

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



## **TESIS DOCTORAL**

Adhesión de membranas lipídicas mediada por la proteína mitofusina 1: implicaciones en el proceso de fusión mitocondrial

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Andrés Darío Tolosa Díaz

DIRECTORES

Iván López Montero  
Paolo Natale

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE FARMACIA



**TESIS DOCTORAL**

ADHESIÓN DE MEMBRANAS LIPÍDICAS MEDIADA POR LA PROTEÍNA  
MITOFUSINA 1: IMPLICACIONES EN EL PROCESO DE FUSIÓN MITOCONDRIAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ANDRES DARIO TOLOSA DIAZ

DIRECTOR

IVÁN LÓPEZ MONTERO  
PAOLO NATALE





Dedico el trabajo a mi Familia y en especial a mi mamá y a mi tía Cecilia, por todo su cariño y ayuda mutua en cada momento.



# Agradecimientos

Agradezco a Dios por todo este tiempo de enseñanzas. Gracias a mi familia, a mi mamá por siempre estar pendiente y darme consejos muy valiosos, a mi hermano Javier por toda su disposición, dedicación y esfuerzo, a mi hermano Freddy que siempre ha sido curioso por mi trabajo y por su apoyo mutuo, también a mi hermano César. Mi tía Cecilia y familia.

En segundo lugar, especialmente agradecido con Francisco Monroy por darme la oportunidad de llegar a su grupo de investigación. A mis directores de tesis Iván López y Paolo Natale por su comprensión y su oportunidad de trabajar en el grupo de laboratorio. Agradezco nuevamente a Paolo por todas sus enseñanzas y consejos, a Iván López por la oportunidad de trabajar en su grupo de laboratorio y llegar hasta esta etapa de mi vida. A mis amigos de laboratorio Víctor, Mónica, Diego, Judit, Ismael, Sergio, Ismael, Nuria y Mikheil muchas gracias por los momentos vividos. A mi amigo Aly por aquellas tardes de risa.

# Índice general

Índice	I
Índice de figuras	V
Índice de cuadros	VI
Lista de abreviaturas	VI
Resumen	XI
Summary	XVI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Mitocondria . . . . .	2
1.2. Metabolismo mitocondrial . . . . .	3
1.2.1. Sistema de fosforilación oxidativa-OXPHOS . . . . .	4
1.3. La dinámica mitocondrial . . . . .	5
1.4. Enfermedades mitocondriales . . . . .	6
1.5. La maquinaria de fisión mitocondrial . . . . .	7
1.6. La maquinaria de fusión mitocondrial . . . . .	7
1.6.1. Mitofusina . . . . .	9
1.6.2. Las estructuras proteicas de las mitofusinas . . . . .	11
1.6.3. La fuerza iónica local modula la formación de dímeros de Mfn . . . . .	14
1.7. Membranas lipídicas . . . . .	16
1.8. Proteínas de membrana . . . . .	19
1.9. Modelos de membranas biomiméticos . . . . .	20
1.10. Propiedades mecánicas de las membranas . . . . .	21
1.10.1. Elasticidad de compresión . . . . .	22
1.10.2. Elasticidad de cizalla . . . . .	22
1.10.3. Elasticidad de curvatura . . . . .	23
1.10.4. Adhesión . . . . .	24
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIALES</b>	<b>29</b>
3.1. Ácidos y bases . . . . .	30
3.2. Antibióticos . . . . .	30
3.3. Anticuerpos . . . . .	30
3.4. Buffers . . . . .	31

3.5. Cepas <i>Escherichia coli</i> . . . . .	32
3.6. Cebadores . . . . .	32
3.7. Colorantes . . . . .	33
3.8. Detergentes . . . . .	33
3.9. Enzimas . . . . .	34
3.10. Equipos utilizado . . . . .	34
3.11. Lípidos . . . . .	35
3.12. Marcadores Moleculares . . . . .	36
3.13. Medios de cultivo . . . . .	36
3.14. Nucleótidos . . . . .	36
3.15. Otros reactivos . . . . .	36
3.16. Plásmidos . . . . .	38
3.17. Software . . . . .	39
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>41</b>
4.1. Aislamiento de ADN en gel de agarosa . . . . .	42
4.2. Aislamiento de ADN plasmídico . . . . .	42
4.3. Aislamiento de membranas citoplasmática de <i>E. coli</i> . . . . .	43
4.4. Clonaje de MFN1 de <i>homo sapiens</i> . . . . .	44
4.5. Cuantificación de proteína total . . . . .	45
4.6. Cuantificación de la energía de adhesión . . . . .	46
4.7. Digestión de ADN plasmídico . . . . .	47
4.8. Dispersión de luz dinámica . . . . .	47
4.9. Electroforesis en gel de agarosa . . . . .	47
4.10. Fraccionamiento de <i>E. coli</i> . . . . .	48
4.11. Ensayo de adhesión de vesículas con y sin Mfn1 por transferencia de energía no radiativa . . . . .	48
4.12. Ensayo de hidrólisis de GTP . . . . .	49
4.13. Marcaje fluorescente de vesículas . . . . .	49
4.14. Microscopía Confocal . . . . .	49
4.15. Preparación de vesículas . . . . .	50
4.16. Producción heteróloga de MFN1 . . . . .	51
4.17. Solubilización de IMVs-Mfn1 . . . . .	51
4.18. Visualización de proteínas por electroforesis SDS-PAGE . . . . .	52
4.19. Visualización de proteínas por Inmunodetección . . . . .	52
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>54</b>
5.1. Clonaje de la gen MFN1 . . . . .	55
5.2. La producción heteróloga de la proteína Mfn1 humana en <i>Escherichia coli</i> . . . . .	56
5.3. Fraccionamiento celular de <i>E. coli</i> SF100(DE3) . . . . .	59
5.4. Caracterización de <i>E. coli</i> IMV . . . . .	59
5.4.1. Titulación del anticuerpo anti-Mfn1(D-10) . . . . .	60
5.4.2. La Orientación de Mfn1 en las IMV . . . . .	61
5.5. La hidrólisis de GTP catalizado por IMVs de <i>E. coli</i> que llevan Mfn1 . . . . .	62
5.6. La Solubilización de IMVs-Mfn1 . . . . .	63
5.7. Ensayo de mezcla de lípidos totales de Mfn1-IMVs por transferencia de energía no radiativa . . . . .	65
5.8. La remodelación de la membrana mediados por Mfn1 . . . . .	66

5.9. La fuerza de adhesión entre las vesículas en presencia de GDP o GTP	69
5.10. Cambio de los diámetros promedio Mfn1-LUVs inducido por la presencia de GTP	70
5.10.1. Intercambio de lípidos durante los eventos de adhesión de las Mfn1-GUVs	70
5.11. La adhesión de membrana mediada por Mfn1 ocurre a través una unión cooperativa	71
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	<b>81</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>101</b>

# Índice de figuras

1.1. Redes mitocondriales . . . . .	2
1.2. La morfología mitocondrial . . . . .	3
1.3. El metabolismo mitocondrial . . . . .	4
1.4. Representación esquemática del Sistema OXPHOS . . . . .	5
1.5. Dinámica mitocondrial . . . . .	6
1.6. Los dominios de las proteínas de la superfamilia de dinamina . . . . .	8
1.7. Alineamiento de secuencia de los elementos G1-G4 de los miembros de la superfamilia de dinamina. . . . .	9
1.8. Estructuras cristalinas de proteínas de la superfamilia de dinamina . . . . .	10
1.9. Estructura molecular de MFN1 <sub>IM</sub> . . . . .	11
1.10. Detalle molecular de elementos estructurales de Mfn1 . . . . .	13
1.11. Comparación de las estructuras cristalinas de MGD. . . . .	14
1.12. La dimerización de MFN1 <sub>IM</sub> a través del dominio-G. . . . .	15
1.13. Estructura molecular de Mfn1-MGD. . . . .	16
1.14. Comparación de las estructuras cristalinas MGD. . . . .	17
1.15. Los centros catalíticos de las DLPs. . . . .	18
1.16. Maquinaria catalítica de Mfn1. . . . .	18
1.17. El modelo de mosaico fluido . . . . .	19
1.18. Tipos de lípidos de membrana . . . . .	19
1.19. Tipos de proteína integral de membrana . . . . .	20
1.20. Structure of a liposome . . . . .	21
1.21. Deformaciones elásticas de vesículas . . . . .	23
5.1. Amplificación y clonaje de los genes <i>MFN1</i> , <i>MFN2</i> y <i>OPA1</i> humanos. . . . .	55
5.2. Short version for LoF . . . . .	56
5.3. Alineamiento local de la secuencia génica de la <i>MFN1</i> humano por software BLASTN (NCBI). . . . .	57
5.4. Crecimiento de varias cepas de <i>E. coli</i> y producción heteróloga de Mfn1 humana. . . . .	58
5.5. SDS-PAGE y western blot . . . . .	59
5.6. Fraccionamiento celular de <i>E. coli</i> SF100(DE3) <sup>+</sup> /pTL2 . . . . .	60
5.7. Caption . . . . .	61
5.8. Ensayo de protección de proteasas de Mfn1-IMV . . . . .	62
5.9. Actividad de GTPasa de Mfn1-IMV . . . . .	63
5.10. Sedimentación de Mfn1-IMVs solubilizados 2% de DDM . . . . .	64
5.11. Mfn1-IMVs incubado con varios detergentes . . . . .	65
5.12. Ensayo de mezcla de lípidos totales de IMV. . . . .	66
5.13. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal . . . . .	67

5.14. Marcaje IMVs con $\alpha$ MFN1 . . . . .	67
5.15. Ensayos de control . . . . .	68
5.16. GUV adhesión . . . . .	69
5.17. Adhesión de membrana de GUVs marcados con RhoPE promovida por Mfn1 . . . . .	70
5.18. Evolución temporal del ensayo de mezcla de lípidos en GUVs . . . . .	71
5.19. Evolución temporal del ensayo de mezcla de lípidos en GUVs . . . . .	71
5.20. Cooperatividad . . . . .	72
5.21. Fuerza de adhesión de Mfn1-GUVs . . . . .	72
5.22. La fuerza de adhesión de Mfn1-GUVs . . . . .	73
6.1. Modelo de trabajo para el papel de Mfn1 . . . . .	77
6.2. Esquema del mecanismo de la cooperatividad de las proteínas Mfn1 en Mfn1-GUVs . . . . .	79

# Índice de cuadros

3.1. Ácidos y bases . . . . .	30
3.2. Antibióticos . . . . .	30
3.3. Anticuerpos . . . . .	30
3.4. Buffers . . . . .	31
3.5. Cepas <i>Escherichia coli</i> . . . . .	32
3.6. Cebadores . . . . .	32
3.7. Colorantes . . . . .	33
3.8. Detergentes . . . . .	33
3.9. Enzimas . . . . .	34
3.10. Equipos utilizado . . . . .	34
3.11. Lípidos . . . . .	35
3.12. Marcadores Moleculares . . . . .	36
3.13. Medios de cultivo . . . . .	36
3.14. Nucleótidos . . . . .	36
3.15. Otros reactivos . . . . .	37
3.16. Plásmidos . . . . .	38
3.17. Software . . . . .	39
4.1. Gradiente de Sacarosa . . . . .	43
4.2. Programa termociclador . . . . .	44
4.3. Condiciones de ligación de plásmido pGEM . . . . .	45
4.4. GUVs empleados . . . . .	50
4.5. Pasos de incubación para revelar western blot . . . . .	53

# Resumen

## Introducción y objetivos

### Fusión de membranas.

La fusión de membranas es un proceso biológico fundamental en muchas áreas de la fisiología. Extracelularmente, ocurre durante la infección viral, la fertilización de los óvulos por los espermatozoides y la formación de sincitios en el desarrollo muscular. Intracelularmente, participa en el transporte de proteínas y lípidos entre orgánulos, en eventos excitotóxicos como la liberación de neurotransmisores o la secreción de insulina, y en el mantenimiento de la forma y función de las mitocondrias. Durante todos estos eventos, dos compartimentos celulares, inicialmente separados y delimitados por bicapas lipídicas deben conectarse y fusionarse para mezclar sus componentes de membrana y sus volúmenes acuosos. Dado que las membranas biológicas están diseñadas para ser estables, tales eventos de fusión son energéticamente costosos y requieren la intervención de proteínas especializadas que ayudan a las membranas a avanzar a través de las etapas sucesivas que conducen a la fusión. Estas etapas incluyen:

- (I) reconocimiento y acoplamiento de membranas
- (II) aproximación y deformación de la membrana
- (III) ruptura y fusión de la membrana, con la formación potencial de una estructura de hemifusión donde las monocapas externas de las bicapas lipídicas se fusionan, mientras que las monocapas internas y los compartimentos acuosos permanecen separados
- (IV) formación y crecimiento de un poro de fusión, que conduce a la mezcla de los dos compartimentos acuosos. La estructura de las proteínas de fusión a menudo se divide en varios dominios funcionales que pueden orquestar una o más de estas etapas intermedias que conducen a la fusión.

Estas proteínas también son asistidas por varios factores reguladores (lípidos o proteínas) que facilitan la fusión (por ejemplo, al inducir la curvatura local de la membrana) y / o aseguran que la fusión ocurra en el momento y lugar correctos (por ejemplo, atrapando y liberando la maquinaria de fusión en respuesta a señales particulares).

### Dinámica mitocondrial.

La imagen clásica de las mitocondrias, como se muestra en los libros de texto, muestra las características ultraestructurales de las mitocondrias, que incluyen la doble membrana y los pliegues de la membrana interna denominados crestas (Figura 1.2). Sin embargo, la visión canónica de las mitocondrias como orgánulos estáticos ha sido revisada en los últimos años. Las mitocondrias tienen morfologías drásticamente diferentes según el tipo de célula, e incluso, dentro de la misma célula, las

mitocondrias pueden adoptar una variedad de morfologías, desde pequeñas esferas o bastoncillos cortos hasta túbulos largos. Además, los estudios de imágenes en células vivas indican que la estructura mitocondrial es muy dinámica: se mueve constantemente y sufre transiciones estructurales. Los túbulos mitocondriales se mueven a lo largo de los filamentos proteicos del citoesqueleto. Las mitocondrias forman una red altamente dinámica de orgánulos que se fusionan y dividen constantemente. Las mitocondrias individuales pueden encontrarse durante estos movimientos y someterse a fusión, lo que resulta, en la fusión de las membranas dobles y la mezcla de membranas lipídicas y contenido intramitocondrial. Por el contrario, una mitocondria individual puede dividirse por fisión para producir dos o más mitocondrias más pequeñas. El equilibrio entre estos procesos antagonistas de fusión y división es importante para el normal funcionamiento celular. En ausencia de fusión, las mitocondrias se fragmentan en pequeñas esferas mientras que en ausencia de división, las mitocondrias se alargan y están muy interconectadas. Los componentes clave de las maquinarias de fusión y división mitocondrial se han identificado recientemente, pero se desconocen los mecanismos moleculares exactos por los que ejecutan su función.

### **Mitofusinas.**

En las células mamíferas, el mecanismo central de todos los eventos de fusión de la membrana intracelular, excepto los que involucran a las mitocondrias, consiste en el ensamblaje en forma de cremallera entre la proteína v-SNARE (que reside en la membrana del transporte vesicular) y la proteína t-SNARE (que reside en la membrana del compartimento celular de destino) para producir un complejo de puente de membrana altamente estable (el SNAREpin) que desencadena la estrecha aposición y fusión de estas bicapas. Sin embargo, la fusión de la membrana mitocondrial externa requiere dos proteínas de la superfamilia de la dinamina, Mitofusina 1 (Mfn1) y Mitofusina 2 (Mfn2). Las mitofusinas (Mfns) son proteínas transmembrana que residen en la membrana externa de las mitocondrias, que contienen un dominio GTPasa N-terminal, y cuyos dominios transmembrana se extienden por la bicapa lipídica dos veces. Como resultado, ambos los terminos N- y C-terminales de Mfns se encuentran en el citosol de la célula. El dominio transmembrana de Mfns está flanqueado por dos regiones (Cc1 y Cc2) capaces de formar helicoides enrollados (Coiled-coil) similares a las formadas por las proteínas SNARE y proteínas virales. La delección del gen MFN1 o MFN2 o la presencia de mutaciones de cualquiera de sus dominios funcionales y estructurales perjudican la fusión mitocondrial en fibroblastos embrionarios de ratón y conducen a mitocondrias fragmentadas debido a la falta de fusión mitocondrial. No obstante, el modo de acción exacto de las Mfns sigue sin entenderse completamente.

En el caso de la fusión mitocondrial, se desconocen los mecanismos moleculares y las etapas intermedias del evento de fusión. Las Mfns contienen varios dominios funcionales con el potencial de controlar el acoplamiento (aposición), el acercamiento, la deformación y la fusión de la membrana. En esta tesis proponemos la expresión heteróloga y purificación de Mfn1 y su reconstitución en modelos de membranas para responder a las siguientes preguntas fundamentales:

1. ¿Cuáles son las interacciones moleculares entre Mfns? Mediante microscopía de fluorescencia confocal y usando vesículas unilamelares gigantes se explorará

la visualización de fusión de membranas mediada por mitofusinas.

2. ¿Cuál es el papel de la función GTPásica de Mfns (Mfn1/Mfn1)? En principio, el dominio GTPasa podría funcionar análogamente a cómo lo hace la superfamilia de dinamina. Esto es, usar la energía de la hidrólisis de GTP para ejercer una acción mecánica, como la deformación de la membrana o la aposición cercana de la membrana. Se estudiará el efecto de análogos de GTP no hidrolizables sobre la capacidad de la Mfn1.
3. ¿Cuáles son los requisitos mínimos para la fusión de membrana? ¿Es la interacción Mfn1-Mfn1 suficiente para promover la fusión de membranas? Se estudiará también si la distinta cantidad de complejos puede ser relevante para la actividad de fusión de membranas así como la presencia de lípidos con propiedades fusogénicas como la fosfatidil etalonamina.

## Metodología

Para poder realizar el estudio propuesto, se propone la reconstitución de Mfn1 recombinante en sistemas lipídicos modelo. El gen que codifica para la Mfn 1 se obtuvo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos y extracto de ADNc total humano como plantilla. El ADNc humano se sintetizó mediante transcripción inversa del ARN de sangre humana extraído con un kit de extracción de ARN comercial. Para la producción y purificación de la proteína Mfn1, el gen obtenido se clonó en un sistema de vector de expresión de proteínas comercial (pET) para *E. coli*. Los vectores pET permiten marcar las proteínas de interés con una etiqueta de hexahistidina para la purificación por afinidad y la detección de proteínas. La producción de Mfn1 recombinante se indujo con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y se expresó la proteína recombinante durante 3 horas antes de recolectar las células. Para el aislamiento de la fracción de la membrana interna, las células obtenidas se rompieron primero mecánicamente mediante sonicación. Las células no rotas y los restos celulares se eliminan mediante centrifugación y las membranas se recogieron mediante ultracentrifugación. La fracción de membrana total (membranas interna y externa) se separaron en un gradiente escalonado de sacarosa para obtener solo la fracción de membrana interna como material de partida para los ensayos de interacción entre membranas.

Previo a los ensayos de interacción entre membranas, se reconstituyeron funcionalmente las proteínas Mfn1 en bicapas lipídicas modelo. Debido a su naturaleza anfífila, los lípidos se autoensamblan espontáneamente en solución acuosa para formar bicapas lipídicas. Las bicapas lipídicas sirven como un disolvente bidimensional para proteínas de membrana. El extenso repertorio de lípidos existente en los sistemas vivos dota a los lípidos de una gran versatilidad para su uso en construcciones artificiales. Además, poseen una gran variedad de comportamiento viscoelástico, que gobierna la cinética y espontaneidad de diferentes procesos de membrana que puedan ocurrir en la célula, como la división celular o la fusión y fisión mitocondrial. La reconstitución de proteínas de membrana en membranas modelo permite el estudio de funciones biológicas específicas. En nuestro caso el sistema modelo lipídico empleados son las vesículas unilamelares gigantes (GUVs), que se obtienen mediante

la técnica de electroformación. El uso de GUVs permite gracias a su tamaño micrométrico (10  $\mu\text{m}$  de diámetro) el empleo de distintas técnicas de caracterización óptica como la microscopía de fluorescencia confocal. Mediante esta técnica se puede monitorizar la incorporación de la proteína fluorescente así como su carácter funcional en el sistema de membrana utilizado. Para la incorporación de Mfn1 a GUVs, se incluyó en la formulación lipídica de las vesículas, un lípido funcionalizado con NTA en la cabeza polar para promover la unión específica de los grupos histidina de la proteína recombinante. La reconstitución de la proteína Mfn1 en las vesículas se realiza incubando la proteína estabilizada en detergente con GUVs preformadas. Mediante una dilución del sistema por debajo de la CMC (concentración micelar crítica) del detergente la proteína se incorpora al medio lipídico al quedar desprotegida sus dominios hidrofóbicos.

Los ensayos funcionales en membranas se realizaron mediante microscopía de fluorescencia confocal, que permitió la observación de cambios estructurales producidos en las membranas cuando se aproximan dos vesículas con la proteína Mfn 1 reconstituida en presencia de GTP. El fenómeno observado se estudió modificando las variables de composición lipídica, concentración de lípido NTA así como la incubación de distintos nucleótidos. Tras la comprobación de la funcionalidad de la proteína en GUVs, se determinó la energía de adhesión promovida por Mfn1 mediante la extensión de la ecuación de Young-Dupré a sistemas vesiculares compuestos por bicapas lipídicas. El ajuste de los perfiles del contorno vesicular en las proximidades de la interfase de adhesión, junto con el valor del parámetro mecánico del módulo de curvatura, permite la obtención de la tensión de las vesículas adheridas, así como la energía de adhesión del sistema. La estrategia experimental consiste en comparar la energía de adhesión obtenida en función de diferentes parámetros como la cantidad de proteína presente en las vesículas o el nucleótido utilizado.

## Resultados

La sobreproducción de Mfn1 en bacteria lleva a la presencia de la proteína en la membrana interna de *E. coli*. Tras el fraccionamiento se comprobó la funcionalidad de la proteína mediante ensayos bioquímicos de hidrólisis de GTP. La incubación con detergentes para la extracción de Mfn1 no resultó en lo esperado en la solubilización total de la proteína. El extracto que contenía la proteína se utilizó para unirla específicamente a la superficie de vesículas gigantes unilamelares compuestas por POPC y lípidos-NTA. La unión de la proteína a los lípidos-NTA se produjo mediante los grupos histidina de la proteína. Mediante microscopía de fluorescencia confocal, se pudo comprobar la unión específica de Mfn1 a la membrana lipídica con el uso de anticuerpos específicos fluorescentes. Se comprobó que la interacción era reversible mediante la incubación del sistema con imidazol. Las membranas miméticas con Mfn1 fueron utilizadas como plataforma para visualizar procesos de adhesión cuando se incubaron con GTP. Los controles realizados en ausencia de anticuerpo, o lípido-NTA permitieron asegurar que los fenómenos de adhesión observados eran mediados por la presencia de Mfn1. En presencia de GDP, se observaron procesos de adhesión similares. Las energías de adhesión mediada por Mfn1 que obtuvimos fueron  $E_{adh} = (2.7 \pm 0.7) 10^8 \text{ J/m}^2$  en presencia de GTP y  $E_{adh} = (2.7 \pm 0.5) 10^8 \text{ J/m}^2$  en presencia de GDP. Debido a la naturaleza flexible de las membranas lipídicas, se

pudo observar cómo la fuerza de adhesión depende de la concentración superficial de Mfn1, controlada mediante la concentración de lípido-NTA en la composición lipídica de las GUVs. La dependencia de la  $E_{adh}$  en función de la concentración superficial de Mfn1 es compatible con un mecanismo de unión cooperativo. Además, se comprobó que la incubación con  $GDP \cdot AlF_4^-$ , nucleótido análogo de GTP no hidrolizable, no induce la adhesión de membranas lipídicas mediada por Mfn1. Finalmente, para promover la fusión completa de vesículas, se realizaron experimentos con diferentes composiciones lipídicas, en particular con la incorporación de fosfatidiletalona (PE). El PE es un lípido conocido por promover la formación de fases no lamelares y por tanto la formación de poros de hemifusión. La adición de PE en la composición lipídica de las GUVs no ayudó a promover la fusión completa de vesículas.

## Conclusiones

Las mitocondrias son orgánulos que están presentes en la mayoría de las células eucariotas y cuya función principal es la producción de energía química en forma de adenosín trifosfato (ATP). Para un funcionamiento óptimo, las mitocondrias forman una red dinámica que se fusionan y dividen constantemente. La fusión de la membrana mitocondrial externa está mediada por las proteínas de membrana mitofusina 1 (Mfn1) y mitofusina 2 (Mfn2) mediante la hidrólisis de GTP.

La presente tesis doctoral ha proporcionado un modelo *in vitro* basado en vesículas gigantes decoradas con la Mfn1 en su superficie. Este sistema biomimético ha permitido mostrar que:

1. la proteína Mfn1 promueve la adhesión de vesículas lipídicas adyacentes.
2. las fuerzas de adhesión están sostenidas molecularmente por el estado GDP de la proteína Mfn1.
3. la energía de adhesión es del orden de  $10^8$  J/m<sup>2</sup>.
4. la adhesión de membranas mediada por Mfn1 es cooperativa.

Finalmente, se discuten los resultados obtenidos en el marco del modelo de fusión mitocondrial aceptado hasta la fecha

## Palabras clave

Mitofusina 1, fusión mitocondrial, ensayos *in vitro*, vesículas gigantes, adhesión de membranas, energía de adhesión



# Summary

## Introduction and objectives

### Membrane fusion

Membrane fusion is a fundamental biological process in many areas of physiology. Extracellularly, it occurs during viral infection, fertilization of the ovules by sperm and the formation of syncytia in muscle development. Intracellularly, it participates in the transport of proteins and lipids between organelles, in exocytotic events such as the release of neurotransmitters or insulin secretion, and in the maintenance of the shape and function of mitochondria. During all these events, two cellular compartments, separated and delimited by lipid bilayers, must connect and fuse to mix their membrane components and their aqueous volumes. Since biological membranes are designed to be stable, such fusion events are energetically costly and require the intervention of special proteins that help the membranes advance through the successive stages that lead to fusion. These steps include:

- (I) membrane recognition and coupling
- (II) membrane approach and deformation
- (III) membrane rupture and fusion, with the potential formation of a hemifusion structure where the outer monolayers of the lipid bilayers fuse, while the inner monolayers and the aqueous compartments remain separate
- (IV) the formation and the growth of a melt pore, leading to mixing of the two aqueous compartments. The structure of fusion proteins is often divided into several functional domains that can orchestrate one or more of these intermediate steps leading to fusion.

These proteins are also assisted by various regulatory factors (lipids or proteins) that facilitate fusion (for example, by inducing local curvature of the membrane) and/or ensure that fusion occurs at the correct time and place (for example, trapping and releasing the fusion machinery in response to particular signals).

### Mitochondrial dynamics

The classic picture of mitochondria, as shown in textbooks, shows the ultrastructural features of mitochondria, which include the double membrane and inner membrane folds called *cristae* (Figure 1.2). However, the canonical view of mitochondria as bean-shaped organelles has recently been revisited. Mitochondria have a plethora of different morphologies depending on cell type. Even within the same cell, mitochondria are present in a variety of morphologies, from small spheres or short rods to long tubules. Furthermore, microscopic imaging in living cells indicate that the mitochondrial structure is highly dynamic, which is constantly moving and undergoing continuous structural transitions. Mitochondrial tubules move with

their long axes aligned along the cytoskeletal tracks and form a highly dynamic network of organelles that constantly fuse and divide. Individual mitochondria gather during these movements and undergo mitochondrial fusion, resulting in the fusion of the double membranes and the mixing of lipid membranes and intramitochondrial content. In contrast, an individual mitochondrion can divide by fission to produce two or more shorter mitochondria. The balance between these antagonistic processes of fusion and division is important for normal cellular function. In the absence of fusion, mitochondria fragment into small spheres or short rods. In the absence of division, mitochondria are elongated and highly interconnected. The key components of the mitochondrial division and fusion machines have only recently been identified, but the exact molecular mechanisms by which they perform their function are unknown.

### **Mitofusins.**

In mammalian cells, the central mechanism of all intracellular membrane fusion events, except those involving mitochondria, consists of the zipper-like assembly between the protein v-SNARE (that resides in the membrane of the vesicular transport) and the protein t-SNARE (that resides in the target membrane) to assemble into the highly stable membrane bridge complex (the SNAREpin) that triggers the tight apposition and fusion of these bilayers. However, fusion of the outer mitochondrial membrane requires two proteins from the dynamin superfamily mitofusin 1 (Mfn1) and mitofusin 2 (Mfn2). The deletion of the MFN1 or MFN2 gene or the presence of mutations within the structural or functional domains of mitofusins (Mfns) of mouse embryonic fibroblasts lead to fragmented mitochondria due to the absence of mitochondrial fusion. Mfns are transmembrane proteins that reside in the outer membrane of mitochondria which contain an N-terminal GTPase domain, and two transmembrane domains that span the lipid bilayer twice. As a result, the N- and C-terminal regions of Mfns face the cytosol. The transmembrane domain of Mfns is flanked by two coiled-coil (Cc) regions (Cc1 and Cc2) capable of forming spiral helices similar to those formed by SNARE or viral proteins.

In the case of mitochondrial fusion, the molecular mechanisms and intermediate stages of the fusion event are unknown. Mfns contain distinct functional domains that have the potential to control the membrane coupling, approach (apposition), deformation, and fusion. In this thesis we propose the heterologous expression and purification of Mfn1 and its reconstitution in membrane models to answer the fundamental questions:

4.

