo correspondiente a la constricción del NT se hace muy evidente en el quimógrafo y es el testigo directo de la remodelación lipídica. Para poder analizar dicha caída, usando la herramienta *threshold* seleccionamos los píxeles de la región donde se produce la constricción del NT, y generamos una máscara binaria, asignando el valor cero a las regiones fuera de la constricción y el valor 1 a la zona correspondiente a la constricción.
7. La máscara se multiplica por el quimógrafo original (quimógrafo 2 de la Fig. 2.10) dando lugar a una nueva imagen que sólo contiene los valores de intensidad total de fluorescencia correspondientes a la región en constricción, considerando valores nulos todos los demás.
8. El valor total de intensidad de fluorescencia en cada punto corresponde al término I_{NT} de la Ec. 4. El término L de la Ec. 4 se obtiene sumando los píxeles en cada punto temporal de la máscara binaria. Este valor se puede dimensionar en nm o μm conociendo la escala en píxeles del microscopio. Por tanto, aplicando la Ec. 4 se puede obtener el valor r_{NT} o r_T para un NT o dNT, respectivamente.

Dado que el sistema de generación masiva de NTs permite la obtención de imágenes con objetivos de gran magnificación, y el método de análisis desarrollado permite el análisis del radio de los NTs a lo largo del tiempo, decidimos combinar ambos para el estudio de la remodelación lipídica mediada por las proteínas citosólicas Drp1 y Dyn2, como parte de la maquinaria de fisión de la doble membrana mitocondrial²⁵.

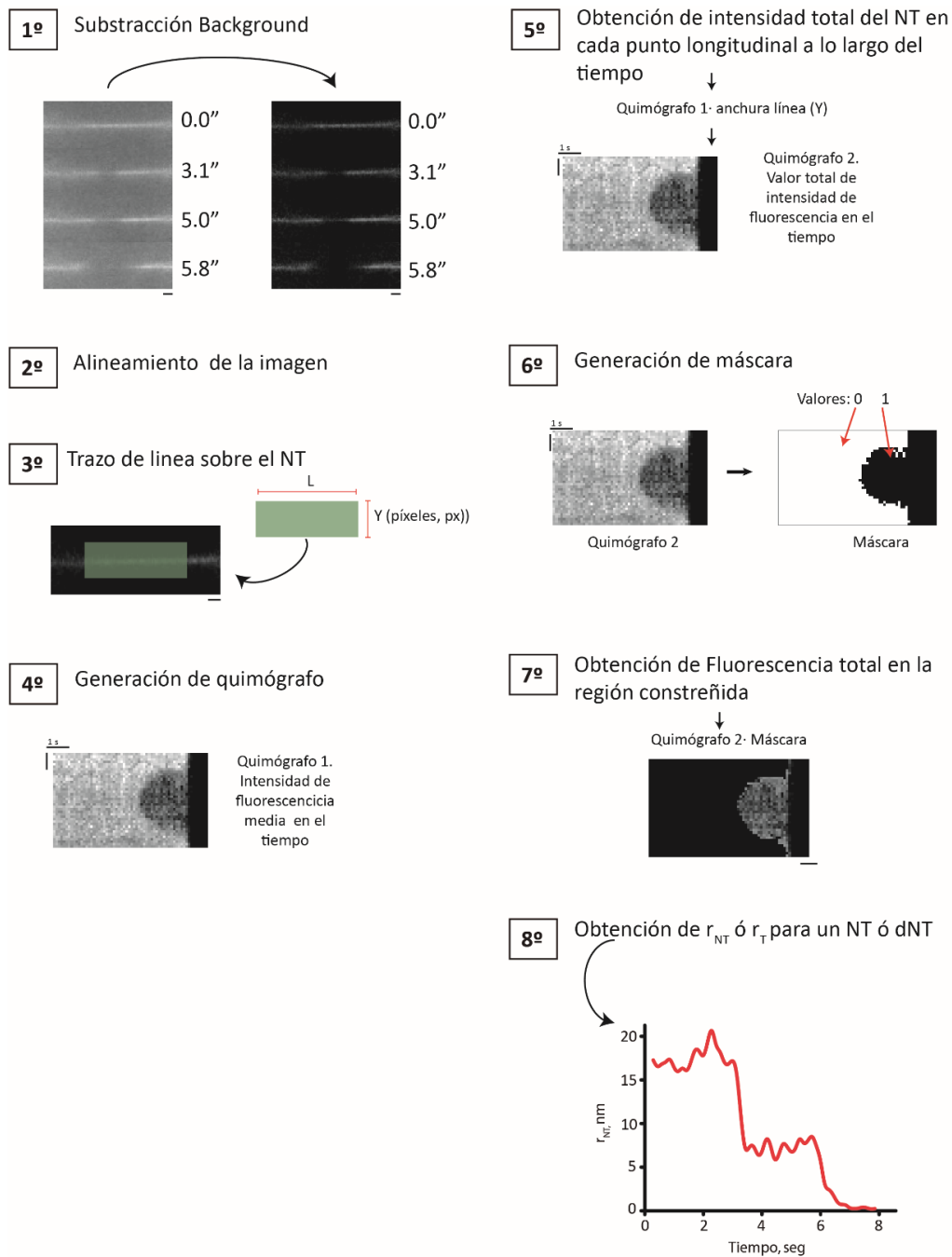


Figura 2.10. Pasos del algoritmo desarrollado para el análisis de la dinámica de remodelación del radio de los NTs. Escalas 1 μ m.

2.6. Prueba de concepto: estudio de la remodelación de membrana en dNTs generados sobre micropilares de SU-8

Uno de los objetivos de esta tesis es el estudio *in vitro* de la fisión de los dNTs, dada la relevancia biológica de la fisión de la doble membrana mitocondrial. Para que se produzca la fisión de la membrana es necesario alcanzar una curvatura crítica que

permita la desestabilización de la misma. Es decir, el paso previo a la fisión de membrana es siempre una constricción extrema. Hemos visto en el capítulo anterior como dicha constricción se alcanza gracias al trabajo de maquinaria especializada, como la formada por la Dyn1 (Fig. 2.3A), que se aplica de forma muy controlada y localizada para evitar la formación de poros de membrana y pérdida de la función de barrera de la misma. Ampliaremos estos conceptos en el siguiente capítulo. Sin embargo, la constricción también se puede alcanzar aplicando una fuerza global, como es la presión osmótica, que desestabiliza la membrana de forma global, probablemente a través de la formación de poros¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Como prueba de concepto, procedimos a probar la desestabilización por ósmosis en busca de la fisión consecutiva de cada una de las membranas de un dNT.

Así, tras seleccionar un dNT basándonos en su perfil de fluorescencia (ver Fig. 5), aumentamos la presión osmótica del exterior del dNT en $\Delta\Pi = 600\text{mOsm}$. Como se puede observar en la Figura 2.11, a los pocos segundos se produjo la ruptura de una de las bicapas del dNT, seguida de la ruptura de la segunda membrana. El aumento de la presión osmótica conlleva una salida hacia el exterior del NT del agua existente entre las bicapas. Esto resulta en una reducción gradual de los radios de ambas membranas de un dNT y su fisión consecutiva (Fig. 2.11). Aunque no podemos determinar cuál es el paso que siguen las membranas en esta remodelación, estos datos demuestran que la remodelación se puede producir de forma secuencial. Para analizar la remodelación aplicamos el algoritmo descrito en la sección anterior. Según se observa el quimógrafo de la Fig. 2.11, la primera remodelación no lleva a la retracción completa de una de las membranas del dNT a su reservorio, si no que el proceso se ralentiza. Esta ralentización puede ser debida a la fricción de la membrana interna contra las paredes de la membrana externa del dNT tras su fisión, o a la formación de un diafragma de hemifusión entre las dos membranas durante el primer evento de remodelación^{177,178}. En cualquier caso, esta prueba de concepto demuestra la posibilidad de observación de la remodelación de un dNT en tiempo real.

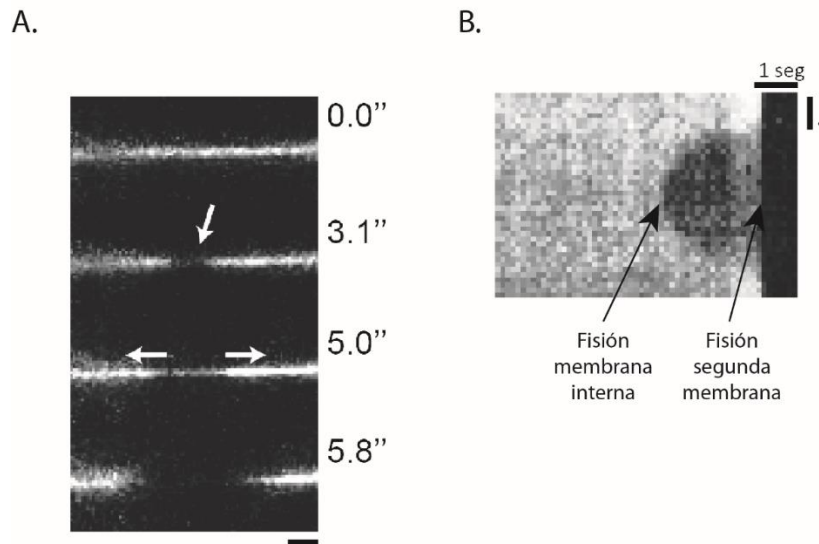


Figura 2.11. Fisión de doble membrana como consecuencia del aumento de la presión osmótica. **A.** Secuencia temporal de un evento de fisión de un dNT promovido por $\Delta\Pi$, donde se aprecian fisiones consecutivas de las membranas. Las flechas indican el momento en el que se produce la posible fisión y la retracción de la membrana interna. Barra de escala 4 μm . **B.** Quimógrafo correspondiente a la secuencia temporal en A.

3. APLICACIÓN DEL NUEVO MÉTODO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA REMODELACIÓN DE MEMBRANA POR LA MAQUINARIA DE FISIÓN MITOCONDRIAL

3.1. Reconstitución de la actividad de remodelación de membrana mediada por la Drp1

En el capítulo de la introducción hablamos de cómo la mecano-enzima Drp1 forma la maquinaria de la fisión mitocondrial en las células. Sin embargo, experimentos *in vitro* han mostrado resultados contradictorios. Mientras que la Drp1 es capaz de auto-ensamblarse sobre nanotubos lipídicos y producir la constricción de estos, no siempre es capaz de producir la fisión de los NTs en presencia de GTP^{94,115}. Por ello, quisimos primero estudiar qué factores son lo que controlan la actividad de fisión de membrana de la Drp1 *in vitro*.

3.1.1. Efecto de la composición lipídica en la remodelación de NTs mediada por la Drp1

Una de las posibles razones de la disparidad de resultados sobre la actividad *in vitro* de la Drp1 puede ser la variabilidad de las composiciones lipídicas empleadas en los diferentes estudios. Por tanto, decidimos ver cómo funciona la Drp1 sobre una membrana con una composición lipídica lo más asimilada a la MEM^{179,180}. Para ello, formamos NTs con una composición similar a la encontrada en la MEM, DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P₂:RhPE 46:30:10:10:3:1 % mol, y perfusionamos el sistema con 1 μM de Drp1 en presencia de 1 mM de GTP. De acuerdo con resultados previos de otros grupos¹¹⁵, observamos que la Drp1 fue incapaz de producir la constricción-fisión en los NTs, incluso cuando la composición de la membrana se

asemejaba a la membrana externa mitocondrial (Fig. 3.1A). Sin embargo, este resultado contradice el obtenido por Pucadyil y coautores, quienes recientemente han establecido que la Drp1 es capaz de fisurar NTs por sí sola⁹⁴. Hay que observar que las composiciones lipídicas utilizadas en ese trabajo no se asemejaban a las nuestras, pues tenían un alto contenido del lípido CL^{94,115}. La CL normalmente no se encuentra en la superficie mitocondrial, siendo su exposición al citosol uno de los factores que desencadenan la cascada apoptótica¹⁸¹. Sin embargo, se ha sugerido que la CL es un factor clave para el correcto funcionamiento de la Drp1, promoviendo su oligomerización y aumentando la actividad GTPasa^{76,77,136} (ver Capítulo 1). Datos obtenidos por nuestro colaborador en EEUU, el Dr. Rajesh Ramachandran, confirman que la CL favorece el correcto plegamiento del bucle variable de la Drp1, favoreciendo su interacción con la membrana¹⁸². Por tanto, decidimos testar si la presencia de CL en los NTs lipídicos resultaría en la constricción-fisión de estos, como ha sido previamente observado por Pucadyil y coautores. Esta vez, generamos NTs con DOPC:CL:RhPE 74:25:1 % mol. Al añadir 1 μ M de Drp1 en presencia de 1 mM de GTP a estos NTs, detectamos constricciones de los mismos de forma casi inmediata, alrededor de los 10 segundos post-adición. Las constricciones se observaron como una caída local de fluorescencia, que es debida a una menor concentración de marcador fluorescente por unidad de longitud del NT (Fig. 3.1B).

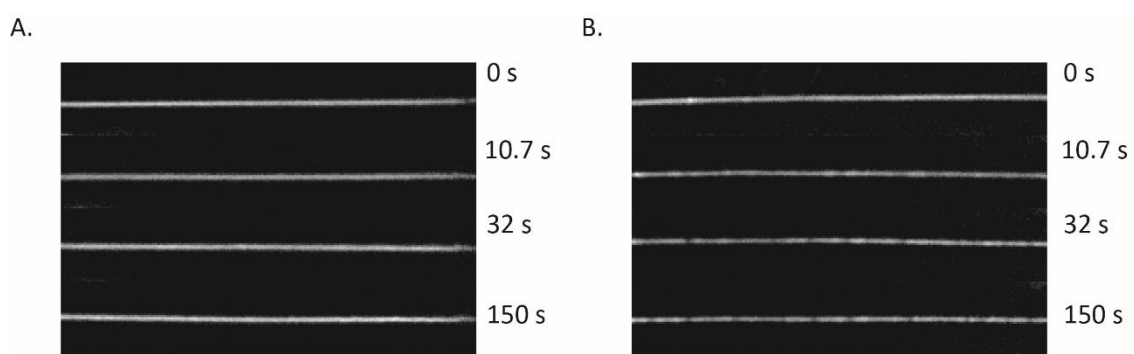


Figura 3.1. Imágenes de fluorescencia que muestran dos NTs lipídicos tras la adición de 1 μ M de Drp1 y 1 mM de GTP. **A.** Drp1 no produce constricción en los NTs con una composición MEM. **B.** Drp1 produce la constricción de los NTs en presencia de CL (zonas oscuras del NT). Barra de escala 2 μ m.

El radio en las zonas constreñidas por la hélice de Drp1 fue de 20 nm (DE= 6 nm, n= 30) (Fig. 3.2A). Este valor es similar a los medidos por crioEM anteriormente en LUVs tubulados por la Drp1¹⁸³. Sin embargo, este radio se sitúa muy lejos del valor crítico que ha de alcanzarse para que se desestabilice la membrana y se produzca su fisión, ~2 nm¹⁸⁴. De hecho, no detectamos ni un solo evento de fisión en más de 200 NTs testados. En otros estudios se han obtenido radios de constricción ligeramente diferentes, si bien siempre más grandes que los obtenidos en nuestro sistema. Dado que en todos estos estudios se han usado composiciones lipídicas diferentes, se puede concluir que la composición lipídica es un factor determinante en la interacción del Drp1 con la membrana.

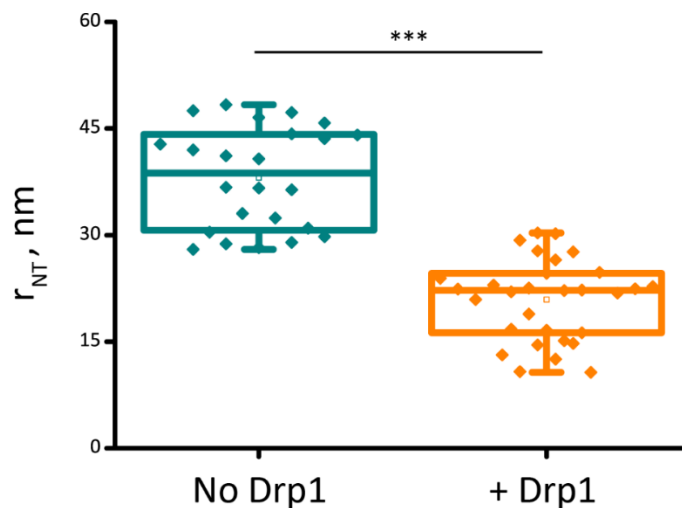


Figura 3.2. El diagrama muestra el radio de los NTs antes y después de la adición de 1 μ M de Drp1 y 1 mM de GTP al sistema microfluídico. Sin Drp1, los NTs tiene un radio de 45.52 nm (DE= 16.61, n=30). Tras la adición de Drp1 en presencia de GTP, la Drp1 se ensambla encima de los NTs disminuyendo su radio hasta los 20 nm (DE= 6 nm, n= 30). Valores estadísticamente diferentes para un nivel de significancia de 0.001 (t-test desparejado, igualdad de varianzas no asumida).

El hecho de que la composición lipídica afecte al radio de constricción sugiere, a su vez, que los factores lipídicos son un elemento regulador en la remodelación

mitocondrial. De hecho, la composición lipídica de los orgánulos celulares cambia en función del estado celular. Niveles altos de estrés celular están a menudo relacionados con un aumento de la fisión mitocondrial, lo que se corresponde con un aumento de la presencia de CL y Drp1 en el exterior mitocondrial¹⁸¹. Sin embargo, aun incluyendo en los NTs generados en nuestro sistema un gran porcentaje molar de CL, Drp1 en presencia de GTP sólo es capaz de producir la constricción de estos, lo que sugiere que para que se produzca la fisión mitocondrial no basta con la mera presencia de Drp1, sino que otros elementos son necesarios. La ayuda de estos factores podría ir encaminada en dos sentidos: asistir a Drp1 para que esta pueda generar una mayor curvatura en el sitio de pre-fisión, o actuar inmediatamente después, terminando de llevar a cabo la fisión mitocondrial.