1. What are the molecular interactions between Mfns? By confocal fluorescence microscopy and using giant unilamellar vesicles the visualization of mitofusin-mediated membrane fusion will be explored.
2. What is the role of the Mfns GTPase function? In principle, the GTPase domain could function analogously to how the Dinamine family of proteins does. That is, using the energy of GTP hydrolysis to exert a mechanical action, such as deformation of the membrane or close apposition of the membrane. The effect of non-hydrolyzable GTP analogs on the capacity of Mfn1 will be studied.

3. What are the minimum requirements for membrane fusion? Is the Mfn1-Mfn1 interaction sufficient to promote membrane fusion? It will also be studied whether the different amount of complexes may be relevant for membrane fusion activity as well as the presence of lipids with fusogenic properties such as phosphatidyl ethanolamine.

## Methodology

In order to carry out the proposed study, the reconstitution of recombinant Mfn1 in model lipid systems is proposed. The gene encoding Mfn1 was obtained by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and total human cDNA extract as a template. Human cDNA was synthesized by reverse transcription of isolated total human blood RNA using a commercial RNA extraction kit. For the overproduction of the Mfn1 protein, the obtained gene was cloned into a commercial protein expression vector system (pET) and produced in *E. coli* as a host. PET vectors allow the proteins of interest to be labeled with a hexahistidine tag for affinity purification or protein detection. Recombinant Mfn1 production was induced with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and plasmid encoded recombinant Mfn1 gene was expressed for 3 hours before harvesting the cells. For the isolation of the inner membrane fraction, the cells obtained were first mechanically disrupted by sonication and after the removal of unruptured cells and cell debris by centrifugation, the membranes were collected by ultracentrifugation. The total membrane fraction (inner and outer membranes) were separated in a sucrose gradient to obtain only the inner membrane fraction as a starting material for membrane fusion/interaction assays.

Prior to the membrane interaction, Mfn1 proteins were functionally reconstituted into model lipid bilayers. Due to their amphiphilic nature, lipids spontaneously self-assemble in aqueous solution to form lipid bilayers. Lipid bilayers serve as a two-dimensional solvent for membrane proteins. The extensive repertoire of lipids existing in living systems endows lipids with great versatility for use in artificial constructions. In addition, they have a great variety of viscoelastic behavior, which governs the kinetics and spontaneity of different membrane processes that may occur in the cell, such as cell division or mitochondrial fusion and fission. The reconstitution of membrane proteins in model membranes allows the study of specific biological functions. In our case, the lipid model system used is the giant unilamellar vesicles (GUVs), which are obtained using the electroforming technique. The use of GUVs allows, thanks to their micrometric size (10  $\mu$ m in diameter), the use of different optical characterization techniques such as confocal fluorescence microscopy.

Using this technique, the incorporation of the fluorescent protein as well as its functional character in the membrane system used can be monitored. For the incorporation of Mfn1 to GUVs, a lipid functionalized with NTA in the polar head was included in the lipid formulation of the vesicles to promote the specific binding of the histidine groups of the recombinant protein. Reconstitution of the Mfn1 protein in the vesicles is performed by incubating the detergent-stabilized protein with preformed GUVs. Through a dilution of the system below the critical micelle concentration (CMC) of the detergent, the protein is incorporated into the lipid environment as its hydrophobic domains are unprotected.

The functional assays on membranes were performed using confocal fluorescence microscopy, which allowed the observation of structural changes produced in the membranes when two vesicles with the reconstituted Mfn1 protein were brought together in the presence of GTP. The observed phenomenon was studied by modifying the variables of lipid composition, NTA lipid concentration, as well as the incubation of different nucleotides. After checking the functionality of the protein in GUVs, the adhesion energy promoted by Mfn1 was determined by extending the Young-Dupré equation to vesicular systems composed of lipid bilayers. The adjustment of the vesicular contour profiles in the vicinity of the adhesion interface, together with the value of the mechanical parameter of the modulus of curvature, allows obtaining the tension of the adhered vesicles as well as the adhesion energy of the system. The experimental strategy consists of comparing the adhesion energy obtained as a function of different parameters such as the amount of protein present in the vesicles or the nucleotide used.

## Results

The overexpression of Mfn1 in bacteria resulted in an enrichment of the protein in the inner membrane of *E.coli*. After fractionation, the functionality of the protein was verified by biochemical GTP hydrolysis assays. Incubation with detergents for Mfn1 extraction did not result in total solubilization of the protein. The extract containing the protein was used to specifically bind it to the surface of unilamellar giant vesicles composed of POPC and lipid-NTA. Binding of the protein to lipids-NTA occurred through the histidine groups of the protein. Through confocal fluorescence microscopy, the specific binding of Mfn1 to the lipid membrane could be verified with the use of specific fluorescent antibodies. The interaction was found to be reversible by incubation of the system with imidazole.

Mfn1 mimetic membranes were used as a platform to visualize adhesion processes when incubated with GTP. Controls carried out in the absence of antibody or lipid-NTA made it possible to ensure that the observed adhesion phenomena were mediated by the presence of Mfn1. In the presence of GDP, similar adhesion processes were observed. The adhesion energy that we obtained mediated by Mfn1 of  $E_{adh} = (2.7 \pm 0.7) 10^8 \text{ J/m}^2$  in the presence of GTP and  $E_{adh} = (2.7 \pm 0.5) 10^8 \text{ J/m}^2$  in the presence of GDP. Due to the flexible nature of lipid membranes, it was possible to observe how the adhesion force depends on the surface concentration of Mfn1, controlled by the concentration of lipid-NTA in the lipid composition of GUVs. The dependence of  $E_{adh}$  as a function of the surface concentration of Mfn1 is consistent with a cooperative binding mechanism. In addition, it was found that incubation with  $\text{GDP} \cdot \text{AlF}_4^-$ , a non-hydrolyzable GTP analog nucleotide, does not induce Mfn1-mediated adhesion of lipid membranes.

Finally, to promote complete vesicle fusion, experiments were carried out with different lipid compositions, in particular with the incorporation of phosphatidylethanolamine (PE). PE is a lipid known to promote the formation of non-lamellar phases and therefore the formation of hemifusion pores. The addition of PE in the lipid composition of GUVs did not help to promote complete vesicle fusion.

# Conclusiones

Mitochondria are organelles that are present in most eukaryotic cells and whose main function is the production of chemical energy in the form of adenosine triphosphate (ATP). For optimal function, mitochondria form a dynamic network that constantly merge and divide. Fusion of the outer mitochondrial membrane is mediated by the membrane proteins mitofusin 1 (Mfn1) and mitofusin 2 (Mfn2) through the hydrolysis of GTP.

The present doctoral thesis has provided an *in vitro* model based on giant vesicles decorated with Mfn1 on their surface. This biomimetic system has shown that:

1. the Mfn1 protein promotes adhesion of adjacent lipid vesicles.
2. the adhesion forces are molecularly supported by the GDP state of the Mfn1 protein.
3. the adhesion energy is of the order of  $10^8$  J/m<sup>2</sup>.
4. Mfn1-mediated membrane adhesion is cooperative.

Finally, the results obtained in this thesis are discussed within the current model of the mitochondrial fusion.

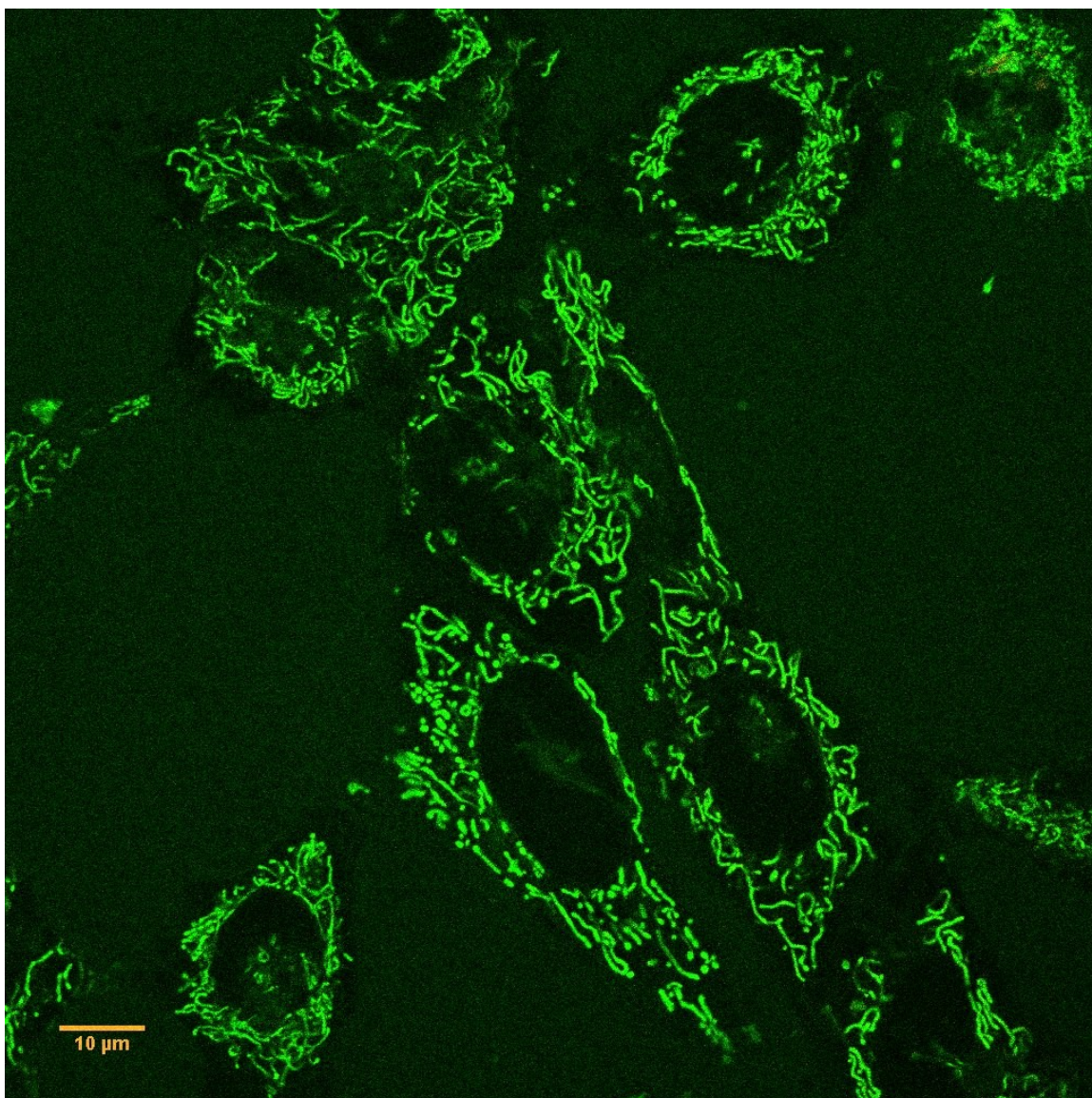
## Keywords

Mitofusin 1, mitochondrial fusion, *in vitro* fusion assays, giant vesicles, membrane adhesion, adhesion energy



# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN



## 1.1. Mitochondria

La presencia de las mitocondrias se describe por primera a mediados del siglo XVIII por el botánico suizo Kolliker quien identificó estos orgánulos en células musculares de insectos llamado sarcosomas<sup>1</sup> que fueron nombrados posteriormente como mitocondrias<sup>1-3</sup>. Las mitocondrias miden entre 1 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro con una longitud de 2  $\mu\text{m}$  a varios  $\mu\text{m}$ , formando una red tubular alrededor de otros orgánulos como es el retículo endoplasmático (RE)<sup>4-7</sup> (Figura 1.1). Las mitocondrias pueden llegar a formar extensas redes muy ramificadas y dinámicas, formando un sistema complejo e importante para el desarrollo de la biogénesis mitocondrial<sup>8</sup>. El número y la morfología mitocondrial varía de acuerdo con el tipo de célula y las demandas energéticas específicas para cada tejido celular. Las mitocondrias son, por lo tanto, esenciales para la vida y la homeostasis y viabilidad de la célula. La dinámica y la biogénesis mitocondriales regulan mediante los continuos procesos de fisión y fusión mitocondrial su distribución, su morfología y la producción de ATP<sup>9,10</sup>.

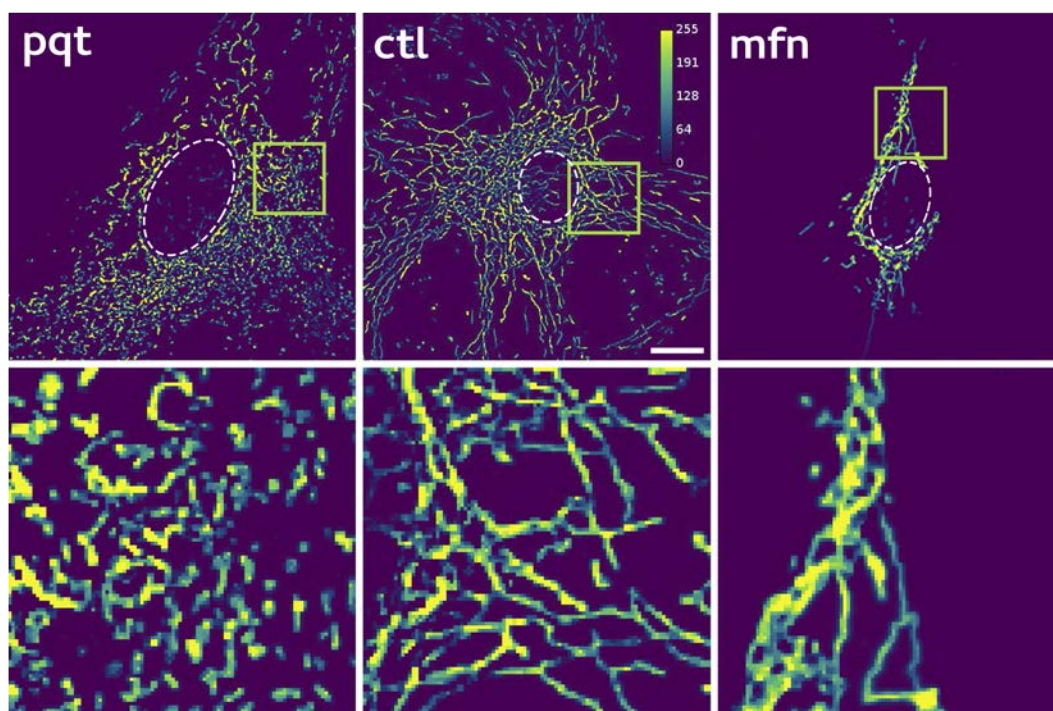


Figura 1.1: Imágenes de redes mitocondriales obtenidas en diferentes condiciones. Imágenes de microscopía confocal de fibroblastos embrionarios de ratón transfectados con mYFP en condiciones de control (ctl), tratamiento con paraquat (pqt) o sobreexpresión de mitofusina 1 (mfn). La intensidad de la señal fluorescente se representa en falso color. Los recuadros resaltan el efecto producido por cada tratamiento sobre la estructura mitocondrial. Las barras de escala representan 10 micras. Imagen publicada en<sup>11</sup>

Cada mitocondria está envuelta por dos membranas: la membrana externa mitocondrial (MEM) y la membrana interna mitocondrial (MIM), que están separadas por el espacio intermembranoso (Figura 1.2). La membrana externa es permeable a iones, metabolitos, polipéptidos y está compuesta por lípidos y contiene entre un 60 y un 70 % de proteínas, mientras que la membrana interna carece de poros y contiene un 80 % proteínas<sup>12</sup>. En la MIM se localiza la cadena transportadora de electrones que produce y mantiene un gradiente electroquímico de protones y jun-

to con el complejo V cataliza la síntesis de adenosín trifosfato (ATP)<sup>13</sup>. La MIM está organizada en pliegues llamados *crestas* mitocondriales que encierra el espacio interior llamada la matriz mitocondrial. Entre la MEM y la MIM se encuentra el espacio intermembranoso<sup>14</sup>. La presencia de *crestas* en la MIM tiene como consecuencia una mayor superficie de membrana que la MEM. La matriz contiene el DNA mitocondrial (mtDNA), la maquinaria proteica para su mantenimiento (replicación y transcripción), ribosomas y proteínas que pertenecen a procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de pirimidinas o el ciclo de la urea.



Figura 1.2: Imagen de microscopía electrónica mostrando la morfología mitocondrial . Modelo tradicional basado en las observaciones de Palade con cuatro compartimentos mitocondriales: membrana externa (MEM), membrana interna (MIM), espacio intermembranoso y matriz.<sup>15,16</sup>

## 1.2. Metabolismo mitocondrial

Las mitocondrias son muy importantes para el metabolismo celular ya que participan en la obtención de energía, metabolismo de lípidos y aminoácidos, la síntesis de los grupos hemo (centros de hierro-azufre en la síntesis de pirimidinas)<sup>17</sup>, el metabolismo del calcio, en la señalización intracelular, la apoptosis<sup>18</sup> e incluso en el desarrollo de la respuesta inmune<sup>19</sup>. La oxidación de la glucosa por las células como fuente de energía para la producción de ATP, empieza con la glucólisis, que tienen lugar en el citoplasma celular (Figura 1.3). La glucólisis produce hasta 2 moléculas de ATP y puede garantizar la supervivencia celular, incluso en ausencia de mitocondrias funcionales. El producto final de la glucólisis es el piruvato que es importado a la matriz mitocondrial donde se convierte por oxidación en acetil-CoA. El acetil-CoA

es un precursor para entrar en el ciclo de Krebs o en la ruta de síntesis y degradación de los ácidos grasos. En el ciclo de Krebs, la oxidación de acetyl-CoA genera los cofactores reducidos  $\text{NADH}/\text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$ . La oxidación de estos cofactores por el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) produce agua y 30-32 moléculas de ATP<sup>20</sup>. Finalmente, el ATP generado es liberado al citosol celular, intercambiado por ADP a través de la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT)<sup>21</sup>.

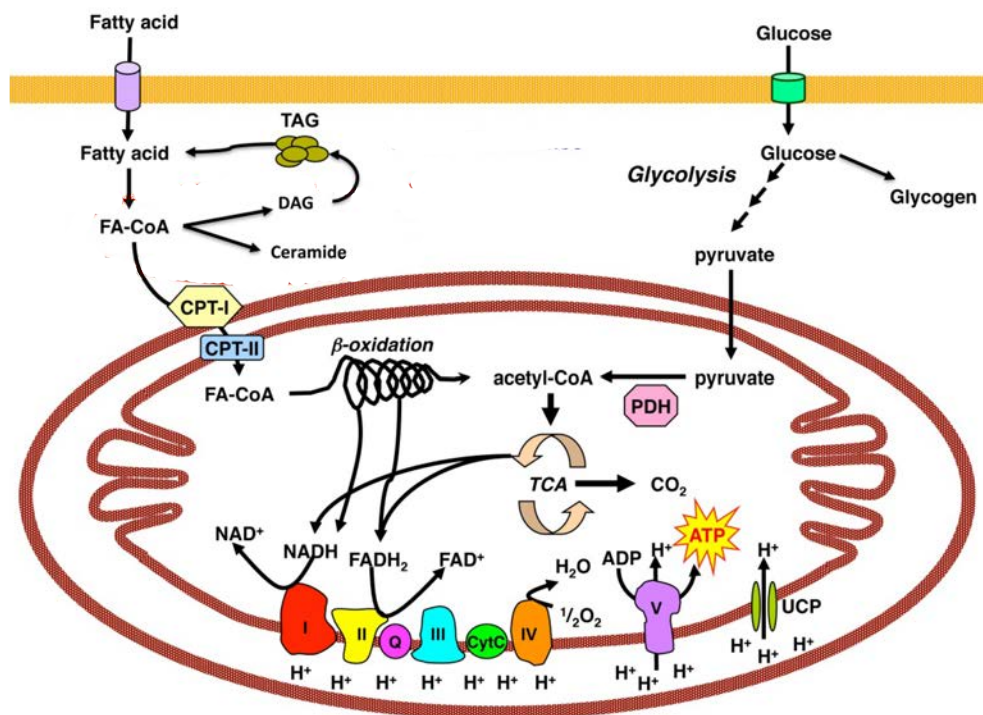


Figura 1.3: Durante el metabolismo oxidativo de la glucosa y los ácidos grasos, se generan equivalentes reductores ( $\text{NADH}$  o  $\text{FADH}_2$ ) a partir de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación. Cuando  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$  se oxidan a  $\text{NAD}^+$  o  $\text{FAD}$  pasan los electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial mientras que los protones se bombean al espacio intermembrana a través de los complejos I, III y IV. Los electrones se transfieren al oxígeno en el complejo IV para producir  $\text{H}_2\text{O}$ . Los protones bombeados generan un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna, que se utiliza como fuerza impulsora de la ATP-sintasa (complejo V) para producir ATP. Los protones también pueden ingresar a la matriz a través de proteínas desacopladas. Imagen adaptado de<sup>22</sup> TAG triacilglicérido; DAG diacilglicérido; PDH Piruvato deshidrogenasa; CPT Carnitine palmitoyltransferase I; UCP proteína desacoplante

### 1.2.1. Sistema de fosforilación oxidativa-OXPHOS

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) consta de una cadena de transporte electrónico (mtETC, *del inglés*: Electron Transport Chain), formada por los complejos I-IV, dos transportadores de electrones móviles (CoQ y Cyt c) y el complejo V o ATP sintasa (Figura 1.4). El proceso de fosforilación oxidativa acopla el flujo electrónico producido por la oxidación del  $\text{NADH}/\text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$  a la fosforilación del ADP. En los complejos I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa), III (ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa) y IV (Citocromo c oxidasa), el flujo electrónico está acoplado a un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranoso (Figura 1.4). De esta manera se genera un gradiente electroquí-

mico o potencial de membrana que es aprovechado por el complejo V (ATP sintasa mitocondrial) para sintetizar ATP a partir de ADP y  $P_i$ <sup>23,24</sup>. De forma alternativa, los electrones del  $FADH_2$ , producto final complejo II (succinato deshidrogenasa) o enzimas como la glicerol-3-P deshidrogenasa, la ubiquinona oxidoreductasa o la dihidroorotato deshidrogenasa son cedidos a la ubiquinona y son canalizados mediante el complejo III, citocromo c y complejo IV para finalmente reducir el oxígeno molecular. La transferencia electrónica entre los complejos respiratorios está catalizada por dos transportadores de electrones (la ubiquinona y el Cyt C) capaces de trasladarse a través de la bicapa lipídica y conectar los complejos I-IV entre sí.<sup>25,26</sup>

La organización del sistema de fosforilación oxidativa dentro de la membrana interna mitocondrial no está resuelta de manera definitiva. Actualmente existen dos modelos: el modelo *fluido* y el modelo *sólido*. El modelo *fluido* postula que los complejos de la cadena difunden libremente por la membrana y la transferencia de electrones tiene lugar en función de las colisiones arbitrarias entre los complejos y los transportadores móviles<sup>27,28</sup>. El modelo "sólido" propone la asociación entre los complejos I-IV siguiendo una secuencia ordenada<sup>29?</sup>. Actualmente se postula la existencia de interacciones estables entre los complejos formando los denominados supercomplejos<sup>30-36</sup>. Finalmente se ha sugerido que deben coexistir ambas formas de organización del sistema OXPHOS, en una manera dinámica<sup>37</sup> denominado modelo de *plasticidad* que propone que los complejos pueden aparecer individualmente o en diferentes tipos de supercomplejos<sup>38,39</sup>. Además de los complejos I-IV, también se ha descrito la formación de dímeros para el complejo V<sup>40-43</sup>.

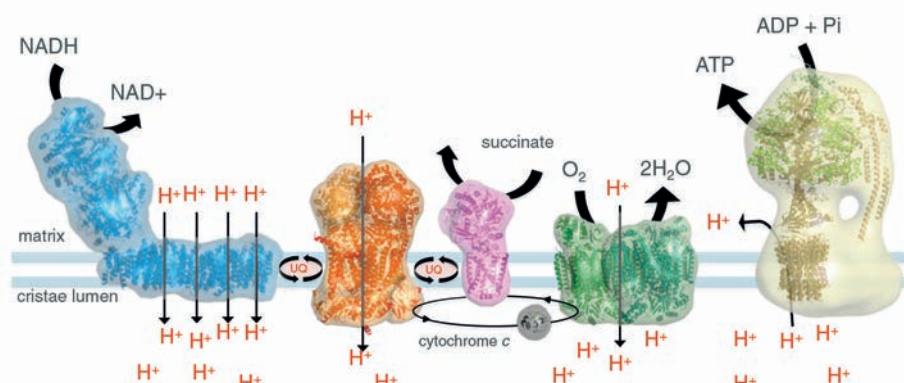


Figura 1.4: Representación esquemática del Sistema OXPHOS. En la figura se muestran los complejos de la cadena respiratoria y se indica en qué puntos se produce el bombeo de protones, así como el número de subunidades que los componen y los cofactores que contienen. El complejo V o ATP sintasa completa el sistema de fosforilación oxidativa. Complejo I (NADH deshidrogenasa, azul), II (succinato deshidrogenasa, rosa), III (complejo citocromo  $bc_1$ , naranja), IV (citocromo c oxidasa, verde) V (FoF1-ATP sintasa mitocondrial, amarillo)<sup>44</sup>

### 1.3. La dinámica mitocondrial

La dinámica mitocondrial (DM) incluye los procesos de motilidad de la mitocondria en el citoplasma<sup>45</sup>, la remodelación por fusión y fisión y como consecuencia la remodelación de la ultraestructura mitocondrial<sup>46,47</sup> (Figura 1.5). La fusión y fisión de las mitocondrias, catalizados por proteínas hidrolasas de trifosfato de guanósina (GTPasas) de la superfamilia de la dinamina<sup>8,48</sup> garantiza la transferencia entre

mitocondrias de moléculas de señalización y el intercambio de metabolitos.

Además, la fusión y fisión producen cambios del potencial de membrana mitocondrial y oscilaciones del estado energético a nivel celular, ambos relacionados con las propiedades de las membranas mitocondriales<sup>49</sup>. El equilibrio entre los mecanismos de fusión y fisión determina la estructura global de la red mitocondrial<sup>50</sup> y una remodelación continua de la morfología de las mitocondrias son procesos esenciales e importantes para mantener la homeostasis celular y la viabilidad de la célula eucariota<sup>51-53</sup>. Este equilibrio determina si las mitocondrias producen energía en forma de ATP o si se dirigen a la muerte celular o apoptosis<sup>50</sup>.

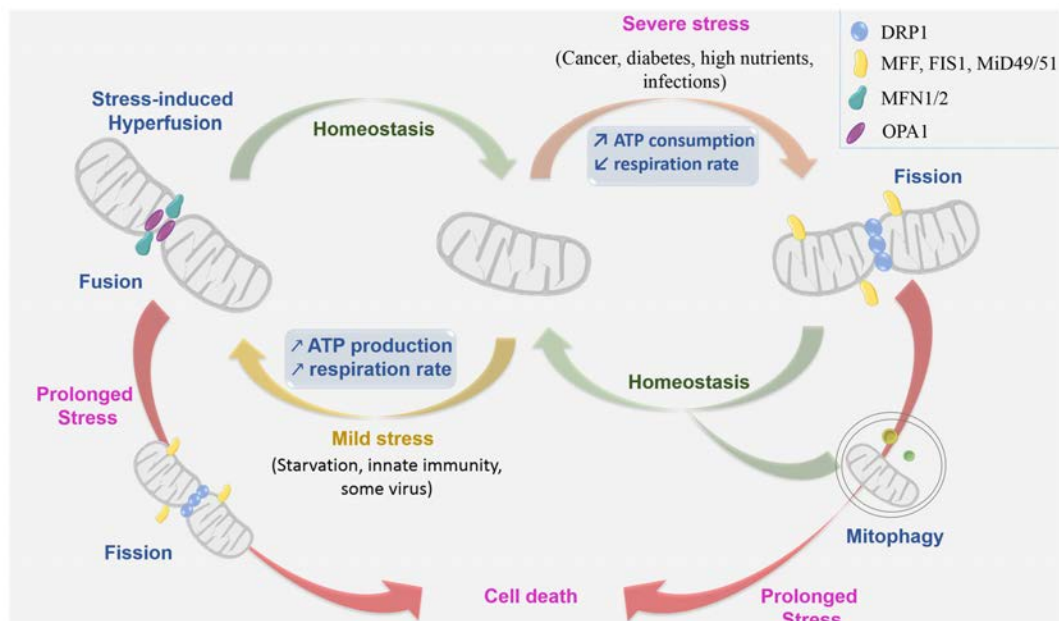


Figura 1.5: Dinámica mitocondrial: maquinaria y contexto. Las mitocondrias se someten continuamente a dos procesos opuestos relacionados con la membrana: fisión y fusión. Según el contexto celular y las circunstancias, el equilibrio entre fisión y fusión podría verse alterado y se inclinaría hacia uno de estos dos procesos. Cuando las células se someten a estrés leve, las mitocondrias forman una red alargada e interconectada, resisten la mitófagia y aumentan la producción de ATP para adaptarse a las estreses celulares como privación de nutrientes. Por el contrario, en el caso de estrés severo, las mitocondrias presentan una forma fragmentada. El incapacidad de estas vías de generar un equilibrio entre los dos procesos resulta en la eliminación de la mitocondria por medio de mitófagia o, en caso de que el estrés es prolongado, por apoptosis. DRP1: proteína 1 relacionada con dinamina; MFF: factor de fisión mitocondrial; FIS1: FISsion 1; MiD49/51: Dinámica mitocondrial 49/51; Mfn1/2: mitofusina 1/2; OPA1: atrofia óptica 1. Imagen publicada en <sup>54</sup>

## 1.4. Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales o la disfunción mitocondrial están relacionados con defectos de la oxidación de los ácidos grasos<sup>55</sup>, del metabolismo del piruvato<sup>56</sup>, defectos del ciclo de Krebs<sup>20</sup>, el acoplamiento oxidación-fosforilación<sup>57</sup>, de la cadena respiratoria mitocondrial (complejos I-V) o por deficiencia de coenzima Q<sub>10</sub><sup>58</sup> y pueden llevar a neuropatías<sup>59</sup>, cardiopatías<sup>60,61</sup> o alteraciones metabólicas que tienen como resultado una aceleración del envejecimiento de las células<sup>62,63</sup>.

La disminución de fusión mitocondrial altera la oxidación de nutrientes, la cadena respiratoria, y los niveles de leptina<sup>64</sup> o insulina<sup>65</sup> produciendo obesidad o

diabetes respectivamente<sup>66–69</sup>. En el cerebro, la disfunción mitocondrial daña parte del sistema fisiológico neuronal<sup>70</sup> y puede producir como consecuencia varios trastornos neurodegenerativos, como las enfermedades de Parkinson, el Síndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT2), la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington<sup>71</sup>. En el tejido cardiaco, la DM es importante como cardioprotector en la edad adulta y fundamental para el desarrollo embrionario temprano. Aunque en general, el envejecimiento de las células está asociado a la pérdida de los telómeros, los segmentos finales de los cromosomas, que protegen la información genética contenida en los cromosomas de la degradación<sup>66,69,70,72–76</sup>, también se ha descrito que puede inducir cambios en los niveles de expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en DM produciendo así mitocondrias disfuncionales.

## 1.5. La maquinaria de fisión mitocondrial

En mamíferos, la fisión mitocondrial está regulada por la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp-1; *del inglés*: Dynamin-related proteína) y la proteína de fisión 1 (Fis1)<sup>77</sup> (Figura 1.5). Drp-1 es una GTPasa que se localiza en futuros sitios de fisión de la MEM a través de la proteína Fis1, una proteína adaptadora que participa en el ensamblaje de complejos de fisión y que actúa por constricción<sup>63</sup>. El aumento de fisión se ha asociado a condiciones de estrés metabólico<sup>78</sup>, autofagia<sup>79</sup> y apoptosis<sup>80</sup>.

## 1.6. La maquinaria de fusión mitocondrial

La fusión de mitocondrias está controlada por la presencia de proteínas tipo dinamina (DLP; *del inglés*: dyamin-like proteins)<sup>77,81,82</sup> en la membrana externa como mitofusina 1 (Mfn1) y mitofusina 2 (Mfn2)<sup>52,83</sup>; y en la membrana interna como la proteína atrofia óptica 1 (OPA1; *del inglés*: Optic atrophy protein 1)<sup>84</sup> (Figura 1.5). Estas proteínas y las DLPs muestran una alta similitud estructural, pero baja identidad de secuencia primaria<sup>48,85</sup>. Las DLPs operan en diferentes orgánulos dentro de la célula eucariota, donde desencadenan la formación de vesículas, la citocinesis, la fusión de membranas, la división (fisión) de orgánulos o actividad antiviral<sup>48,85–88</sup> e incluyen proteínas como la atlastina (ATL)<sup>89</sup>, la proteína Mx1 (Proteína de unión a GTP inducida por interferones Mx)<sup>90</sup>, Drp1 (proteína 1 relacionada con la dinamina)<sup>91</sup>, Dnm1 de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>92</sup> y DLP bacteriana (BDLP; *del inglés*: Bacterial Dynamin like Protein)<sup>85</sup> (Figura 1.6). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de un dominio-GTPasa (dominio G), dominios centrales (*del inglés*: middle domain) y un dominio efector de GTPasa (GED; *del inglés*: GTPase effector domain)<sup>85,88</sup>.

El dominio-G contiene cuatro motivos conservados para la unión e hidrólisis de GTP. El G1 (o bucle P) es fundamental para las interacciones con los grupos fosfato en el nucleótido, el G2 (o interruptor/switch 1) y G3 (o interruptor/switch 2) coordinan los grupos fosfato y generalmente transmiten cambios conformacionales durante la hidrólisis de nucleótidos. Finalmente el motivo G4 se acopla a la ribosa del nucleótido (Figura 1.7). Los dominios GED están involucrados en la oligomerización de la proteína y la regulación del dominio-G. No obstante, algunas proteínas de esta superfamilia contienen de un segmento transmembrana (TMS; *del inglés*:

Transmembrane Segment) que ancla la proteína a la membrana<sup>91</sup> (Figura 1.6 y 1.8). Esta superfamilia contiene también proteínas que sólo muestran homología con el dominio-G, pero no con el dominio central o el dominio-GED.

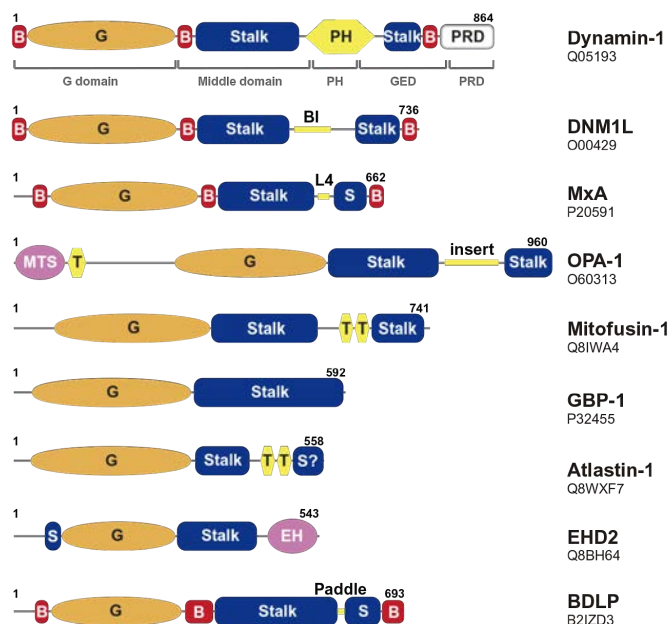


Figura 1.6: Los dominios de las proteínas de la superfamilia de dinamina. Los dominios basados en la estructura de las proteínas de la superfamilia de dinamina, con el número de acceso UniProt indicado (G: dominio-G; B: BSE; S: tallo (*del inglés* stalk); PH: dominio PH; PRD: dominio rico en prolina (*del inglés* proline rich domain); BI: inserto B; L4: Bucle 4 (*del inglés* Loop L4); MTS: secuencia de direccionamiento mitocondrial (*del inglés* mitochondrial targeting sequence); T: dominio transmembrana predicho; EH, dominio de homología a Eps15). Si no hay estructura disponible (OPA-1 y Mitofusin-1) se supone la arquitectura del dominio. El termino-C de atlastina-1 no se resolvió por cristalografía. Forma una hélice  $\alpha$  que participa en la remodelación de la membrana, pero no se ha descrito que esta hélice se asocie con la parte identificada del tallo (*del inglés* stalk). La imagen esta publicada en<sup>93</sup>

Mientras que las Mfn 1 y 2 interactúan entre sí para coordinar la fusión de la membrana mitocondrial externa de mitocondrias opuestas<sup>83,94</sup>, OPA1 participa en la remodelación de las *crestas* mitocondriales, el acoplamiento y la fusión de la membrana mitocondrial interna<sup>95,96</sup>. La fusión de ambas membranas mitocondriales funciona como dos eventos independientes y separados<sup>97</sup>. Mientras que la fusión de la membrana externa mitocondrial requiere baja concentración de GTP, la fusión de la membrana interna requiere de la hidrólisis de GTP y un potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta p$  o pmf; *del inglés*: proton motive force)<sup>98</sup>. La fusión regula directamente el metabolismo mitocondrial<sup>99</sup>. Una bajada de la concentración de la proteína OPA1 o cualquiera de las Mfn mediante ARN de interferencia produce mitocondrias fragmentadas con menor consumo de oxígeno y un reducido  $\Delta p$ <sup>99</sup>. La sobreproducción de Mfn2 incrementa directamente la actividad de los complejos respiratorios, la oxidación mitocondrial y la utilización de glucosa<sup>100</sup>. No obstante se desconoce la relación de Mfn y OPA1 con la maquinaria metabólica.

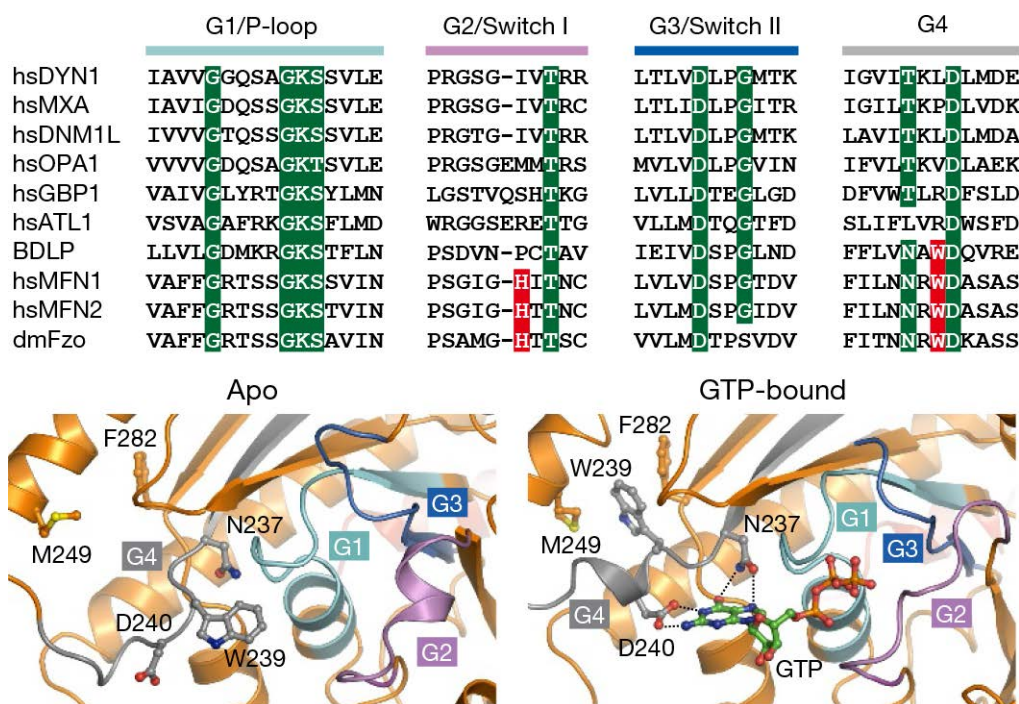


Figura 1.7: Alineamiento de secuencia de los elementos G1-G4 de los miembros de la superfamilia de dinamina. Arriba) Los motivos/residuos conservados se resaltan en verde. Los residuos clave responsables para la unión de nucleótidos y la catálisis de Mfn1 se resaltan en rojo. dm, *Drosophila melanogaster*; hs, *Homo sapiens*. Abajo) Detalles estructurales del bolsillo de unión a nucleótidos libre de nucleótido (apo, izquierda) y unido a GTP (holo, derecha). G1 hasta G4 están coloreados como en arriba.<sup>101</sup>

### 1.6.1. Mitofusina

Las proteínas Mfn1 y Mfn2 de mamífero son homologas a la proteína Fzo1 de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>102</sup> y Fzo de *Drosophila melanogaster*<sup>103-105</sup>. Se cree que Mfn1 y Mfn2 ejercen juntas la misma función que sus homólogos en *S. cerevisiae* y *D. melanogaster*<sup>106</sup>.

Entre sí, Mfn1 y Mfn2 comparten una alta homología de su secuencia primaria de aminoácidos con una identidad de 63.46%<sup>94,106,107</sup>. El gen que codifica la Mfn1 humana se localiza en el cromosoma 3 locus 3q27 y tiene un tamaño de 2226 pares de bases<sup>108</sup>. El proceso de empalme alternativo (*del inglés*: alternative splicing) durante la transcripción y traducción del gen se pueden producir tres isoformas del ARN mensajero que dan lugar a la producción de la proteína Mfn1 con tamaños de 84, 71 y 41 kDa. La forma íntegra, la isoforma 1 (~84 kDa) es la más investigada<sup>106,108</sup>. Los dominios estructurales de las Mfn son el dominio-G (dominio-G) en su amino-terminal (termino-N), los dominios GED con nombre HR1 y HR2 (*del inglés* Heptad Repeat), que se organizan como helicoides enrollados (Cc1 y Cc2; *del inglés* Coiled-coil), en la parte central y en el carboxilo-terminal (termino-C) y una región hidrofóbica que separa estructuralmente los dominios HR1 y HR2<sup>106</sup> (Figura 1.6 y 1.8). Actualmente existe una controversia sobre la organización de la región hidrofóbica. Si se organiza en dos TMS, el termino-N y el termino-C de la proteína están orientados hacia el citoplasma de la célula. En este caso un segmento corto de cinco aminoácidos que separa los dominios TMS1 y TMS2 está orientado hacia el espacio intermembranoso de la mitocondria<sup>106</sup>. Si la región hidrofóbica se organiza

como un único TMS, el termino-N se orienta hacia el citoplasma de la célula y su término-C hacia el espacio intermembranoso de la mitocondria<sup>109</sup>.

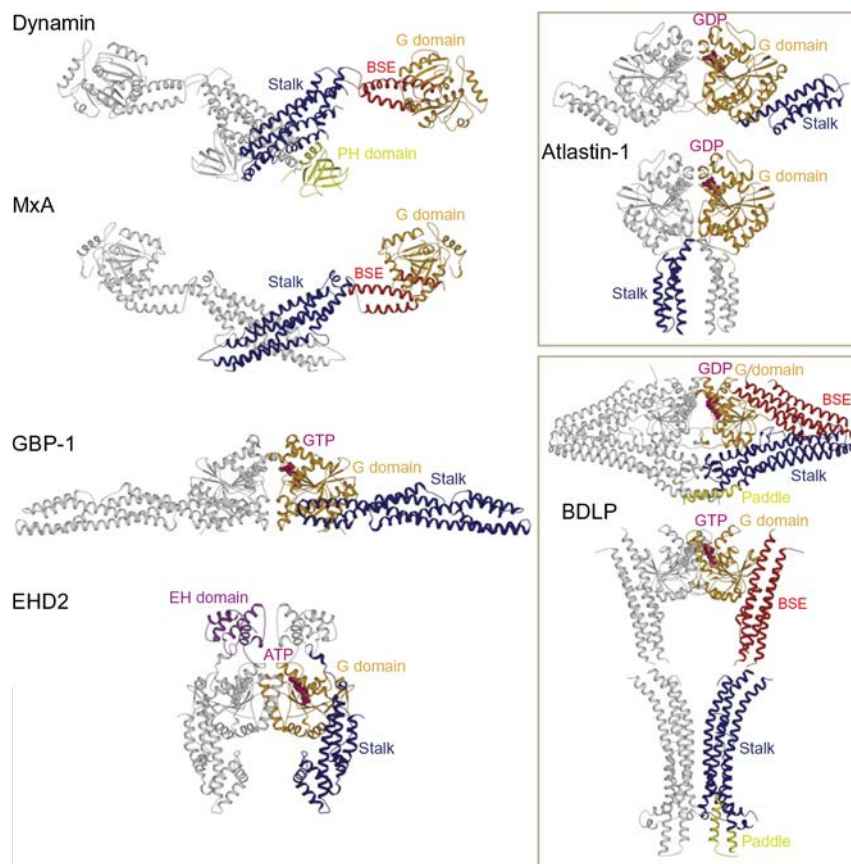


Figura 1.8: **Estructuras cristalinas de proteínas de la superfamilia de dinamina.** Representación de los dímeros de dinamina (pdb: 3SNH), MxA (pdb: 3SZR), GBP1 de longitud completa (pdb: 1F5N) con el dominio-G como interfaz (modelado usando pdb: 2B8W), atlasina-1 unido a GDP (pdb: 3Q5D y 3Q5E), EHD2 en presencia de un análogo de ATP no hidrolizable (pdb: 2QPT) y BDLP en la forma cerrada (pdb: 2J68) y la forma abierta (pdb: 2W6D) en presencia de un análogo de GTP no hidrolizable<sup>93</sup>.

Hasta la fecha, la secuencia de los eventos que conllevan a la fusión de la MEM sigue sin esclarecerse completamente, ya que solo se han realizado unos pocos estudios con la proteínas Mfn de longitud completa<sup>97,102</sup>. Algunos estudios genéticos indican que la presencia del dominio-G de la Mfn es obligatoria<sup>102</sup> y la hidrólisis de GTP necesaria para la adhesión de las mitocondrias a través de la dimerización de los dominios-G de las Mfn de membranas adyacentes (*trans*)<sup>102,108-117</sup>. Estos experimentos no aclaran si el dominio-G está activamente implicada en la adhesión de membranas o si su actividad facilita la adhesión de membranas ejecutado por otro dominio de Mfn. Además, algunos experimentos *in vitro* han demostrado que la fusión de mitocondrias aisladas requiere la presencia de cationes ( $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ) y la presencia de un  $\Delta p$ <sup>14,118</sup>.

DE manera análoga al mecanismo descubierto para la proteína ATL<sup>119</sup>, la hipótesis actual es que Mfn aproxima mitocondrias adyacentes a través de sus dominios-G y promueve su adhesión<sup>14,101,112,118</sup>. ATL es una proteína bifuncional del Retículo Endoplasmático (RE)<sup>120</sup> y es junto con la dinamina, una de las DLPs mejor estudiadas. En presencia de GTP forma dímeros *trans* cuyos monómeros, que provienen de

membranas RE adyacentes (*trans*), residen en conformación abierta, con sus dominios centrales elongados tocando la membrana opuesta. Tras la hidrólisis del GTP unido, el dominio central se compacta<sup>112</sup> y produce como consecuencia la adhesión de las membranas adyacentes. En un paso posterior, la fusión de las membranas RE está mediado por una hélice anfipática situado en el término-C de los monómeros de ATL que desestabiliza la bicapa lipídica y facilita su remodelación<sup>121,122</sup>.

### 1.6.2. Las estructuras proteicas de las mitofusinas

Las estructuras proteicas de Mfn disponibles hoy por hoy son, en general, variantes truncadas en presencia (*holo*; pdb: 5GNS<sup>123</sup>; 5GOE, 5GOF<sup>101</sup>, 6JFK<sup>124</sup>), en ausencia (*apo*; pdb: 1T3J<sup>110</sup>, 5GO4<sup>101</sup>, 6JFL, 6JFM<sup>124</sup>) de nucleótido o en presencia de análogos de GTP, GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> (pdb: 5GOM<sup>101</sup>) o GDP·BeF<sub>3</sub><sup>-</sup> (pdb: 5YEW<sup>14</sup>).

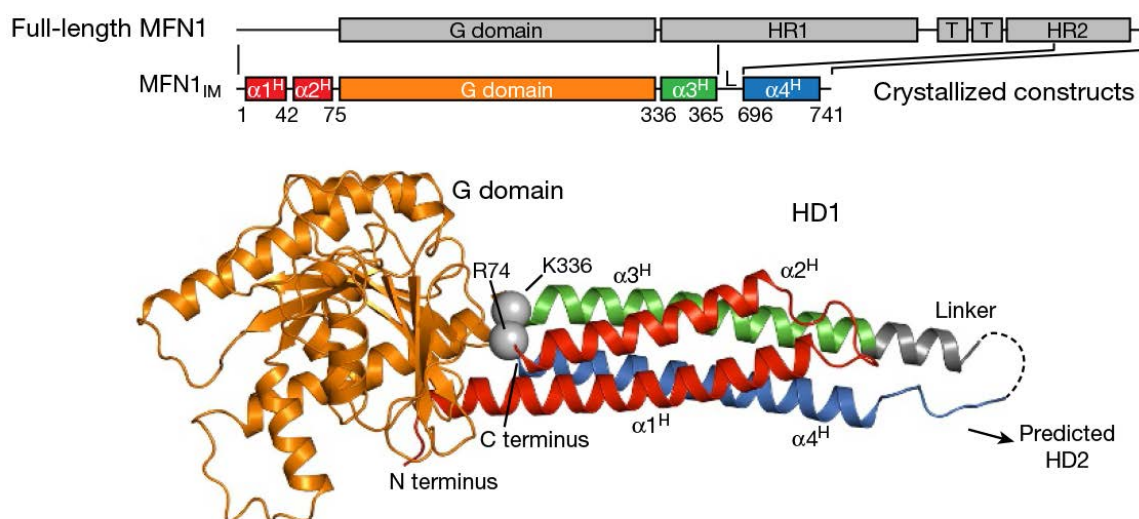


Figura 1.9: **Estructura molecular de MFN1<sub>IM</sub>**. Representación esquemática y estructural de Mfn1<sub>IM</sub> basada en Mfn1 de longitud completa<sup>101</sup>. Dominio-G, dominio GTPasa; HR1, heptad Repeat y T, región transmembrana. L indica el enlazador artificial. Los límites de cada elemento se indican mediante números de residuo.  $\alpha$ -hélices de HR1 (HD1) están coloreadas como indicado en la representación esquemática. El bucle desordenado y parte del enlazador artificial se muestra como línea discontinua y  $\alpha$  de R74 y K336 se representan como esferas grises.

#### El dominio HR2

En una primera aproximación, la cristalización del dominio HR2 de Mfn1 permitió formular una hipótesis sobre el mecanismo del acoplamiento de las membranas externas de mitocondrias adyacentes (*trans*) a través una interacción antiparalela de su dominio HR2<sup>52,113</sup>. El acoplamiento intermolecular (HR1/HR1; HR2/HR2) e intramolecular (HR1/HR2) de los dominios HR de modo paralelo o antiparalelo pueden ser importantes moduladores para la función de las mitofusinas<sup>14,83,110,113,123,125</sup>. Actualmente el modelo vigente postula que el dominio HR2 conduce a la oligomerización intramolecular *cis* y a la interacción intermolecular *trans* de la mitofusina<sup>110?</sup>, mientras que el dominio HR1 produce la fusión de las membranas<sup>113</sup>. La ausencia de los TMS en las estructuras disponibles limita la interpretación de los mecanismos

ya que por su analogía a la proteína ATL esta región debe tener un papel durante la fusión y no solo limitarse a anclar la proteína en la membrana<sup>126</sup>.

### La variante MFN1<sub>IM</sub>

La variante MFN1<sub>IM</sub> (pdb:5GO4, 5GOE 5GOF, 5GOM<sup>101</sup>), que está compuesto por en su término-N y la mitad del dominio HR2 en su término-C<sup>14,101,112,123</sup> (Figura 1.9), has sido cristalizada en forma monomérica y en forma dimérica<sup>14,112</sup>.

El dominio-G está formado por una lámina- $\beta$  central compuesta por ocho cadenas rodeada por ocho hélices- $\alpha$ . Juntos forman dos lóbulos con el bolsillo de unión de nucleótido en el centro (Figura 1.10A). El lóbulo 1, está formado por dos cadenas- $\beta$  ( $\beta$ -1'<sup>G</sup> y  $\beta$ -2'<sup>G</sup>) y una hélice- $\alpha$  ( $\alpha$ -1'<sup>G</sup>) y el lóbulo 2 está formado por la hélice- $\alpha$  ( $\alpha$ -3'<sup>G</sup>) y un bucle. En comparación con la estructura canónica de la GTPasas Ras<sup>127</sup>, el dominio-G de Mfn1 tiene dos bucles de aminoácidos adicionales que tapan el bolsillo de unión de nucleótidos y una hélice- $\alpha$  corta ( $\alpha$ -2'<sup>G</sup>) que se encuentra entre la hélice- $\alpha$ -4<sup>G</sup> y la hoja- $\beta$ -6<sup>G</sup> (Figura 1.10A).

Por otro lado, HR1 está compuesto por cuatro hélices- $\alpha$  que forman una gran red hidrofóbica (Figura 1.10B). HR1 está conectado al dominio-G a través de arginina 74 (R74) en el extremo término-C de  $\alpha$ -2<sup>H</sup> y lisina 336 (K336) entre  $\alpha$ -5<sup>G</sup> y  $\alpha$ -3<sup>H</sup>. En el otro lado de HR1 se sitúa un enlazador que reemplaza los TMS para unir artificialmente el dominio HR1 con el dominio HR2 (Figura 1.10B). El enlazador se pliega en una hélice- $\alpha$  que extiende la hélice  $\alpha$ -3<sup>H</sup> y sugiere que esta podría ser más largo en la Mfn1 completa.

El dominio HR1 de MFN1<sub>IM</sub> es parecido a la zona *cuello* (*del inglés: neck*) de la proteína BDLP de *Nostoc punctiforme* (pdb:W6D<sup>128</sup> y pdb: 2J69, 2J68<sup>129</sup>; Figura 1.11) y sugiere, por analogía, que la hidrólisis de GTP por el dominio-G produce un cambio estructural de la proteína Mfn de una conformación compacta a una conformación extendida parecida a una navaja plegable<sup>128,129</sup> (Figura 1.11 y 1.14). Los aminoácidos lisina 336 (K336), glicina 309 (G309) y arginina 74 (R74) de MFN1<sub>IM</sub> se superponen con arginina 327 (R327), glicina 309 (G309) y glicina 68 (G68) de BDLP situada en la zona denominada "bisagra" (*del inglés: hinge*). Mutaciones de estos residuos en MFN1 disminuyen su actividad GTPasica y se observan mitocondrias elongadas en fibroblastos de ratón (Mfn1/2-null MEFs, *del inglés: Mouse Embryonic Fibroblasts*)<sup>101</sup>.

Mientras que las estructuras *apo* y *holo* (en ausencia y presencia de GTP, respectivamente) son monoméricas, se obtiene un homodímero de MFN1<sub>IM</sub> en presencia de GDP·AlF<sub>4</sub>. GDP·AlF<sub>4</sub> se une al sitio de unión de nucleótidos y la molécula de fluoruro mimetiza el fosfato- $\gamma$  de GTP y la proteína permanece atrapada en el estado de transición de GTP<sup>130</sup>. La dimerización está mediada por la interacción de los dominios-G a través del bolsillo de unión a nucleótidos que se enfrentan entre sí y los HR1 que sobresalen en direcciones opuestas del eje del dímero (Figura 1.12). Proteínas diméricas con el dominio-G en el estado de transición de GTP se han obtenido también para otros DLPs<sup>131-133</sup>.

### La variante Mfn1-MGD

La variante MFN1-MGD de MFN1 está compuesta en su término-N del dominio-G y las primeras hélices de HR1 y en su término-C por las hélices de HR2 (Figura 1.13). Los dominios HR1 y HR2 están conectados por una secuencia de aminoácidos

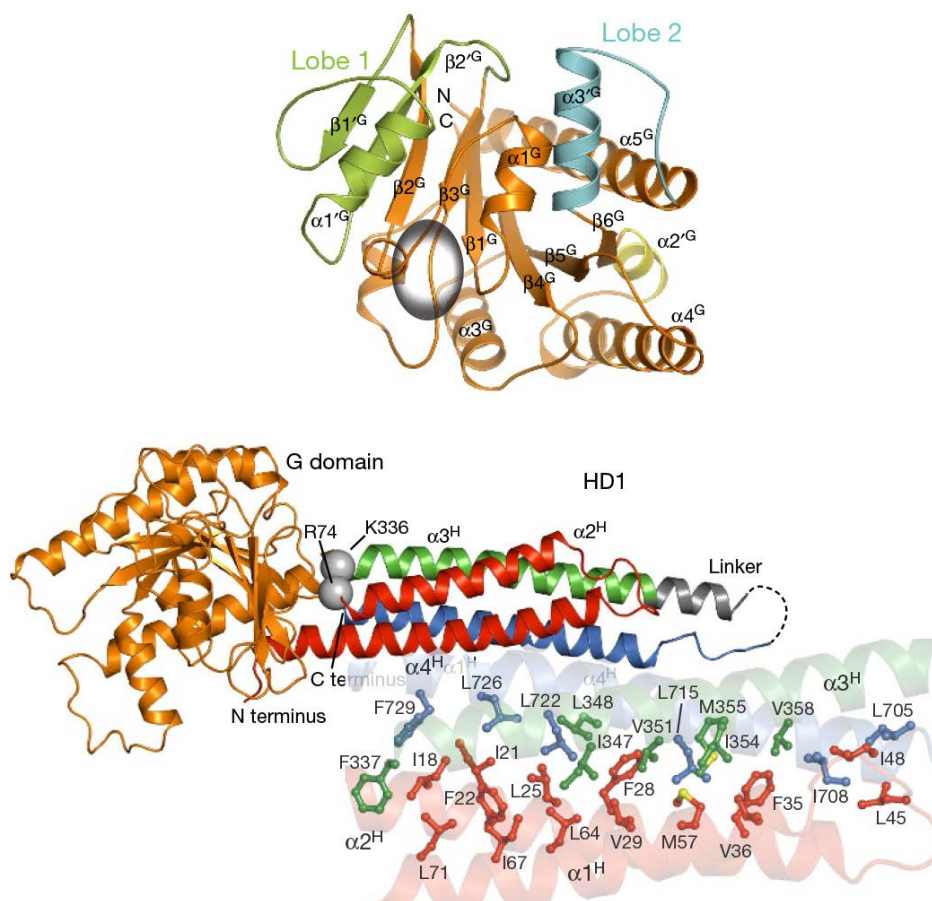


Figura 1.10: **Detalle molecular de elementos estructurales de Mfn1.** Arriba) El dominio-G de MFN1<sub>IM</sub>. Los lóbulos 1, 2 y  $\alpha 2^G$  se distinguen por color. La región central correspondiente a Ras (naranja) y el sitio activo de GTPasa está indicado por un elipsoide. Abajo) Los dominios HR (HD1). Las cadenas laterales de los residuos involucrados en la red se muestran en el mismo color que las hélices a las que pertenecen.<sup>101</sup>

de pequeño tamaño (GSGSGSGGS) para no interferir con el plegamiento de la proteína. Esta variante de Mfn1 forma un dímero en presencia de GDP y trifluoruro de berilio ( $\text{GDP} \cdot \text{BeF}_3^-$ )<sup>123</sup>. El  $\text{GDP} \cdot \text{BeF}_3^-$  actúa como  $\text{GDP} \cdot \text{AlF}_4^-$  y la proteína permanece atrapada en el estado de transición de GTP<sup>130</sup>. El dominio-G de Mfn1-MGD es parecido al dominio-G obtenido de Mfn1<sub>IM</sub> (Figura 1.9). Similar a Mfn1<sub>IM</sub><sup>101</sup> y otros DLPs<sup>120,131,132,134-136</sup>, la interfaz de dimerización está formada por los dominios-G de modo que los sitios de unión de nucleótidos se enfrentan entre sí. El dímero formado por Mfn1-MGD tiene un área de superficie de la interfaz más grande que la observada para el dímero de Mfn1<sub>IM</sub><sup>14,101</sup>. Ambos monómeros se orientan de forma casi paralela apuntando en la misma dirección<sup>14</sup> y presentan una conformación *cerrada*<sup>14</sup> (Figura 1.14, izquierda). Esto es distinto a Mfn1<sub>IM</sub>. La orientación de sus monómeros adopta una conformación *abierta*<sup>101</sup> como la establecida por la proteína BDLP<sup>128,129</sup> (Figura 1.14, derecha). La hidrólisis de GTP resulta en una relajación en el motivo G1 y el motivo G3 que a su vez inducen movimientos de en la zona "bisagra" ( $\beta$ -1 y  $\alpha$ -2) y un movimiento oscilatorio de  $\sim 77$  de HR1.