Estos datos podrían concordar con la hipótesis planteada por Jason E. Lee y colaboradores en 2016²⁵. Según esta hipótesis, tras la constricción inicial promovida por la Drp1, otra mecano-enzima, la Dinamina 2 (Dyn2), se ensamblaría en el cuello mitocondrial y llevaría a cabo la fisión completa de la mitocondria.

La Drp1, situada en la parte citosólica de la mitocondria, lleva a cabo la constricción de ambas membranas mitocondriales. Por ello, nos preguntamos si la actividad remodeladora de la Drp1 estaba condicionada por la lamelaridad de los NTs. La Drp1 produjo constricción local en todos los NTs de una (61 tubos) y dos bicapas lipídicas (12 tubos), mientras que la eficiencia de constricción bajó drásticamente hasta el 30% (3 de 9 tubos) para NTs de tres o más bicapas lipídicas (Fig. 3.3). Cuando la tensión de la membrana viene definida por un reservorio determinado, la curvatura externa de los NTs debe disminuir con el aumento de lamelaridad, mientras que la resistencia al doblamiento aumenta, lo que explicaría esta diferencia en la actividad de la proteína. Por tanto, la lamelaridad del orgánulo ha de ser tomada en cuenta a la hora de estudiar la remodelación de sistemas celulares multilamelares, como las mitocondrias.

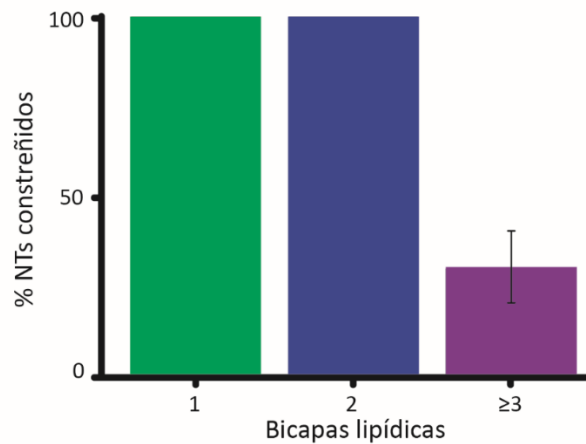


Figura 3.3. Eficiencia de constricción de Drp1 en base a la lamelaridad de los NTs. Gráfica que representa el porcentaje de NTs constreñidos según su topología. Mientras que la Drp1 produjo constricción en el 100% de NTs de una y dos bicapas lipídicas, la eficiencia de constricción bajó hasta un 30% cuando los NTs presentaban tres o más bicapas lipídicas. La barra de error representa la variación en el % de NTs constreñidos en los experimentos independientes realizados (n= 3).

3.1.2. La CL y el PE afectan al ensamblaje de la Drp1

Debido a la influencia de la composición lipídica sobre la remodelación de la membrana mediada por la Drp1, nos preguntamos si la presencia de DOPE (un lípido cónico altamente enriquecido en las membranas mitocondriales) junto con la CL podría afectar o facilitar la constricción de los NTs (ver Capítulo 1, sección 1.2.1.4). El DOPE aumenta la presión lateral de las cadenas lipídicas adyacentes, generando defectos que pueden ayudar a la unión de la proteína favoreciendo a la vez la remodelación de la membrana. Para ver si este doble efecto del DOPE podría facilitar la fisión de los NTs, añadimos 1 μ M de Drp1 en presencia de 1 mM de GTP a NTs formados con una mezcla lipídica de DOPC:CL:RhPE 74:25:1 y DOPC:DOPE:CL:RhPE 39:35:25:1 % mol. La Drp1 produjo constricciones locales en NTs formados con ambas composiciones lipídicas (Fig. 3.4). Aunque no hubo diferencias significativas en el radio de las constricciones, la distribución de estos fue más amplia en las membranas sin DOPE (Fig. 3.4C). Los defectos generados en la membrana por la presencia del DOPE pueden favorecer el correcto ensamblaje del andamiaje proteico, lo que resulta en una mayor eficiencia en la

constricción de los NTs. Sin embargo, y aunque se ha visto que el DOPE disminuye la rigidez a la flexión en la membrana¹²¹, facilitando el trabajo mecánico de Drp1, esto no fue suficiente para producir la fisión en los NTs. Por tanto, otros factores lipídicos o proteicos han de participar en la fisión mitocondrial.

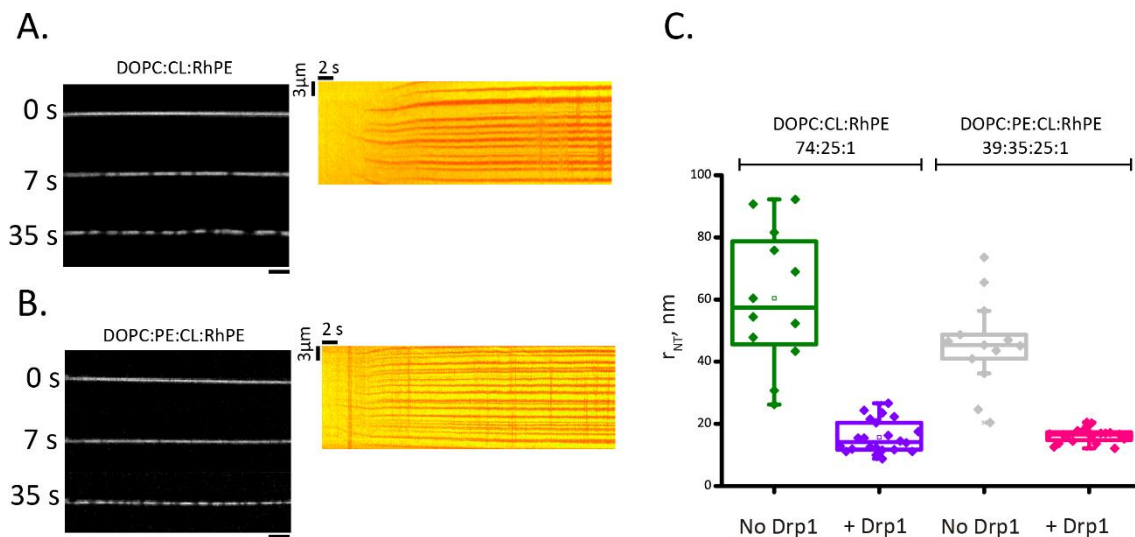


Figura 3.4. La CL y el DOPE juegan un papel fundamental en el ensamblaje de Drp1. **A-B** Imágenes de fluorescencia que muestran la constricción de los NTs tras la adición de Drp1 en presencia de GTP para las composiciones con DOPC:CL:RhPE 74:25:1 (A) y DOPC:PE:CL:RhPE 39:35:25:1 % mol (B). Barra de escala 5 μ m. A la derecha de cada imagen se muestran los quimógrafos producidos a partir de las secuencias temporales en (A), mostrando la formación de las constricciones a lo largo del NT tras la adición de Drp1 en presencia de GTP. Las zonas más oscuras corresponden a las constricciones. **C.** Diagrama que muestra los radios de los NTs antes y después de la adición de Drp1 para ambas composiciones lipídicas.

3.1.3. El etiquetado de la Drp1 altera su funcionalidad *in vitro*

El hecho de que la Drp1 no promueva la fisión de NTs con un alto contenido de CL en nuestro sistema, contradice los datos publicados por Pucadyil y colaboradores^{115,94}. Notoriamente, anteriormente se demostró que el etiquetado de la Drp1 con GFP (del

inglés, *Green Fluorescent Protein*) en su terminal C (Drp1-GFP) puede alterar su funcionalidad¹²⁸. La Drp1 utilizada por Pucadyil y colaboradores estaba etiquetada tanto en el terminal N como en el terminal C, mientras que nosotros utilizamos un constructo con una etiqueta en el terminal N, necesaria para la purificación posterior de la proteína (Ver Materiales y Métodos, sección 2.3). Esta diferencia, unida al efecto previamente demostrado para la Drp1-GFP, nos hizo sospechar que la localización de la etiqueta podría influir directamente en la funcionalidad de la proteína. Así, decidimos indagar si la posición del etiquetado afecta a la habilidad de fisión de la Drp1. Para ello, usamos la Drp1-tagA, con una etiqueta de 24 aminoácidos con una cola de poli-histidina localizada en el C-terminal, y la Drp1-tagB, con una etiqueta de tan sólo 9 aminoácido en el terminal C. Procedimos a cuantificar la capacidad de hidrólisis de GTP cuando las proteínas, en presencia de un molde lipídico, se auto-ensamblan alrededor de estos en forma de espiral (actividad GTPasa estimulada). Comparamos dicha actividad de nuestro constructo habitual, con el etiquetado en el N terminal (tag-Drp1) con las Drp1-tagA y Drp1-tagB. Confirmando nuestras sospechas, observamos que la proteína Drp1-tagA había perdido su capacidad de hidrólisis estimulada en un 40% con respecto a la tag-Drp1 (Fig. 3.5A). Sin embargo, la Drp1-tagB tenía una capacidad de hidrólisis igual a la de tag-Drp1. A la vista de las diferentes actividades GTPasa, decidimos comprobar la funcionalidad de Drp1-tagA y -tagB en la fisión de los NTs. La hidrólisis de GTP está directamente relacionada con el autoensamblaje de la proteína en el caso de las dinaminas clásicas. Por tanto, esperábamos no ver ningún efecto de remodelación producido por la Drp1-tagA, cuya capacidad de hidrólisis estimulada de GTP estaba notoriamente afectada. Sorprendentemente, al añadir 1 μ M Drp1-tagA en presencia de GTP a NTs con un alto contenido de CL (DOPC:DOPE:CL:RhPE 39:35:25:1 % mol), observamos fisión de NTs en un 21.92% de los casos (11 de 48 NTs) (Fig. 3.5B). Para la Drp1-tagB, con un etiquetado más corto en el terminal C también detectamos la fisión de un 10% de los NTs (8 de 80) (Fig.3.5B). Estos datos sugieren que la colocación de una etiqueta en el terminal C de la proteína influye directamente en su función de fisión. Además, la longitud de la etiqueta tiene un efecto tanto en el autoensamblaje de la proteína como en su capacidad de fisión. Cuanto mayor es la etiqueta colocada en el terminal C de la Drp1, más probabilidad de fisión hay. Aunque observamos una mayor capacidad de fisión de NTs para la Drp1-tagA, también observamos que esta proteína

tiene gran tendencia a la agregación, probablemente debido a un autoensamblaje temprano en disolución, lo que explica un menor grado de hidrólisis estimulada de GTP.

En el diagrama de la Figura 3.5C se observa que el radio inicial de los NTs afecta la probabilidad de fisión de estos. En presencia de Drp1-tagA, la probabilidad de fisión de NTs con un radio inferior a 50 nm es cercana al 50%, mientras que esta decae drásticamente una vez superado dicho valor, para llegar al cero por ciento de probabilidad cuando los NTs tienen un radio superior a los 150 nm (Fig. 3.5C). Para el caso de la Drp-tagB, la probabilidad de fisión es prácticamente nula a partir de los 50 nm de radio inicial del NT (Fig. 3.5C). Es decir, ambas proteínas muestran una sensibilidad hacia la curvatura inicial del sustrato, lo que sugiere que la presencia de la etiqueta en el C terminal altera de alguna manera la interacción con la membrana por parte de la proteína.

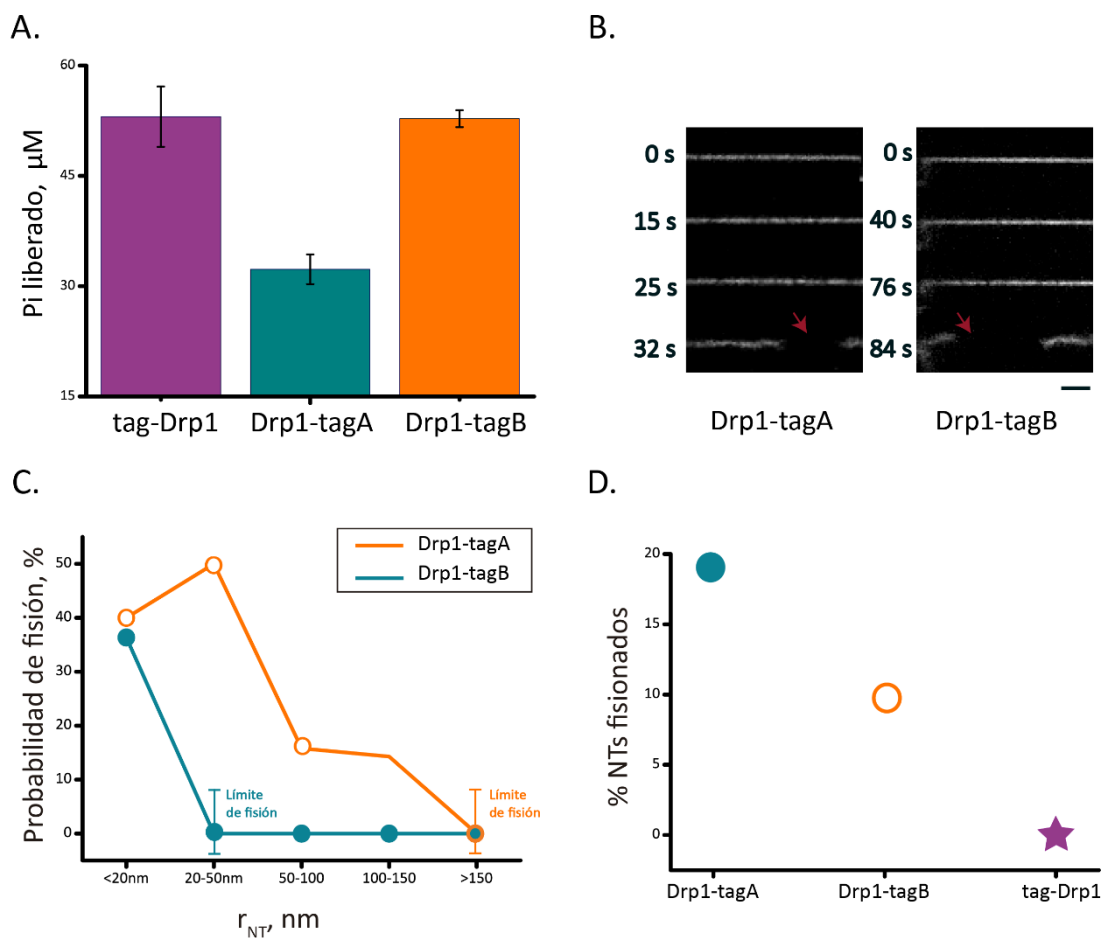


Figura 3.5. El etiquetado de la Drp1 altera su funcionalidad *in vitro*. **A.** Gráfica que muestra la actividad GTPasa de tag-Drp1, Drp1-tagA y Drp1-tagB. **B.** Imágenes de fluorescencia que muestran la fisión de un NT en presencia de GTP y Drp1-tagA (izquierda) y Drp1-tagB (derecha). **C.** Gráficas que muestran la probabilidad de fisión (%) de ambas proteínas en función del radio inicial del NT. **D.** Gráfica que muestra el porcentaje de NTs fisionados para Drp1-tagA (18.96 %, 58 tubos en total), Drp1-tagB (10 %, 80 tubos en total) y tag-Drp1 (0 %, 214 tubos en total), N=9.

Pero, ¿por qué la proteína que hidroliza más GTP es la que no produce la fisión, al contrario de lo que la lógica nos indica? Si tomamos como modelo guía aquel planteado para la fisión por Dyn1^{125,127,185}, podemos ver que el dominio BSE juega un papel fundamental en el proceso. De hecho, mutaciones en dicho dominio afectan a la actividad GTPasa estimulada, así como a la endocitosis mediada por clatrina (EMC)¹⁸⁶. La energía proveniente de la hidrólisis del GTP se transduce desde la cabeza G hasta el dominio PH a través de la acción del BSE²². Como resultado, además de reducirse el rango dinámico de la hélice, los PH se inclinan, insertándose más en la membrana, y cambiando así la orientación de los lípidos, lo que llevará a la fisión de la membrana a través del intermediario lipídico de HF¹⁵. Cuando observamos la localización de las etiquetas añadidas a la estructura de Drp1, situadas en el extremo C-terminal, podemos ver que quedan localizadas muy cerca de esta región bisagra (Fig. 3.6). Por ello, podemos especular que la presencia de la etiqueta cerca del dominio BSE podría provocar un autoensamblaje prematuro de la proteína, resultando en un giro del polímero con respecto a la membrana en un ángulo diferente al habitual. Este giro puede generar la curvatura suficiente para la desestabilización de la membrana, llevando ésta a su fisión. Estos datos también pueden indicar *a priori*, que para que la Drp1 pueda mediar la fisión mitocondrial necesita que otros factores proteicos (adaptadores, Dyn2) o incluso químicos (Ca²⁺) interactúen con el terminal C de la proteína. Sin embargo, más experimentos son necesarios para elucidar la relación cofactores-estructura-función en la Drp1.