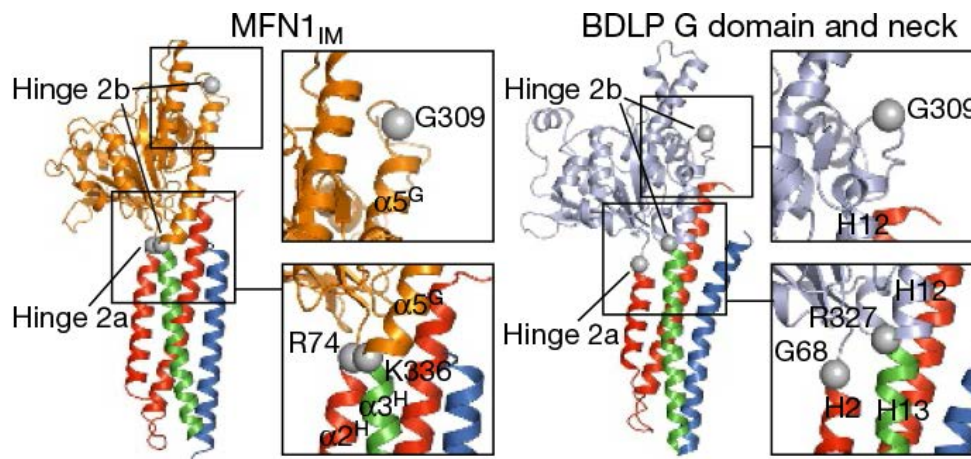


Figura 1.11: **Comparación de las estructuras cristalinas de MGD.** Comparación entre los dominios bisagra 2 (hinge 2) de las estructuras cristalinas las proteínas de MFN1<sub>IM</sub> y BDLP<sup>101</sup>

### 1.6.3. La fuerza iónica local modula la formación de dímeros de Mfn

Estudios de espectroscopia de fluorescencia muestran que Mfn1-MGD es monomérica en estado *apo* y en presencia de GDP o GTP $\gamma$ -S. En presencia de GDP $\cdot$ BeF $_3^-$  es mayoritariamente dimérica independientemente de si el medio acuoso contiene Na $^+$  o K $^+$ . La posición de estos iones en Mfn1-MGD es comparable con la posición de un ion de sodio que se encuentra en la estructura del dominio-G de dinamina-1 en complejo con GDP $\cdot$ AlF $_4^-$ . En dynamin-1, el catión monovalente sirve como un compensador de carga para la hidrólisis de GTP<sup>131</sup>. Cuando se sustituye el NaCl por KCl en el medio acuoso, el GDP se une con la misma afinidad a MFN1-MGD, pero el nucleótido no-hidrolizable GTP $\gamma$ -S muestra mayor afinidad en presencia de KCl<sup>123</sup>; indicando que el nucleótido se acomoda mejor en el bolsillo de unión. En presencia de BeF $_3^-$ , la unión de GDP es más eficiente con KCl y menos eficiente con RbCl o NaCl, consecuentemente la actividad GTPasica de MFN1-MGD aumenta notable en presencia de K $^+$  y Mg $^{2+}$  en comparación con Rb $^+$  y Mg $^{2+}$  o Na $^+$  y Mg $^{2+}$  o cualquiera de estos iones solos. A concentraciones fisiológicas de K $^+$  y Mg $^{2+}$ , la actividad GTPasica de Mfn1-MGD aumenta. También, pero en menor grado, las variaciones de pH y la competencia de Na $^+$  pueden alterar la actividad GTPasica. Un aumento de las concentraciones de proteína no interfiere con la actividad GTPasica. En comparación con otros DLPs, Mfn *apo* muestra una actividad de GTPasa débil. Un razón puede ser que el bolsillo de unión a GTP está tapado por el motivo G2<sup>101</sup>.

En presencia de GTP, sólo se observó una dimerización en cuando el medio acuoso contenía Na $^+$ . En presencia de K $^+$ , el GTP fue rápidamente hidrolizado a GDP, y el dímero se disocia en monómeros. Por el contrario, el intercambio de GTP se redujo en el medio acuoso que contiene Na $^+$  y una población de la proteína permanece unida a GTP en un estado de transición y, por tanto dimérica. La presencia de dímeros de Mfn1-MGD en presencia de GDP $\cdot$ AlF $_4^-$  aumenta cuando se reemplaza Na $^+$  por K $^+$ . Estos resultados indican que la formación de dímero depende de la unión de nucleótidos y que la proteína se mantiene en estado de transición hasta la disponibilidad de la fuerza iónica adecuada, incluso después de la unión de GTP<sup>14</sup> (Figura 1.15).

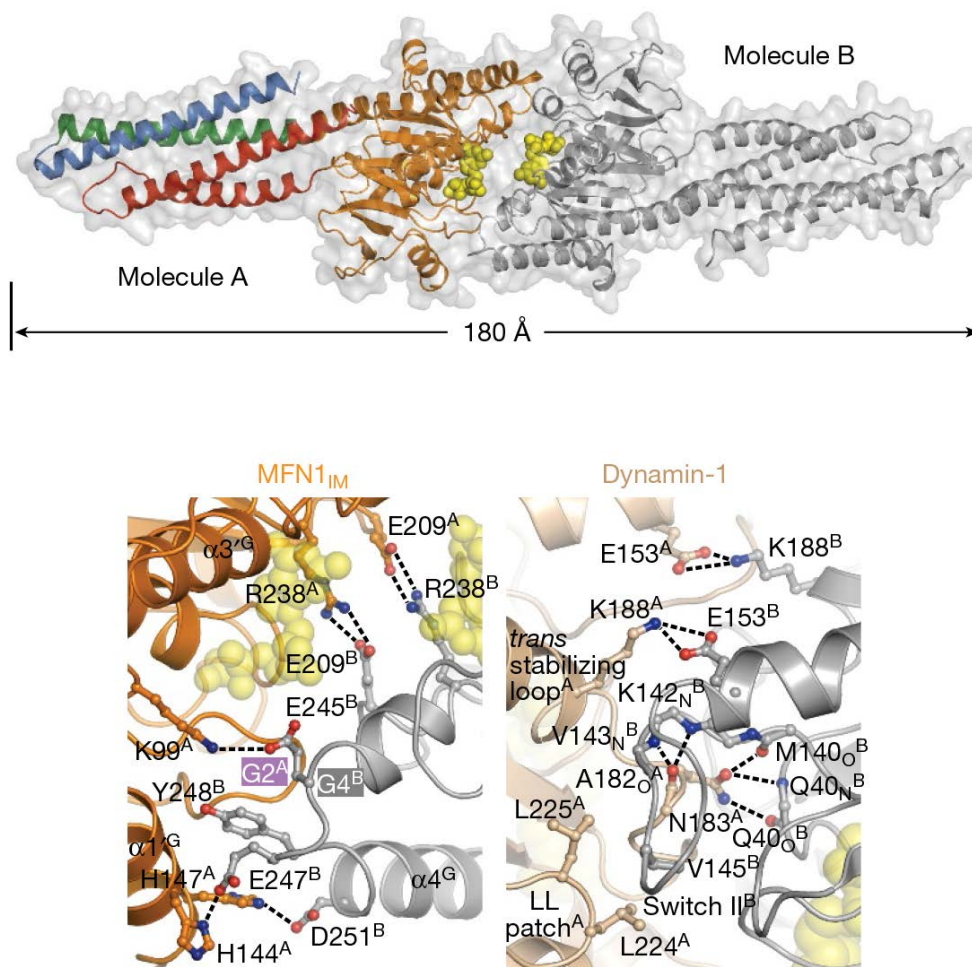


Figura 1.12: **La dimerización de MFN1<sub>IM</sub> a través del dominio-G.** Arriba) Representación de superficie del dímero MFN1<sub>IM</sub> en el estado de transición. La molécula A está coloreada como en Figura 1.9 y la molécula B en gris. El GDP se representa en esferas amarillas. Abajo izq.) Detalles moleculares del interfaz entre dos dominios-G de MFN1<sub>IM</sub>. Solo se muestra un lado del interfaz para otros residuos involucrados. Abajo dcha.) Detalles moleculares del interfaz entre dos dominios-G de la proteína dinamina-1 humana en el estado de transición (PDB: 2X2E).

### Mutaciones en Mitofusina 2 (MFN2) asociados al Síndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT2)

Residuos clave identificados en Mfn1 se conservan principalmente en Mfn2. Cuando se trazan las mutaciones de Mfn2, causantes de la enfermedad CMT2A12, en sus posiciones correspondientes en estructura de Mfn1, V273G, Q276R y R280H (V252, Q255 y R259 en MFN1) se sitúan en el interfaz del dímero, G127D (G106 en Mfn1) coordina un ion de K<sup>+</sup> en G2 (el interruptor/switch 1), y R94Q/W (R73 en Mfn1) y R250Q/W (K229 en Mfn1) están involucrados en la asociación del dominio-G con HR1 cuando la proteína se encuentra en la conformación cerrada. La mutación K336N afecta la bisagra *abierta* y la mutación R73Q afecta al estado *cerrado*. En MEFS Mfn1/2-null R73Q no puede restaurar la fusión mitocondrial mientras que el doble mutante R73Q D198N es capaz de rescatar el defecto provocado por R73Q. La interacción R73 con D198 es crítica para estabilizar el estado *cerrado* de la proteína.

Las mutaciones en el dominio-G de Fzo1 de *Saccharomyces cerevisiae*, incluidos K200A, S201A y T221A (equivalente a K88A, S89A y T109A en Mfn1), no pueden

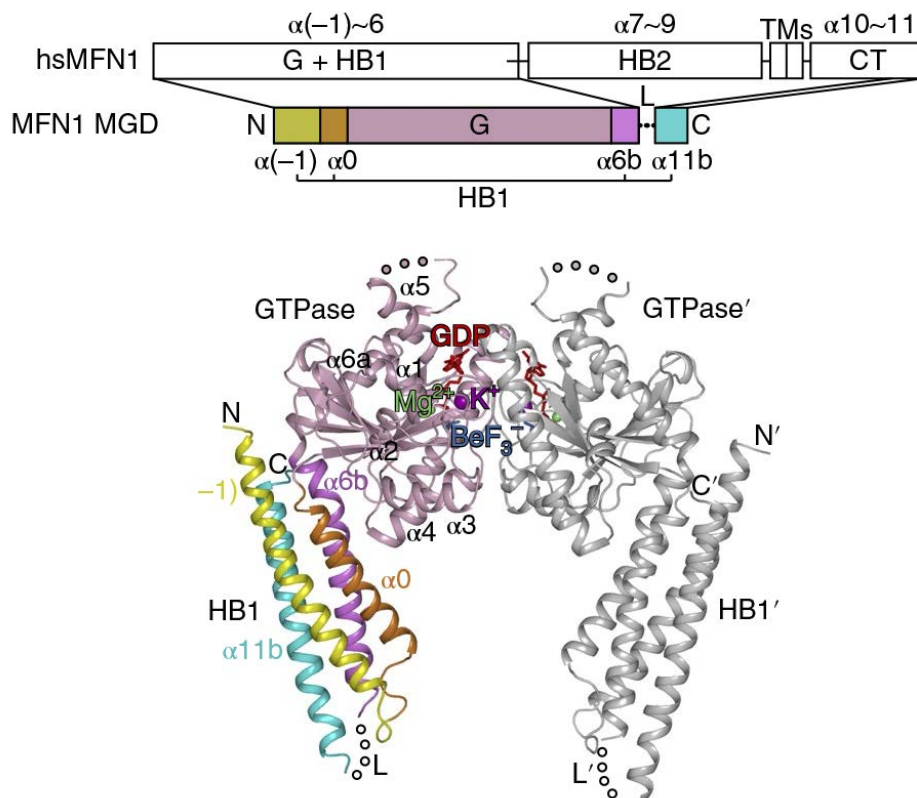


Figura 1.13: **Estructura molecular de Mfn1-MGD.** Arriba) Representación esquemática de la organización de MGD basada en Mfn1 de longitud completa (RN3180). Las regiones de MGD se representan en diferentes colores y los elementos de la estructura secundaria que forman los dominios HR (HB1) están indicados. G, GTPasa; TM, segmentos transmembrana; CT, cola citosólica; L, enlazador; N, termino-N; C, termino-C. Abajo) Estructura cristalina de MGD unido con  $\text{GDP}\cdot\text{BeF}_3^-$ . El dominio-G está representado en rosa, y las hélices en HR (HB1) están en amarillo ( $\alpha(-1)$ ), naranja ( $\alpha(0)$ ), violeta ( $\alpha(6b)$ ), y cian ( $\alpha(11b)$ ). La otra molécula se muestra en gris con sus elementos estructurales etiquetados con una comilla ('). El GDP se representa en rojo,  $\text{BeF}_3^-$  en azul,  $\text{Mg}^{2+}$  en verde,  $\text{K}^+$  en violeta y el enlazador desordenado se indica con una línea de puntos.

soportar el crecimiento en placas YPG (*del inglés*: Yeast Peptone Dextrose<sup>137</sup>). L218 (I105) también es crítico, probablemente en la formación de dímeros. Sorprendentemente, E344 (E209A) y K371 (R238A) no son esenciales.

## 1.7. Membranas lipídicas

Las membranas lipídicas se han descrito, según el clásico modelo de mosaico fluido, como barreras selectivas bidimensional compuestas por lípidos y proteínas que están distribuidos de forma homogénea permitiendo su libre difusión lateral<sup>138</sup>. Las proteínas y los lípidos polares representan casi la totalidad de la masa de membranas biológicas y las proporciones relativas de proteínas y lípidos difieren en diferentes membranas, lo que refleja la diversidad de funciones biológicas. Las pequeñas cantidades de carbohidratos presentes son generalmente parte de glucoproteínas o glucolípidos.

Esta visión simplista ha sido modificada y ajustada. Actualmente, las mem-

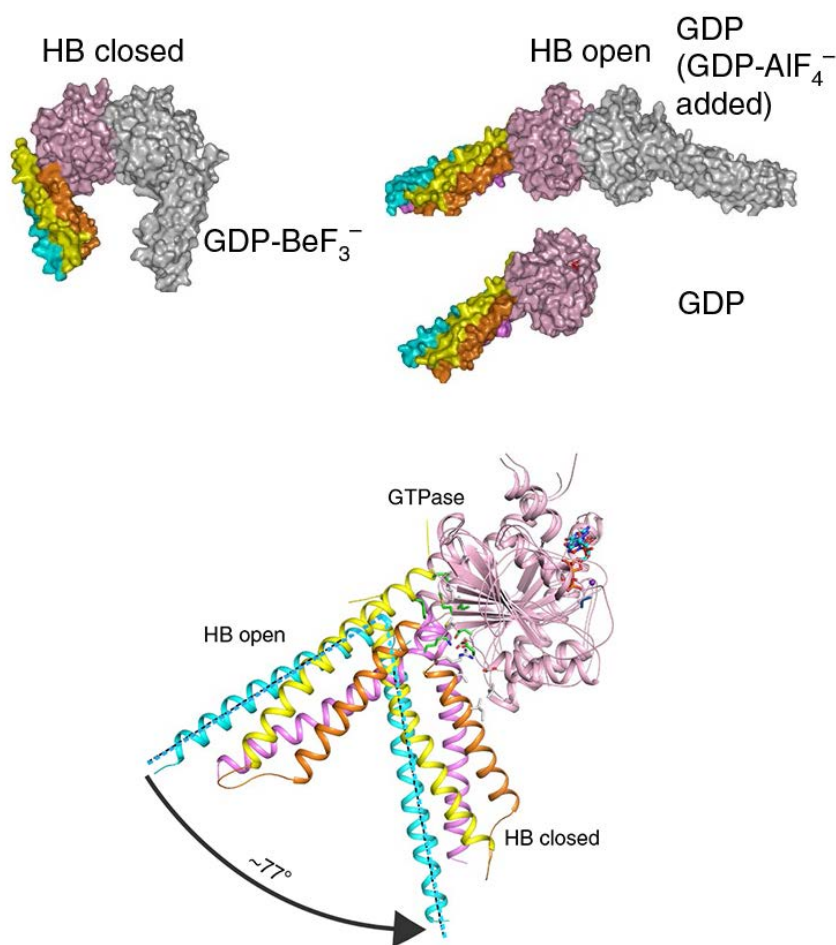


Figura 1.14: **Comparación de las estructuras cristalinas MGD.** Arriba) Representación de la superficie de las estructuras MGD<sup>14</sup>. La GTPasa de un protómero se representa en rosa y las hélices HR (HB1) están en amarillo (*alpha*(-1)), en naranja (*alpha* 0), morado (*alpha* 6b) y cian (*alpha* 11b). Los nucleótidos están rotulados. Abajo) La estructura del dímero (pdb: 5GOM) y el monómero unido a GDP (pdb: 5GNT). El movimiento de HR en relación con GTPasa se indica con una flecha.

branas lipídicas se describen no sólo como barreras selectivas sino también como superficies que catalizan reacciones enzimáticas específicas ya que muchas características y funciones de las proteínas de membrana dependen de la composición y organización lipídica<sup>138</sup>.

El componente mayoritario que encontramos en las membranas biológicas son los lípidos<sup>140</sup>, moléculas con una naturaleza anfipática con su parte hidrofóbica compuesta por cadenas alifáticas, grupos aromáticos o estructuras policíclicas y su parte hidrofílica compuestos por alcoholes (colina, etanolamina, serina, glicerol o inositol, entre otros). Debido a la naturaleza anfipática, los lípidos tienen la capacidad de auto ensamblarse en medio acuoso en agregados supramoleculares como micelas o bicapas para proteger sus zonas hidrofóbicas y exponer las hidrofílicas de forma que se agrupan y emparejan paralelamente<sup>141</sup>. En una bicapa con un  $\sim 4-5$  nm de espesor por ejemplo las colas hidrofóbicas apuntan hacia el interior y sus las cabezas hidrofílicas se quedan en la zona externa<sup>138,142</sup> (Figura 1.17). Los lípidos naturales pueden ser clasificados en tres grupos según su estructura química: glicerofosfolípidos (lípidos basados en glicerol), esfingolípidos (basados en esfingosina) y esteroides<sup>141</sup> (Figura 1.18).

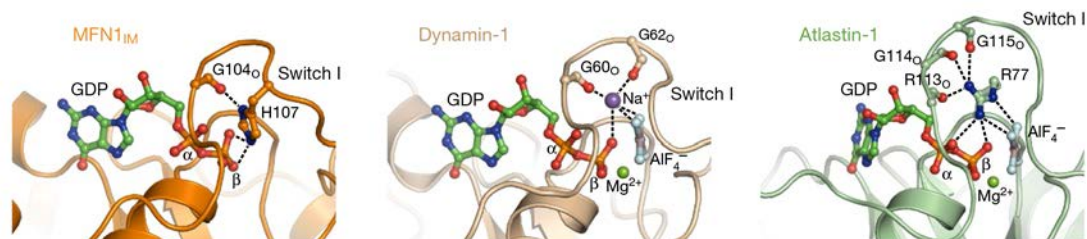


Figura 1.15: La comparación de los centros catalíticos de MFN1 (estado de transición), dinamina-1 (pdb: 2X2E<sup>131</sup>) y atlastina-1 (pdb: 4IDO<sup>132</sup>).

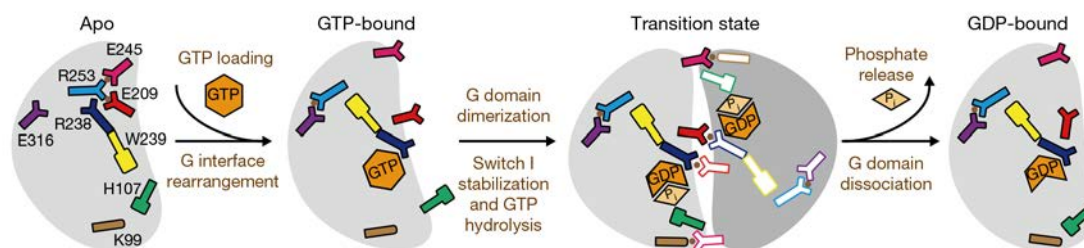


Figura 1.16: **Maquinaria catalítica de MFN1.** Representación esquemática que resume los cambios conformacionales del dominio-G durante la hidrólisis de GTP. Los dominios-G están coloreados en gris. Los residuos y nucleótidos se indican por colores y formas individuales. Los puentes salinos se indican con puntos marrones entre los residuos involucrados.  $P_i$  representa el ion de fosfato.

Los glicerofosfolípidos (Figura 1.18 A), presentes mayoritariamente en las membranas biológicas con una fracción molar de 40-60% con respecto al total de lípidos, tienen una molécula de glicerina como cuerpo principal, cuyos carbonos  $C_1$  y  $C_2$  están esterificados con una cadena de ácidos grasos<sup>143</sup>. En  $C_1$  los ácidos grasos suelen ser cadenas hidrocarbonadas saturadas compuestas por 16 o 18 carbonos, mientras en  $C_2$  los ácidos grasos suelen ser más largas e insaturadas, con uno o varios enlaces dobles en configuración *cis*. En el carbono  $C_3$  de la glicerina se encuentra una molécula de alcohol (colina, etanolamina, serina, glicerol o inositol) unida a un grupo fosfato cargado negativamente. A este conjunto se le conoce como la cabeza polar del lípido que puede tener una carga neta negativa o con carga total neutra (zwitteriónica) dependiendo del alcohol asociado<sup>143</sup>.

Los esfingolípidos (Figura 1.18 B) tienen como base principal la molécula 1, 3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno o esfingosina (ceramida) que lleva en su carbono  $C_2$  unido por un enlace amida una cadena de ácidos grasos (saturada o insaturada) que puede llegar hasta 24 átomos de carbono. La ceramida es unidad estructural de todos los esfingolípidos que se dividen en fosfoesfingolípidos y glucoesfingolípidos, dependiendo si contiene un grupo fosfato unido al hidroxilo de la ceramida al cual se pueden unir colina o etanolamina o si contiene un azúcar (monosacárido u oligosacárido) en el grupo hidroxilo de la ceramida<sup>144,145</sup>.

El último grupo, los esteroides (Figura 1.18 C), tienen una estructura policíclica hidrofóbica formada por tres anillos hexagonales y uno pentagonal fusionados. Estos anillos pueden llevar dobles enlaces y una cadena lateral de 8 o más átomos de carbono conjugado en el carbono  $C_{17}$ , un grupo alcohol en el carbono  $C_3$  y con un grupo metilo en los carbonos  $C_{10}$  y  $C_{13}$ . El esteroide más importante en los mamíferos

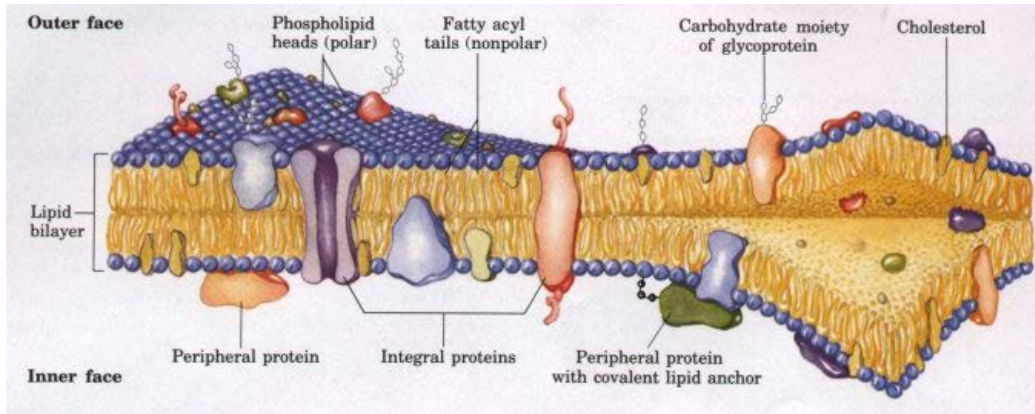


Figura 1.17: El modelo de mosaico fluido para la estructura de la membrana<sup>139</sup>. Las cadenas de acilo graso en el interior de la membrana forman una región hidrófoba fluida. Las proteínas integrales de la membrana flotan en este mar de lípidos, sostenidas por interacciones hidrofóbicas con sus cadenas laterales de aminoácidos no polares. Tanto las proteínas como los lípidos pueden moverse lateralmente en el plano de la bicapa, pero el movimiento de cualquiera de las dos caras de la bicapa a la otra está restringido. Los restos de carbohidratos unidos a algunas proteínas y lípidos de la membrana plasmática se exponen invariablemente en la cara extracelular de la membrana.

es el colesterol, compuesto muy abundante en glóbulos rojos, membranas plasmáticas y en orgánulos celulares, llegando a una fracción molar de 30 y un 50% del total de lípido respectivamente. En hongos, levaduras y protozoos se encuentra el ergosterol<sup>146</sup> y en algunos procariontes el lanosterol<sup>147</sup>.

Todos estos lípidos, independiente de sus diferencias como las insaturaciones de las cadenas alifáticas, la carga eléctrica o el peso molecular están mezclados en las membranas. Dependiendo de su fracción molar definen las propiedades quimicofísicas como la elasticidad, la flexibilidad y la viscosidad de la membrana<sup>148-150</sup>.

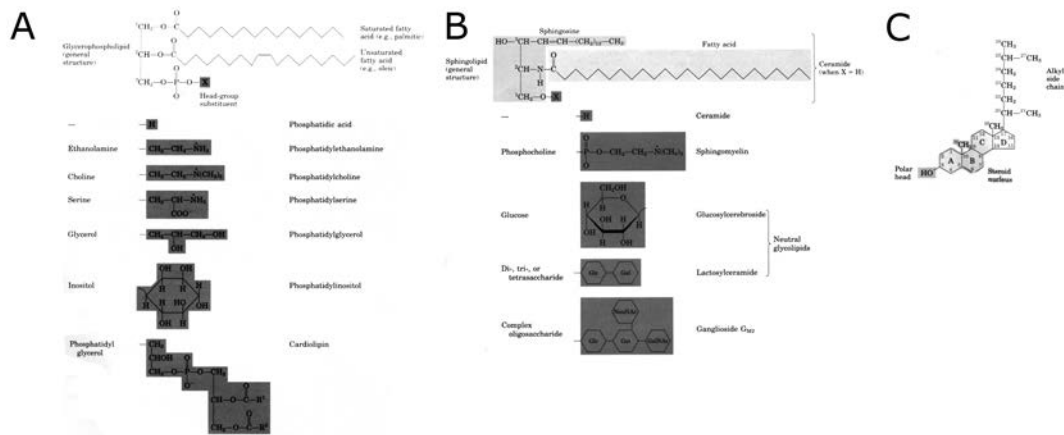


Figura 1.18: Tipos de lípidos de membrana<sup>151</sup>

## 1.8. Proteínas de membrana

Las proteínas son las responsables de la mayoría de los procesos celulares que tienen lugar en las membranas. El contenido de proteínas de una membrana típica respecto a los lípidos es variable y depende del tipo de membrana<sup>152</sup>. Las proteínas de membrana se pueden dividir operativamente en las proteínas integrales o intrínsecas,

que están anclados en la membrana, y en las proteínas periféricas o extrínsecas, que están unidas de manera más débil y reversible.

Las proteínas integrales generalmente tienen uno o varios dominios ricos en aminoácidos hidrófobos, lo suficientemente largos como para abarcar la bicapa lipídica cuando están en la conformación  $\alpha$ -hélice (Figura 1.19). Las proteínas periféricas se mantienen adheridas a la membrana mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno con los dominios hidrófilos de las proteínas integrales de la membrana o con los grupos de la cabeza polar de los lípidos y pueden disociarse mediante tratamientos suaves que interfieren con las interacciones electrostáticas o que rompen los enlaces de hidrógeno. Aunque las proteínas con anclajes lipídicos se asemejan a las proteínas integrales de membrana generalmente se consideran proteínas de membrana periférica porque su asociación con la membrana suele ser débil y reversible, no contienen largas secuencias hidrofóbicas, y una vez solubilizadas se comportan como proteínas solubles.

La liberación de proteínas integrales de las membranas requiere la acción de agentes (detergentes, disolventes orgánicos o desnaturalizantes) que interfieren con las interacciones hidrofóbicas entre la proteína y los lípidos. Muchas proteínas de membrana tienen, como los lípidos, la libertad de desplazarse lateralmente en la membrana como si estuviera flotando en un mar de lípidos. La asociación las proteínas de membrana con proteínas de membranas adyacentes para formar grandes oligómeros en la superficie de una célula u orgánulo es una forma de regular y modular su funcionamiento<sup>153</sup>.