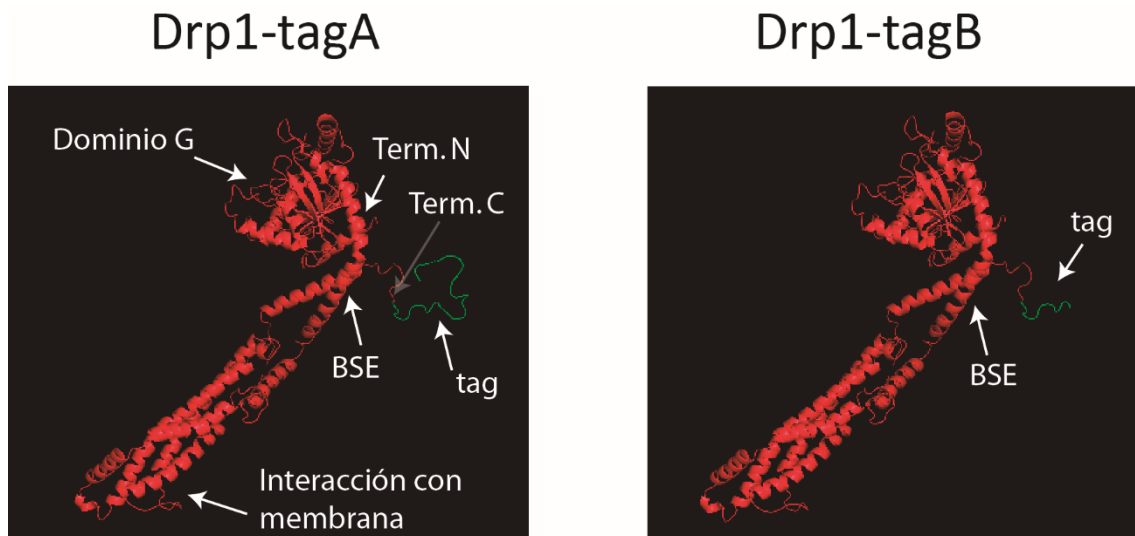


Figura 3.6. Modelos obtenidos con el *software* Coot en el que se muestra la estructura de Drp1 con el tagA (izquierda) y el tagB (derecha).

Los datos que mostramos en este capítulo indican que Drp1 no produce la fisión *in vitro* de NTs ni de dNTs, ya sea con una composición semejante a la membrana externa mitocondrial, o con una enriquecida con CL. Las fisiones *in vitro* observadas hasta la fecha pueden deberse a un artefacto derivado de las etiquetas que se añaden a la estructura de la proteína para su purificación. Tomados juntos, estos datos sugieren que, aunque la Drp1 sea partícipe de la fisión mitocondrial, el rango dinámico de su hélice contráctil no permite que las bicapas lleguen a un radio crítico para su fisión. Recientemente se ha propuesto que otra mecano-enzima, Dyn2, termina de llevar a cabo este proceso. Sin embargo, hasta ahora no hay evidencias *in vitro* que certifiquen si esta proteína puede constreñir y fisionar una doble bicapa lipídica, ya sea por sí sola, o asistiendo a Drp1 en su misión.

3.2. Caracterización de la remodelación de dNTs mediada por la Dyn2

Dado que la Dyn2 ha sido recientemente implicada en la fisión mitocondrial¹, decidimos testar su capacidad de remodelación de moldes lipídicos similares en composición y topología a la MEM. Para ello, formamos NTs con una composición

lipídica DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P₂:RhPE 36:30:10:10:10:3:1 % mol que simula a la MEM. A continuación, seleccionamos dNTs y perfusionamos el sistema microfluídico con 0.5 μ M de Dyn2 marcada con GFP monomérica (Dyn2-mEGFP). Aunque la Dyn2 se ha postulado como una constrictora débil⁹⁴, observamos su auto-ensamblaje y actividad constrictora sobre los dNTs (Fig. 3.7). Las dinaminas clásicas, a diferencia de la Drp1, son capaces de producir constricciones incluso en ausencia de nucleótido. Sin embargo, la hidrólisis del GTP es necesaria para la fisión de membrana mediada por estas proteínas en sistemas de una sola membrana. Así que nos preguntamos si la hidrólisis de GTP por la Dyn2 sería suficiente también para inducir la fisión de un dNT.

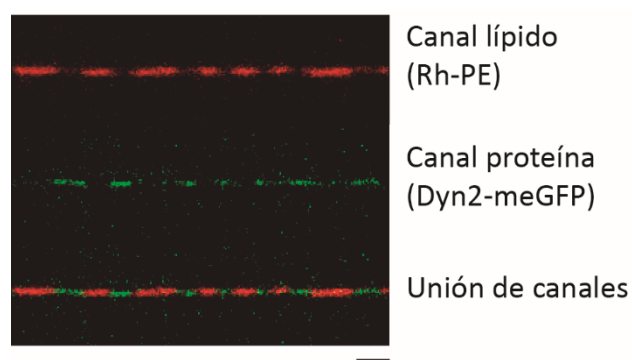
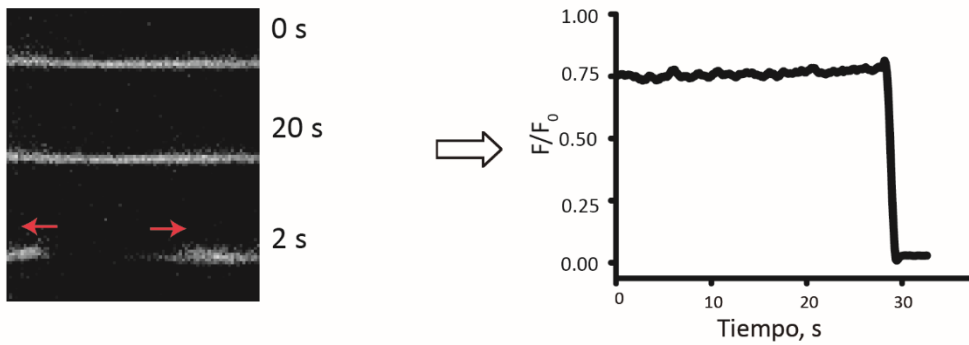


Figura 3.7. Imagen de fluorescencia que muestra un dNT (canal Rh-PE) y constreñido por Dyn2 marcada con proteína monomérica de fluorescencia verde (mEGFP, monomeric enhanced Green Fluorescent Protein). Se observa como la Dyn2 se localiza en las zonas de constricción del dNT. Barra de escala 2 μ m.

Tras la adición de 1 mM de GTP a los dNTs previamente constreñidos por el andamio de la Dyn2 detectamos la fisión de un 66% de los dNTs (16 NTs, N=3). La fisión se observó como una rápida retracción de los extremos del dNT hacia los reservorios, situados en los micropilares de SU-8 (Figura 3.8). En NTs con una sola membrana, la fisión se produjo en un 100% de los casos (26 NTs, N=3). Por tanto, la Dyn2 es capaz de inducir la fisión de dNTs, aunque con menor eficiencia que en el caso de los NTs.

A.



B.

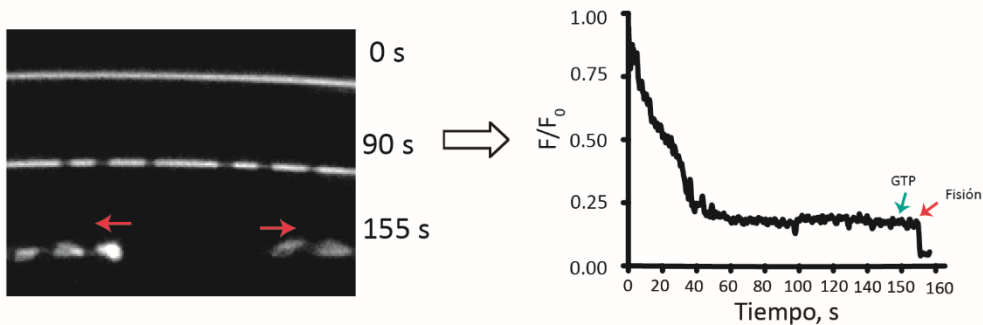


Figura 3.8. Fisión de un NTs por Dyn2 tras la hidrólisis de GTP. **A.** Imágenes de Fluorescencia que muestran la fisión de un NT en presencia de GTP. Las flechas rojas indican la retracción hacia los micropilares de SU-8 de ambos extremos del dNT. A la derecha, gráfica que muestra el descenso brusco de la señal de fluorescencia en el momento en que se produce la fisión del NT (flechas rojas). **C.** Imágenes de Fluorescencia que muestran la constricción de un dNT y su posterior fisión tras añadir GTP. Las flechas rojas indican la retracción hacia los micropilares de SU-8 de ambos extremos del dNT. A la derecha, gráfica que muestra el descenso paulatino de la fluorescencia en la constricción donde, tras añadir GTP (flecha verde), se produce la fisión del dNT, correspondiente a una caída brusca en la señal de fluorescencia (flecha roja).

Nos preguntamos si dicha disminución en la capacidad de fisión se debe a una menor capacidad de constricción de los dNTs por parte de la Dyn2. Así, para comprobar si la topología afectaba a la capacidad de ensamblaje de la Dyn2, medimos el número de constricciones por unidad de longitud en los NTs y dNTs. En la Figura 3.9 se muestra el resultado de dicha comparación, donde se observa que la cantidad de constricciones por unidad de longitud es aproximadamente 2.8 veces mayor cuando la Dyn2 se ensambla sobre NTs con una sola membrana.

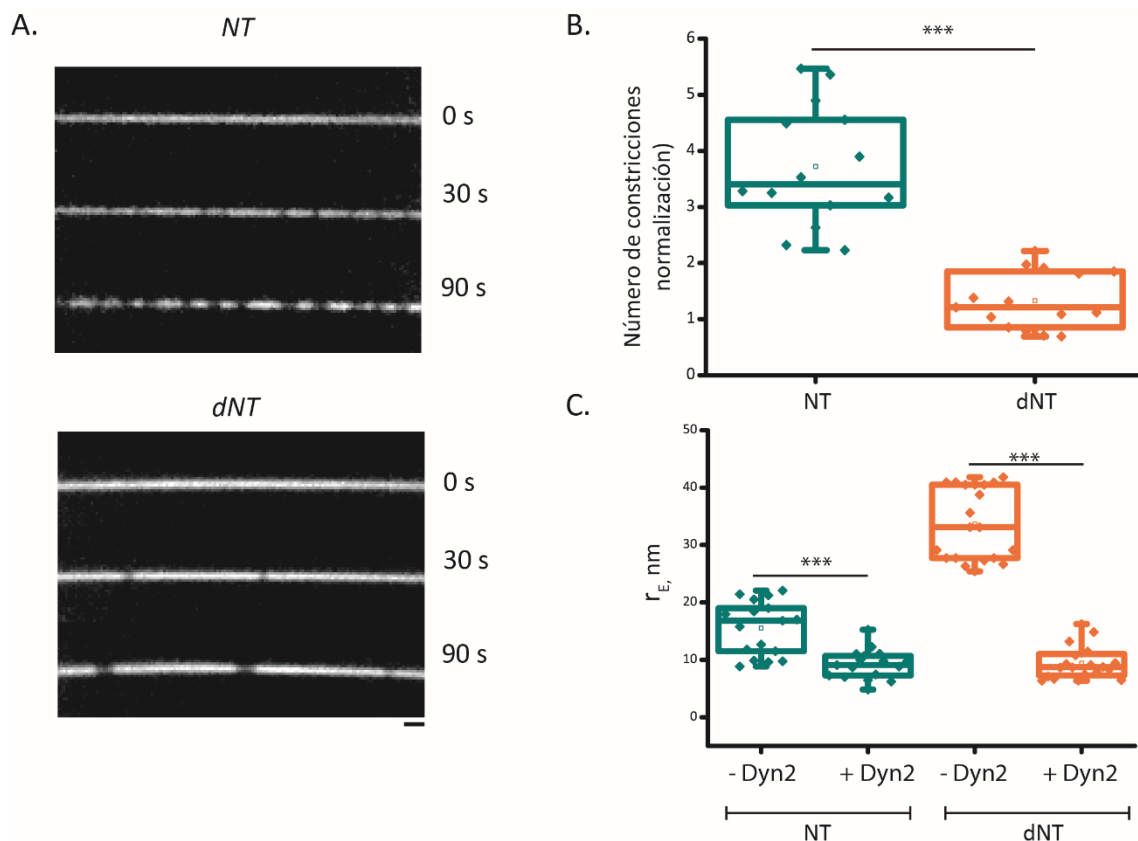


Figura 3.9. Constricción por Dyn2 en NTs y dNTs. **A.** Imágenes de fluorescencia que muestran que la Dyn2 se ensambla y produce la constricción de NTs (arriba) y de dNTs (debajo) a los pocos segundos de perfusionar 0.5 μ M de Dyn2 en el sistema microfluídico. Barra de escala 1 μ M. **B.** El número de constricciones por unidad de longitud de NT lipídico son significativamente distintas (ANOVA, p valor ≤ 0.001) según la topología, siendo estas de 5 ± 1 nm (14 NTs $N=3$) y 2 ± 1 nm (15 dNTs, $N=3$) constricciones por unidad de longitud para NTs y dNTs, respectivamente. Valores normalizados con respecto a la longitud total de cada NT. **C.** Los r_T de los NT son significativamente menores (ANOVA, p valor ≤ 0.001) cuando la Dyn2 es perfusionada en el sistema, variando de 14 ± 4 nm para los NTs y de 34 ± 6 nm para los dNTs.

A pesar de que tienen una bicapa lipídica más, los dNTs presentan una curvatura externa (C_{NT}) similar a la encontrada en los NTs ($C_{NT} = 1/17 \text{ nm}^{-1}$ para los dNTs frente a $C_{NT} = 1/15 \text{ nm}^{-1}$ para los NTs). Por tanto, la disminución de fisiones observada no es debida a una menor curvatura de los dNTs, sino a su topología. La presencia de una membrana más en el interior del nanotubo aumenta la resistencia al doblamiento del sistema, algo que influye en el ensamblaje de la proteína. Por otro lado, si la Dyn2 es un sensor de la rigidez de la membrana, deberíamos observar grandes cambios en la remodelación que produce esta proteína al variar la composición lipídica de la membrana. Curiosamente, la MEM contiene un gran porcentaje de PE, lípido que baja

la rigidez al doblamiento de la membrana lipídica². Nos preguntamos, por tanto, si disminuyendo la cantidad de este lípido en los dNTs podríamos ver un incremento en el radio de constricción producido por la Dyn2. De hecho, tal y como se observa en la Figura 3.10, el radio de constricción del dNT aumenta significativamente cuando el PE en la membrana es reducido al 10%. Además, la constricción se ve favorecida por una mayor tensión lateral en la membrana, ya que los dNTs con una menor curvatura inicial se constriñen menos que aquellos que tienen una mayor curvatura (Fig. 4).

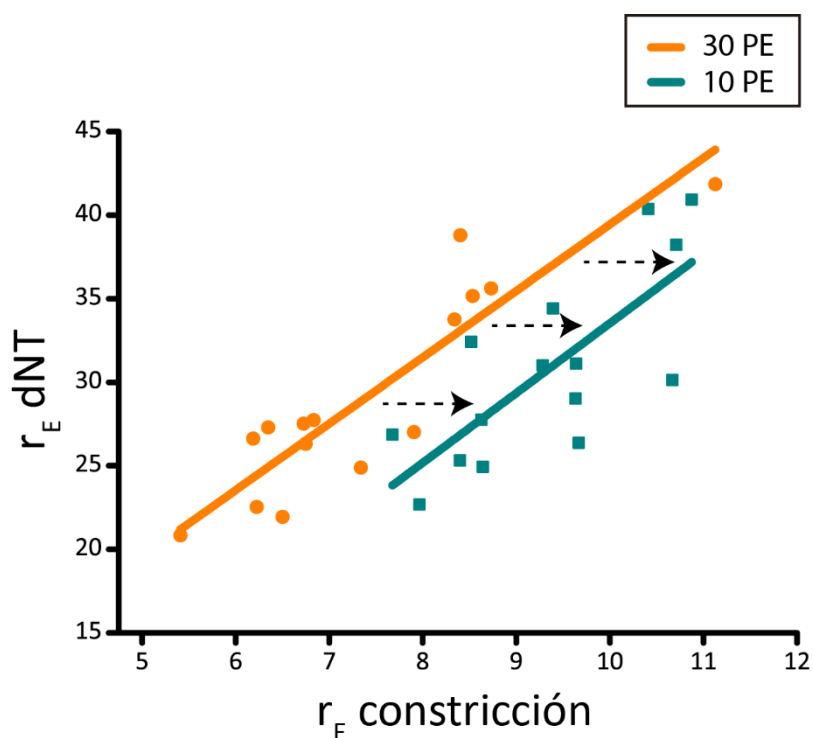


Figura 3.10. La constricción de los dNTs provocadas por las hélices de la Dyn2 dependen de la curvatura externa inicial de los dNTs así como de la presencia de DOPE en la membrana. En naranja se representan los datos y el ajuste lineal para dNTs con una mayor cantidad de DOPE (DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P₂:RhPE 36:30:10:10:10:3:1 %mol) y en azul para el 10 %mol de DOPE (DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P₂:RhPE 56:10:10:10:10:3:1 %mol). Ajuste lineal con un $R^2=0.82$ y 0.54 para 30 y 10 %mol de DOPE, respectivamente.

Por tanto, la Dyn2 forma una maquinaria de fisión muy potente capaz de vencer la rigidez al doblamiento de la doble membrana. Su ensamblaje y correcto funcionamiento depende de factores mecánicos de la membrana, tales como la tensión o la rigidez al

doblamiento. Por tanto, la fisión de sistemas de doble membrana por la Dyn2 se presenta como un proceso altamente regulado por la composición lipídica de las membranas, su nivel de pre-constricción, u otros factores que puedan influir en la tensión de la membrana, como es el citoesqueleto. El hecho de que determinados lípidos, como el PE, puedan modificar el grado en que la Dyn2 produzca la constricción de un cuello lipídico de doble membrana, sugiere un mecanismo de regulación activa, donde el proceso de fisión por Dyn2 pueda ser facilitado o no, como consecuencia de las necesidades energéticas puntuales de la célula o como efecto derivado de alguna de las muchas patologías humanas que interfieren en el funcionamiento mitocondrial normal.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que la Dyn2 produce la remodelación lipídica de una amplia gama de membranas en la célula, donde se incluyen diferentes topologías, curvaturas, y composiciones lipídicas. Por tanto, esta proteína podría adaptarse a diferentes funciones guiada por las señales mecánicas de la membrana. Más específicamente, estos datos sugieren que la Dyn2 podría también formar parte de la maquinaria de fisión mitocondrial, tal y como fue propuesto recientemente¹.