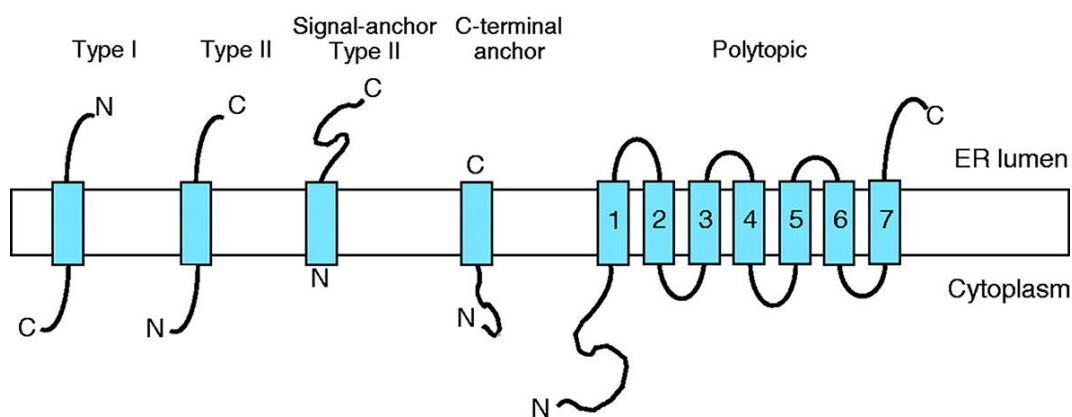


Figura 1.19: Tipos de proteína integral de membrana. Las proteínas de membrana integrales se pueden sintetizar de forma tipo I, de tipo II, de tipo II anclada por su extremo-C o por péptido señal en su extremo-N o de forma poli-tópica múltiples dominios de membrana.<sup>154</sup>

## 1.9. Modelos de membranas biomiméticos

Los sistemas biomiméticos como las vesículas gigantes unilamelares (GUV; *del inglés*: Giant Unilamellar Vesicles) son una herramienta importante para reconstruir y visualizar procesos biológicos mediante microscopía óptica o de fluorescencia confocal<sup>155</sup>.

Las vesículas lipídicas o liposomas son estructuras esféricas de membranas lipídicas de doble capa (Figura 1.20 A) que se clasifican en función del tamaño y del

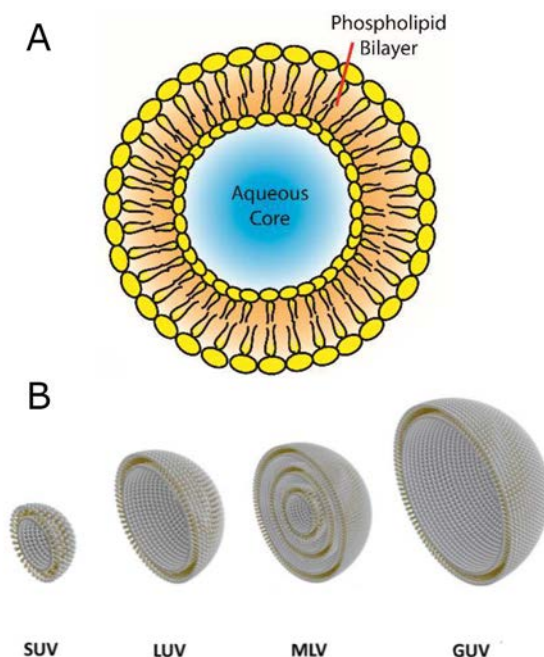


Figura 1.20: Structure of a liposome. A) A liposome consists of a phospholipid bilayer with an aqueous core.<sup>165</sup> B) Different structures of vesicles: SUV (small unilamellar vesicles), LUV (large unilamellar vesicles), GUV (giant unilamellar vesicles), and MLV (multilamellar large vesicles). Vesicles are presented as hemivesicle to show the inside.<sup>166</sup>

número de bicapas presentes; como vesículas unilamelares pequeñas ( $\leq 50$  nm; SUV; del inglés: Small Unilamellar Vesicles), vesículas unilamelares grandes ( $50 \leq x \leq 100$  nm; LUV del inglés: Large Unilamellar Vesicles), vesículas unilamelares gigantes ( $1 - 200 \mu\text{m}$ ; GUV) o vesículas multilaminares (MLV del inglés: Multilamellar Vesicles) formando tamaños variables dentro de una misma vesícula<sup>156</sup> (Figura 1.20 B).

Modulando parámetros como la temperatura, el pH o la fuerza iónica pueden conservarse por un tiempo específico para el estudio de las propiedades de membrana y los procesos biológicos que ocurren en ellas. Estos modelos se utilizan mucho para el estudio de la adhesión celular así como la fusión, mediadas por interacciones no covalentes que involucran a proteínas, pero sobre todo como vehículos para el transporte de medicamentos, proteínas, enzimas o ADN, dando lugar a estudios sobre su transporte, distribución, acumulación y eficacia<sup>157-159</sup>. Los sistemas modelo para estudiar la fusión de membranas se basan predominantemente en LUVs y GUVs.<sup>160-164</sup>

## 1.10. Propiedades mecánicas de las membranas

La mecánica de una bicapa lipídica depende de la composición y organización lipídica<sup>138</sup> y no sirve solo para anclar proteínas a su superficie, pero también es importante para modular la funciones de las proteínas<sup>167</sup>. Dada la complejidad estructural y composicional de las membrana natural es necesario simplificar los componentes esenciales de naturaleza proteica o lipídica. Puesto que el espesor de la membrana es varios órdenes de magnitud menor que su superficie (nm frente a  $\mu\text{m}$ ), se puede considerar la membrana como una plancha bidimensional que encierra un volumen acuoso. De esta forma, se pueden aplicar las definiciones mecánicas de de-

formaciones elásticas para láminas delgadas como la compresión, cizalla y curvatura llevando cada una de ellas asociadas un parámetros que se conocen como el módulo de compresión  $K$ , módulo de curvatura  $\kappa$  y módulo de cizalla  $G$  respectivamente<sup>168</sup>.

### 1.10.1. Elasticidad de compresión

La energía de compresión por unidad de área para deformaciones de una lámina con un área  $A_0$ , viene dada por la expresión

$$h_e = \frac{1}{2}K \left( \frac{A - A_0}{A_0} \right)^2 = \frac{1}{2}K \left( \frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 \quad (1.1)$$

,con  $K$  para el módulo de compresibilidad lateral (con valores del orden de 0.1 - 1 J/m<sup>2</sup>)<sup>169,170</sup>.

Al expandirse la membrana un mayor espacio entre las moléculas anfipáticas se rellena con medio acuoso . Los valores altos de  $K$  indican que las membranas celulares se resisten a ser expandidas, debido a un aumento en las interacciones hidrofóbicas.

Al estirar o comprimir una membrana aparece una tensión  $\sigma$  en toda la superficie que tiende llevar el sistema a su posición de equilibrio y recuperar el área  $A_0$ . Esta tensión se puede expresar como:

$$\sigma = \left[ \frac{\partial(h_e A_0)}{\partial \Delta A} \right] = K \left( \frac{\Delta A}{A_0} \right) \quad (1.2)$$

, considerando la membrana totalmente plana si se desprecian las microrugosidades en la superficie en forma de fluctuaciones que provoca la temperatura<sup>170</sup>.

Los valores experimentales de  $\sigma$  varían entre 0.25 y 0.1 N/m<sup>153,171</sup> y durante la expansión, las interacciones hidrofóbicas pueden provocar la rotura la bicapa, llevando asociada una tensión de lisis  $\sigma_{lyse}$ . Experimentalmente, esta rotura se puede dar a valores de expansibilidad relativamente bajos, con aumentos del área de  $\sim 2$ -3 %, dependiendo de la composición lipídica y de la tensión superficial presente<sup>172,173</sup>.

### 1.10.2. Elasticidad de cizalla

Las deformaciones de cizalladura aparecen cuando una membrana se estira hacia una dirección y se comprime simultáneamente en la otra, todo ello ocurriendo a área y curvatura constantes. La densidad de energía involucrada en este proceso de deformación viene dada por:

$$h_{ciz} = \frac{1}{4}G (\lambda^2 + \lambda^{-2} - 2) \quad (1.3)$$

,siendo  $G$  el módulo de cizalla (en J/m<sup>2</sup>) y  $\lambda$  la variación de elongación lateral definida por:

$$\lambda = \left( \frac{L_0 + \Delta L}{L_0} \right) \quad (1.4)$$

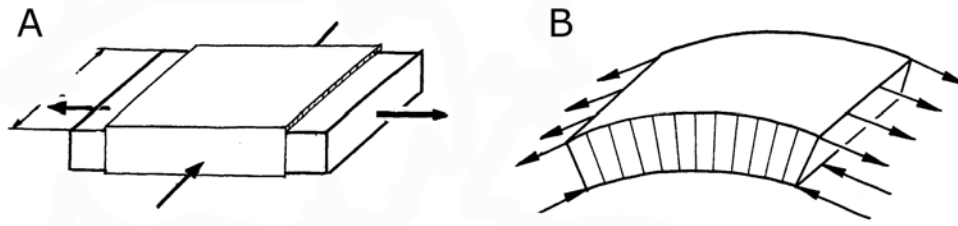


Figura 1.21: Deformaciones elásticas de vesículas, A) Deformación alargados y comprimidos del área de una bicapa rectangular. B) Deformación de doblaje introduciendo curvatura en una bicapa rectangular por extensión de la parte superior y compresión de la monocapa inferior. <sup>179</sup>

Cuando se somete a una membrana a deformaciones por cizalladura y se comporta a 37 °C como un líquido los lípidos que forman la bicapa se encuentran en fase fluida ya que su temperatura de transición de fase  $T_m$  es superior a 37 °C (temperatura fisiológica). En esta fase fluida, el módulo de cizalla es  $G \approx 0$ , haciendo que esta deformación tenga un coste energético despreciable y por tanto causando que las membranas no presenten resistencia a la cizalladura <sup>174</sup>. En las membranas biológicas, la presencia de un módulo de cizalladura  $G > 0$  es debido a las estructuras intra y extracelulares que están asociados a ella como por ejemplo el citoesqueleto <sup>155,175</sup> o a la presencia de ceramida, un lípido que puede formar dominios en fase sólida <sup>176,177</sup>.

### 1.10.3. Elasticidad de curvatura

Al contrario que con la elasticidad de compresión, las bicapas lipídicas presentan una baja elasticidad de curvatura, un parámetro que con frecuencia es despreciado en modelos de mecánica de membranas. La rigidez de curvatura se produce por el mismo tipo de interacciones moleculares presentes en la rigidez de expansión. Cuando se dobla una bicapa, las cabezas polares de la capa lipídica externa quedan más alejadas entre sí, mientras que en la capa interna el espacio intermolecular entre ellas disminuye. Al curvar, el grosor de la bicapa ( $\sim 5$  nm) apenas muestra un cambio en el área superficial por molécula o en las energías involucradas por su deformación de expansión. Si consideramos la membrana una plancha plana, se podría curvar aplicando una fuerza en ambos extremos <sup>157?</sup>.

En este caso, la curvatura de la membrana contribuye a la energía siguiendo:

$$E_{bend} = \frac{1}{2} \kappa_b (C - C_0)^2 + \kappa_G C_1 C_2 \quad (1.5)$$

, donde  $C$  corresponde a  $C_1 + C_2$  (la curvatura media de la membrana) y  $C_1$  y  $C_2$  corresponden a  $1/R_1$  y  $1/R_2$  (las curvaturas principales) respectivamente <sup>178</sup>. La curvatura espontánea  $C_0$  hace referencia al estado de curvatura preferente de la membrana cuando está en equilibrio, la curvatura Gaussiana  $C_1 C_2$ , el módulo de curvatura  $\kappa_b$  (constante de Boltzmann), que tiene un valor del orden  $10 \kappa_b T$  con  $T$  como temperatura absoluta según el tipo de células <sup>?</sup>, y el módulo de curvatura Gaussiana  $\kappa_G$ .

### 1.10.4. Adhesión

La interacción fisicoquímica de liposomas con otras membranas o superficies a través de otras proteínas (integrinas, selectinas, cadherinas, inmunoglobulinas o lectinas<sup>180</sup>) en su superficie provoca un cambio en su morfología como se observa en la adhesión que puede además conllevar también cambios a nivel topológico provocando ruptura o fusiones entre membranas lipídicas<sup>181</sup>.

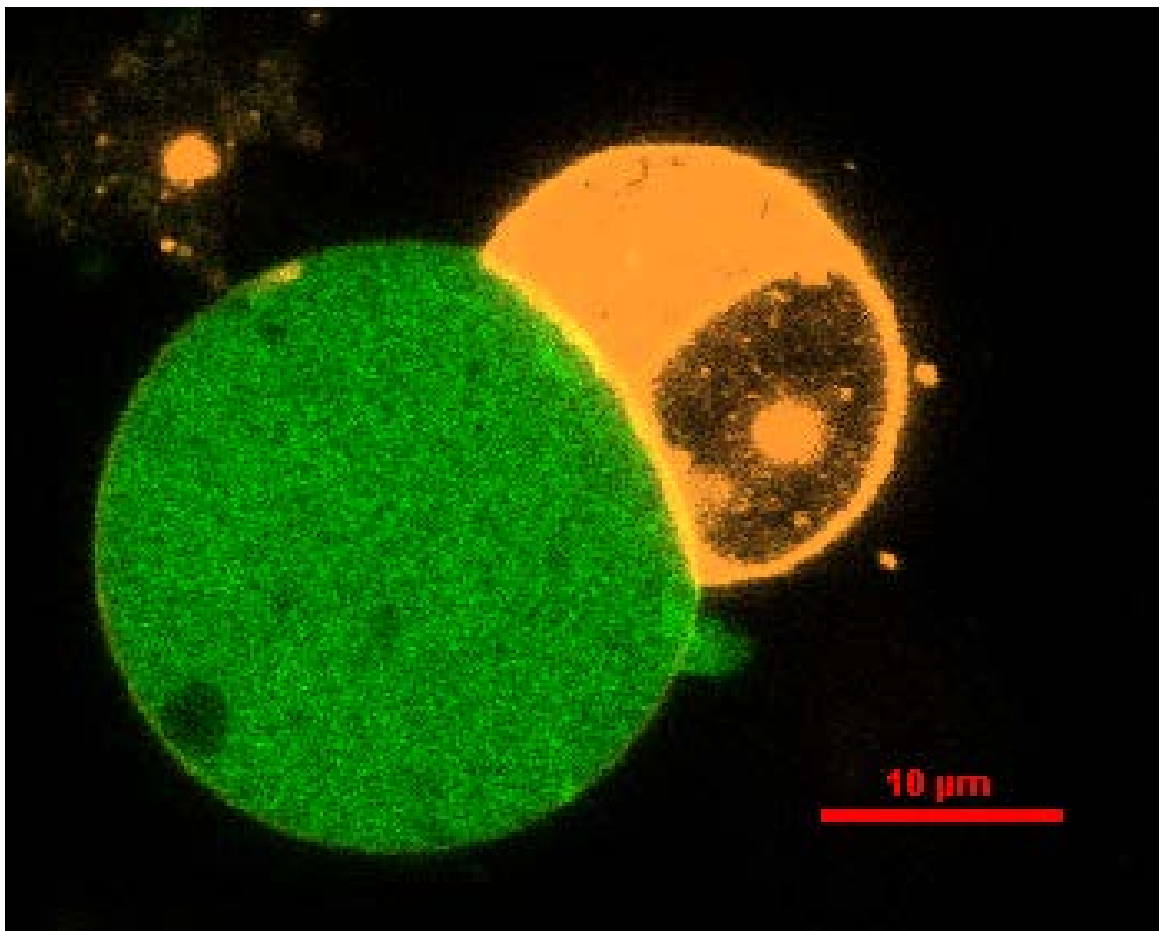
En sistemas naturales en células de todo los dominios de la vida utilizan la adhesión para interactuar con el mundo exterior y sondear el medio externo o mantener su integridad estructural durante el intercambio y transporte de solutos entre ellas<sup>139</sup>.

La adhesión de membranas también ocurre a través de atracciones no específicas que pueden producir una fuerza atractiva neta por área de  $\sim 100 \text{ N/m}^2$  a distancias de  $\sim 25 \text{ nm}$  como fuerzas atractivas (van der Waals) y repulsivas (electrostáticas, estéricas) que se oponen a la compresión<sup>182</sup>.

La fuerza de adhesión entre liposomas se puede estimar a través de imágenes de microscopía óptica. El contorno de las vesículas permite medir parámetros como ángulos de contacto o distancias para para hallar las energías implicadas<sup>183</sup> utilizando modelo teórico que englobe todos los términos relativos a la geometría del sistema, las propiedades mecánicas de la membrana y el contacto causado por una superficie atractiva<sup>184</sup>.

## Capítulo 2

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Muchos estudios estructurales para la familia de las dinaminas se han basado en construcciones genéticas para la facilitar la cristalización y su observación estructural<sup>91</sup>. La fusión de la membrana externa mitocondrial requiere bajas concentraciones de GTP, mientras que la fusión de membrana interior mitocondrial requiere de la hidrólisis de GTP y la presencia de un potencial de membrana<sup>185</sup>. La homología estructural de las mitofusinas con la proteína dinamina sugiere que el modo de acción de las mitofusinas a nivel molecular es similar<sup>81,88,91,186</sup>. La dinamina es una GTPasa responsable de la endocitosis en las células eucariotas<sup>85,88,111</sup>. Cuando una vesícula envagina, la dinamina forma un anillo en la base de la membrana envaginada y una vez posicionado se extiende longitudinalmente y se constriñe a través de la hidrólisis de GTP hasta separar la parte invaginada de la membrana de partida<sup>85</sup>. Se especula que durante el proceso de fusión de membrana se encuentran las mitofusinas en una conformación extendida en la superficie de las membranas adyacentes<sup>85,88</sup>. La unión e hidrólisis de GTP introduce un cambio de conformación en las mitofusinas que pasan de una forma extendida a una forma compacta<sup>112,187</sup>. Las interacciones inter- o intramoleculares entre dos o más mitofusinas extendidas acercan las membranas para ser fusionadas<sup>14,123</sup>. Se piensa que la hidrólisis de GTP podría estar acoplada a la deformación de la membrana *per se* o necesaria para regular los estados conformacionales de las mitofusinas<sup>14,123,129,188,189</sup>. De acuerdo con lo descrito a la proteína ATL, que también se dimeriza en presencia de GTP y forma una conformación abierta-cerrada de su dominio medio tras la hidrólisis con GTP<sup>112</sup>, podríamos hipotetizar un modelo sobre los estados conformacionales de las MFNs respecto a la fusión de membranas mitocondriales. Un reordenamiento conformacional de mitofusinas a través de un estado abierto que induce la dimerización de los dominios GTPasa y un estado conformacional cerrado que permite acercar las dos membranas adyacentes a una distancia menor de 5 nm, proceso dependiente de GTP y se podría decir que posiblemente hay una formación de “anillo de acoplamiento” como lo hacen la Fzo1 en levaduras (figura 2)<sup>101,112,118</sup>.

### Objetivo General

Esta tesis doctoral ha implementado un nuevo sistema biomimético basado en la reconstitución de MFN1-his en vesículas gigantes que contienen DOGS-NTA, con el objetivo principal de estudiar la fusión *in vitro* de membranas lipídicas mediada por Mfn1 y su modulación en presencia de GTP, GDP y GDP/AIF<sub>4</sub>. Los detalles sobre los mecanismos moleculares de las etapas intermedias de fusión de mitocondrias son aún desconocidos. Análisis genéticos indican que los dominios específicos de las proteínas mitofusinas tienen la capacidad de sincronizar el acoplamiento de membranas adyacentes con el fin de deformar la membrana y generar fusión. Mediante un análisis cuantitativo el modelo experimental pretende proporcionar información sobre las interacciones homotípicas de la mitofusina 1 durante los eventos que conducen a la fusión de membranas modelo y poder responder a cuestiones generales como:

- I) Cuáles son los requerimientos mínimos para la aproximación de membranas?
- II) ¿Es suficiente la energía química que se libera de la hidrólisis de GTP para ejercer una acción mecánica en la membrana, tales como la deformación y constricción o formación de dímeros estables entre vesículas, para la fusión?
- III) ¿Cuál es la energía necesaria para promover la adhesión y posterior fusión entre dos vesículas?

### **Objetivos Específicos**

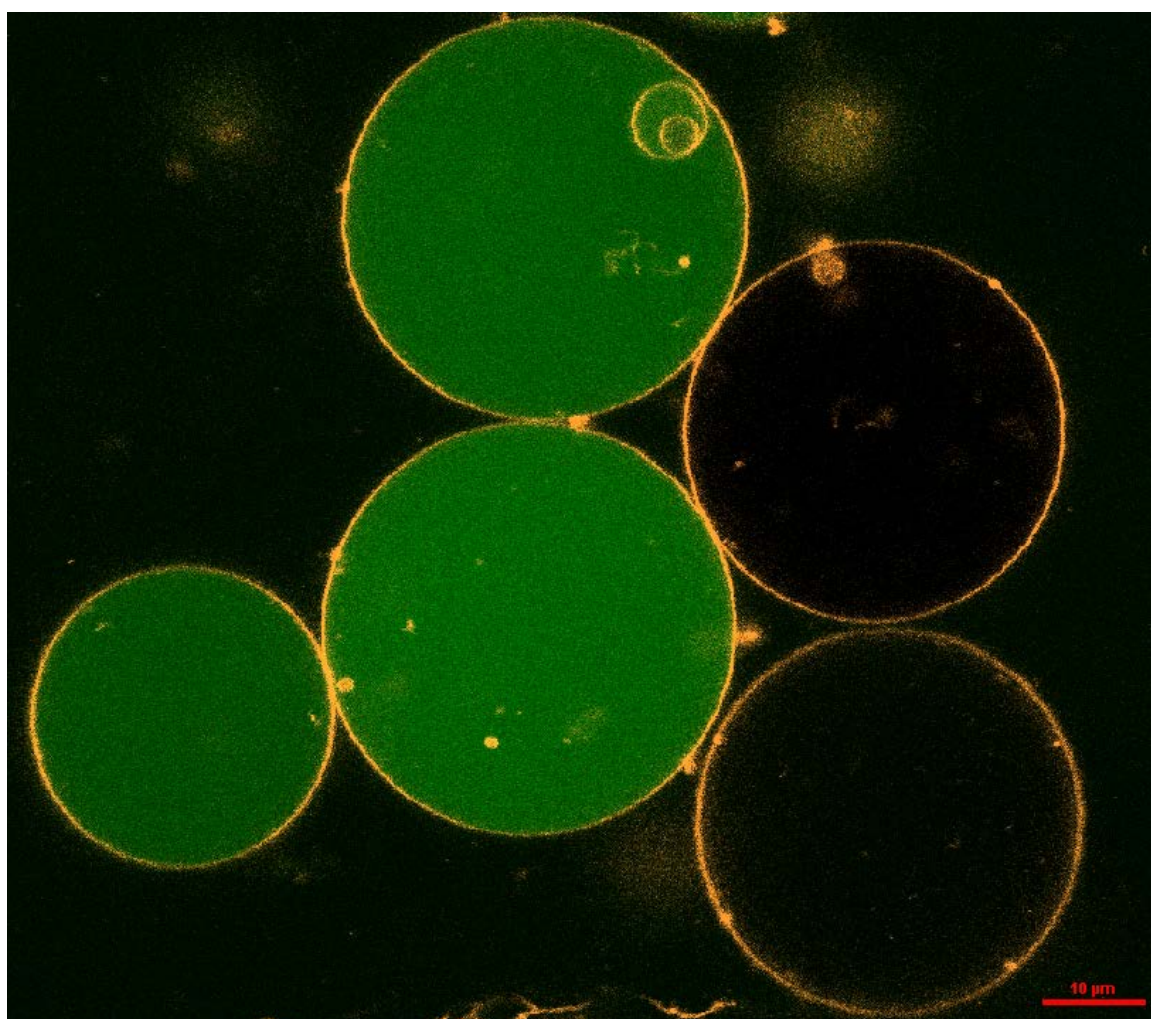
Para poder responder a las preguntas anteriores, es necesario la ejecución de tareas cuyos resultados puedan ser evaluables para el cumplimiento de los objetivos específicos que se especifican a continuación:

- 1): La clonación, expresión de MFN1 en membranas bacterianas y ensayos funcionales.
- 2): La purificación de la proteína Mfn1 de forma funcional.
- 3): la reconstitución de la proteína purificada en sistemas de membrana modelos tipo LUVs y GUVs con distinta composición lipídica
- 4) Observación mediante microscopía de fluorescencia confocal de eventos de adhesión y posterior fusión de vesículas gigantes recubiertas con Mfn1 y evaluación cuantitativa de las energías involucradas en el proceso.



## Capítulo 3

# MATERIALES



En este capítulo se encuentra una lista de los Materiales utilizados en forma de cuadros:

### 3.1. Ácidos y bases

Cuadro 3.1: Ácidos y bases

Nombre	Fórmula química	Casa comercial
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	Sigma Aldrich
Ácido clorhídrico	HCl	Sigma Aldrich
fosfato disódico	$Na_2HPO_4$	Sigma Aldrich
fosfato dipotásico	$K_2HPO_4$	Sigma Aldrich
fosfato monosódico	$NaH_2PO_4$	Sigma Aldrich
fosfato mono potásico	$KH_2PO_4$	Sigma Aldrich
Hidróxido de sodio	NaOH	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma Aldrich

### 3.2. Antibióticos

La solución madre de los antibióticos se preparan con agua y para cloranfenicol en etanol y se almacenan a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

Cuadro 3.2: Antibióticos

Nombre	Concentración solución madre/ final	Casa comercial
Ampicilina	$100\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} / 100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	Sigma Aldrich
Cloranfenicol	$35\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} / 35\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	Sigma Aldrich
Kanamicina	$50\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} / 50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	Sigma Aldrich

### 3.3. Anticuerpos

Cuadro 3.3: Anticuerpos

Nombre	Casa comercial
Primarios	
Anti-MFN1 (D-10) monoclonal de ratón; sc-166644	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MFN1 (D-10) monoclonal de ratón unido a Alexa-488	Santa Cruz Biotechnology
Secundarios	
Anti-Conejo de cabra unida a peroxidasa	Sigma Aldrich
Anti-polihistidina monoclonal de ratón unido a fosfatasa alcalina	Sigma Aldrich
Anti-Ratón de conejo unida a peroxidasa de rábano	Sigma Aldrich

### 3.4. Buffers

Cuadro 3.4: Buffers

Nombre	Composición
<b>SDS-PAGE y Western blot</b>	
Tampón de carga	250 mM Tris-HCl (pH 8); pH: 6.8, 10 % SDS, 50 % glicerina, 0.05 % bromofenol azul, 10 mM DTT
Tampón de electroforesis	25 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM glicina y 0.1 % SDS
Tampón separador	Tris-HCl (pH 8) pH: 8.7, 0.4 % SDS
Tampón stacking	Tris-HCl (pH 8) pH: 6.8, 0.4 % SDS)
Tampón de transferencia	25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1 % SDS y 20 % metanol
Tinción Coomassie	CBB R-250 disuelto en 25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1 % SDS y 20 % metanol
<b>Otros</b>	
BGM	200 mM glucosa
BSM	200 mM de sacarosa
CaCl <sub>2</sub>	0.1 M de CaCl <sub>2</sub>
CaCl <sub>2</sub> -G	0.1 M de CaCl <sub>2</sub> , 10 % de glicerina
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> y 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y 0.1 % PBST
PBST/Block 1 %	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 % PBST y 1 % leche en polvo
PBST/Block 2 %	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 % PBST y 2 % leche en polvo
STET	8 % Sacarosa, 5 % Triton X-100, 50 mM EDTA y 50 mM Tris pH 8.0
T <sub>10</sub> E <sub>1</sub>	10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA
TAE	2M Tris base, 1M EDTA y 1M Ácido Acético
Tampón para PCR (10 x)	100 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> y 0.01 % gelatina
Tris	50 mM Tris-HCl pH 8
Tris-D	50 mM Tris-HCl pH 8, 39 mM DDM <b>2 % (p/v)</b>
Tris-K	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM KCl
Tris-KGC	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM KCl, 10 % de glicerina, inhibidor de proteasa cOMPLETE
Tris-M	50 mM Tris-HCl pH 8, <b>1 mM</b> MgCl <sub>2</sub>
Tris-N	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl
Tris-NGC	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % de glicerina, inhibidor de proteasa cOMPLETE
Tris-S	50 mM Tris-HCl pH 8, 0.58 M sacarosa
Verde Malaquita	Oxalato de Verde Malaquita al 0,045 % (p/v) y 3 partes de molibdato amónico al 4.2 % (p/v) con una ratio de 1:3 disuelto en 2N HCl

### 3.5. Cepas *Escherichia coli*

Cuadro 3.5: Cepas *Escherichia coli*

Cepa	Genotipo	Ref
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$F^-$ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(lacZYA-argF)$ , <i>U169</i> , $\phi80(lacZ \Delta M15)$	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$F^-$ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB(=rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm(DE3)</i>	
<i>E. coli</i> C41(DE3)		
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)		
<i>E. coli</i> Codon Plus-RP(DE3)		
<i>E. coli</i> SF100	<i>E. coli</i> KS272 $F^-$ , $\Delta lacX74$ , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> , $\Delta phoA$ , $\Delta ompA$	
<i>E. coli</i> KS272	$\Delta ompT$ (proteasa VII)	190
<i>E. coli</i> SF100(DE3)	<i>E. coli</i> SF100 <i>dcm</i> (DE3)	