La figura 3.11A muestra un ejemplo de la evolución en el tiempo (haciendo uso del algoritmo desarrollado previamente (ver Capítulo 2, sección 1.5) de la constricción de un dNT con composición MEM por Dyn2 en ausencia de nucleótido. Se puede apreciar como la curvatura del dNT bajo el andamio de Dyn2 aumenta paulatinamente hasta estabilizarse. Este nivel estable de curvatura se corresponde con un radio de constricción de 9 ± 2 nm (24 dNTs, $n=5$). Suponiendo una DI de 6 nm (ver Capítulo 2, sección 1.4), este valor de r_T se corresponde con el valor del radio externo del dNT de 8 ± 1 nm, siendo de 2 ± 1 nm el valor de r_i . Es decir, tanto la separación entre las membranas como el radio interno del dNT se sitúan en unos valores críticos, cercanos a la longitud de Debye, siendo posible su remodelación. Según los cálculos de nuestros colaboradores en el laboratorio del Dr. Marcus Muller (Universidad de Gotinga, Alemania), la fisión de la membrana interna a través de un intermediario de hemifisión sería un camino energéticamente favorable, con una barrera energética lo suficientemente pequeña.

Sin embargo, *in vivo* el GTP siempre está presente. El análisis de las constricciones en presencia de GTP en nuestro sistema no ha sido posible debido a la rapidez con la que la Dyn2 efectúa la fisión. Por ello, decidimos usar un análogo no hidrolizable del GTP, el GMPPCP, que paraliza el proceso de hidrólisis en su estado fundamental, es decir, de unión al GTP¹⁸⁷. Al añadir 1 mM de GMPPCP conjuntamente con 0.5 μ M de Dyn2 observamos la constricción de dNTs que alcanzaron un radio externo de r_e de 9 ± 1 (21 dNTs, N=6) (Fig. 3.11). Teniendo en cuenta estos valores, al aplicar la Ec. 4 obtuvimos un r_i de 3 ± 1 (21 dNTs, N=5). Si tenemos en cuenta que el radio crítico para que se produzca la fisión espontánea de una bicapa lipídica está en torno a los 2 nm⁷, la coexistencia de la membrana interna con la externa se hace posible, estando ambas constreñidas bajo el andamiaje de la hélice de Dyn2 en su estado de fundamental. Cabe destacar que estos datos muestran una constricción significativamente menos acusada en presencia de GMPPCP. Esta disminución de la curvatura de constricción se podría explicar por homología con la Dyn1. Para la Dyn1 se ha observado que la unión de la molécula de GTP a la cabeza G (estado simulado por el GMPPCP) hace que el dominio PH se levante de la membrana, dejando más libertad a la membrana debajo del andamiaje. Sin embargo, en el momento de transición, cuando la GTP pasa a GDP-P, se produce un cambio conformacional en la proteína llevando al andamio proteico a un estado de super-constricción, y a la membrana al umbral de fisión. Un efecto parecido también se ha observado para la Dyn2. Se ha observado que cuando la Dyn2 se encuentra en presencia de GMPPCP y oligomeriza sobre los filamentos de actina, se produce un aumento en el diámetro del polímero en comparación a su estado en ausencia de nucleótidos¹⁰. Cuando el ciclo catalítico avanza hacia el estado de transición, el polímero de Dyn2 aparece más constreñido sobre los filamentos de actina¹⁰. Es decir, el estado fundamental del ciclo de hidrólisis del GTP lleva a una menor constricción de la membrana por el andamio de la Dyn2. Por tanto, la fisión de la doble membrana mitocondrial se produciría en el estado de transición, tal y como hemos observado en nuestros experimentos. Es de esperar, por tanto, que el radio de constricción que hemos detectado en estado apo de la proteína sea un buen indicador de la evolución de la remodelación en estado de transición, ya que representaría un punto intermedio en la evolución del proceso de constricción.

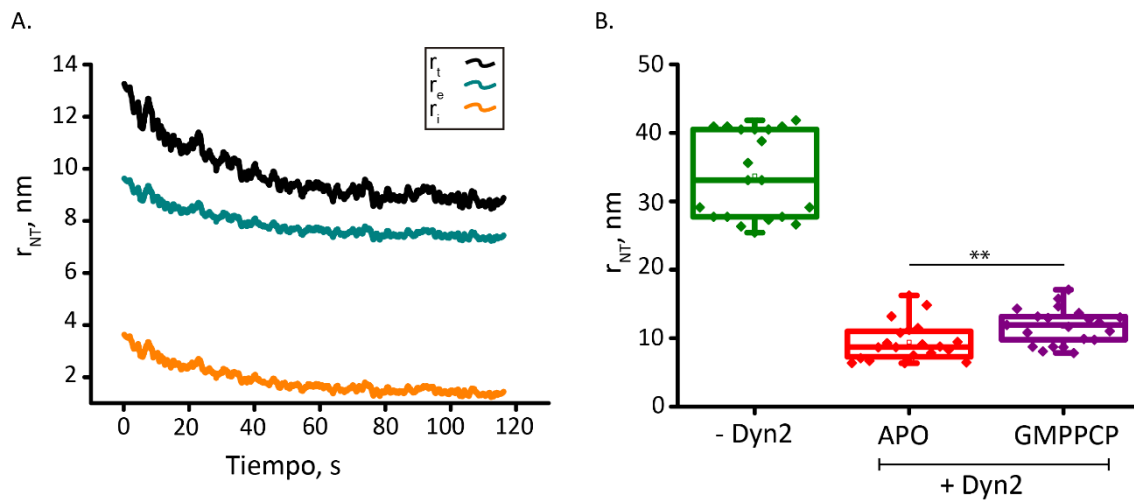


Figura 3.11. Constricción provocada por Dyn2 sobre dNTs con composición MEM. **A.** Gráfica que muestra la dinámica de constricción de un dNT por Dyn2 en ausencia de nucleótido (estado apo) donde se aprecia cómo los valores de r_t (negro), y los correspondientes valores de r_e (azul) y r_i (naranja) caen paulatinamente en el tiempo hasta alcanzar la meseta correspondiente al radio de constricción final. **B.** Diagrama que muestra el radio de dNTs antes de añadir la Dyn2 (verde) y los radios finales alcanzados tras añadir Dyn2, siendo significativamente distintos (p valor ≤ 0.01) en estado APO y en presencia de GMPPCP.

Con la esperanza de detectar indicios de la fisión de la membrana en dNTs preformados decorados por la Dyn2, nos dirigimos a la crioeM. En la Figura 3.12A se observa el patrón típico que forma la Dyn2 tras su ensamblaje en NTs de una membrana. Curiosamente, y a diferencia de la Dyn1, el andamiaje de la Dyn2 formado sobre los NTs parece ser poco uniforme, indicando cierto grado de flexibilidad en la hélice, concordante con la adaptabilidad a la mecánica de la membrana que hemos observado en este estudio. La figura 6B muestra un dNT preformado decorado por Dyn2. Aquí se observan claramente dos regiones del tubo. En una primera región, fuertemente decorada por las hélices de Dyn2, aparece una sola membrana. El radio del tubo en esta región es cercano al observado en el sistema unilamelar (11 ± 2 nm (38 NTs, $N=1$)). Por otro lado, en la región central aparece un ensanchamiento del tubo en el que se distinguen claramente las dos membranas del dNT, cuyo radio también se aproxima al observado en nuestro sistema para una doble membrana (26 ± 6 nm) (6 dNTs, $N=1$). Además, la membrana interna aparece claramente separada de la externa (flechas rojas,

Fig. 3.12B), lo que podría indicar la fisión de la membrana interna debida a la fuerte constricción ejercida por la Dyn2 en las zonas colindantes. Estos datos confirman la posibilidad de fisión secuencial (comenzando con la membrana interna) como el camino de la remodelación de sistemas de doble membrana. Sin embargo, son necesarios más estudios de esta problemática, tanto desde el punto teórico, como experimental, para confirmar la existencia de caminos de remodelación alternativos de dNTs.

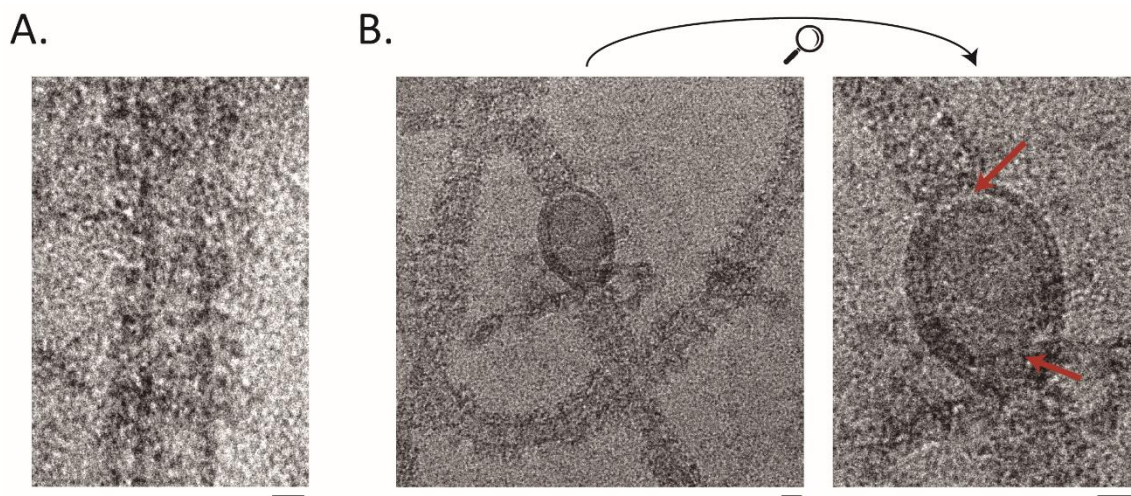


Figura 3.12. Imágenes de crióEM de NTs en presencia de Dyn2. **A.** NT preformado y decorado por el andamio de Dyn2 **B.** dNT preformado y decorado por la Dyn2. Las flechas rojas señalan las regiones donde se observa la separación entre las membranas del dNT. Barras de escala 20 nm.

3.3. Sinergia entre Drp1-Dyn2 en la remodelación de membrana

Como se ha mostrado anteriormente en este capítulo, las habilidades de Drp1 y Dyn2 para llevar a cabo la fisión de NTs difieren notablemente. Aunque clásicamente se ha observado a Drp1 en el momento de la división mitocondrial^{23,24,92,188}, la Dyn2 también ha sido colocada junto con la Drp1 en este proceso¹. Dyn2 actuaría tras la acción de Drp1, terminando de llevar a cabo la fisión mitocondrial¹. Sin embargo, y como se

observa en la Figura 3.8, Dyn2 es autosuficiente en la fisión de los NTs y dNTs a concentraciones micromolares en solución.

Para poder apreciar la interacción entre las dos proteínas *in vitro*, decidimos reducir la concentración de la Dyn2 a niveles nanomolares para a su vez reducir su nucleación sobre la membrana en solitario. Datos anteriores de nuestro laboratorio establecieron que el umbral para la nucleación de la Dyn2 sobre NTs se sitúa a una concentración de 20 nM. Al añadir esta concentración de proteína marcada con GFP monomérico observamos una formación de escasos andamios de proteína de tamaño muy reducido (Fig. 3.12A). Además, cuando añadimos la proteína sin marcar en presencia de GTP observamos una caída en la eficiencia de fisión a tan sólo 8,2% de los NTs (9 de 109) (Fig. 3.12B) frente al 100% de fisiones detectadas en presencia de 0.5 μ M de proteína en solución.

Algo parecido sucedió con la Drp1. Cuando perfusionamos el sistema con 20 nM de Drp1 marcada químicamente con el fluoróforo Janelia 646 y detectamos pequeños andamios de Drp1 sobre la membrana. Con la proteína sin marcar, no detectamos remodelación de la membrana, probablemente debido al carácter muy localizado de las posibles constricciones.

Cuando añadimos ambas proteínas marcadas a la misma concentración (20 nM cada una) observamos su colocalización en pequeños clústers sobre los NTs (Fig. 3.12C). Finalmente, perfusionamos el sistema con ambas proteínas sin marcar (para no interferir con su actividad GTPasa) a la misma concentración (20 nM) en presencia de GTP. Curiosamente, con la adición simultánea la eficiencia de fisión aumentó desde el 8.2% detectado en presencia de Dyn2 sola, hasta el 48.8% (22 de 49 NTs) (Fig. 3.13D).

Por tanto, nuestros datos confirman una posible sinergia entre la Drp1 y Dyn2 durante la remodelación de las membranas. Esta sinergia puede tener un origen proteico (es decir, una interacción directa entre las proteínas) o puede estar originada por la curvatura de la membrana. En este último caso, la curvatura creada por la Drp1 puede facilitar el rápido y correcto ensamblaje de la Dyn2 en el cuello de la membrana, facilitando así su fisión. Futuros estudios deberán hacerse cargo de esta cuestión.

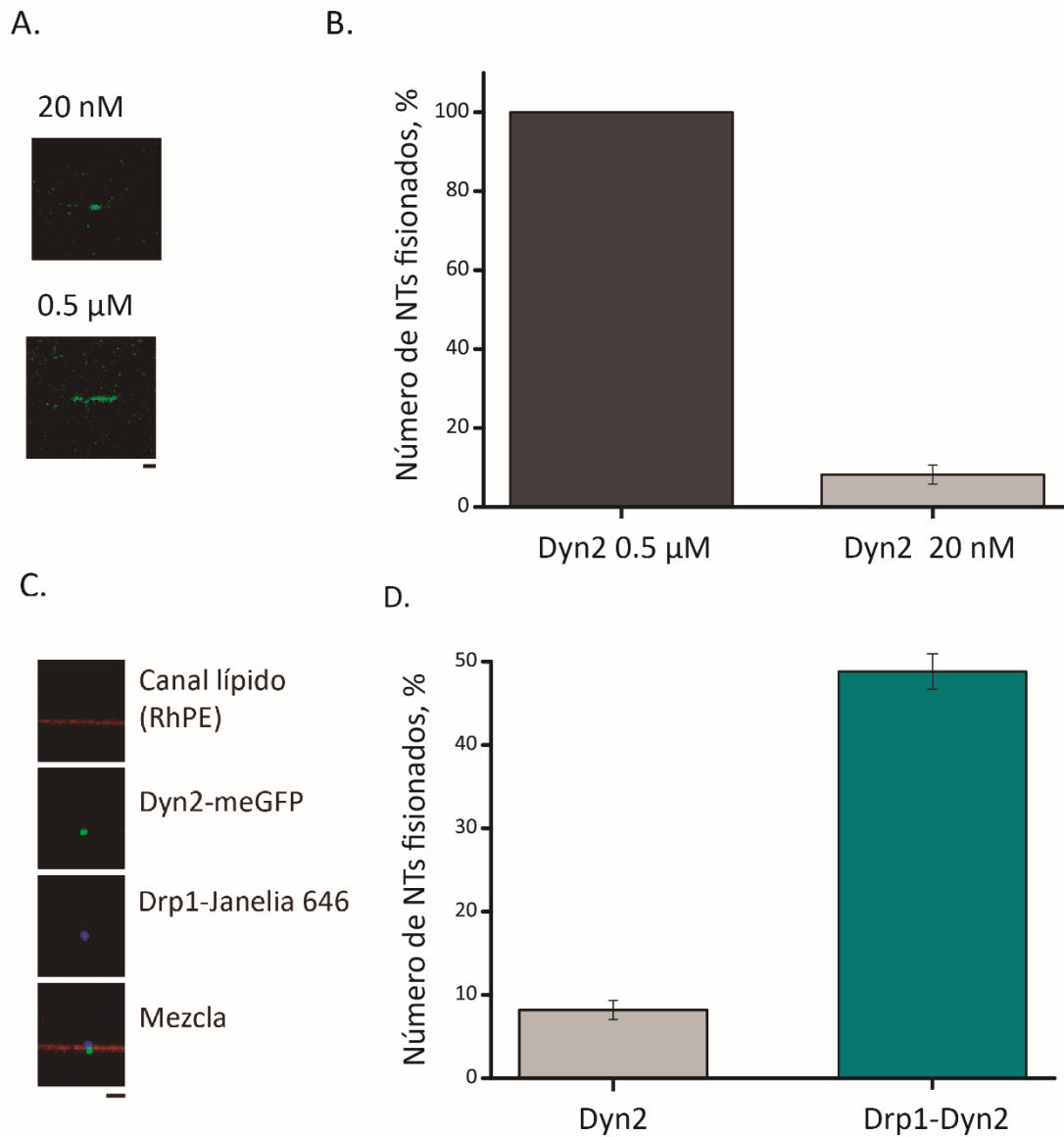


Figura 3.13. Sinergia en remodelación entre Dyn2 y Drp1. **A.** Andamios de Dyn2-mEGFP detectados sobre un NT a 0.5 μ M y a 20 nM de concentración de proteína en solución. **B.** Diagrama que muestra la eficiencia de fisión de Dyn2 0.5 μ M en comparación a cuando se añade a una concentración de 20 nM. **C.** Imágenes de fluorescencia que muestran los andamios formados por Dyn2-meGFP (verde) y Drp1-Janelia 646 (azul) sobre un NT lipídico (rojo). Barra de escala 1 μ m. **D.** Diagrama que muestra la eficiencia de fisión a una concentración de 20 nM del tándem Drp1-Dyn2 en comparación a cuando solo está presente la Dyn2.

En cualquier caso, nuestros resultados ofrecen evidencias *in vitro* de la colocación –e interacción– de dos tipos de dinaminas que, como sugiere Lee y colabores, llevan a cabo el último paso de la división mitocondrial¹.

4. CONCLUSIONES

Desarrollo de un nuevo sistema experimental para el estudio de la remodelación de membrana *in vitro*

- La formación de NTs sobre micropatrones de polímero fabricados directamente sobre un cubreobjetos permite su observación en tiempo real mediante microscopía de fluorescencia con objetivos de gran poder de resolución.
- La topología y la geometría de los NTs generados sobre micropatrones de polímero en un sistema microfluídico se puede controlar mediante el diseño del micropatrón y la cantidad de material lipídico depositado.
- La cantidad de reactivos necesaria para la generación de los NTs así como para los ensayos con proteínas es mínima debido a la miniaturización del sistema.
- Los NTs se pueden preformar directamente sobre una rejilla de crioEM, lo que abre nuevas posibilidades al estudio de la remodelación de membranas mediante esta técnica.

Las dinaminas en la maquinaria de la fisión mitocondrial

- Drp1 no es autosuficiente en la fisión de membranas *in vitro* independientemente del contenido de CL y de la lamelaridad de los NTs.
- Las etiquetas en el C terminal afectan la actividad de la Drp1 *in vitro*, probablemente debido a una interacción con la región del BSE.
- La Dyn2 es capaz de auto-ensamblarse tanto sobre NTs como sobre dNTs y de producir su fisión en presencia de GTP.
- El PE, enriquecido en la MEM, facilita el trabajo mecánico y el ensamblaje de la maquinaria de fisión de la Dyn2.
- En ausencia de nucleótido, la constricción producida por la Dyn2 sobre un dNT es suficiente para inducir la fisión de la membrana interna.
- Los andamios de Dyn2 y Drp1 entran en sinergia durante el proceso de fisión de la membrana.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3. Materiales y equipamiento

5.3.1. Fabricación de micropilares y del chip de PDMS

Cubreobjetos 25 mm	Hecht Assistent, Alemania
Lámpara de luz ultra violeta	UV-KUV 2, 4''version, KLÓE, Francia
Resina SU-8 2005	MicroChem Inc, EEUU
Placa calefactora	Fisher Scientific, EEUU
Polidimetilsiloxano (PDMS)	Dow Corp., Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit, EEUU
Adhesivo, PSA	ARcare 8939, Adhesive Research Inc., EEUU
Limpiador de plasma	PDC-002-CE, Harrick Plasma, EEUU
Punzones 0.55 mm diámetro	Harrick Plasma, EEUU
Placas Petri de cristal 45 mm diámetro	Fisher Scientific, EEUU

5.3.2. Formación de moldes lipídicos

Tubos de microcentrífuga	Tubos de cierre seguro, 1.5 mL, Eppendorf, Alemania
Vortex	2x3, Velp Scientifica, Italia
Película de Parafina	Parafilm® M de 4", SPI supplies, EEUU
Microesferas	Microesferas de Óxido de Silicio, $\varnothing=40$ y $5 \mu\text{m}$. Corpuscular Inc, EEUU
Evaporador	vv micro, Heidolph, Alemania
Capilares de borosilicato	GB 150-10, Science Products, Alemania
Limpiador de plasma	PDC-002-CE, Harrick Plasma, EEUU
Cubreobjetos	Cubreobjetos redondos de cuarzo de 0.13-0.16 mm de espesor con un $\varnothing=25$, mm, Ref# 41001125, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs, Alemania.
Gas de Argón comprimido	Alphagaz™, Air Liquide, Francia
Cámara de observación para microscopía	QR-40LP para cubreobjetos circulares de $\varnothing=25$, m+E4:G24m, Warner Instruments, EEUU
Extrusor manual	Lipex Extruder, Transferra, Canadá
Filtro de policarbonato	Filtros de policarbonato de 400 nm, Avanti Lipids, EEUU

Baño termostático	CBN 18-30, Heto-Holten, Alemania
Tubos	24 AWG Thin Wall Tubing Natural, Cole Palmer, Cole-Palmer Instrument Company, EEUU
Conexiones PDMS-tubos	Microfluidic fitting 23G Steel tubing PDMS adapter, Darwin Microfluidics, Francia
Rejillas de microscopía	Quantifoil R2/2 Micromachined Holey Carbon Grids, 400 Mesh Copper, Agar Scientific, Reino Unido
Robot de vitrificación en etano líquido	Leica Automatic Plunge Freezer EM GP2, Alemania
Lípidos	<p>1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 18:1 (Δ^9-cis) PC, DOPC. #850375, Avanti Polar Lipids Inc., EEUU</p> <p>1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 18:1 (Δ^9-Cis) PE, DOPE. #850725, Avanti Polar Lipids Inc., EEUU</p> <p>1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal sódica), 18:1 PS, DOPS. #840035, Avanti Polar Lipids Inc., EEUU</p> <p>Colesterol (Iana de oveja, >98%), Chol. #700000, Avanti Polar Lipids Inc., EEUU</p> <p>L-fosfadilinositol-4,5-bisfosfato (Cerebro, α-fosfadilinositol-4,5-bisfosfato (Cerebro, Porcino). (Sal amonica), PI(4,5)P₂. #840046, Avanti Polar Lipids Inc., EEUU</p>

Cardiolipina (E. coli) (sal sódica,), E.Coli CL. #841199, Avanti Polar Lipids Inc., EEUU

1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Lisamina rodamina B sulfonil) (sal amónica), 18:1 Liss Rhod PE, Rh-DOPE. 810150, Avanti Polar Lipids Inc., EEUU

5.3.3. Proteínas

Los plásmidos y proteínas necesarias para la realización de esta tesis han sido amablemente provistas por:

Plásmidos de Dyn2 y Dyn2-mEGFP: Dr. Sandra L. Schmid, UT Southwestern Medical Centre, Dallas, Texas, Estados Unidos.

Plásmido de Drp1 isof. 3 tag-Drp1 y proteínas Drp1 Isof. 3 tagA y tagB C: Dr. Rajesh Ramachandan, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, Estados Unidos.

Células de insecto SF9	Línea celular de tejido ovárico pupal de <i>Spodoptera frugiperda</i> , # 89070101, Sigma-Aldrich, EEUU
Bacterias	BL21 Star™ (DE3), Life Technologies Inc., EEUU
Inhibidor de proteasas	cOmplete™ Tablets EASYpack #04693116001, Roche, Suiza
Rotor de ultracentrífuga	Rotor Ti70, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc, EEUU
Sonicador	Soniprep 150, MSE, Reino Unido

Ultracentrifuga	Ultra Optima L90K Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc, EEUU
Centrifuga de sobremesa	Heraeus™ Biofuge™ Stratos, Thermo Fisher Scientific, EEUU
Microesferas GST	Pierce™ Glutathione Magnetic Agarose Microesferas, ThermoFisher Scientific Inc, EEUU
Agitador-calentador magnético	ARE, Velp Scientifica, Italia
Columna cromatografía por gravedad	Columnas Econo-Pac®, Bio-rad, Bio-Rad Laboratories, Inc, EEUU
Columna cromatografía por gravedad	DEAE–Sepharose® Fast Flow, GE Healthcare, EEUU
Resina de níquel	HisPur Ni-NTA, Thermo Scientific™, EEUU
Proteínas	Dinamina 2
	Drp1 isoforma 3
	Drp1-tagA*
	Drp1-tagB**

*Secuencia de aminoácidos del tagA: *ADPLEVLFQGPKLAAALEHHHHHH*

** Secuencia de aminoácidos del tagB: *ADPLEVLFQ*

5.3.4. Tampones y soluciones de trabajo

Cloruro Potásico, KCl	#P9333, SigmaUltra, Sigma-Aldrich, EEUU
Cloruro Sódico, NaCl	#S7653, SigmaUltra, Sigma-Aldrich, EEUU
HEPES 1M pH 7.3	#BP299 Fisher Bio reagents, Thermo Fisher Scientific, EEUU
Ácido Etilenodiaminatetraacético	EDTA 0,5M, pH 8,0 #03690, Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido Etilenoglicoltetraacético, EGTA	#E3889, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
1,4-Dithiothreitol, DTT	#GE17-1318-01, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
Tris(2-carboxietil) clorhidrato de fosfina, TCEP	#C4706-2G, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
Dimetilsulfóxido , DMSO	#472301, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
Cloruro Magnésico, MgCl ₂	#63069, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
Cloruro Cálculo, CaCl ₂	#21115, Reino Unido Analytical, Sigma-Aldrich, EEUU
Sacarosa	#84097, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
D-(+)-Trehalosa dihidratada	#T9449, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU

Albúmina de suero bovino (BSA)	#10829410, Thermo Scientific, EEUU
4-(2-Aminoetil) benceno sulfonil fluoruro hidroclorehídrico, AEBSF	#A8456, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido clorhídrico, HCl Solución 4N (4M) en 1,4-Dioxano/agua	#10140902 ACROS Organics™, Thermo Scientific, EEUU

Para los ensayos sin proteína, se usó la solución de trabajo:

KCl 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 1 mM

Para los ensayos con proteína sin la presencia de nucleótido, se usó la solución de trabajo:

KCl 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 2mM, pH 7.3

Para los ensayos con proteína y alguno de los nucleótidos, se usó la solución de trabajo:

KCl 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 1 mM , MgCl₂ 2mM (,pH 7.3)+ GTP o GMP-PCP 1mM

Para la visualización de NTs y Dyn2 en crioEM, se usó la solución de trabajo:

KCl 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 2mM (pH 7.3) + 1% TRH (v/v)

5.3.5. Disolventes orgánicos y detergentes

Cloroformo ≥99,9%	#366927, Sigma-Aldrich, EEUU
Metanol ≥99,8%	NORMAPUR #20847, Normapur, VWR, EEUU
Etanol ≥99,5%	#100983, EMSURE, Merk Millipore, EEUU
Isopropanol ≥99,5%	#190764, Sigma-Aldrich, EEUU
Acetona ≥99,7%	#635680, Sigma-Aldrich, EEUU
Decon™ Neutracon	#10253710, Fisher Scientific, EEUU

5.3.6. Marcaje de la Drp1

Janelia Fluor® 646, Maleimida	Tocris Bioscience™, Fisher Scientific, EEUU
Dimetilsulfóxido, DMSO	#472301, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU

Tris(2-carboxietil) clorhidrato de fosfina, TCEP	#C4706-2G, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
Solución de diálisis	KCL 150 mM, HEPES 20mM, EDTA 1mM (pH 7.3)

5.3.7. Nucleótidos

Guanosina 5'- trifosfato, sal de litio, Li GTP	#G5884, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU
β,γ -Metilenoguanosina 5'- trifosfato, sal de sodio, GMPPCP	#M3509, Sigma, Sigma-Aldrich, EEUU

5.3.8. Microscopía

Microscopio invertido Eclipse Ti-E, Nikon, Japon

Lente	CFI S Plan Fluor ELWD 40X (NA=0.60), Nikon, Japón
Lente	CFI Apo TIRF 100X Aceite (NA=1.49), Nikon, Japón
Cámara	Zyla 4.2 sCMOS, Andor, Oxford Instruments, Reino Unido

Lámpara de fluorescencia	pE-4000, Cooled, Reino Unido
Filtro de fluorescencia (FITC)	485/505 ex/em, Semrock, EEUU
Filtro de fluorescencia (TRITC)	560/585 ex/em, Semrock, EEUU
Filtro de fluorescencia (Cy5)	649/662 ex/em, Semrock, EEUU
Ordenador personal	Dell Inc., EEUU
Mesa óptica	Newport, EEUU

Microscopio invertido IX-71, Olympus, Japon

Lente	LUCPlan FL N 40X/0,60(NA=0,60), Olympus, Japón
Lente	UAp 150X/1,45 aceite TIRFM (NA=1,45), Olympus, Japón
Cámara	iXon EM+, Andor, Ireland
Lámpara de fluorescencia	Series 120PC Q, X-Cite, Lumen dynamics, EEUU
Filtro de fluorescencia (FITC)	485/505 ex/em, Semrock, EEUU

Filtro de fluorescencia (TRITC)	560/585 ex/em, Semrock, EEUU
Filtro de fluorescencia (Cy5)	649/662 ex/em, Semrock, EEUU
Ordenador personal	Dell Inc., EEUU
Mesa óptica	Newport, EEUU

Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2200FS-CR (200 kV)

Cámara	UltraScan 4000 SP (4008 x 4008 pixels) cooled slow-scan CCD, modelo 895, US4000, GATAN, EEUU
<i>Software</i>	JEM-toolbox, TEMography.com
Sistema de recubrimiento de alto vacío para evaporación de carbón y descarga luminiscente	MED 020, BALTEC, Suiza
Ordenador personal	Dell Inc., EEUU

5.3.9. Softwares de uso general

μManager ¹⁸⁹	Version 1.4, μManager, NIH, EEUU
Image J ¹⁷³	64 bit, versión 1.50n, NIH, EEUU
Origin 8	SR4, OriginLab Inc., EEUU

5.3.10. Otro equipamiento

Baño sonicador	FB15049, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, EEUU
Balanza	CP32025, Sartorius, Alemania
Balanza	ME36S-OCE, Sartorius, Alemania
Tiras de papel para PH	Macherey-Nagel, Alemania
Mini centrífuga	2507/11, Nahita, Auxilab, España
Sistema de purificación de agua	Ultrapure Direct-Q® 3 UV, Merck-Millipore, Alemania
Micropipetas	0,1-2, 2-20, 20-200, 100-1000 μL, Discovery Comfort, HTL, Alemania
Lector de placas	Synergy HT, BioTek Instruments Inc., EEUU
Ultracentrífuga	Optima™ L-90 K BioSafe Centrifuge System, BeckmanCoulter, EEUU.
Rotor de ultracentrífuga	Ti70, BeckmanCoulter, EEUU.

Osmómetro	Cryoscopic osmometer, Osmomat 300, Gonotec, Alemania.
Filtros jeringas	Filtros de 0.2 µM, Corning™, Fisher Scientific, EEUU
Placas Petri redondas transparentes,	90 mm diámetro. Fisher Scientific, EEUU
Columnas desaladoras por centrifugación	ThermoFisher Scientific Inc., EEUU
Concentradores de Proteína	Filtros de centrifugación, Amicon Ultra -0,5ml, Merk-Millipore, Alemania.
Geles de electroforesis SDS-PAGE	Geles Precise para proteínas de 4-20%, Thermo-Scientific, EEUU.
Kit de medición de concentración de proteína	BCA, ThermoFisher Scientific Inc., EEUU.

5.3.11. Software

µManager ¹⁸⁹	Version 1.4, µManager, NIH, EEUU
Image J ¹⁷³	64, 1.50n, NIH, EEUU
Origin 8	SR4, OriginLab Inc., EEUU
WinCoot 0.9.4.1 ¹⁹⁰	Medical Research Council, Reino Unido
PyMol	DeLano Scientific LLC, EEUU

5.4. Métodos

5.4.1. Fabricación del sistema microfluídico

5.4.1.1. Fabricación de los micropilares de SU-8

Los micropilares fueron fabricados con SU-82005 (SU-8) sobre un cubreobjetos de cuarzo *Nº1*, con un espesor de 0.13-0.16 mm, haciendo uso de la fotolitografía. Para ello:

1. Se diseñó una fotomáscara con AutoCAD que contenía tres columnas paralelas de micropilares de 15 μm de diámetro. Dentro de cada columna se diseñaron 4 zonas distintas de separación entre los micropilares: 10, 20, 30 y 40 μm .
2. Los cubreobjetos sobre los que se iban a fabricar los micropilares se lavaron con una serie de isopropanol, etanol y metanol y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se deshidrataron calentándolos a 240 °C durante 15 min.
3. Los cubreobjetos se colocaron uno a uno en un revestidor giratorio (*spin coater*). Una vez que el revestidor se puso en movimiento, se depositó una gota de 100 μL de SU-8 sobre el cubreobjetos. El programa usado en el revestidor giratorio para la correcta distribución del SU-8 sobre el cubreobjetos consistía en 4 pasos consecutivos:
 - i. 100 rpm/s durante 20 segundos
 - ii. 100 rpm/s durante 30 segundos
 - iii. 500 rpm/s durante 60 segundos
 - iv. 500 rpm/s durante 20 segundos

4. Se aumentó la adhesión entre la resina y cubreobjetos mediante un horneado suave con rampas de calor en una placa calefactora de precisión en 4 pasos:

- i. 30 °C, 1 minuto
- ii. 64 °C, 4 minutos
- iii. 93 °C, 7 minutos
- iv. Enfriamiento hasta $\leq 40^\circ$

5. Polimerización del patrón con luz ultravioleta (UV) (365 nm). Para ello, los cubreobjetos se colocaron sobre la fotomáscara con el patrón de micropilares diseñado, y se expusieron a pulsos de luz UV en 4 pulsos (5 segundos encendido + 60 segundos apagado, potencia al 20%, 5 mJ s^{-1}).

6. La polimerización final de la resina se consiguió con rampas de calor, colocando los cubreobjetos sobre una placa calefactora. Esta vez se aplicó:

- i. 64 °C, 1 minuto
- ii. 93 °C, 3 minutos
- iii. Enfriamiento hasta $\leq 40^\circ\text{C}$.

7. Los cubreobjetos se sumergieron en un revelador, suministrado por el fabricante, y se agitaron durante 3 min. Se repitió el proceso, sumergiendo las muestras en isopropanol. Se secó con nitrógeno y se realizó un abundante lavado con agua Milli-Q. Si quedaban impurezas en las muestras, estas se lavaron repetidamente con isopropanol.

La altura de los micropilares de SU-8 se confirmó por perfilometría óptica ($4.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ($n = 10$)) y por microscopía electrónica de barrido.