### 3.6. Cebadores

Cuadro 3.6: Cebadores

Nombre	Secuencia 5'->3'	Casa Comercial
cMFN1-fw	GCG GCA GCC ATA TGG CAG AAC CTG TTT CTC C	Sigma Aldrich
cMFN1-rev	TGC TCG AGT GCG GCC GCA AGC TTG TCG ACT TAG GAT TCT TCA TTG CTT GAA GC	Sigma Aldrich
cMFN2-fw	GCG GCA GCC ATA TGT CCC TGC TCT TCT CTC G	Sigma Aldrich
cMFN2-rev	TGC TCG AGT GCG GCC GCA AGC TTG TCG ACT TAT CTG CTG GGC TGC AGG TAC TGG	Sigma Aldrich
cOPA1-fw	GCG GCA GCC ATA TGT GGC GAC TAC GTC GGG CC	Sigma Aldrich
cOPA1-rev	TGC TCG AGT GCG GCC GCA AGC TTG TCG ACT TAC TCC TGA TGA AGA G	Sigma Aldrich

### 3.7. Colorantes

Cuadro 3.7: Colorantes

Nombre	Casa comercial
Ácido hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (Piranina)	Sigma Aldrich
Azul de bromofenol	Sigma Aldrich
Azul de coomasie	Sigma Aldrich
Gelred	Biotium

### 3.8. Detergentes

Cuadro 3.8: Detergentes

Nombre	Cantidad utilizada	CMC (mM)	Casa Comercial
CHAPS (3-[(3-Cholamido propil) dimetil-ammonio]-1-propanosulfonato); MM:614.88 g/mol	2 % = 33 mM	6	Sigma Aldrich
C (Colato de Sodio); MM: 430.6 g/mol	2 % = 46 mM	9-15	Sigma Aldrich
CTAB (Bromuro de hexadecil trimetilamonio); : 364.46 g/mol		0.92-1.0	Sigma Aldrich
DOC (Desoxicolato de Sodio); PM: 392.6 g/mol	2 % = 51 mM	2-6	Sigma Aldrich
DDM ; (n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosida) MM: 510.6 g/mol	1 % = 20 mM 2 % = 39 mM 2.5 % = 49 mM 5 % = 89 mM 10 % = 195 mM		Anatrace
Digitonina; MM: 1229 g/mol	2 % = 16 mM	0.2-0.73	Sigma Aldrich
OG (Octilglucosida); MM: 292.37 g/mol	2 % = 68	25 mM	Anatrace
SDS (Dodecilsulfato sódico); MM: 288.372 g/mol	2 % = 69 mM	8.2	Sigma Aldrich
Tx-100 (Triton X-100) ; MM: 625.1 g/mol	2 % = 32 mM 2 % = 2 % =	0.22-0.24	Sigma Aldrich
Tx-114 (Triton X-114); MM: 537 g/mol	2 % = 37 mM	0.2	Sigma Aldrich
Tween-20; MM: 1.228 g/mol		0.059	Sigma Aldrich

CMC: Concentración Micelar Crítica  
MM: Masa Molar

### 3.9. Enzimas

Cuadro 3.9: Enzimas

Nombre	Casa Comercial
ADNasa I	Sigma Aldrich
ADN polimerasa Taq (recombinante)	Thermo Scientific
ARNasa (concentración final de 0.1 mg/mL)	Sigma Aldrich
EcoRI	New England Biolabs
Lisozima (25 mg/mL)	Sigma Aldrich
NdeI	New England Biolabs
NcoI	New England Biolabs
T4 ADN ligasa	Sigma Aldrich
XhoI	New England Biolabs

### 3.10. Equipos utilizado

Cuadro 3.10: Equipos utilizado

Equipo	Modelo	Fabricante
Analizador de partículas	Brookhaven 90 Plus	Brookhaven Instruments
Anillo de goma	(espesor de 2,5 mm)	??
Agitador con incubación	MaxQ 6000	Thermo
Centrifuga	Microfuge 22R	Beckman-Coulter
Centrifuga	Allegra 25R	Beckman-Coulter
Congelador -80°C	Forma 991	Thermo
Cubeta desechable	Plástico, grosor 10 mm	Brand
Cubeta Fluorimetro	Ultra-Micro cells 160 $\mu\text{L}$	Hellma
Cubre Objetos	Circulares ( $\phi = 25$ mm)	??
Dispersión de Luz	Zetasizer Nano S	Malvern
Electroforesis horizontal	MultiSUB Mini	Fisherbrand
Electroforesis vertical	Protean III	Bio-Rad
Equipos de Transferencia electroforética	Trans-Blot Semy-Dry	Bio-Rad
Espectrofluorimetro	Serie AB2	AMINCO-Bowman
Espectrofotómetro	Genesys 10 UV-Vis	Thermo
Filtros de paso de banda de emisión		Nikon
Generador de funciones	TG315	AIM-TTI Instruments
Láser continuo	488 nm	Nikon
Láser continuo	651 nm	Nikon
Lector de Placa Multipocillos	MultiSkan FC	Thermo Scientific

Conjunción de cuadro 3.10		
Equipo	Modelo	Fabricante
Mini-Extruder		Avanti Lipids
Membrana de policarbonato	poro de 100 nm	Avanti Lipids
Microscopio de fuerza atómica	5500 AFM	Agilent
Microscopio invertido	Nikon Ti-E	Nikon
Módulo de escaneo confocal	Nikon C2	Nikon
MilliQ ( $\leq 18\text{M } \Omega \text{ cm}$ )	Direct Q	Merck
Objetivo de inmersión en aceite	Nikon Plan Apo 100x NA 1.45	Nikon
Rotor F301.5	Microfuge 22R	Beckman-Coulter
Rotor MLA 80	Optima-MAX-XP	Beckman-Coulter
Rotor TA-14	Allegra25R	Beckman-Coulter
Rotor TA-10	Allegra25R	Beckman-Coulter
Rotor TLA-100.3	Optima-MAX-XP	Beckman-Coulter
Rotor TLA-120	Optima-MAX-XP	Beckman-Coulter
Sistema de imagen molecular	ImageQuant LAS 500	GE Healthcare
Sonicador	Bioblock Scientific	Thermo
Speed Vac	Vibra Cell 75115 Model 5301	Eppendorf
Ciclador térmico de PCR	AP 2720	Applied Biosystems
Transiluminador UV	Vilber Lourmat	Thermo
Ultracentrífuga	213115021 Optima-MAX-XP	Beckman-Coulter

### 3.11. Lípidos

Lípidos se han resuspendido a una concentración de 1 mg/mL en cloroformo y almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo nitrógeno

Cuadro 3.11: Lípidos

Nombre		Casa Comercial
DOGS-NTA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[(ácido N-(5-amino-1-carboxipentil) iminodiacético) succinil]	Avanti Lipids
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	Avanti Lipids
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-glicerol-3-fosfocolina	Avanti Lipids
Rho-PE	1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonilo)	Avanti Lipids
NBD-PE	1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-ilo)	Avanti Lipids
TLE	Extracto Total de Lípidos de <i>E. coli</i>	Avanti Lipids

### 3.12. Marcadores Moleculares

Cuadro 3.12: Marcadores Moleculares

Nombre	Casa Comercial
Marcador de proteína, Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad
Marcador de ADN, ExACTGene 1 kb Plus	Fisher Scientific
Marcador de ADN, $\lambda$ DNA-BstEII Digest	New England Biolabs

### 3.13. Medios de cultivo

Cuadro 3.13: Medios de cultivo

Medio de cultivos	Componentes	Ref
Lysogeny Broth (LB)	Triptona 10 g/L Extracto de levadura 5 g/L NaCl 10 g/L Agua Milli-Q	Sambrook <sup>191</sup> Bertani (2004) <sup>192</sup>
LB-A	LB Antibiótico (cuadro 3.2)	Sambrook <sup>191</sup>
LB-AG	LB Antibiótico (cuadro 3.2)	Sambrook <sup>191</sup>
Placas LB	11 mM glucosa (cuadro 3.15) LB	Sambrook <sup>191</sup>
Placas LB Antibiótico	Agar bacteriológico 15 g/L Placas LB Antibiótico (cuadro 3.2)	Sambrook <sup>191</sup>

### 3.14. Nucleótidos

Cuadro 3.14: Nucleótidos

Nombre		Ref
Adenosín-5-difosfato	ADP	Sigma Aldrich
Adenosín-5-trifosfato	ATP	Sigma Aldrich
Guanosín-5-difosfato	GDP	Sigma-Aldrich
Guanosín-5-trifosfato	GTP	Sigma-Aldrich
	GDP:AlF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Sigma Aldrich
Nucleósido trifosfato	dNTP's (10 x, PCR Grade)	Sigma-Aldrich

### 3.15. Otros reactivos

Cuadro 3.15: Otros reactivos

Nombre		Casa Comercial
Acetona		
Acrilamida	30 % Acrylamide/Bis-acrylamide (C=37.5:1)	Bio-Rad
ADN <sub>c</sub>	de una muestra de sangre humana	Hospital 12 de Octubre, Madrid
Agarosa		
APS	persulfato de amonio	Sigma Aldrich
BSA	Albúmina de suero bovino	Sigma Aldrich
Cloroformo		
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio	Sigma Aldrich
C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> ON <sub>4</sub>	Oxalato de Verde Malaquita	Sigma Aldrich
·2C <sub>2</sub> HO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		
cCOMPLETE, inhibidor de proteasas	libre de EDTA	Roche
DMSO		Sigma Aldrich
DTT	ditiotreitól	Sigma Aldrich
EDTA		Sigma Aldrich
Etanol absoluto		
2-isopropanol	Sigma Aldrich	
Etanol 70 %	Sigma Aldrich	
Extracto de levadura		
FagoλDE3 Kit de lisogenización		Merck
Glicerina		Sigma Aldrich
Glucosa		Sigma Aldrich
HEPES		Sigma Aldrich
H <sub>2</sub> 4Mo <sub>7</sub> N <sub>6</sub> O <sub>24</sub>	Molibdato de amonio	
IPTG	isopropilo-β-D-1-tiogalacto- piranosido	
KCl	Cloruro de potasio	Sigma Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		Sigma Aldrich
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		Sigma Aldrich
Leche desnatada en Polvo	Sveltesse	Nestlé
Masilla Vitrex		Vitrex Medical, Herlev, DK
Membrana para western blot	Fluoruro de polivinilideno (PVDF)	Roche/Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio	Sigma Aldrich
3M NaAc pH 5.2	Acetato de Sodio	Sigma Aldrich
1.2 M NaCl		Sigma Aldrich
NiCl <sub>2</sub>		Sigma Aldrich
PBS		

Continuación de cuadro 3.15		
Nombre		Casa Comercial
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo	
Portaobjetos recubiertos de óxido de indio-estaño (ITO)	7.5 x 2.5 cm <sup>2</sup> ; 15-25Ω/sq	Sigma Aldrich Sacarosa
Silano	Sigma Aldrich 10 %	
Sustrato Quimioluminiscente para fosfatasa alcalina	Novex-CDP-Star	Thermo
Sustrato Quimioluminiscente para peroxidasa de rábano	Reactivos ECL	Sigma Aldrich
Sustrato Quimioluminiscente para Peroxidasa de rábano	Immobilon	Merck
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina	Bio-Rad
Triptona		
Kit de reactivos de concentración de proteínas	Bio-Rad RCDC	Bio-Rad
Kit de reactivos de concentración de proteínas	Pierce BCA	Thermo

### 3.16. Plásmidos

Cuadro 3.16: Plásmidos

Nombre	Característica	Casa Comercial
pCPRP	cam, codifica los genes textitargU y textitproL que permiten la expresión de genes que codifican ARN-t para codones AGA y AGG raros de arginina y prolina respectivamente	Stratagene
pET15B	Promoter T7/lac, Selection amp, TagN-HisProtease cleavage site Thr expression vector	Novagen
pGEM-T Easy		Promega
pTL1	pGEM-T Easy, MFN1	Este trabajo
pTL2	pET15B, MFN1	Este trabajo

### 3.17. Software

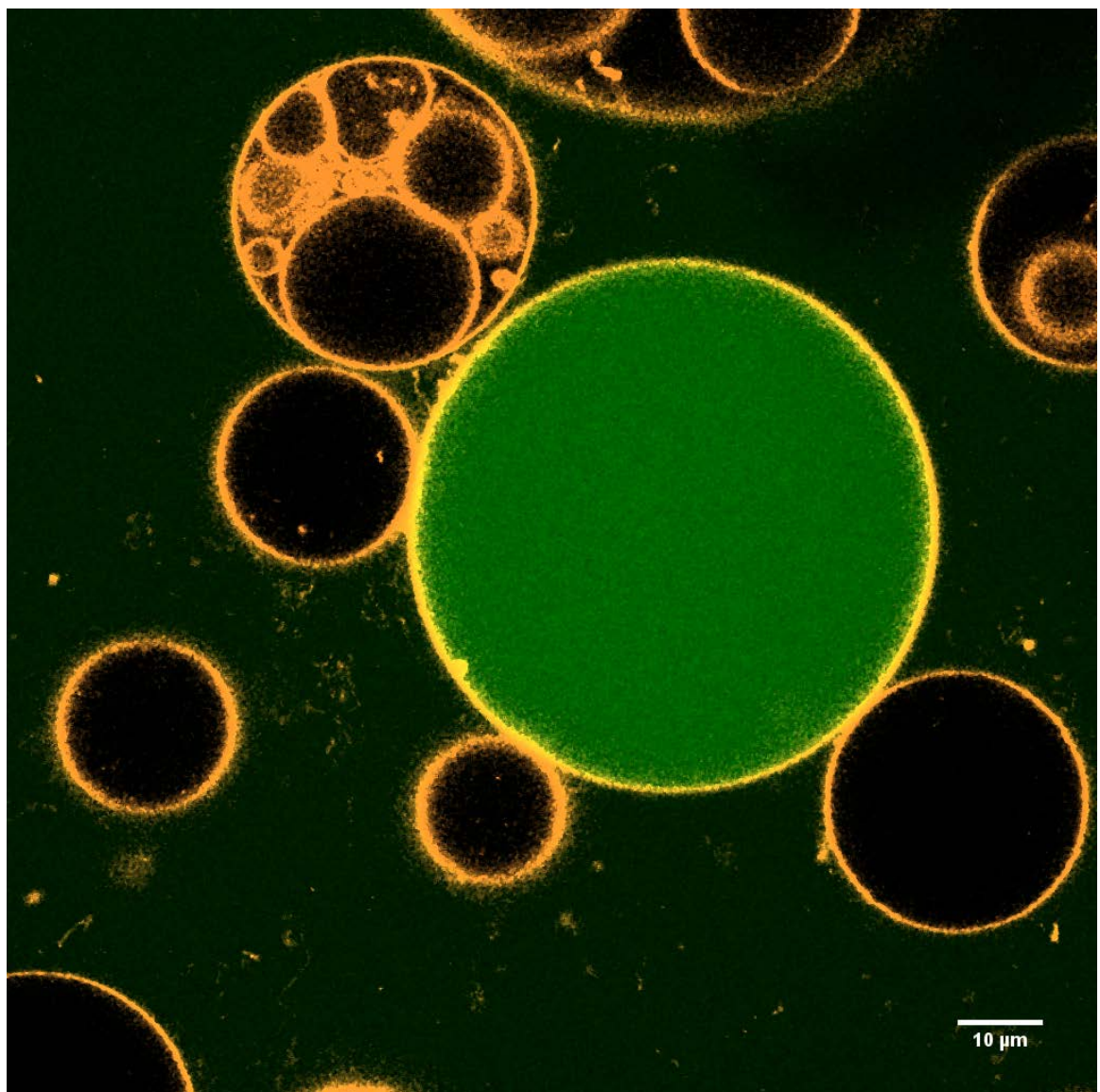
Cuadro 3.17: Software

Nombre	Casa Comercial
Nikon NIS-Elements	Nikon
MATLAB R2013b	The MathWorks Inc.
Image J	Wayne Rasband, NIH



# Capítulo 4

## MÉTODOS



## 4.1. Aislamiento de ADN en gel de agarosa

El ADN de interés lineal o linealizado, visualizados con un transiluminador, fue cuidadosamente cortado con un bisturí en el gel de agarosa. Cada fragmento de gel con su ADN fue colocado en un tubo de eppendorf de 500  $\mu\text{L}$  que contiene fibra sintética en su interior y un orificios en su parte inferior. Este tubo se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifuga durante 5 min (2348·g, Microfuge 22R;Rotor F301.5) para extraer el ADN del gel. Se obtiene  $\sim 100 \mu\text{L}$  y el ADN fue precipitado después de añadir 10  $\mu\text{L}$  de NaAc y 500  $\mu\text{L}$  de 2-propanol (Cuadro 3.15) durante 30 min a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . ADN precipitado se sedimenta (13523·g, Microfuge 22R, Rotor F301.5) durante 15 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se descarta el sobrenadante, y después de añadir 600  $\mu\text{L}$  etanol al 70 % se vuelva a incubar durante 20 min a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Después de este lavado se sedimenta el de nuevo el ADN (15 min, 13523·g, Microfuge 22R, Rotor F301.5) y se descarta el sobrenadante para recoger el ADN precipitado. Se último, se secan los precipitados a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  al vacío con un Speedvac (Eppendorf) y una vez seco, se resuspende el ADN con agua MiliQ o T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Cuadro 3.4 en el volumen inicial que se cargó en el carril del gel de agarosa. Las muestras de ADN fueron conservadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su posterior empleo.

## 4.2. Aislamiento de ADN plasmídico

Para aislar el ADN plasmídico de células bacterianas seguimos el método Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB *del inglés*: Cetrimonium bromide)<sup>193</sup>. Para todos los casos, el aislamiento de ADN plasmídico se inicia a partir de una colonia crecida en una placa de LB-agar complementado con el antibiótico que corresponde al gen de resistencia del plásmido. Se pica una colonia y se inocula en un tubo de ensayo que contiene  $\sim 2 \text{ mL}$  de medio LB<sup>191</sup> (Cuadro 3.13) complementado con el antibiótico que corresponde al gen de resistencia del plásmido (Cuadro 3.2) y se incuba durante toda la noche a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  con una agitación de 250 rpm (revoluciones por minuto). Los 2 mL de cultivo se centrifugan (10 min, 13523·g, Microfuge 22R, Rotor F301.5) a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y se recogen las células sedimentadas después de descartar el sobrenadante. La lisis celular se inicia con resuspender las células en 300  $\mu\text{L}$  de Tampón STET (Cuadro 3.4), 8  $\mu\text{L}$  de enzima lisozima (Cuadro 3.15 e incubado la mezcla a temperatura ambiente por 2 min. Después se inactiva la lisozima y se lisan las células bacterianas durante 1 min a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . A continuación se centrifuga el tubo (10 min, 13523·g, Microfuge 22R, Rotor F301.5) y se retira el sedimento de aspecto mucoso y blanco con un palillo estéril. El sobrenadante contiene el ADN plasmídico. Para aislar el ADN plasmídico se añade  $\sim 8 \mu\text{L}$  de 5 % CTAB y se mezcla suavemente. La solución transparente se vuelve turbio y el ADN plasmídico se une con el detergente. Se centrifuga (5 min, 13523·g, Microfuge 22R, Rotor F301.5) y se descarta el sobrenadante. Para eliminar el detergente se resuspende el sedimento en 300  $\mu\text{L}$  de 1.2 M NaCl y se incuba durante 20 min a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Una vez que este el sedimento disuelto se precipita el ADN plasmídico durante 20 min a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  con 500  $\mu\text{L}$  2-isopropanol. Se recoge el ADN precipitado mediante centrifugación (10 min, 13523·g, Microfuge 22R, Rotor F301.5) a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y se descarta el sobrenadante. Se lava el sedimento una vez con 70 % de etanol y se sedimenta el sedimento (10 min, 13523·g, Microfuge 22R, Rotor F301.5). Después de descartar el sobrenadante se seca el sedimento durante 20 min a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  (Speedvac; Cuadro 3.10). Se obtiene un precipitado blanco que va

resuspendido en 45  $\mu\text{L}$  T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Table 3.4 o agua MiliQ estéril (Cuadro 3.15 y 5  $\mu\text{L}$  de ARNasa (1 mg/mL).

### 4.3. Aislamiento de membranas citoplasmática de *E. coli*

La membrana citoplasmática o vesículas de membrana interna (IMV; *del inglés*: Inner membrane Vesicles) de *E. coli* se aislaron, aunque con pequeñas modificaciones, como descrito en la literatura<sup>194</sup>. Para obtener masa celular se cultiva la bacteria *E. coli* en un volumen final de 1 L como descrito (Sección 4.16. Se descongela cuidadosamente el sedimento bacteriano guardado a -80 °C y se complementa con 1 mM de DTT (Cuadro 3.15), 1 mM de PMSF (Cuadro 3.15), 1 mM ADNasa I (Cuadro 3.9) y una pastilla de cóctel de inhibidores de la proteasa cCOMPLETE (Cuadro 3.15).

Las células se lisaron en hielo mecánicamente mediante sonicación (Cuadro 3.10 con pulsos de 30 segundos encendido y apagado durante 10 min a una amplitud de 40 %. A continuación se centrifuga (10 min; 10000-g, Allegra 25R; Rotor TA-14) el lisado a 4 °C y se recoja cuidadosamente el sobrenadante que contiene proteínas de citoplasma y periplasma bacteriano y el extracto total (citoplasmática y externas) de membranas de *E. coli*. Para Aislar el extracto total de membranas se centrifuga (90 min, 327578-g, Optima-MAX-XP; Rotor MLA 80). Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1 mL Tris-S (Cuadro 3.4). A continuación se separan las membranas citoplasmáticas de las membranas externas mediante un gradiente de sacarosa. A partir de una disolución de 1.75 M de sacarosa diluida en Tris (Cuadro 3.4), se prepararon dos tubos de centrifuga para el Rotor TLA-100.4 (Cuadro 3.10) con cuatro capas de sacarosa desde 1.05 M a 1.6 M de sacarosa (Cuadro 4.1) con la solución de sacarosa más concentrada en el fondo del tubo.

Cuadro 4.1: Gradiente de Sacarosa

% Sacarosa (p/v)	Molaridad (M)	Volumen (mL)
36	1.052	0.5
45	1.315	1.5
51	1.490	0.5
55	1.607	0.5

El volumen de las membranas resuspendidas se divide en 2 y se cargan cada en un gradiente de sacarosa. Para separar las membranas se centrifugan (30 min, 264499-g, Optima-MAX-XP, Rotor TLA 100.3) los gradientes con membranas y se transfiere cuidadosamente la fracción de 45 % (p/v) de sacarosa (Cuadro 4.1 y a un tubo de centrifugación para el rotor TLA 100.3 vacío. Se diluye esta fracción cuatro veces Tris (Cuadro 3.4) y se centrifugan (30 min, 264499-g, Optima-MAX-XP, Rotor TLA 100.3) las membranas internas 4 °C para eliminar la sacarosa y concentrar las membranas citoplasmáticas aisladas. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento (con un color marrón-rojo) en  $\sim 100\text{-}200$   $\mu\text{L}$  de Tris (Cuadro 3.4). Para tener una referencia de cantidad se determina la concentración de proteína (Sección 4.5) totales presente en las membranas. El material se conserva a -80 °C hasta su uso después de congelar la muestra en nitrógeno líquido.

#### 4.4. Clonaje de MFN1 de *homo sapiens*

El gen *MFN1* humano que codifica la proteína mitofusina 1 (Mfn1) se obtuvo mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR, *del inglés*: polymerase chain reaction)<sup>191</sup> utilizando una ADNc total obtenido de una muestra de sangre humana (Cuadro 3.15). Los genes que codifican para los genes *MFN1*, *MFN2* y *OPA1* fueron amplificados por PCR según condiciones estándar (Cuadro 4.2<sup>191</sup>) con una temperatura de alineamiento de 50 °C. Cada reacción contiene 0.5  $\mu$ L de ADNc, 1  $\mu$ L de cebadores fw (*del inglés*: forward) y rv (*del inglés*: reverse) (Table 3.6, 5  $\mu$ L dNTPs, 5  $\mu$ L de tampón de PCR (Cuadro 3.4,  $\mu$ L de polimerasa Taq (Cuadro 3.9 y 32.5  $\mu$ L de agua MilliQ estéril, aforando hasta un volumen final de 50  $\mu$ L. El ADN se amplifica en un ciclador térmico de PCR AP 2720 (Table 3.10). Para conservar los productos de PCR se mantienen una vez finalizado los ciclos a 4 °C y posteriormente almacenados a -80 °C.

Cuadro 4.2: Programa termociclador

Temperatura	Tiempo	Ciclos
		1x
94 °C	10 min	
		30 x
94 °C	1 min	
50 °C	1 min	
72 °C	3 min	
		1 x
72 °C	10 min	
4 °C	$\infty$	

Para producir el plásmido pTL1 se ligaron los productos de PCR con el plásmido linealizado pGEM-T Easy (Cuadro 3.16) mediante la enzima de ligación T4 ADN ligasa (Cuadro 3.9). Los productos de PCR del gen Mfn1 poseen una adenina terminal no apareada colgando en su extremo 3-OH' (3'-A) debido a la polimerasa de ADN Taq (Cuadro 3.9). El plásmido pGEM-T Easy posee una timidina terminal en sus extremos 5'.

Para producir el plásmido pTL2 se ligaron los gen *MFN1* de pTL1 con el plásmido linealizado pET15b (Cuadro 3.16) con una ratio de 3:2 (*MFN1*:pET15b). Los detalles de la ligaciones se presentan en Cuadro 4.3. La presencia del gen *MFN1* humano en el plásmido pTL1 se verificó mediante secuenciación de ADN tipo Sanger<sup>195</sup> (Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) Genómica y Proteómica, Universidad Complutense, Madrid).

Para preparar células quimio-competentes se inoculó la cepa de *E. coli* en 2 mL de medio LB (Cuadro 3.13 a partir de colonias sembradas en una placa de LB-agar (Cuadro 3.13. Se incubó el inóculo  $\sim$ 16 horas con una agitación de 250 rpm a 37 °C para preparar una dilución de 1: 100 en 50 mL de medio LB. En cuando el cultivo llega a DO<sub>600</sub> de 0.3 se centrifuga el cultivo (10 min; 2680.8-g, Allegra 25R; Rotor TA-14) a 4 °C y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el sedimento de células cuidadosamente en 50 % del volumen inicial con CaCl<sub>2</sub> (Cuadro 3.4) y se incubó 30 min en hielo. A continuación se centrifuga la suspensión (10 min; 2680.8-g, Allegra

Cuadro 4.3: Condiciones de ligación de plásmido pGEM

Reactivo	$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$	Concentración final
	pGEMT-Easy	pET15b	
Agua MiliQ tipo I	2		
Tampón (10X)	1.5	2	1X (1.5 mM MgCl <sub>2</sub> )
T4 ADN ligasa	(5U/ $\mu\text{L}$ )		1.5 (1.25 U/reacción)
Plásmido	?	2	
Inserto Mfn1	8	8	
Volumen final	15	15	
Incubar la reacción	durante 30 min	a 16 °C	

25R; Rotor TA-14) a 4 °C y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el sedimento de células cuidadosamente en 10% del volumen inicial con CaCl<sub>2</sub>-G (Cuadro 3.4) preparado fresco y refrigerado a 4 °C. Para conservar las células competentes, se alícuota en volumen de 50  $\mu\text{L}$ , congelan en nitrógeno líquido y se conservan a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación se mezclan 5 $\mu\text{L}$  del plásmido de interés (Cuadro 3.16 con mínimo 50  $\mu\text{L}$  de *E. coli* quimio-competentes y se incuba durante 30 min a 4 °C o hielo. Después se incuba la muestra durante 5 min a 37 °C también conocido como ("*choque térmico*"). A continuación se añade 400  $\mu\text{L}$  de medio LB (Cuadro 3.13) a la muestra y se incuba durante 60 min a 37 °C. Después se centrifuga la muestra durante 5 min (2348·g, Microfuge 22R; Rotor F301.5), se descarta el sobrenadante y se resuspende con cuidado el sedimento bacteriano en 200  $\mu\text{L}$  de medio LB (Cuadro 3.13). Por último se plaquean las células en placas de LB-agar (Cuadro 3.13 complementado con antibiótico (Cuadro 3.2) según el marcador de resistencia del plásmido (Cuadro 3.16) que se transforma. Las placas con los cultivos se incuban ~16 horas a 37 °C. Si la cepa *E. coli* quimio-competente lleva plásmido en su interior y se requiere la presencia de antibiótico durante la transformación, se añade el antibiótico al medio LB. Las placas LB-Agar se complementan con todos los antibióticos necesarios.

## 4.5. Cuantificación de proteína total

La concentración de proteínas en las muestras fue cuantificada con los métodos BCA o Lowry. Estos ensayos están basados en la reacción de biuret<sup>196,197</sup>, en un entorno alcalino y presencia de sulfato cúprico, péptidos de cadena corta y proteínas tiñen la solución rosa o violeta respectivamente que absorbe la luz a 540 nm. La intensidad de color está directamente relacionada con la cantidad de péptido o proteína presente en la solución. Para hacer la determinación en presencia de detergente (hasta un ~5%) utilizamos el kit de ensayo de proteínas kit de Bio-Rad RCDC (Cuadro 3.15). La absorbancia de la proteína de interés se relaciona con una curva patrón (estándar) de albúmina de suero bovino a 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mg/mL.

## 4.6. Cuantificación de la energía de adhesión

Las energías de adhesión de GUV-Mfn1 en presencia de GTP o GDP se midieron a partir de la forma general de los dobletes adheridos como descrito por Servuss y Helfrich<sup>198</sup>. Para cada evento de adhesión, adquirimos imágenes de microscopía confocal (Sección 4.14) de las secciones transversales del plano ecuatorial procesados con el software Nikon NIS-Elements (3.17).