5.4.1.2. Fabricación de la cubierta de PDMS

Para tener un sistema con control de flujo, se diseñó una cubierta de PDMS la cual queda alineada con los tres canales de micropilares previamente generados sobre el cubreobjetos. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

1. Se diseñaron tres canales idénticos, cada uno de 8 mm de longitud y 2 mm de ancho, haciendo uso del software CleWin. El diseño de los canales fue transferido al adhesivo PSA, de 127 μm de espesor. El PSA se pegó a una placa Petri de vidrio de 90 mm de diámetro.
2. Se preparó PDMS mediante la mezcla de elastómero y agente de curado en una proporción 10:1. El PDMS se degasificó usando una bomba de vacío. El PDMS fue vertido sobre la placa Petri con las pegatinas de PSA, hasta llegar a los 2 cm de altura. Se volvió a degasificar todo para eliminar las posibles burbujas de aire formadas durante la transferencia de PDMS a la placa. El PDMS se polimerizó mediante su incubación a 60 °C durante 40 min.
3. Una vez polimerizado, el PDMS se recortó acorde a las dimensiones de la cámara de observación de microscopía y se despegó de la superficie de la placa Petri. En este punto es importante notar que el patrón de los 3 canales debe estar situado en el centro del PDMS recortado para poder coincidir con las tres columnas de micropilares de SU-8 del cubreobjetos.
4. Los extremos de los canales en el PDMS se perforaron con un punzón de 0.55 mm para formar los puertos de entrada y salida de cada canal microfluídico.
5. El PDMS se lavó con etanol puro y agua, para limpiar las posibles impurezas en su superficie. Seguidamente, se secó con N_2 gas.

5.4.1.3. Montaje y preparación final del chip microfluídico

Una vez que se fabricaron los micropilares de SU-8 y la cubierta de PDMS, ambas partes se unieron para formar el canal microfluídico. Para ello:

1. Se activó la superficie del cubreobjetos con plasma de aire durante 15 s.
2. Se colocó el cubreobjetos sobre una cartulina con fondo negro para facilitar la visualización de las columnas de micropilares. El patrón de los canales de la cubierta de PDMS se alineó con las columnas de micropilares y se unieron haciendo una ligera presión con los dedos, teniendo cuidado de no romper el cubreobjetos. La adhesión de PDMS al cubreobjetos de cuarzo previamente activado con plasma se produce de forma espontánea debido a la atracción electrostática del PDMS por el cristal activado.
3. Se realizaron las conexiones fluídicas al canal. Para ello, se acopló un tubo Tygon con un diámetro externo de 0.5 mm al puerto de salida perforado en el PDMS. El otro extremo del tubo se conectó a una jeringa tipo Hamilton de 20 μ L.
4. Antes de la formación de los NTs, la superficie del canal ha de ser pasivada para evitar la interacción inespecífica con las membranas lipídicas. Para ello, se usó una solución de albúmina de suero bovino con una concentración de 0.2 g/L, que fue introducida en el canal microfluídico. Tras una incubación de 15 minutos, la albumina se lavó perfusionando el canal con un volumen de 100 μ L de la solución tampón de trabajo.

5.4.2. Generación de membranas modelo

5.4.2.1. Formación de Vesículas Multilamelares

Las vesículas multilamelares (MLVs, del inglés *Multi Lamellar Vesicles*) son el material de partida para la elaboración de todas las plantillas lipídicas usadas en este trabajo de tesis. Las MLVs se prepararon en un vial de 1.5 mL siguiendo el siguiente protocolo:

1. Los stock lipídicos en cloroformo (a excepción del PI(4,5)P₂, que está disuelto en cloroformo:metanol:agua 20:90:1 (vol/vol) se mezclaron según las cantidades indicadas en la tabla 2.1.

2. El cloroformo (o la mezcla cloroformo:metanol:agua para el caso de las composiciones con PI(4,5)P₂) se evaporó durante al menos 20 minutos usando un desecador conectado a una bomba de vacío.
3. La película lipídica resultante tras la evaporación del disolvente se rehidrató usando agua Milli-Q tamponada a pH 7.0 con 1 mM HEPES. El volumen de esta solución se eligió para obtener la concentración lipídica total según la indicada en la Tabla 5.1 (pág. 91).
4. Para asegurar la completa hidratación de las lamelas y el desprendimiento de la película lipídica de las paredes del vial, éste se sometió a un vortexeado intenso durante 3 minutos, obteniéndose la disolución de MLVs final.

ENSAYO	MOLDE	COMPOSICIÓN LIPÍDICA	[] g/L
Generación de NTs mediante el sistema microfluídico	NTs, SLBs	DOPC:RhPE (99:1 %mol)	1
		DOPC:RhPE (99:1 %mol)	2
Ensayo de constricción-fisión por Dyn1	NTs, SLBs	DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P ₂ :RhPE (46:30:10:10:3:1 %mol)	1
Prueba de concepto mediante la fisión de NTs por aumento de presión osmótica	NTs, SLBs	DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P ₂ :RhPE (46:30:10:10:3:1 %mol)	1
Ensayos de constricción con Drp1	NTs, SLBS	DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P ₂ :RhPE (46:30:10:10:3:1 %mol) DOPC:CL:RhPE (74:25:1 %mol) DOPC:DOPE:CL (39:35:25:1 %mol)	1
Ensayos de constricción-fisión con Drp1-tagA y Drp1-tagB	NTs, SLBs	DOPC:DOPE:CL:RhPE 39:35:25:1 %mol	1
Ensayos GTPasa Drp1, Drp1-tagA y Drp1-tagB	LUVs	DOPC:CL:RhPE (74:25:1 %mol)	1
Ensayos de constricción-fisión con Dyn2	NTs, SLBs	DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P ₂ :RhPE (46:30:10:10:3:1 %mol) DOPC:CL:RhPE (74:25:1 %mol)	1
Generación de NTs para crioEM	NTs	DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P ₂ :RhPE (46:30:10:10:3:1 %mol)	1

Tabla 5.1. Composiciones lipídicas usadas según tipología del molde lipídico y experimento. Las SLBs fueron usadas para obtener la constante de calibración (*K*) en los experimentos donde fue necesario calcular el radio. Todos los moldes fueron generados a partir de MLVs.

5.4.2.2. Formación de LUVs

Para formar Vesículas Grandes Unilamelares (LUVs, del inglés *Large Unilamellar Vesicles*) de 400 nm se siguió el siguiente protocolo:

1. Pasos 1-4 del protocolo de formación de MLVs.
2. Las MLVs se sometieron a 10 ciclos de congelación (en nitrógeno líquido) y descongelación (en un baño de agua a 35 °C). Este proceso favoreció la formación de vesículas unilamelares de diferentes tamaños.
3. Finalmente, las vesículas se sometieron a 10 extrusiones a través de un filtro de policarbonato de 400 nm, usando un extractor manual.

5.4.2.3. Formación de GSBs

Los GSBs se formaron según el protocolo publicado previamente¹⁹⁰. De forma resumida:

1. El fondo de una placa Petri de 90 mm de diámetro se cubrió con una película de Parafina. El uso de la película de Parafilm® presenta varias ventajas, ya que su superficie interna está libre de impurezas, es transparente y además es de fácil manejo.
1. 10 µL de la solución de MLVs se dividieron en 5 gotas de 2 µL cada una que se depositaron sobre la superficie de Parafina.
2. A cada gota se le añadieron microesferas de sílice (aproximadamente 1 µL de microesferas fué repartido entre las 5 gotas). El tamaño de las microesferas con las que se han desarrollado la mayoría de los experimentos de esta tesis es de 40 µm de diámetro.
3. La mezcla de gotas de la solución de MLVs con las microesferas se secó al vacío durante 15-30 minutos, de modo que una película lipídica multilaminar se formó sobre la superficie de las microesferas.
4. Una punta de pipeta de 10 µL se acortó desde su extremo estrecho 1/3 de su tamaño original. La punta se usó para coger 6 µL del tampón de hidratación, en

- este caso, trehalosa 1 M. A continuación, la punta se quitó con cuidado de la micropipeta.
5. Una micropipeta de patchclamp de borosilicato se cerró por la punta aplicando calor. Esta micropipeta cerrada se usó para raspar la cantidad deseada de microesferas cubiertas con las películas lipídicas. El extremo de la micropipeta que contenía los beads se introdujo por el extremo ancho de la pipeta precortada del paso 4. Al entrar en contacto con la superficie del tampón que contenía la punta, las microesferas cayeron hacia el extremo inferior por gravedad, iniciándose así la hidratación de las lamelas lipídicas.
 6. La punta con las microesferas se introdujo en una cámara de humedad de fabricación casera y la hidratación de las lamelas prosiguió a 60°, durante 15 minutos.
 7. Durante la hidratación de las lamelas, según lo indicado en el paso 6, se prosiguió a preparar el cubreobjetos para la visualización de las GSBs en el microscopio. Para ello, el cubreobjetos fue sonicado en etanol durante 1 minuto y lavado 3-4 veces en agua Milli-Q para eliminar posibles residuos de etanol. Seguidamente, la superficie del cubreobjetos se pasivó con 100-200 μL de una solución de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) 0.2 g/L que se dejó incubar durante 20 min. Tras la incubación, el cubreobjetos se lavó con agua Milli-Q. Tras colocar el cubreobjetos en la cámara de observación de microscopía, se añadieron aproximadamente 500 μL de la solución de trabajo.
 8. Una vez se terminó la incubación de las microesferas con 1 M trehalosa, la punta se puso en contacto breve con la superficie de la solución de trabajo de la cámara de observación de microscopía. Las GSBs se formaron por el choque osmótico originado por la diferente osmolaridad de la solución de trabajo y la solución de hidratación. Es recomendable dejar estabilizar el sistema durante 10 minutos antes de comenzar la observación por microscopía óptica.

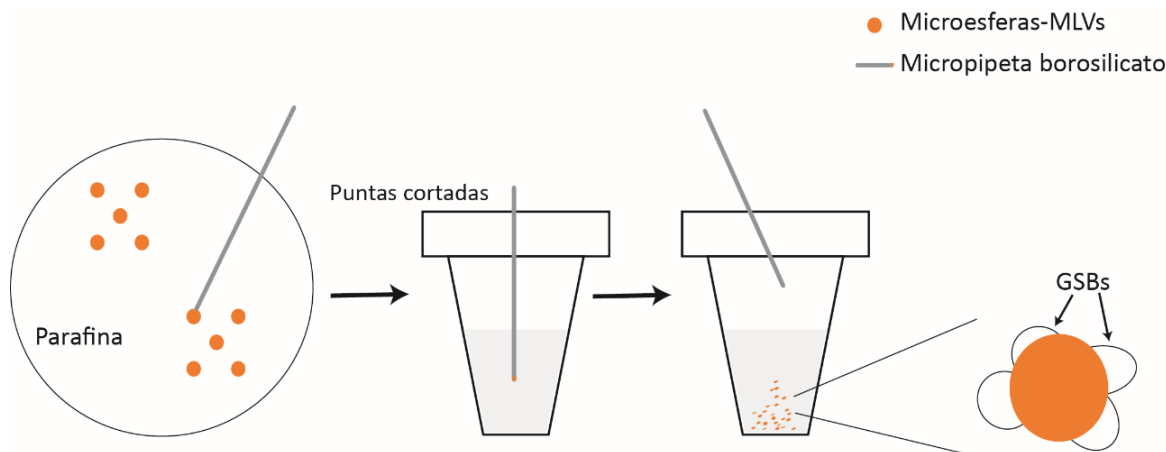


Figura 5.1. Generación de GSBs a través de microesferas conjugadas con MLVs.

Este protocolo se puede modificar para obtener las más conocidas vesículas gigantes (GUVs, del inglés *Giant Unilamellar Vesicles*) según ha sido previamente descrito en la Ref.⁴.

5.4.2.4. Formación de parches lipídicos soportados

Para formar parches lipídicos soportados (SLBs, del inglés *Supported Lipid Bilayers*), se siguió el mismo protocolo que para la formación de los GSBs hasta el paso 6. A continuación, el protocolo se modificó de la siguiente forma:

1. Un cubreobjetos se sonicó en etanol durante 1 minuto y se lavó con agua Milli-Q para eliminar restos de etanol. Tras un secado con N_2 gas, el cubreobjetos se sometió a un tratamiento de plasma por aire durante 30 segundos para dejar la superficie del mismo hidrófila y libre de trazas orgánicas. Tras colocar el cubreobjetos en la cámara de observación de microscopía, se añadieron aproximadamente 500 μ L de la solución de trabajo.
2. Las microesferas con lamelas lipídicas previamente hidratadas se introducen en la cámara de observación tocando brevemente la superficie de la solución de trabajo con la punta que contiene las microesferas.

3. Se incubó durante 5 min, para favorecer la extensión del lípido sobre el cubreobjetos, que es atraído por la superficie hidrófila y cargada el cubreobjetos tratado con plasma.
4. Seguidamente, se realizan 3 lavados con la solución de trabajo para expulsar las microesferas del cubreobjetos y favorecer la eliminación de multicapas de los parches lipídicos. El cubreobjetos aparecerá ampliamente cubierto por parches lipídicos, listos para su visualización por microscopía de fluorescencia.

Cabe mencionar que se puede tomar ventaja del protocolo de formación de GUVs para la formación de parches lipídicos. Si estos son depositados sobre un cubreobjetos sin bloquear, los GUVs se estamparán sobre el cubreobjetos, formando un parche con un tamaño proporcional al del GUV del que se forma. Para seguir este método de formación, es recomendable realizar una incubación de mayor duración en la cámara de humedad (paso 6 del protocolo de formación de GSBs (2.2.2)), lo que favorecerá que los GUVs obtenidos sean de un mayor tamaño, por lo que, el parche lipídico que se formará a partir de él, también lo sea.

5.4.2.5. Generación de NTs soportados entre micropilares

Los NTs fueron generados en la celda microfluídica montada con el cubreobjetos con el patrón de SU8. Para ello, se siguieron los siguientes pasos.

1. Tras el montaje y preparación del chip microfluídico (2.1.3), los canales se llenaron con la solución de trabajo y el sistema montado se colocó en una cámara de observación, encima de la mesilla del microscopio invertido.
2. El canal seleccionado para el experimento se conectó por su puerto de salida a una jeringa Hamilton mediante un tubo Tygon. La jeringa, a su vez, fue conectada a una bomba de jeringa.

3. Se aplicó una pequeña presión positiva con la bomba de jeringa para hacer ascender un poco de la solución de trabajo por encima del puerto de entrada del canal microfluídico.
4. Se siguieron los pasos 1-4 del protocolo de formación de GSBs (2.2.3).
5. Una cantidad mínima de microesferas cubiertas con lípido se raspó desde la parafina con la ayuda de la micropipeta de borosilicato cerrada, y se depositó dentro de la gota remanente del puerto de entrada del chip microfluídico, facilitando su entrada al canal.

Los NTs se formaron aplicando una presión negativa con la bomba de jeringa o por volcado del sistema, tal y como se discute en la sección de resultados (3.1). En el caso del empleo de la presión negativa con bomba de jeringa, antes de poner la bomba en marcha se añadieron 10 μL de la solución de trabajo encima de la gota ya existente en el puerto de entrada del canal microfluídico, para evitar así la formación de burbujas de aire.

5.4.2.6. Generación de NTs para su visualización por crioEM

Para generar NTs sobre rejillas de microscopía electrónica aptas para la crioEM, se prosiguió de la siguiente forma:

1. Pasos 1-4 del protocolo de formación de GSBs (2.2.3).
2. Una rejilla con carbono perforado (*holey grid*) se sometió a un tratamiento por plasma de aire de 1 minuto a 9 mA y 0.35 mbar.
3. La rejilla, sujeta por pinzas de precisión, se dispuso de manera horizontal sobre la superficie de trabajo.
4. Una gota de 2-5 μL de la solución de trabajo con un 1% trehalosa (V/V) se pipeteó con cuidado sobre la rejilla.
5. Las microesferas cubiertas por lípido (paso 4, apartado 2.2.3) se introdujeron dentro de la gota de solución de trabajo sobre la rejilla haciendo uso de la micropipeta de borosilicato como en el paso 5, apartado 2.2.3.

6. Con la ayuda de las pinzas de precisión, la rejilla se inclinó aleatoriamente, de manera que las microesferas rodaron por su superficie, formándose los NTs.
7. La rejilla se colocó verticalmente, y su extremo fue introducido en una gota de la solución de trabajo, previamente depositada sobre un trozo de Parafina®. Las microesferas, por gravedad, se transfirieron a la gota inferior, dejando la rejilla libre de microesferas.
8. La rejilla fue colocada en el robot de vitrificación, y se llevó a cabo el secado y la vitrificación en etano líquido de la muestra.

En los experimentos en los que se usa la Dyn2, 0.5 μM de proteína fueron añadidos entre los pasos 5 y 6. Una incubación de 10 minutos de los NTs y la Dyn2 basta para observar el andamiaje proteico sobre los NTs.

La vitrificación y la observación de las muestras fue llevada a cabo en la plataforma de microscopía electrónica de CIC bioGUNE. Para la observación, se usó el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM2200FS.

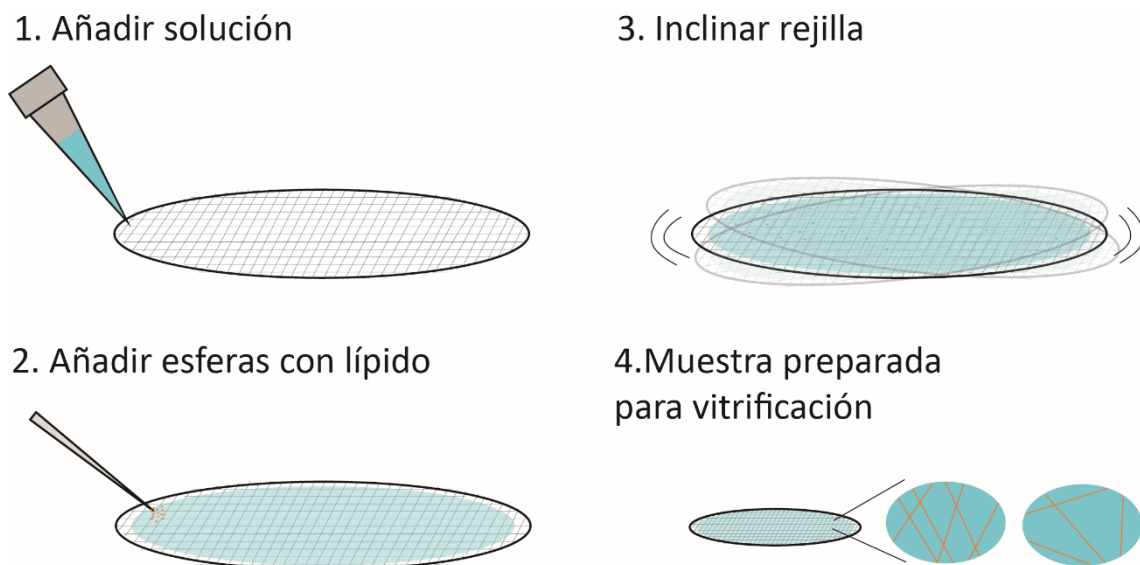


Figura 5.2. Representación esquemática de la obtención de NTs en una rejilla con agujeros de carbono para su visualización por crioelectromicroscopía, tras su vitrificación.

5.4.3. Proteínas

5.4.3.1. Purificación de proteínas

Para la purificación de Dyn2 y Dyn2-mEGFP, se transfectaron células de insecto con sendos plásmidos. Ambas fueron purificadas por cromatografía de afinidad, siguiendo los protocolos de Neuman y colaboradores y Stowel colaboradores^{117,191}, respectivamente. En el caso de tag-Drp1, la proteína se expresó en *E. Coli* BL21. La purificación fue llevada a cabo por cromatografía de afinidad siguiendo el protocolo de McDonald y colaboradores⁷⁷.

5.4.3.2. Medida de la concentración de proteína

La concentración de las proteínas se midió inmediatamente tras su diálisis en la solución de trabajo y en el momento previo a realizar los diferentes ensayos, para asegurar una medición más precisa. La medición se realizó por cuantificación colorimétrica, haciendo uso del kit PierceTM BCA, con una curva estándar con albumina de suero bovino. Tanto los estándares como las muestras de proteínas se midieron en un lector de placas a una longitud de onda de emisión de 562 nm, siguiendo el protocolo del fabricante.

5.4.3.3. Determinación de la actividad GTPasa

Se realizó un ensayo para determinar la actividad GTPasa de las diferentes Drp1 y comprobar así si la localización de las etiquetas usadas durante la purificación le afectaba.

La actividad GTPasa basal y estimulada en LUVs de 400 nm de las diferentes Drp1 (tag-Drp1, Drp1-tagA y Drp1-tagB) se cuantificó usando verde Malaquita, con el que se

mide el fosfato (Pi) libre en la reacción, como se ha descrito por Leonard y colaboradores⁹. El ensayo se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos, en la que se incluye una serie de concentraciones de Pi libre conocidas (0-100 μ M) para generar una recta patrón. Cada condición se realiza por triplicado. Los pasos seguidos para medir la actividad GTPasa fueron:

1. Para medir la actividad GTPasa estimulada, se incubó durante 30 minutos a 37 °C 1 μ M de Drp1 en presencia de 150 μ M de LUVs de 400 nm. Para medir la actividad basal se procedió del mismo modo, pero en ausencia de LUVs. Esta reacción se llevó a cabo por triplicado en una placa de 96 pocillos.
2. Se añadió 1 mM de GTP a ambas condiciones y se incubó 1 h a 37 °C.
3. Para parar la reacción, se añadieron 100 mM de EDTA a cada pocillo con la reacción.
4. Finalmente, a cada pocillo se añadió 150 μ L de verde Malaquita, y se midió la absorbancia a 650 nm en un lector de placas.

5.4.3.4. Marcaje químico de la Drp1

El marcaje químico de la Drp1 para los experimentos de colocación se basó en trabajos previos de Ramachandran y colaboradores⁹⁷. Se siguieron los siguientes pasos concretos:

1. Se dializó la proteína contra la solución de trabajo, para eliminar el DTT, el cual se encuentra en el tampón de purificación.
2. Se procedió a la ruptura de puentes disulfuro de la proteína mediante la adición de TCEP con un exceso de 10 mol con respecto a la proteína. En este paso es importante ajustar el pH a 7.6, aproximadamente.
3. Se preparó el stock del fluoróforo Janelia 646 a 10-20mM en DMSO. Este se ha de preparar justo antes de añadirlo a la proteína.

4. Se realizó la mezcla de Drp1:Jenalia646 1:10 mol/mol. Se incubó 2 h a temperatura ambiente. El fluoróforo se añadió gota a gota, en condiciones de agitación constante.
5. Diálisis ON a 4 °C contra la solución de trabajo (pH 7.3) para eliminar el fluoróforo sobrante.

5.4.3.5. Generación del modelo de la estructura de Drp1-tagA y Drp1-tagB

Ya que las etiquetas añadidas en la estructura de las proteínas Drp1-tagA y Drp1-tagB podrían interaccionar con algún dominio de la estructura, modificando su función real, decidimos modelar sendas etiquetas, para ver donde quedaban localizadas. Para ello, partimos de la estructura cristalizada por Fröhlich y colaboradores en 2013¹⁹². Haciendo uso del *software* Coot¹⁹⁰, añadimos los residuos al terminal C de Drp1.

Etiqueta para Drp1-tagA: *ADPLEVLFQGPKLAAALEHHHHHH*

Etiqueta para Drp1-tagB: *ADPLEVLFQ*

Coot realiza una predicción de la estructura y la orientación de los residuos basándose en los principios de Ramachandran¹⁹³. Además, permite añadir los residuos en un lugar preciso.

5.4.4. Microscopía de fluorescencia

5.4.4.1. Adquisición de imágenes

Para visualizar las muestras y adquirir las imágenes, usamos un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-e, equipado con un objetivo de inmersión en aceite 100x/1.49 y otro de

aire 40x/0.75, una fuente de luz CoolLed pE-4000 y una cámara Andor Zyla sCMOS. El *software* μ Manager¹⁸⁹ se usó para la adquisición de imágenes, las cuales fueron analizadas usando los softwares Fiji¹⁷³ y Origin 8.0. Todas las imágenes fueron adquiridas con 100 ms de exposición, y con la misma intensidad de fluorescencia. Para las membranas dopadas con rodamina (RhPE) se usó el filtro 560/585 ex/em. La Dyn2-mEGFP fue monitorizada con el filtro 485/505 ex/em, mientras que para visualizar a Drp1-Janelia 646 se usó el filtro 649/662 ex/em. La adquisición de imágenes se hizo con un *binning* de 2:2, una intensidad de la lámpara de 6% y un tiempo de exposición de 100 ms.

5.4.4.2. Visualización de NTs y ensayos de constricción-fisión

Los ensayos de ensamblaje de las proteínas en los NTs se llevaron a cabo con una concentración de 0.5 μ M para Dyn1 y Dyn2 y 1 mM para Drp1. Para los ensayos con GMPPCP o GTP, se usó una concentración final de estos de 1 mM. La solución de trabajo usada fue KCl 150 mM, HEPES 10mM y EDTA 1mM (pH 7.3) para los experimentos sin la presencia del nucleótido o KCl 150 mM, HEPES 10mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 2 mM y GTP o GMP-PCP 1mM (pH 7.3). Una vez que se localizaron los NTs de interés, un volumen de proteína se perfusionó por presión negativa a través del canal microfluídico utilizando velocidades mínimas de la bomba de jeringa, para evitar fuerzas externas sobre los NTs. La adquisición de imágenes se llevó a cabo desde el inicio de la perfusión de la proteína.

Para la cuantificación de los radios de los NTs, se adquirieron imágenes de los NTs con un ruido de fondo uniforme y cercanos al plano focal. Cerca del plano focal, la intensidad de fluorescencia permanece constante, lo que permite una correcta cuantificación del radio, aunque los NTs tengan ligeros movimientos. Una vez tomadas las imágenes, se procedió a su análisis haciendo uso del *software* Fiji¹⁷³ según el protocolo descrito en el capítulo 3 (Sección 3.2).

6. BIBLIOGRAFÍA

1. GM, C. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.* (2000).
2. McMahon, H. T. & Gallop, J. L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590–596 (2005).
3. Frolov, V. A., Shnyrova, A. V & Zimmerberg, J. Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004747–a004747 (2011).
4. Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M. M. & Rapoport, T. A. Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 329–354 (2009).
5. Carlton, J. G., Jones, H. & Eggert, U. S. Membrane and organelle dynamics during cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 151–166 (2020).
6. Kuroiwa, T. Mechanisms of organelle division and inheritance and their implications regarding the origin of eukaryotic cells. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **86**, 455–471 (2010).
7. Kaksonen, M. & Roux, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 313–326 (2018).
8. Weidman, P., Roth, R. & Heuser, J. Golgi membrane dynamics imaged by freeze-etch electron microscopy: Views of different membrane coatings involved in tubulation versus vesiculation. *Cell* **75**, 123–133 (1993).
9. Haucke, V. & Kozlov, M. M. Membrane remodeling in clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Sci.* **131**, (2018).
10. Gazaryan, I. G. & Brown, A. M. Intersection between mitochondrial permeability pores and mitochondrial fusion/fission. *Neurochem. Res.* **32**, 917–929 (2007).
11. Zimmerberg, J. & Kozlov, M. M. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 9–19 (2006).
12. Bashkirov, P. V *et al.* GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell* **135**, 1276–1286 (2008).
13. Praefcke, G. J. K. & McMahon, H. T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133–147 (2004).
14. Song, S. *et al.* Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian J. Pharm. Sci.* **14**, 30–39 (2019).
15. Schmid, S. L. & Frolov, V. A. Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 79–105 (2011).
16. Ramachandran, R. & Schmid, S. L. The dynamin superfamily. *Curr. Biol.* **28**,

- R411–R416 (2018).
17. Ge, Y. *et al.* Two forms of Opa1 cooperate to complete fusion of the mitochondrial inner-membrane. *Elife* **9**, e50973 (2020).
 18. Dorn, G. W. 2nd. Mitofusins as mitochondrial anchors and tethers. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **142**, 146–153 (2020).
 19. Kim, K. T. *et al.* Molecular mechanisms of atlastin-mediated ER membrane fusion revealed by a FRET-based single-vesicle fusion assay. *Sci. Rep.* **7**, 8700 (2017).
 20. Nakata, T., Takemura, R. & Hirokawa, N. A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. *J. Cell Sci.* **105**, 1 LP – 5 (1993).
 21. Sontag, J. M. *et al.* Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J. Biol. Chem.* **269**, 4547–4554 (1994).
 22. Antonny, B. *et al.* Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J.* **35**, 2270–2284 (2016).
 23. Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N. & van der Blik, A. M. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* **143**, 351–358 (1998).
 24. Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. & van der Blik, A. M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2245–2256 (2001).
 25. Lee, J. E., Westrate, L. M., Wu, H., Page, C. & Voeltz, G. K. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* **540**, 139–143 (2016).
 26. González-Jamett, A. M. *et al.* Dynamin-2 function and dysfunction along the secretory pathway. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 126 (2013).
 27. Boucrot, E. *et al.* Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* **517**, 460–465 (2015).
 28. Gumpert, A. M., Varco, J. S., Baker, S. M., Piehl, M. & Falk, M. M. Double-membrane gap junction internalization requires the clathrin-mediated endocytic machinery. *FEBS Lett.* **582**, 2887–2892 (2008).
 29. Xiao, D. *et al.* Dynamin 2 interacts with connexin 26 to regulate its degradation and function in gap junction formation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **55**, 288–297 (2014).
 30. Zick, M., Rabl, R. & Reichert, A. S. Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 5–19 (2009).
 31. Mannella, C. A., Marko, M., Penczek, P., Barnard, D. & Frank, J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-

- voltage transmission electron microscope. *Microsc. Res. Tech.* **27**, 278–283 (1994).
32. Walczak, J. *et al.* Mitochondrial Network and Biogenesis in Response to Short and Long-Term Exposure of Human BEAS-2B Cells to Aerosol Extracts from the Tobacco Heating System 2.2. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **54**, 230–251 (2020).
 33. Zamponi, N. *et al.* Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. *Sci. Rep.* **8**, 363 (2018).
 34. Gerencser, A. A. *et al.* Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J. Physiol.* **590**, 2845–2871 (2012).
 35. Valm, A. M. *et al.* Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* **546**, 162–167 (2017).
 36. Simon, V. R., Swayne, T. C. & Pon, L. A. Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J. Cell Biol.* **130**, 345–354 (1995).
 37. Schwarz, T. L. Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
 38. Palikaras, K., Lionaki, E. & Tavernarakis, N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* **20**, 1013–1022 (2018).
 39. Mishra, P. & Chan, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 634–646 (2014).
 40. Adebayo, M., Singh, S., Singh, A. P. & Dasgupta, S. Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *FASEB J.* **35**, e21620 (2021).
 41. Serasinghe, M. N. & Chipuk, J. E. Mitochondrial Fission in Human Diseases. *Handb. Exp. Pharmacol.* **240**, 159–188 (2017).
 42. Ernster, L. & Schatz, G. Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* **91**, 227s–255s (1981).
 43. Ma, Y., Wang, L. & Jia, R. The role of mitochondrial dynamics in human cancers. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 1278–1293 (2020).
 44. Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I. & Oza, A. M. Epithelial ovarian cancer. *Lancet* **393**, 1240–1253 (2019).
 45. Tanwar, D. K. *et al.* Crosstalk between the mitochondrial fission protein, Drp1, and the cell cycle is identified across various cancer types and can impact survival of epithelial ovarian cancer patients. *Oncotarget* **7**, 60021–60037 (2016).
 46. Xie, Q. *et al.* Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells. *Nat. Neurosci.* **18**, 501–510 (2015).

47. Jin, X. *et al.* Dysregulation of INF2-mediated mitochondrial fission in SPOP-mutated prostate cancer. *PLoS Genet.* **13**, e1006748 (2017).
48. Rehman, J. *et al.* Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 2175–2186 (2012).
49. Olichon, A. *et al.* Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis . *J. Biol. Chem.* **278**, 7743–7746 (2003).
50. Lutz, A. K. *et al.* Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J. Biol. Chem.* **284**, 22938–22951 (2009).
51. Song, W., Song, Y., Kincaid, B., Bossy, B. & Bossy-Wetzels, E. Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: neuroprotection by SIRT3 and PGC-1 α . *Neurobiol. Dis.* **51**, 72–81 (2013).
52. Song, W. *et al.* Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat. Med.* **17**, 377–382 (2011).
53. Wang, X. *et al.* Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **29**, 9090–9103 (2009).
54. Bach, D. *et al.* Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* **278**, 17190–17197 (2003).
55. Lavandero, S., Chiong, M., Rothermel, B. A. & Hill, J. A. Autophagy in cardiovascular biology. *J. Clin. Invest.* **125**, 55–64 (2015).
56. Kim, J.-S., He, L. & Lemasters, J. J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 463–470 (2003).
57. Taanman, J.-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1410**, 103–123 (1999).
58. Friedman, J. R. *et al.* ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science (80-.)*. **334**, 358 LP – 362 (2011).
59. Rowland, A. A. & Voeltz, G. K. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 607–625 (2012).
60. Rizzuto, R. *et al.* Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* **280**, 1763–1766 (1998).
61. Wales, P. *et al.* Calcium-mediated actin reset (CaAR) mediates acute cell adaptations. *Elife* **5**, e19850 (2016).
62. Hatch, A. L., Gurel, P. S. & Higgs, H. N. Novel roles for actin in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* **127**, 4549 LP – 4560 (2014).
63. Korobova, F., Ramabhadran, V. & Higgs, H. N. An actin-dependent step in

- mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* **339**, 464–467 (2013).
64. Manor, U. *et al.* A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife* **4**, e08828 (2015).
 65. Yang, C. & Svitkina, T. M. Ultrastructure and dynamics of the actin-myosin II cytoskeleton during mitochondrial fission. *Nat. Cell Biol.* **21**, 603–613 (2019).
 66. Korobova, F., Gauvin, T. J. & Higgs, H. N. A Role for Myosin II in Mammalian Mitochondrial Fission. *Curr. Biol.* **24**, 409–414 (2014).
 67. Pontes, B., Monzo, P. & Gauthier, N. C. Membrane tension: A challenging but universal physical parameter in cell biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **71**, 30–41 (2017).
 68. Francy, C. A., Alvarez, F. J. D., Zhou, L., Ramachandran, R. & Mears, J. A. The mechanoenzymatic core of dynamin-related protein 1 comprises the minimal machinery required for membrane constriction. *J. Biol. Chem.* **290**, 11692–11703 (2015).
 69. Ingerman, E. *et al.* Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* **170**, 1021–1027 (2005).
 70. Koirala, S. *et al.* Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E1342 LP-E1351 (2013).
 71. Osellame, L. D. *et al.* Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* **129**, 2170–2181 (2016).
 72. Losón, O. C., Song, Z., Chen, H. & Chan, D. C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* **24**, 659–667 (2013).
 73. Otera, H. *et al.* Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **191**, 1141–1158 (2010).
 74. Ji, W., Hatch, A. L., Merrill, R. A., Strack, S. & Higgs, H. N. Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *Elife* **4**, e11553 (2015).
 75. Chang, C.-R. & Blackstone, C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1201**, 34–39 (2010).
 76. Bustillo-Zabalbeitia, I. *et al.* Specific Interaction with Cardiolipin Triggers Functional Activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS One* **9**, e102738 (2014).
 77. Macdonald, P. J. *et al.* A dimeric equilibrium intermediate nucleates Drp1 reassembly on mitochondrial membranes for fission. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1905–