Los contornos doblete de las GUVs de interés adheridos se identificaron con MATLAB R2013b (Cuadro 3.17) y a continuación se calculó la energía de adhesión  $E_{adh}$  a partir de la tensión lateral y los ángulos de contacto basados en la ecuación de Young<sup>7</sup>:

$$E_{adh} = \sigma_1(1 - \cos\psi_1) + \sigma_2(1 - \cos\psi_2) \quad (4.1)$$

, con  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  para las tensiones laterales y  $\psi_1$  y  $\psi_2$  para los ángulos de contacto. Para calcular la longitud de correlación:

$$\xi_\sigma = (\kappa/\sigma)^{1/2} \quad (4.2)$$

, obtenido ajustando la función exponencial:

$$y = \xi_\sigma^{(x-x_0)}/\xi_\sigma + y_0 \quad (4.3)$$

que describe el contorno de la membrana considerado desde el borde del área de contacto hasta la asíntota en la membrana libre con  $\kappa = 10 k_B T$  para la rigidez medido para GUVs de POPC<sup>199</sup>.

Este procedimiento se repitió para cada evento de adhesión, obteniendo así un promedio de la densidad de energía de todos los eventos de adhesión. La fuerza de adhesión se puede analizar en términos del marco teórico proporcionado por Dembo et al.<sup>200</sup> para una adhesión de membranas por unión cooperativa:

$$E_{adh} = k_B T ([Mfn1_A] \ln(1 + [Mfn1_B] K_{2D})) \quad (4.4)$$

, donde  $[Mfn1_A]$  y  $[Mfn1_B]$  representan las concentraciones de Mfn1 en la superficie de las GUVs<sub>A</sub> y GUVs<sub>B</sub> respectivamente,  $k_B T$  es la energía térmica y  $K_{2D}$  la constante de equilibrio de unión bidimensional  $K_{2D}$  definida por:

$$K_{2D} = [Mfn1^*]/[Mfn1_A][Mfn1_B] \quad (4.5)$$

con  $[Mfn1^*]$  que representa la concentración del dímero Mfn1-Mfn1 en la superficie de la zona de adhesión.

En el límite de  $[Mfn1_B]K_{2D} \ll 1$  como se espera para un régimen de adhesión débil,  $E_{adh}$  es proporcional a  $K_{2D}$ , es decir:

$$E_{adh} \approx k_B T [Mfn1_A][Mfn1_B] \quad (4.6)$$

Las interacciones específicas a través de múltiples complejos de Mfn1-Mfn1 deben suprimir las ondulaciones repulsivas de la membrana de las contrapartidas de la

bicapa lipídica. Esto implica que la constante de equilibrio de unión bidimensional  $K_{2D}$  depende de la concentración de Mfn1<sup>201</sup>:

$$K_{2D} \approx c(\kappa/k_B T)l^2[\text{Mfn1}_A][\text{Mfn1}_B](K'_{2D})^2 \quad (4.7)$$

con  $c$  un prefactor numérico,  $\kappa$  la rigidez a la flexión de las vesículas,  $l$  es el rango de unión definido como la diferencia entre la separación de membrana local más pequeña y grande en la que las proteínas Mfn1 pueden unirse y  $K'_{2D}$  una constante de equilibrio de unión bidimensional para las membranas planas en la separación óptima Mfn1-Mfn1.

La combinación de las ecuaciones 4.7 y 4.6, suponiendo que  $\sim 3$  grupos NTA (Cuadro 3.11, expuestos en la superficie de las GUVs, se unen a una molécula de Mfn1<sup>202</sup> muestra que  $E_{adh}$  producidos por los dímeros *trans* de Mfn1 es proporcional a la concentración de Mfn1 en la superficie de las GUVs, representado por la concentración de NTA:

$$E_{adh} \approx (c/81)\kappa l^2(K'_{2D})^2[NTA]^4 \quad (4.8)$$

## 4.7. Digestión de ADN plasmídico

Los plásmidos utilizados en este trabajo (Sección 4.4) fueron digeridos con las enzimas de restricción (Cuadro 3.9) según indicado por el fabricante (Cuadros 3.9 y 3.16).

## 4.8. Dispersión de luz dinámica

Para determinar el tamaño de LUVs (POPC/ 20% NTA) y LUVs-Mfn1 (POPC/ NTA/ Mfn1) en presencia y ausencia de GTP se midieron los diámetros de los liposomas por dispersión de luz dinámica (DLS; del inglés: Dynamic Light Scattering) en un analizador de partículas Brookhaven 90 Plus (Cuadro 3.10). DLS mide la variación de la intensidad de dispersión de partículas durante el tiempo. La determinación de la distribución de tamaños moleculares puede variar entre 0.6 nm hasta 6  $\mu\text{m}$  cuando las partículas están en suspensión. En un volumen de 1500  $\mu\text{L}$  de Tris-K (Cuadro 3.4) se mezclaron 1) LUVs, 2) LUVs incubados con LUVs-MFN1 (LUVs/ LUVs-Mfn1), 3) LUVs/LUVs-Mfn1 en presencia de 2 mM de GTP (LUVs/ LUVs-Mfn1/ GTP) y 4) LUVs/LUVs-Mfn1/GTP incubados 1 h a 20 °C. Se compararon los tamaños obtenidos de 3 medidas independientes con un test t de Student con una confianza de 95% ( $p \leq 0.05$ ).

## 4.9. Electroforesis en gel de agarosa

Plásmidos y fragmentos de ADN se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa<sup>203</sup> a una concentración de agarosa de 1% (p/v) disuelto en TAE (Cuadro 3.4) para los fragmentos de interés en este estudio. En cada pocillo se cargan 10  $\mu\text{L}$  de muestra y se reserva un pocillo para el marcador  $\lambda$  DNA-BstEII Digest o ExACT-Gene 1 kb Plus (Cuadro 3.12) dependiendo del rango de tamaño de la muestra. Los

marcadores se cargaron como indicado por sus fabricantes (Cuadro 3.12). Los geles de agarosa (Cuadro 3.15) se corren  $\sim 1$  h a 100 V y tiñen con GelRed (Cuadro 3.15) para visualizar el ADN con un transiluminador UV (Cuadro 3.10).

## 4.10. Fraccionamiento de *E. coli*

Para fraccionar de las células de *E. coli*, se creció la cepa de interés en un volumen de 1L de LB complementado con antibióticos como descrito en Sección 4.16. El sedimento de las células se recogió por centrifugación a 4 °C (10 min; 10000-g, Allegra 25R; Rotor TA-10) y después de descartar el sobrenadante y se suspendieron las células en 5 mL Tris-S (Cuadro 3.4). A continuación se complementa con DTT (Cuadro 3.15) a una concentración final de 1 mM y el inhibidor de proteasas PMSF (Cuadro 3.15) a una concentración final de 1 mM. La células se lisaron como descrito en Sección 4.3 y se separaron las fracciones de membrana, citosol/periplasma y cuerpos de inclusión por centrifugación diferencial. Para sedimentar y aislar los cuerpos de inclusión y restos celulares que contiene entre otro la pared celular de *E. coli*, se centrifuga (10 min; 10000-g; Allegra 25R; Rotor TA-14) la suspensión después de sonicar. El sobrenadante que contiene la fracción de membranas y la fracción de las proteínas solubles del citoplasma/periplasma se transfiere a un tubo limpio y se centrifuga como descrito en Sección 4.3. Los cuerpos de inclusión y las membranas se resuspenden en Tris (Cuadro 3.4) y se determina la concentración de proteínas presente en las fracciones (Sección 4.5) para comparar las fracciones por SDS-PAGE (Sección 4.18) y Inmunodetección (Sección 4.19).

## 4.11. Ensayo de adhesión de vesículas con y sin Mfn1 por transferencia de energía no radiativa

La adhesión y/o fusión de IMVs y IMVs-Mfn1 de *E. coli* se estudió a través la transferencia de energía no radiante (FRET; *del inglés*: Förster Resonance Energy Transfer<sup>204</sup>). IMVs y IMVs-Mfn1 se mezclaron en presencia de GTP y MgCl<sub>2</sub> a una temperatura de 30 °C en un volumen final de 100  $\mu$ L IMVs-Mfn1 (marcados fluorescentemente con NBD-PC y PE-Rho (Sección 4.13) y IMV-Mfn1 sin marcar con una ratio de 1:5 respectivamente manteniendo una concentración final de proteína total de 1 mg/mL ( $\sim 4$ mg/mL lípidos).

Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia (480-700 nm) después de excitar la muestra a una longitud de onda de 460 nm y un ancho de rendija de 5 nm con un espectrofluorímetro AMINCO-AB2 (Cuadro 3.10) equipado con una lámpara de arco de xenón operando a un voltaje de 700 V. Los espectros de emisión se midieron antes y después (60 min) de incubar la muestra con 10 mM de GTP. La eficiencia de transferencia de energía no radiativa (FRET) entre NBD-PC y PE-Rh (Cuadro 3.11 antes y después de la incubación con GTP se calculó como la ratio entre la emisión del PE-Rh a 593 nm y la emisión del NBD-PC a 523 nm. Para los controles se prepararon vesículas unilamelares pequeñas (SUV; *del inglés*: small unilamellar vesicles) de 4 mg/mL de extracto total de lípido de *E. coli* (TLE; *del inglés*: Total Lípido Extract) marcados con NBD-PC y PE-Rh (Sección 4.13)

## 4.12. Ensayo de hidrólisis de GTP

La hidrólisis de GTP se midió mediante el ensayo de fosfato de verde de malaquita que detecta el fosfato inorgánico liberado del GTP durante la hidrólisis de GTP por proteínas con actividad GTPasica. La cantidad de fosfato liberado por las GTPasas es proporcional a la actividad enzimática presente. La solución de verde malaquita se prepara como descrito (Cuadro 3.4). Para los ensayos de actividad GTPasica se utilizaron IMVs-Mfn1 y IMVs-control a concentraciones de proteína total de 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 1 mg/mL disueltos en Tris-M (Cuadro 3.4) precalentado a 37 °C. En un volumen total de 30  $\mu$ L se incubaron a 37 °C por triplicado las muestras durante 30, 60 y 100 min en presencia y en duplicado en ausencia de GTP (control). Para teñir el fosfato producido se añade 200  $\mu$ L de solución de verde malaquita a cada pocillo. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se mide la absorbencia de la mezcla a 620 nm en un lector placa multipocillos (Cuadro 3.10). Para poder comparar la adsorción con la cantidad de fosfato, se mide en triplicado como una curva patrón concentraciones conocidas de  $K_2PO_4$  (entre 0.1 y 0.5 mM) en un volumen final de 30  $\mu$ L.

## 4.13. Marcaje fluorescente de vesículas

El marcaje fluorescente de vesículas se realizó por la incorporación de lípido fluorescente NBD-PE o Rh-PE en la bicapa lipídica o por la unión de un anticuerpo monoclonal conjugado con Alexa-Fluor 488 específico para la proteína Mfn1.

Para los experimentos de FRET (Sección 4.11), el marcaje fluorescente de lípidos de IMVs (Sección 4.3) con PC-NBD (Cuadro 3.11) y Rho-PE (Cuadro 3.11) se realizó a una relación molar de 1:5 respectivamente. La concentración total de los fluoróforos fue inferior al 1 % mol con respecto al contenido de lípidos y fueron directamente añadidos a los IMVs en Tris (Cuadro 3.4). En esta proporción, la fluorescencia del grupo donador PC-NBD de la pareja de es apagado por el grupo aceptor Rh-PE.

Para marcar las vesículas con el anticuerpo fluorescente, se incubaron IMVs o GUVs a una concentración de proteína total de 1 mg/mL con anti-MFN1 Alexa 488 (Cuadro 3.3 a una dilución de 1:75 durante 1 h en Tris-D. El anticuerpo que se ha quedado libre en solución se elimina a través de tres ciclos lavados con Tris y centrifugación (30 min, 264499\$cdotg, Optima-MAX-XP, Rotor TLA 100.3) para sedimentar el material marcado descartando el sobrenadante después de cada centrifugación. Después de los lavados se resuspende el sedimento en un 200 $\mu$ L con Tris-NGC (Cuadro 3.4) o Tris-KGC (Cuadro 3.4) dependiendo de los experimentos programados.

## 4.14. Microscopía Confocal

Las imágenes de microscopía confocal se han obtenido con un microscopio invertido Nikon Ti-E equipado con un módulo confocal de escaneo Nikon C2, láseres continuos de 488 y 561 nm, filtros de paso de banda de emisión y un objetivo de inmersión en aceite Nikon Plan Apo 100x (Cuadro 3.10). La cámara de observación está montada con dos cubreobjetos circulares ( $\phi = 25$  mm) separados por un anillo de goma con un espesor de 2.5 mm. Para evitar la adhesión o rotura de las vesículas

(IMVs, SUVs, LUVs o GUVs) en la superficie del cubreobjetos inferior, previo a su utilización se incubó el cubreobjetos durante 20 min primero con una solución de 10 mg/mL de albúmina de suero bovino y a continuación se lavó abundantemente con Tampón de sacarosa para microscopía (BSM; Cuadro 3.4). Las imágenes de fluorescencia confocal se capturaron con el software NIS-Elements (Cuadro 3.17) y se procesaron con ImageJ<sup>205</sup> (Cuadro 3.17), donde la señal de fluorescencia de las imágenes se normalizó al 50 % de las intensidades máximas y se redujo el ruido de fluorescencia de fondo.

## 4.15. Preparación de vesículas

La producción de vesículas unilamelares gigantes (GUV; *del inglés*: Giant Unilamellar Vesicles) por electro-formación según Angelota y Dimitrov<sup>206</sup> fueron fabricados como descrito por Almendro-Vedia y col.<sup>207</sup> (Cuadro 4.4. La cubeta de fabricación está compuesta por dos portaobjetos recubiertos de óxido de indio-estaño (ITO, *del inglés*: Indium Tin Oxide) con conductor espaciado de 1 mm (7.5 x 2.5 cm<sup>2</sup>; 15-25Ω/sq resistividad superficial). Se depositan en cada portaobjetos de ITO dos gotas de 5μL de la mezcla de lípidos (Cuadro 3.11) a una concentración de 0.5 mg/mL. Se incuban los portaobjetos durante 5-10 min a 60 °C para evaporar el cloroformo (Cuadro 3.15) y se monta la cubeta con las películas lipídicas mirando hacia el interior de la cubeta. Los dos portaobjetos se separan a una distancia de ~ 1 mm tipo cámara sellando el interior con masilla Vitrex (Cuadro 3.15). Para sujetar el montaje de la cubeta, se fija el cámara de portaobjetos ITO en la parte inferior y los laterales con pinzas de papel de ancho de ~15 mm.

A continuación, se hidratan las películas de lípidos en el interior de la cubeta con una solución de 200 mM de sacarosa y se sella la parte superior con masilla Vitrex sin atrapar burbujas de aire. Para formar las GUVs se conectan los electrodos de la cubeta durante ≤ 3 horas a un generador de funciones (Cuadro 3.10) con a un voltaje de 1.1 V de corriente alterna y una frecuencia de 10 Hz.

Cuadro 4.4: GUVs empleados

Tipo GUVs	Composición (mg/mL)	Frecuencia (Hz)	Voltaje (V)	Tiempo (horas)
POPC	1 POPC	10	1.1	≤ 3
POPC:20%NTA	0.8 POPC/ 0.2 DOGS-NTA	8	1.1	18

Para la preparación de vesículas grandes (LUVs; *del inglés*: Large Unilamellar Vesicles) de composición POPC:20% DOGS-NTA a una concentración final de 5 mg/mL, se secaron durante 30 min en un tubo Eppendorf de 1.5 mL 4 mg/mL de POPC (3.11) y 1 mg/mL de DOGS-NTA (3.11) con un speed vac (3.10). Para hidratar la película lipídica, se mezcla con 500 μL de 50 mM Tris-K (3.4 y se sónica durante 10 min (Amplitud de 40 % ; ciclos de 30 segundos apagado/encendido) para acelerar la formación de LUVs. Por último, para producir una muestra monodispersa se extrudió con cuidado la muestra hidratada ~ 20 veces por una membrana de policarbonato con poro de 100 nm (Mini-Extruder, Cuadro 3.10)

## 4.16. Producción heteróloga de MFN1

Para la producción heteróloga de proteínas cuya secuencia codificante origina de genomas mamíferos ricos en nucleótidos guanina y citosina, las cepas *E. coli* utilizadas fueron previamente transformadas con el plásmido Codon Plus-RP (pCP-RP; Cuadro 3.16). Este plásmido codifica los tRNAs *argU* y *proL* necesarios para reconocer los codones que codifican los amino ácidos arginina (Arg o R) y prolina (Pro o P) en *E. coli* respectivamente. Estas cepas necesitan la presencia de cloranfenicol (Cuadro 3.2) en su medio mantener el pCP-RP en su citoplasma. La cepa *E. coli* SF100(DE3)/pCP-RP (SF100(DE3)<sup>+</sup>) transformada con pTL2 (Cuadro 3.16) se inóculo desde placa LB-Agar en 20 mL de medio LB-A (Cuadro 3.13) complementado con ampicilina y cloranfenicol (Cuadro 3.2) e incubado ~16 horas a 37 °C en una incubadora con agitador orbital (Cuadro 3.10 con una agitación de 250 rpm. Al día siguiente, el preinóculo se diluyó 1: 100 en 1 L de medio LB-AG complementado con ampicilina y cloranfenicol (Cuadro 3.2) e incubado a 37 °C en una incubadora con agitador orbital con una agitación de 250 rpm. Cuando el cultivo llega a una densidad óptica medida a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de ~0.6 el cultivo se complementó con 1 mM de IPTG (Cuadro 3.15) y se incubó durante 1 hora a 37 °C en una incubadora con agitador orbital con una agitación de 250 rpm. Las células se recogieron por centrifugación (10 min; 10000·g; 4 °C; Allegra 25R; Rotor TA-10), se resuspendieron en Tris-S (Cuadro 3.4, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Además de la cepa *E. coli* SF100(DE3), se transformaron las cepas *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* C41(DE3), *E. coli* Rosetta(DE3) y *E. coli* Codon Plus-RP(DE3) (Cuadro 3.5) con 2 µL de plásmido pTL2 (Cuadro 3.16) en 50 µL de células quimio-competentes para comprobar la sobreproducción de Mfn1.

## 4.17. Solubilización de IMVs-Mfn1

La solubilización de proteínas de membrana se realiza a partir IMVs-Mfn1 de *E. coli* a una concentración de proteína total de 1 mg/mL con detergentes que desestabilizan las bicapa lipídica y liberan su contenido proteico y otras macromoléculas con el fin de poder ser estudiadas en forma soluble o en un sistema reconstruido. Inicialmente la solubilización se incubó durante 1 h con 1 %, 2.5 %, 5 %, y 10 % ( Cuadro 3.8) de DDM bajo agitación de 200 rpm a 0-4 °C. Los ensayos se extienden a la incubación de 1 h a 2 % de CHAPS, Digitonin, OG, SC, SDC, SDS, Tx-100 y Tx-114 3.8. Para separar la fracción solubilizada de la non-solubilizada se centrifugaron las muestras (30 min, 271667·g, OptimaMAX-XP; Rotor TLA 100.1 o 30 min, 434513·g, Optima-MAX-XP; Rotor TLA 120.1) y se separa el sedimento con las membranas non-solubilizadas del sobrenadante que contiene las membranas solubilizadas.

Para distinguir si la fracción sedimentada de IMV-Mfn1 en presencia de 2 % de DDM no se solubiliza o que no se puede, por su gran tamaño, mantener en solución cuando se centrifuga a 434513·g hemos solubilizado IMVs-Mfn1 de *E. coli* a una concentración de proteína total de 1 mg/mL durante 2 h a 4°C con 2 % de DDM (Cuadro 3.8) y centrifugado de manera diferencial empleando sucesivas centrifugaciones de 30 min a velocidad creciente de 30000·g, 60000·g, 120000·g, 180000·g y 240000·g. Después de cada centrifugación se separa el sobrenadante del sedimento y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio para continuar con la siguiente

centrifugación.

## 4.18. Visualización de proteínas por electroforesis SDS-PAGE

El contenido de proteínas en extracto totales o fracciones de membranas se visualizaron con electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE; *del inglés*: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), una herramienta que separa, en un campo eléctrico, proteínas por su carga y su masa<sup>163</sup>.

La preparación los geles de poliacrilamida al 12 %, se realizó mediante una mezcla un sistema de Tampónes (Tampón separador y Tampón stacking; Cuadro 3.4) descrito por Laemmli<sup>163</sup> con un sistema de Protean III (Cuadro 3.10) utilizando el tampón de electroforesis (Cuadro 3.4). Una vez finalizado se tiñe el gel 15 min con Tinción Coomassie (Cuadro 3.4) y el exceso de colorante se elimina con destiñendo el gel 30 min con agua caliente (100 °C).

Para los cultivos bacterianos de *E. coli* se cogen durante su crecimiento 1 mL de muestra. Primero se mide la  $DO_{600}$  y a continuación se centrifuga la suspensión durante 1 min a 4°C (13523·g, Microfuge 22R, Rotor F301.5). A continuación se descarta con cuidado el sobrenadante y se resuspende el sedimento (las células) en tampón de carga (Cuadro 3.4) en un volumen que corresponde a una  $DO_{600}$  de 10. Por ejemplo 1 mL de cultivo a  $DO_{600}$  0.42 se resuspende en un volumen de 42  $\mu$ L de tampón de carga. Se hierve la muestra 5 min a 100 °C para romper las células y desnaturalizar su contenido proteico. Se cargan 10  $\mu$ L de esta muestra, que corresponde a la cantidad de proteínas de un cultivo a  $DO_{600}$  de 1, en cada carril del Gel.

Para proteínas solubles o de membranas en disolución se cuantifica la cantidad de proteína presente (Sección 4.5) y se preparan muestras con 10 *mug* de muestra por carril en tampón de carga (Table 3.4). Se hierve la muestra 5 min a 100 °C para romper a desnaturalizar su contenido proteico y se carga en el gel.

## 4.19. Visualización de proteínas por Inmunodetección

La detección de proteínas por el método de inmunodetección o también llamado Western blot permite detectar y cuantificar proteínas de modo específico utilizando un anticuerpo primario específico para su detección y un anticuerpo secundario para su visualización<sup>208</sup>. El western blot consiste en una transferencia de proteínas de una gel SDS-PAGE a un soporte sólido (membrana nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF; *del inglés*: Polyvinylidene fluoride)) mediante un campo eléctrico con el Trans-Blot Semy-Dry (Cuadro 3.10). Previo a la transferencia se incubó el SDS-PAGE (sin teñir) ~ 5 min en tampón de transferencia (Cuadro 3.4). 6 hojas de papeles de filtros (del tamaño del gel) se mojan en tampón de transferencia. La membrana PVDF se moja primero con metanol (Cuadro 3.15) y después con tampón de transferencia. La transferencia de las proteínas del SDS-PAGE a la membrana PVDF se realiza durante 45-60 min con una corriente de 8V.

Para revelar las proteínas de interés se le realizan una serie de lavados e incubaciones (Cuadro 4.5) y por último se revela la señal quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano con las soluciones reveladores Novex-CDP-Star o ECL (Cuadro 3.15 con el ImageQuant LAS 500 (Cuadro 3.10 respectivamente.

Cuadro 4.5: Pasos de incubación para revelar western blot

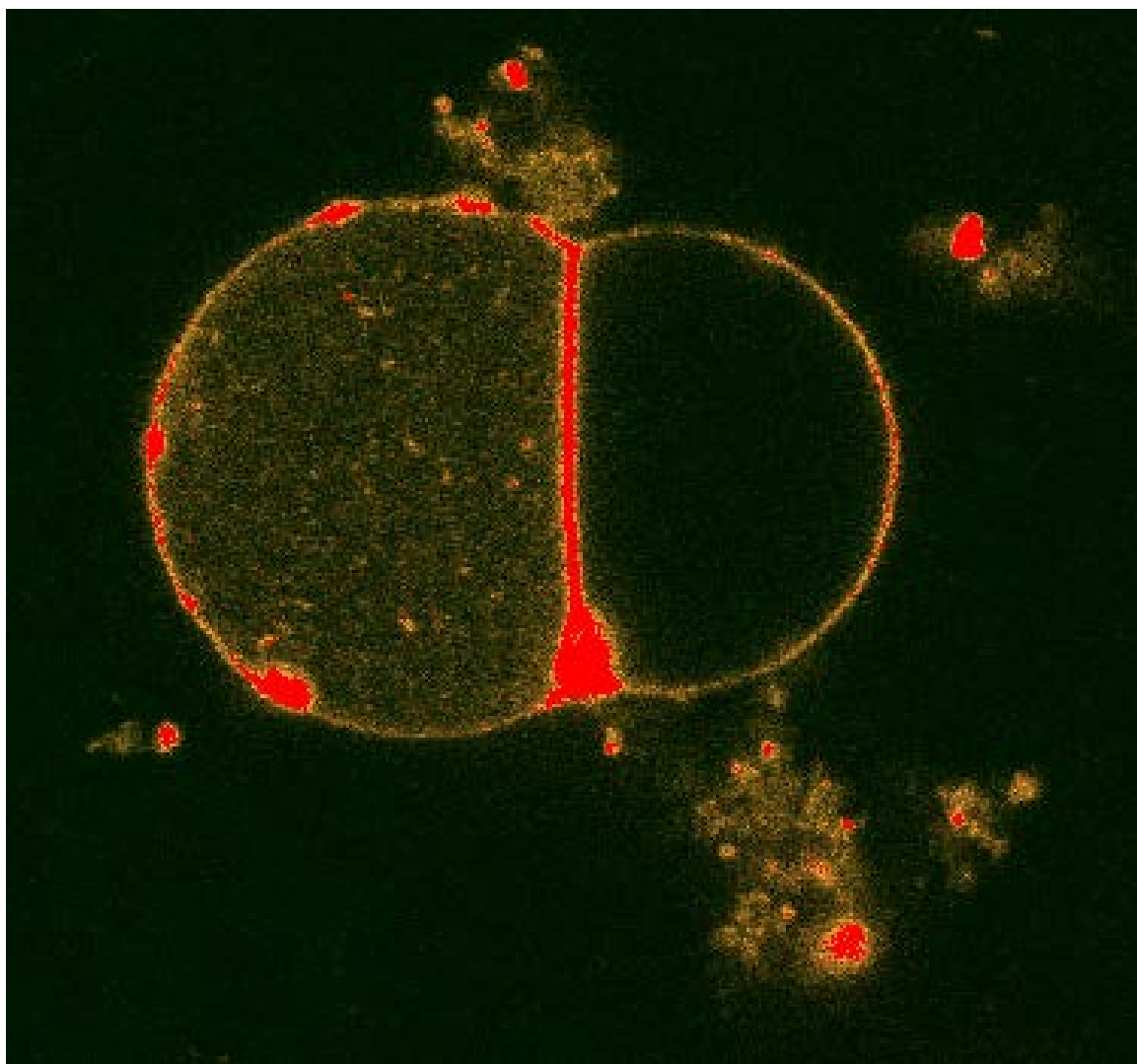
Paso Tiempo	Procedimiento	Compuesto
1 $\geq 1$ hora	Bloqueo	PBST/Bock 2 %
2-4 15 min	Lavado	PBST/Bock 1 %
5 1 hora $\geq x \leq \infty$	Incubación	Anticuerpo primario
6-8 15 min	Lavado	PBST/Bock 1 %
9 1 hora $\geq x \leq \infty$	Incubación	Anticuerpo secundario
10-12 15 min	Lavado	PBST/Bock 1 %
13 5 min	Secar membrana	aire
14 1-5 min	Revelar	Solución reveladora

Para optimizar la titulación del anticuerpo comercial anti-Mfn1(D-10) (Cuadro 3.3 para detectar la proteína Mfn1 en nuestras membranas por inmunodetección (Sección 4.19) se cargan IMVs-Mfn1 ( $10\mu\text{g}$  proteína total por carril) un SDS-PAGE (Sección 4.18) y se transfieren las proteínas a una membrana de PVDF (Cuadro 3.15. El anticuerpo anti-Mfn1(D-10) es monoclonal y producido en ratón contra un péptido que corresponde a la región N-terminal (amino ácidos 10 - 74) de la Mfn1 humana. Se corta la membrana PVDF en tiras de 2 carriles con el marcador de proteínas en un carril y las IMVs-Mfn1 en otro. Las tiras individuales se tratan como western blots individuales y se procede según descrito en Cuadro 4.5.

Después de bloquear la membrana de PVDF (Cuadro 4.5) durante 1 h con PBST/Bock 2 % (Cuadro 3.4) y lavar 3 veces durante de 15 min con PBST/Bock 1 % (Cuadro 3.4), se incuba 1 h con anti-Mfn1(D-10) a unas con diluciones de 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 a 1:10000 en un volumen final de 2 mL. Después de lavar la muestra 3 veces durante 15 min con PBST/Bock 1 % (Cuadro 3.4) se añade el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (AP; *del inglés*: alkaline phosphatase; Cuadro 3.3 ) se incuba para cada tubo durante 1 h a una dilución 1:3000. Se revela como descrito anteriormente.

## Capítulo 5

# RESULTADOS



## 5.1. Clonaje de la gen MFN1

Para la poder producir la proteína mitofusina 1 (Mfn1) en el huésped bacteriano *Escherichia coli* hemos clonado los genes que codifican para las proteínas Mfn1 (**base de datos nuccore: AF329637.1**) con una longitud de 2226 pares de bases (pb), Mfn2 (**base de datos nuccore: 189083766**) con una longitud de 2273 pb y OPA1 (**base de datos nuccore: 224831242**) con una longitud de 2882 pb.