- 1915 (2014).
78. Schlame, M. & Haldar, D. Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**, 74–79 (1993).
 79. de Kroon, A. I., Dolis, D., Mayer, A., Lill, R. & de Kruijff, B. Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim. Biophys. Acta* **1325**, 108–116 (1997).
 80. Gebert, N. *et al.* Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome. *Curr. Biol.* **19**, 2133–2139 (2009).
 81. Schafer, B. *et al.* Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2276–2285 (2009).
 82. Gonzalez, F. *et al.* Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J. Cell Biol.* **183**, 681–696 (2008).
 83. Kim, T.-H. *et al.* Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3061–3072 (2004).
 84. Kuwana, T. *et al.* Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**, 331–342 (2002).
 85. Stavru, F., Palmer, A. E., Wang, C., Youle, R. J. & Cossart, P. Atypical mitochondrial fission upon bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16003–16008 (2013).
 86. McLelland, G.-L., Soubannier, V., Chen, C. X., McBride, H. M. & Fon, E. A. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J.* **33**, 282–295 (2014).
 87. Ferguson, S. M. & De Camilli, P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 75–88 (2012).
 88. Doyon, J. B. *et al.* Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **13**, 331–337 (2011).
 89. Cook, T. A., Urrutia, R. & McNiven, M. A. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 644–648 (1994).
 90. Liu, Y.-W. *et al.* Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, E234 LP-E242 (2011).
 91. Schulze, R. J. *et al.* Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *J. Cell Biol.* **203**, 315–326 (2013).
 92. Fonseca, T. B., Sánchez-Guerrero, Á., Milosevic, I. & Raimundo, N. Mitochondrial fission requires DRP1 but not dynamins. *Nature* **570**, E34–E42 (2019).
 93. Couto, P. M. & Caramelo, J. J. Chapter 4 - Glycoprotein folding. in *Molecular*

- Nutrition: Carbohydrates* (ed. Patel, V. B. B. T.-M. N. C.) 59–71 (Academic Press, 2019). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-849886-6.00019-7>.
94. Kamerkar, S. C., Kraus, F., Sharpe, A. J., Pucadyil, T. J. & Ryan, M. T. Dynamin-related protein 1 has membrane constricting and severing abilities sufficient for mitochondrial and peroxisomal fission. *Nat. Commun.* **9**, 5239 (2018).
 95. Reubold, T. F. *et al.* Crystal structure of the GTPase domain of rat dynamin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13093–13098 (2005).
 96. Song, B. D., Yasar, D. & Schmid, S. L. An assembly-incompetent mutant establishes a requirement for dynamin self-assembly in clathrin-mediated endocytosis in vivo. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2243–2252 (2004).
 97. Ramachandran, R. *et al.* The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *EMBO J.* **26**, 559–566 (2007).
 98. Ford, M. G. J., Jenni, S. & Nunnari, J. The crystal structure of dynamin. *Nature* **477**, 561–566 (2011).
 99. Szaszák, M. *et al.* Role of the proline-rich domain of dynamin-2 and its interactions with Src homology 3 domains during endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 21650–21656 (2002).
 100. Achiriloaie, M., Barylko, B. & Albanesi, J. P. Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1410–1415 (1999).
 101. Salim, K. *et al.* Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* **15**, 6241–6250 (1996).
 102. Zheng, J. *et al.* Identification of the Binding Site for Acidic Phospholipids on the PH Domain of Dynamin: Implications for Stimulation of GTPase Activity. *J. Mol. Biol.* **255**, 14–21 (1996).
 103. Ramachandran, R. *et al.* Membrane insertion of the pleckstrin homology domain variable loop 1 is critical for dynamin-catalyzed vesicle scission. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4630–4639 (2009).
 104. Wenger, J. *et al.* Functional Mapping of Human Dynamin-1-Like GTPase Domain Based on X-ray Structure Analyses. *PLoS One* **8**, e71835 (2013).
 105. Macdonald, P. J. *et al.* Distinct Splice Variants of Dynamin-related Protein 1 Differentially Utilize Mitochondrial Fission Factor as an Effector of Cooperative GTPase Activity. *J. Biol. Chem.* **291**, 493–507 (2016).
 106. Liu, J., Kaksonen, M., Drubin, D. G. & Oster, G. Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 10277 LP – 10282 (2006).
 107. Bethoney, K. A., King, M. C., Hinshaw, J. E., Ostap, E. M. & Lemmon, M. A. A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 13359 LP – 13364 (2009).

108. Watt, S. A., Kular, G., Fleming, I. N., Downes, C. P. & Lucocq, J. M. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem. J.* **363**, 657–666 (2002).
109. Rosivatz, E. & Woscholski, R. Removal or masking of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate from the outer mitochondrial membrane causes mitochondrial fragmentation. *Cell. Signal.* **23**, 478–486 (2011).
110. Yu, R. *et al.* MIEF1/2 function as adaptors to recruit Drp1 to mitochondria and regulate the association of Drp1 with Mff. *Sci. Rep.* **7**, 880 (2017).
111. Adachi, Y., Iijima, M. & Sesaki, H. An unstructured loop that is critical for interactions of the stalk domain of Drp1 with saturated phosphatidic acid. *Small GTPases* **9**, 472–479 (2018).
112. Zhang, Y., Gao, X. & Garavito, R. M. Biochemical characterization of human dynamin-like protein 1. *J. Biochem.* **150**, 627–633 (2011).
113. Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P. R. & McMahon, H. T. Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* **9**, 257–263 (1999).
114. Lin, H. C., Barylko, B., Achiriloaie, M. & Albanesi, J. P. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-dependent activation of dynamins I and II lacking the proline/arginine-rich domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 25999–26004 (1997).
115. Ugarte-Urbe, B., Prévost, C., Das, K. K., Bassereau, P. & García-Sáez, A. J. Drp1 polymerization stabilizes curved tubular membranes similar to those of constricted mitochondria. *J. Cell Sci.* **132**, jcs208603 (2019).
116. Sweitzer, S. M. & Hinshaw, J. E. Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation. *Cell* **93**, 1021–1029 (1998).
117. Stowell, M. H. B., Marks, B., Wigge, P. & McMahon, H. T. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* **1**, 27–32 (1999).
118. Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. & De Camilli, P. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* **441**, 528–531 (2006).
119. Tian, A., Capraro, B. R., Esposito, C. & Baumgart, T. Bending stiffness depends on curvature of ternary lipid mixture tubular membranes. *Biophys. J.* **97**, 1636–1646 (2009).
120. Faizi, H. A., Frey, S. L., Steinkühler, J., Dimova, R. & Vlahovska, P. M. Bending rigidity of charged lipid bilayer membranes. *Soft Matter* **15**, 6006–6013 (2019).
121. Shi, Z. & Baumgart, T. Membrane tension and peripheral protein density mediate membrane shape transitions. *Nat. Commun.* **6**, 5974 (2015).
122. Vamparys, L. *et al.* Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys. J.* **104**, 585–593 (2013).

123. Campelo, F., McMahon, H. T. & Kozlov, M. M. The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophys. J.* **95**, 2325–2339 (2008).
124. Pucadyil, T. J. & Schmid, S. L. Real-Time Visualization of Dynamin-Catalyzed Membrane Fission and Vesicle Release. *Cell* **135**, 1263–1275 (2008).
125. Morlot, S. *et al.* Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell* **151**, 619–629 (2012).
126. Shnyrova, A. V *et al.* Geometric Catalysis of Membrane Fission Driven by Flexible Dynamin Rings. *Science (80-.)*. **339**, 1433 LP – 1436 (2013).
127. Mattila, J.-P. *et al.* A hemi-fission intermediate links two mechanistically distinct stages of membrane fission. *Nature* **524**, 109–113 (2015).
128. Montecinos-Franjola, F., Bauer, B. L., Mears, J. A. & Ramachandran, R. GFP fluorescence tagging alters dynamin-related protein 1 oligomerization dynamics and creates disassembly-refractory puncta to mediate mitochondrial fission. *Sci. Rep.* **10**, 14777 (2020).
129. Bashkirov, P. V. *et al.* GTPase Cycle of Dynamin Is Coupled to Membrane Squeeze and Release, Leading to Spontaneous Fission. *Cell* **135**, 1276–1286 (2008).
130. Chernomordik, L. V & Kozlov, M. M. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 175–207 (2003).
131. Chernomordik, L. V & Kozlov, M. M. Membrane Hemifusion: Crossing a Chasm in Two Leaps. *Cell* **123**, 375–382 (2005).
132. Kozlovsky, Y. & Kozlov, M. M. Membrane Fission: Model for Intermediate Structures. *Biophys. J.* **85**, 85–96 (2003).
133. Kozlov, M. M., Leikin, S. L., Chernomordik, L. V, Markin, V. S. & Chizmadzhev, Y. A. Stalk mechanism of vesicle fusion. *Eur. Biophys. J.* **17**, 121–129 (1989).
134. Martinez Galvez, J. M., Garcia-Hernando, M., Benito-Lopez, F., Basabe-Desmonts, L. & Shnyrova, A. V. Microfluidic chip with pillar arrays for controlled production and observation of lipid membrane nanotubes. *Lab Chip* **20**, 2748–2755 (2020).
135. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G. & Cullis, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 55–65 (1985).
136. Francy, C. A., Clinton, R. W., Fröhlich, C., Murphy, C. & Mears, J. A. Cryo-EM Studies of Drp1 Reveal Cardiolipin Interactions that Activate the Helical Oligomer. *Sci. Rep.* **7**, 10744 (2017).
137. Bashkirov, P. V, Chekashkina, K. V, Akimov, S. A., Kuzmin, P. I. & Frolov, V. A. Variation of lipid membrane composition caused by strong bending. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **5**, 205–211 (2011).

138. Karlsson, M. *et al.* Formation of geometrically complex lipid nanotube-vesicle networks of higher-order topologies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11573–11578 (2002).
139. Hurtig, J., Gustafsson, B., Tokarz, M. & Orwar, O. Electrophoretic transport in surfactant nanotube networks wired on microfabricated substrates. *Anal. Chem.* **78**, 5281–5288 (2006).
140. Stepanyants, N., Jeffries, G. D. M., Orwar, O. & Jesorka, A. Radial Sizing of Lipid Nanotubes Using Membrane Displacement Analysis. *Nano Lett.* **12**, 1372–1378 (2012).
141. Prévost, C., Tsai, F.-C., Bassereau, P. & Simunovic, M. Pulling Membrane Nanotubes from Giant Unilamellar Vesicles. *J. Vis. Exp.* (2017) doi:10.3791/56086.
142. Bashkirov, P. V. Membrane nanotubes in the electric field as a model for measurement of mechanical parameters of the lipid bilayer. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **1**, 176–184 (2007).
143. Beltrán-Heredia, E. *et al.* Membrane curvature induces cardiolipin sorting. *Commun. Biol.* **2**, 225 (2019).
144. Bashkirov, P. *et al.* Cholesterol Effect on the Elastic Properties of Unsaturated Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **110**, 369a-370a (2016).
145. Espadas, J. *et al.* Dynamic constriction and fission of endoplasmic reticulum membranes by reticulon. *Nat. Commun.* **10**, 5327 (2019).
146. Dar, S., Kamerkar, S. C. & Pucadyil, T. J. A high-throughput platform for real-time analysis of membrane fission reactions reveals dynamin function. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1588–1596 (2015).
147. Chandler, D. E. & Heuser, J. E. Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick-freezing. *J. Cell Biol.* **86**, 666–674 (1980).
148. Rosenboom, H. & Lindau, M. Exo-endocytosis and closing of the fission pore during endocytosis in single pituitary nerve terminals internally perfused with high calcium concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5267–5271 (1994).
149. Hochmuth, R. M., Mohandas, N. & Blackshear, P. L. J. Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J.* **13**, 747–762 (1973).
150. Kurczyk, M. E., Mellander, L. J., Najafinobar, N. & Cans, A.-S. Composition based strategies for controlling radii in lipid nanotubes. *PLoS One* **9**, e81293–e81293 (2014).
151. Bo, L. & Waugh, R. E. Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles. *Biophys. J.* **55**, 509–517 (1989).
152. Heinrich, V. & Waugh, R. E. A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes. *Ann.*

- Biomed. Eng.* **24**, 595–605 (1996).
153. Cuvelier, D., Derényi, I., Bassereau, P. & Nassoy, P. Coalescence of membrane tethers: experiments, theory, and applications. *Biophys. J.* **88**, 2714–2726 (2005).
 154. Roux, A. *et al.* Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 4141 LP – 4146 (2010).
 155. Karlsson, M. *et al.* Micropipet-Assisted Formation of Microscopic Networks of Unilamellar Lipid Bilayer Nanotubes and Containers. *Langmuir* **17**, 6754–6758 (2001).
 156. Sott, K. *et al.* Micropipet writing technique for production of two-dimensional lipid bilayer nanotube-vesicle networks on functionalized and patterned surfaces. *Langmuir* **19**, 3904–3910 (2003).
 157. Hurtig, J., Karlsson, M. & Orwar, O. Topographic SU-8 Substrates for Immobilization of Three-Dimensional Nanotube–Vesicle Networks. *Langmuir* **20**, 5637–5641 (2004).
 158. Dols-Perez, A. *et al.* Artificial Cell Membranes Interfaced with Optical Tweezers: A Versatile Microfluidics Platform for Nanomanipulation and Mechanical Characterization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 33620–33627 (2019).
 159. Dar, S., Kamerkar, S. C. & Pucadyil, T. J. A high-throughput platform for real-time analysis of membrane fission reactions reveals dynamin function. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1588–1596 (2015).
 160. Dar, S., Kamerkar, S. C. & Pucadyil, T. J. Use of the supported membrane tube assay system for real-time analysis of membrane fission reactions. *Nat. Protoc.* **12**, 390–400 (2017).
 161. Dar, S., Kamerkar, S. C. & Pucadyil, T. J. Use of the supported membrane tube assay system for real-time analysis of membrane fission reactions. *Nat. Protoc.* **12**, 390–400 (2017).
 162. Kulkarni, V. S., Anderson, W. H. & Brown, R. E. Bilayer nanotubes and helical ribbons formed by hydrated galactosylceramides: acyl chain and headgroup effects. *Biophys. J.* **69**, 1976–1986 (1995).
 163. Tao, S. L., Papat, K. C., Norman, J. J. & Desai, T. A. Surface Modification of SU-8 for Enhanced Biofunctionality and Nonfouling Properties. *Langmuir* **24**, 2631–2636 (2008).
 164. Mitri, E. *et al.* SU-8 bonding protocol for the fabrication of microfluidic devices dedicated to FTIR microspectroscopy of live cells. *Lab Chip* **14**, 210–218 (2014).
 165. Shaw, J. M., Gelorme, J. D., LaBianca, N. C., Conley, W. E. & Holmes, S. J. Negative photoresists for optical lithography. *IBM J. Res. Dev.* **41**, 81–94 (1997).
 166. Velasco-Olmo, A., Ormaetxea Gisasola, J., Martinez Galvez, J. M., Vera Lillo, J. & Shnyrova, A. V. Combining patch-clamping and fluorescence microscopy for quantitative reconstitution of cellular membrane processes with Giant

- Suspended Bilayers. *Sci. Rep.* **9**, 7255 (2019).
167. Gracià, R. S., Bezlyepkina, N., Knorr, R. L., Lipowsky, R. & Dimova, R. Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter* **6**, 1472–1482 (2010).
 168. Upadhyaya, A. & Sheetz, M. P. Tension in tubulovesicular networks of Golgi and endoplasmic reticulum membranes. *Biophys. J.* **86**, 2923–2928 (2004).
 169. McIntyre, J. C. & Sleight, R. G. Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry* **30**, 11819–11827 (1991).
 170. Aeffner, S., Reusch, T., Weinhausen, B. & Salditt, T. Energetics of stalk intermediates in membrane fusion are controlled by lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E1609 LP-E1618 (2012).
 171. Murray, D. *et al.* Electrostatic properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides: theory and experiment. *Biophys. J.* **77**, 3176–3188 (1999).
 172. Peitzsch, R. M., Eisenberg, M., Sharp, K. A. & McLaughlin, S. Calculations of the electrostatic potential adjacent to model phospholipid bilayers. *Biophys. J.* **68**, 729–738 (1995).
 173. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
 174. Taupin, C., Dvolaitzky, M. & Sauterey, C. Osmotic pressure-induced pores in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **14**, 4771–4775 (1975).
 175. Alam Shibly, S. U., Ghatak, C., Sayem Karal, M. A., Moniruzzaman, M. & Yamazaki, M. Experimental Estimation of Membrane Tension Induced by Osmotic Pressure. *Biophys. J.* **111**, 2190–2201 (2016).
 176. Koslov, M. M. & Markin, V. S. A theory of osmotic lysis of lipid vesicles. *J. Theor. Biol.* **109**, 17–39 (1984).
 177. Hed, G. & Safran, S. A. Initiation and Dynamics of Hemifusion in Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **85**, 381–389 (2003).
 178. Warner, J. M. & O’Shaughnessy, B. Evolution of the hemifused intermediate on the pathway to membrane fusion. *Biophys. J.* **103**, 689–701 (2012).
 179. Comte, J., Maïsterrena, B. & Gautheron, D. C. Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **419**, 271–284 (1976).
 180. Ardail, D. *et al.* Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* **265**, 18797–18802 (1990).
 181. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways.
 182. Lu, B. *et al.* Steric interference from intrinsically disordered regions controls dynamin-related protein 1 self-assembly during mitochondrial fission. *Sci. Rep.*

- 8**, 10879 (2018).
183. Mears, J. A. *et al.* Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 20–26 (2011).
 184. Shnyrova, A. V. *et al.* Geometric catalysis of membrane fission driven by flexible dynamin rings. *Science (80-.)*. **339**, 1433–1436 (2013).
 185. Chappie, J. S. *et al.* A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell* **147**, 209–222 (2011).
 186. Chappie, J. S. *et al.* An intramolecular signaling element that modulates dynamin function in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3561–3571 (2009).
 187. Kong, L. *et al.* Cryo-EM of the dynamin polymer assembled on lipid membrane. *Nature* **560**, 258–262 (2018).
 188. Uo, T. *et al.* Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. *Exp. Neurol.* **218**, 274–285 (2009).
 189. Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R. & Stuurman, N. Computer control of microscopes using μ Manager. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 14**, Unit14.20 (2010).
 190. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
 191. Neumann, S., Pucadyil, T. J. & Schmid, S. L. Analyzing membrane remodeling and fission using supported bilayers with excess membrane reservoir. *Nat. Protoc.* **8**, 213–222 (2013).
 192. Fröhlich, C. *et al.* Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *EMBO J.* **32**, 1280–1292 (2013).
 193. Bond, P. S., Wilson, K. S. & Cowtan, K. D. Predicting protein model correctness in {it Coot} using machine learning. *Acta Crystallogr. Sect. D* **76**, 713–723 (2020).