Los genes se han obtenido por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *del inglés*: polymerase chain reaction) (Figura 5.1 izq.) utilizando como molde ADN complementario (ADN $c$ ) de una muestra de sangre producido a partir de un extracto de ARN mensajero (ARN $m$ ) por el grupo de investigación Enfermedades Raras, Mitocondriales y Neuromusculares (Hospital 12 de Octubre, Madrid).

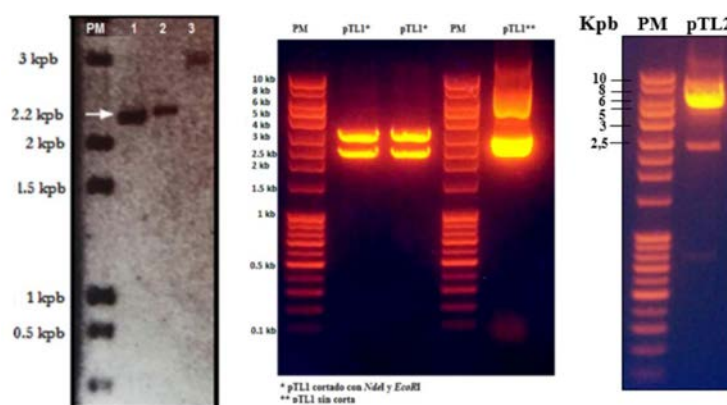


Figura 5.1: **Amplificación y clonaje de los genes *MFN1*, *MFN2* y *OPA1* humanos.** izq.) Gel de 1% de agarosa cargado con los productos de PCR obtenido con los cebadores específicos para los genes MFN1 (2226 bp; carril 1) MFN2 (2274 bp; carril 2) y OPA1 (2883 bp; carril 3). PM: marcador de peso molecular en kilo pares de bases (kpb). La flecha indica una banda con un peso aproximado de 2000 pb para el gen Mfn1. Centro) Gel de 1% de agarosa cargado con el plásmido pTL1 cortado con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI. Las bandas de aproximadamente de 3 kpb corresponde al vector pGEM-T Easy y la banda de aproximado de 2.2 kpb corresponde al gen *MFN1*. El ultimo carril esta cargado con el plásmido pTL1 sin cortar y las bandas representan distintas conformaciones del plásmido en estado relajado (R), lineal (L) y superenrollado (S). dcha.) Gel de 1% de agarosa cargado con el plásmido pTL2 cortado con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI. Las bandas de aproximadamente de 5.7 kpb corresponde al vector pET15b y la banda de aproximado de 2.2 kpb corresponde al gen *MFN1*.

A continuación se transfieren los productos de PCR obtenidos a un vector plasmídico de secuenciación pGEM-T Easy (Figura 5.1 centro) para construir el plásmido pTL1 (Cuadro ??). Los productos de PCR fueron extraídos extraído del gel de agarosa al 1% mediante centrifugación y precipitado con acetato de sodio e incubado con pGEM-T Easy. Este vector bacteriano tiene un origen de replicación para el huésped *E. coli*, un marcador de selección de ampicilina y las secuencias complementarias para los cebadores de secuenciación estándar T7 y SP6 que flanquean en la zona que lleva el gen de interés clonado para verificar su secuencia mediante secuenciación. De los tres productos de PCR (*MFN1*, *MFN2* y *OPA1*) sólo hemos logrado de clonar el gen *MFN1* en el vector de secuenciación (Figura 5.1 centro). Esta nueva construcción se nombró plásmido pTL1 (Figura 5.2A). La presencia del gen *MFN1* se verifico mediante corte con endonucleasas de restricción y mediante secuenciación (Figura 5.3) por la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Las endonucleasas de restricción NdeI y EcoRI que genera 2 fragmentos





humanas en sistemas bacterianos (aquí: SF100 (DE3)<sup>+</sup>/pTL2). Se han comprobado las cepas productoras *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* C41 (DE3) y *E. coli* SF100 (DE3) (Cuadro 3.7) crecidos en medio LB a 37 °C con una agitación de 250 rpm. La producción de proteína en estas cepas se ha inducido con 0.5 y 1 mM de IPTG (Figura 5.4) cuando el cultivo ha llegado a una densidad óptica medida a 600 nm (DO<sub>600</sub> de 0.6. Para ver si la producción de proteína ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento se crecieron los mismos cultivos transformados con el plásmido pTL2 sin añadir IPTG. Para ver el contenido proteico se tomaron muestras de 1 mL cada hora durante el crecimiento.

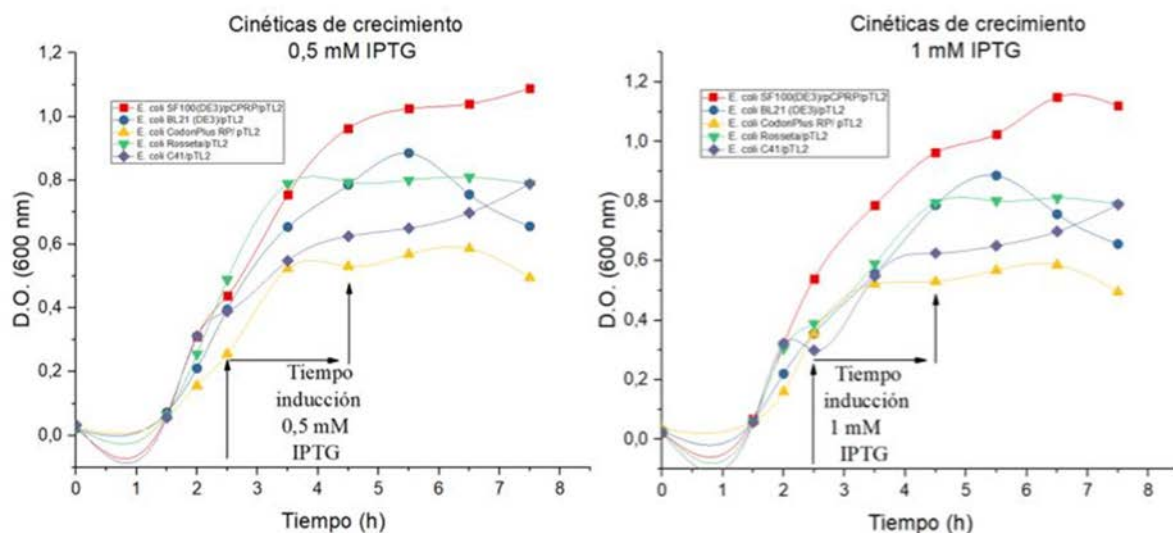


Figura 5.4: Crecimiento de varias cepas de *E. coli* y producción heteróloga de Mfn1 humana. A) La producción de Mfn1 se ha inducido en presencia de 0.5 mM (izq.) y 1 mM (dcha.) de IPTG; B) Expresión de la proteína Mfn1 a partir de cepas transformadas de *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* C41 (DE3) con pTL2. A: la flecha negra indica la hora de la expresión de la Mfn1 en *E. coli* BL21(DE3) con las diferentes concentraciones de IPTG. B: la flecha negra indica la hora expresión de la MFN1 en *E. coli* C41(DE3) con diferentes concentraciones de IPTG.

Las curvas de crecimiento indican que a medida que se aumenta la concentración de IPTG, el crecimiento disminuye lentamente respecto al control. Aunque la sobreproducción de Mfn1 no se aprecia en SDS-PAGE (Figura 5.5), el western blot utilizando el anticuerpo específico para mitofusina (Cuadro 3.3) muestra que Mfn1 está presente a los 60 min y 90 min después de inducir con IPTG, pero que luego se degrada en para tiempos más tardíos (Figura 5.5).

Intentamos optimizar y maximizar la producción de Mfn1 probando otras condiciones de crecimiento durante la producción de proteínas cambiando la temperatura de crecimiento, la concentración de IPTG o el tiempo de inducción, pero no tuvimos éxito para obtener una mayor cantidad de proteína con el cepa utilizada. Hemos fijado las condiciones para la producción heteróloga de Mfn1 de crecer la cepa deficiente en proteasa OmpT *E. coli* SF100 (DE3) e inducir la producción de Mfn1 desde plásmido pTL2 con 0.5 mM de IPTG.

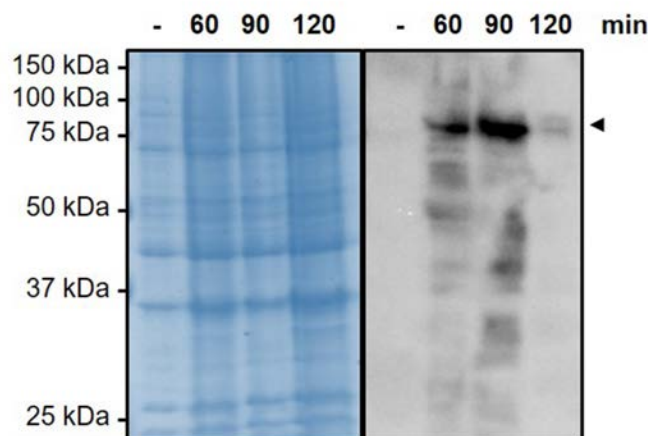


Figura 5.5: 12% SDS-PAGE (izq.) y western blot (dcha.) con *E. coli* células SF100 (DE3) + / pTL2 antes (-) o después (60, 90 120 min) después de la adición de IPTG 1 mM. La punta de flecha indica la posición de Mfn1 ( $\sim 82$  kDa)

### 5.3. Fraccionamiento celular de *E. coli* SF100(DE3)

Una vez obtenido las condiciones de sobreproducción de Mfn1 hemos determinado el estado de proteína producida. Una razón para la escasa producción podría ser la toxicidad inducida por la sobreexpresión y en este caso la proteína podría estar almacenado por la célula en cuerpos de inclusión. Para fraccionar las células de *E. coli*, se creció la cepa de interés en un volumen de 1L de LB complementado con antibióticos como descrito en Sección 4.16. La células se lisaron por sonicación (Sección 4.3) y se separaron las fracciones de membrana, citosol/periplasma y cuerpos de inclusión por centrifugación diferencial (Sección 4.10).

Para sedimentar y aislar los cuerpos de inclusión y restos celulares, que contiene entre otros la pared celular de *E. coli*, se centrifuga la suspensión a baja revoluciones después de sonicar. El sobrenadante que contiene la fracción de membranas y la fracción de las proteínas solubles del citoplasma/periplasma se transfiere a un tubo limpio y se centrifuga a alta revoluciones como descrito en Sección 4.3.

Se observa la presencia de Mfn1 en los cuerpos de inclusión y la fracción de membranas que contiene las membranas internas y externas de *E. coli*. En la fracción soluble que contiene las proteínas que provienen del citoplasma y el periplasma de la bacteria no se detecta la presencia de Mfn1. La presencia de Mfn1 coincide con la disminución de crecimiento durante la sobreproducción de Mfn1. A pesar de mayor señal para Mfn1 en la fracción de cuerpos de inclusión también se encuentra una mayor cantidad de contaminantes que reaccionan con el anticuerpo empleado. La presencia de Mfn1 en la fracción de membranas indicia que el sistema Sec<sup>209</sup>, responsable para la colocación de proteínas de membranas en *E. coli*, es capaz reconocer Mfn1 como proteína de membrana.

### 5.4. Caracterización de *E. coli* IMV

El fraccionamiento de la célula nos indica que Mfn1 se ha insertado en la membrana. No obstante no podemos distinguir si se ha incorporado en la membrana citoplasmática o la membrana externa. Después de aislar las membranas de *E. co-*

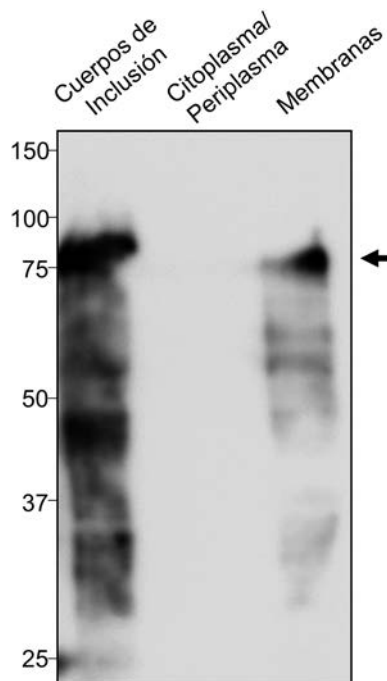


Figura 5.6: *E. coli* SF100(DE3)<sup>+</sup>/pTL2. western blot revelado con  $\alpha$ -Has anticuerpo de las fracciones cuerpos de inclusión, citoplasma/periplasma y membranas internas y externas. La flecha señala la posición de Mfn1.

*li* y separar las membranas externa de las membrana citoplasmática o membrana interna. La membranas aisladas se fragmentan y forman vesículas durante el proceso de aislamiento. De aquí en adelante nos referimos a la membrana interna como vesículas de membrana interna (IMV; *del Ingles*: Inner Membrane Vesicles). Observamos que Mfn1 está localizada en las IMVs membranas y verificamos su presencia mediante western blot (Figura 5.8). El modelo actual de la fusión de membranas mitocondriales establece que para una interacción *trans* los dominios-G de la Mfn1 deberían enfrentarse entre sí y que tras la formación de un dímero y la hidrólisis de GTP tendrá lugar la fusión de membrana<sup>97</sup>. Con respecto a la orientación de nuestra Mfn1 en las IMVs, nos esperamos ya que usamos sonicación para la ruptura de las células (Sección 4.10), que la orientación de la Mfn1 en la de la membrana de las IMVs estará mezclada<sup>210</sup> con el dominio-G orientado al lumen y a la cara externa de la vesícula.

#### 5.4.1. Titulación del anticuerpo anti-Mfn1(D-10)

El uso del anticuerpo monoclonal anti-poli-histidina de ratón unido a fosfatasa alcalina para detectar los residuos de histidina en el término-N de nuestra Mfn1 resulta en unos revelados de membranas con un alto fondo de señal (Figuras 5.5 y 5.6).

Para obtener una señal de Mfn1 más nítida hemos empleado el anticuerpo comercial anti-MFN1 ( $\alpha$ Mfn1; Santa Cruz Biotechnology; Cuadro 3.3), producido contra los amino ácidos 10-74 del término-N de Mfn1. Un requisito para cada anticuerpo empleado para detectar bien la proteína de interés es la determinación de su título. Hemos utilizado IMVs-Mfn1 para titular el anticuerpo. Una vez transferido a una membrana de PVDF (Sección 4.18 y 4.19) se incubaron tiras de membrana PVDF

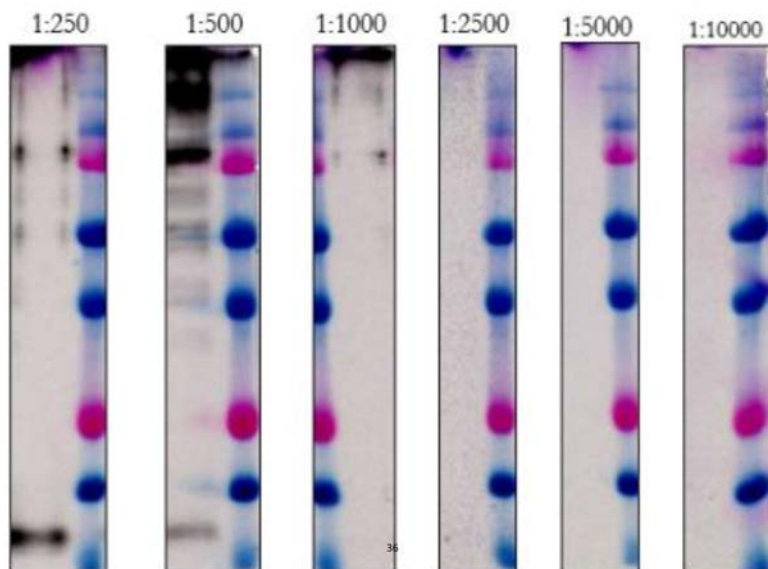


Figura 5.7: Caption

que contienen un carril con IMV-Mfn1 una concentración de 10 mg/mL y otro con marcador molecular para proteínas (Cuadro 3.12). Seis tiras de membrana PDVF fueron incubados durante 60 minutos en PBST (Cuadro 3.4) con anti-MFN1 a una dilución 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 y 1:10000. Como segundo anticuerpo se utilizó anti-ratón-AP a una dilución de 1:3000 y las tiras fueron procesados como descrito en Sección 4.19.

Los resultados muestran una señal de una banda  $\sim 80$  kDa (Figura 5.7) para la proteína Mfn1 para las diluciones 1:250, 1:500 y 1:1000. En las diluciones más altas no se ha detectado señal. Para la dilución 1:250 se obtiene una señal invertida de Mfn1 y su fondo. Además se observa la señal de una banda de  $\sim 12-13$  kDa que puede ser una señal non-específica para este lote de anticuerpo o un producto de degradación de la proteína Mfn1. Para dilución 1:500 observamos una señal de Mfn1 a  $\sim 160$  kDa,  $\sim 80$  kDa y  $\sim 12-13$  kDa. Además se observa una mancha en la zona alta ( $\geq 250$  kDa) que es la zona de inicio del gel de separación del SDS-PAGE que puede contener agregados proteicos que no entraron en el gel de separación y producen una señal de fondo. Para dilución 1:1000 observamos una señal tenue de Mfn1 a  $\sim 160$  kDa,  $\sim 80$  kDa y una mancha en la zona alta ( $\geq 250$  kDa) como para las diluciones previas. Elegimos trabajar con una dilución 1:500 de anticuerpo anti-Mfn1(D-10) ( $\alpha$ -MFN1) para los ensayos de western blot.

#### 5.4.2. La Orientación de Mfn1 en las IMV

En un primer paso para ver la estabilidad de nuestra proteína dentro del marco de tiempo experimental que debería conducir a la fusión de la membrana incubamos las Mfn1-IMVs durante 1 h a 37 °C para evaluar la estabilidad de la proteína. No observamos degradación de Mfn1 (Figura 5.8, izq.; No PK). A continuación, incubamos las Mfn1-IMV durante 30 min (a 4°C) en presencia de 0.1 mg/mL proteinasa K (Figura 5.8, izq.; PK). PK es es una serina proteasa de amplio espectro y degrada (dependiendo de su concentración empleada) las proteínas en la superficie de las

IMVs. A 4 °C, la actividad de PK es moderada y, bajo esta condición, podríamos detectar una diferencia en el perfil de proteínas y evitar el colapso inmediato de las Mfn1-IMVs. Dentro de los primeros cuatro minutos observamos una reducción del 60 % de la señal Mfn1, mientras que el perfil de proteína total del fondo no cambió significativamente (Figura 5.8; PK). Incubaciones más largas deterioran el perfil de proteína total (80 % de degradación de Mfn1 después de 8 minutos y 85-90 % de degradación de Mfn1 después de 15 a 30 minutos). A tiempos de incubación más largos PK colapsó los IMV y digiere todas las proteínas presentes en la membrana. Este experimento indica que Mfn1 está orientado aproximadamente 50:50 con su gran dominio-G hacia ambos lados de la membrana.

Aquí no podemos concluir si el termino-N y el termino-C de Mfn1 se orientan hacia el mismo u opuestos lados de la membrana. Si que podemos concluir que nuestro material, con respecto a la presencia y orientación de la Mfn1, es adecuado para los ensayos de fusión *in vitro*.

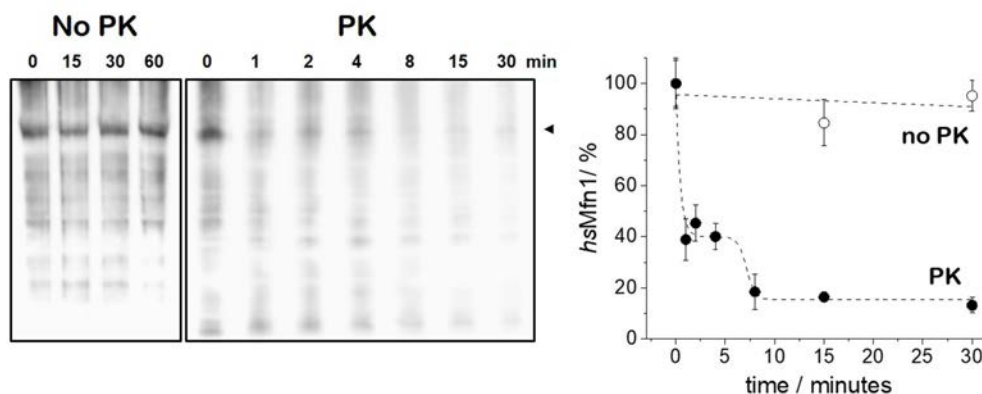


Figura 5.8: Ensayo de protección de proteasas de Mfn1-IMV a una concentración de proteína total de 1 mg/mL en ausencia (sin PK) o presencia de 0.1 mg/mL de PK. Los IMV No-PK se incubaron a 37 °C y los IMV PK se incubaron a 4°C para poder seguir el desglose. **D)** Evolución temporal de la descomposición de proteínas cuantificada a partir de la intensidad de la banda de proteínas durante el tratamiento con PK.

## 5.5. La hidrólisis de GTP catalizado por IMVs de *E. coli* que llevan Mfn1

Una vez aislados y caracterizados hemos ensayado si las Mfn1-IMV son capaces de hidrolizar GTP. Mfn1-IMVs a una concentración de proteína total de 0.1, 0.5 y 1 mg/mL en Tris-M se incubaron en presencia de 2 mM o 10 mM de GTP. durante 30 min a 37 °C. La cantidad de fosfato inorgánico liberado tras la hidrólisis de GTP se detecta mediante el ensayo verde de malaquita<sup>211</sup>.

En comparación con los IMV (control), observamos una estimulación de la hidrólisis de GTP para las Mfn1-IMVs en presencia de 10 mM GTP (Figura 5.9). Observamos una correlación de la cantidad de  $P_i$  producida con la cantidad de proteína total presente. También se puede observar un aumento de la cantidad de  $P_i$  producida en el tiempo de incubación (30, 60 y 100 min). A los 100 min, la cantidad de GTP en la muestra debe estar ya agotada ya que no se observa un aumento significativo de la cantidad de  $P_i$  con respecto a los 60 min de incubación. No se

una estimulación de la hidrólisis de GTP cuando se incubaron las muestras con 2 mM de GTP (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el Mfn1 producido de forma heteróloga es competente para la actividad de hidrolización de GTP, pero como necesitamos una alta concentración (10 mM) de nucleótidos para observar la hidrólisis de GTP, debemos concluir que nuestra proteína Mfn1 se une o hidroliza el nucleótido con baja afinidad.

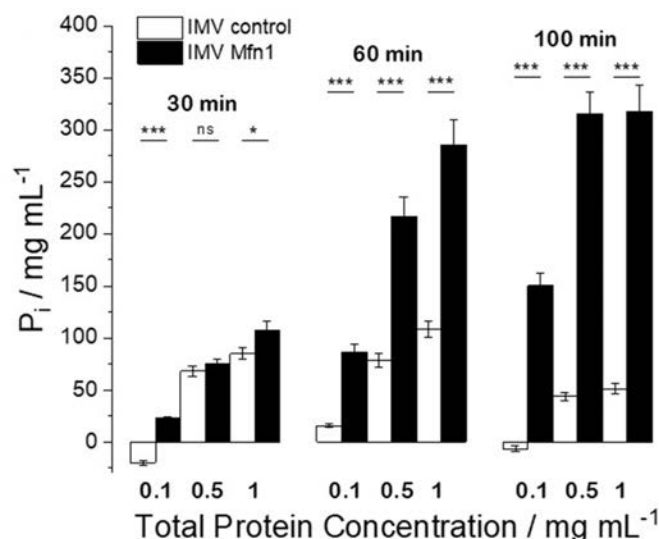


Figura 5.9: Actividad de GTPasa de Mfn1-IMV suplementado con GTP 10 mM e incubado como se indica a 37°C antes de desarrollar con el ensayo de hidrólisis de GTPasa verde malaquita de *E. coli* IMV en presencia de 10 mM de GTP. Los IMV con una concentración de proteína total de 0.1, 0.5 y 1 mg/mL en ausencia (barras blancas; control) y la presencia de Mfn1 (barras negras) se incubaron durante 30, 60 y 100 min a 37°C.

## 5.6. La Solubilización de IMVs-Mfn1

La reconstitución de proteínas de membranas en modelos de membranas requiere la solubilización de la proteína de membrana de interés de su membrana nativa. El uso de detergentes<sup>212</sup> permite en el caso ideal la extracción de la proteína de la membrana lipídica al medio sin interferir con su plegamiento y funcionalidad. En primer instante hemos incubado las Mfn1-IMVs durante 1 h a 20 °C con 2% (p/v) de DDM (Cuadro 3.8) y separado por centrifugación (Sección 5.6) las fracción solubilizada de la non-solubilizada. Por western blot hemos visto que no fuimos capaz de solubilizar la Mfn1 ya que no detectamos ninguna señal en la fracción solubilizada. A continuación hemos variado la concentración de detergente (1%, 2.5%, 5%, y 10% (p/v)). No obstante no hemos logrado de solubilizar Mfn1. Para poder diferenciar si Mfn1 non se solubiliza o si Mfn1 forma oligómeros en presencia de detergentes hemos solubilizado Mfn1-IMVs durante 2 h con 2% de DDM y centrifugado la suspensión durante 30 min a diferente fuerza centrífuga variando de 30000-g hasta 240000-g. Nuestros resultados muestran que a pesar de ver un cambio de distribución de bandas de proteínas de las fracciones sedimentadas a distinta fuerza centrífuga en el SDS-PAGE (Figura 5.10, izq.), el western blot solo nos muestra señal en la fracción de sedimento de 30K y en la fracción soluble de 240K (Figura 5.10, izq.). La

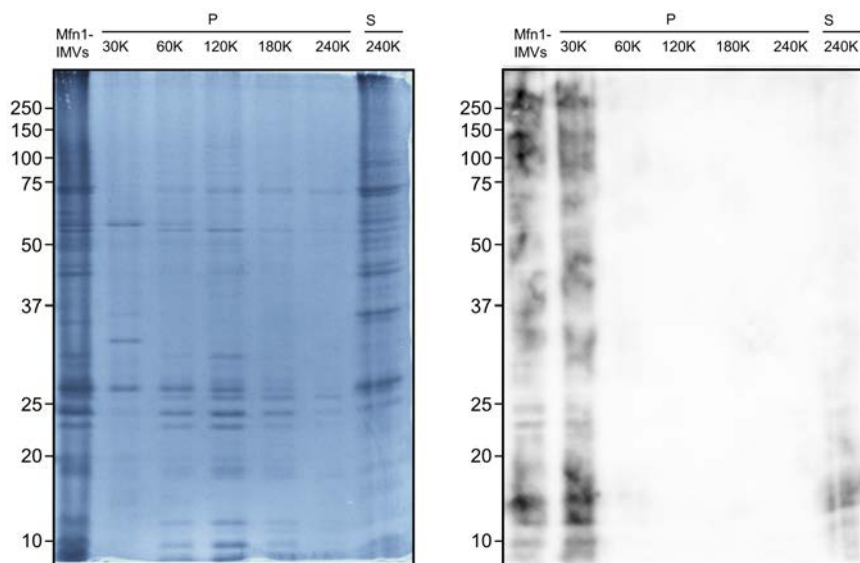


Figura 5.10: Sedimentación de Mfn1-IMVs solubilizados 2% de DDM. SDPS-PAGE (izq.) y western blot (dcha.) de Mfn1-IMVs después de 2 h de incubación con 2% DDM sin centrifugar (Mfn1-IMVs). Los sedimentos (P) después de centrifugar durante 30 min a 30000·g (30K), 60000·g (60K), 120000·g (120K), 180000·g (180K), 240000·g (240K) y la fracción del sobrenadante (S) después de centrifugar durante 30 min a 240000·g (240K) 30000·g (30K). El western blot ha sido revelado con Anti-polihistidina (Cuadro 3.3)

fracción de 30K muestra un perfil de señal parecido a Mfn1-IMVs sin centrifugar. La fracción de 30K muestra una señal de bajo peso molecular alrededor de 15 kDa. Esos resultados indican que Mfn1 sedimenta en presencia del detergente DDM porque no somos capaces de solubilizar Mfn1 en IMV de *E. coli* y no por la formación de un oligómero.

Para distinguir si la fracción sedimentada de IMV-Mfn1 en presencia de 2% de DDM no se solubiliza o que no se puede, por su gran tamaño, mantener en solución cuando se centrifuga a 434513·g, hemos solubilizado IMVs-Mfn1 de *E. coli* a una concentración de proteína total de 1 mg/mL durante 2 h con 2% de DDM (Cuadro 3.8) a 4°C y centrifugado de manera diferencial empleando sucesivas centrifugaciones de 30 min a velocidad creciente de 30000·g, 60000·g, 120000·g, 180000·g y 240000·g. Después de cada centrifugación se separa el sobrenadante del sedimento y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio para continuar con la siguiente centrifugación.

Los ensayos se extienden con la incubación de Mfn1-IMVs durante 2 h con Cloruro de guanidinio, Dodecil- $\beta$ -D-maltosido, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato, digitonina,  $\beta$ -octilglucosido, colato, desoxicolato, dodecilsulfato sódico, Triton X-100 y Triton X-114. Para separar la fracción solubilizada de la no-solubilizada se centrifugaron las muestras y se separa el sedimento con las membranas no-solubilizadas del sobrenadante que contiene las membranas solubilizadas.

Observamos que en ningún caso fuimos capaces de solubilizar Mfn1 con los detergentes utilizados (Figura 5.11, muestra 2-9). La proteína se mantiene integrada en la membrana, ya que el tratamiento con cloruro de guanidinium tampoco pudo solubilizar Mfn1 (Figura 5.11, muestra 1). Salvo para  $\beta$ -octilglucosido (OG) todas las muestras libran una proteína con un tamaño de  $\sim$  40 kDa al sobrenadante (S). Esta banda también está presente en Mfn1-IMVs no tratado (Figura 5.11, muestra

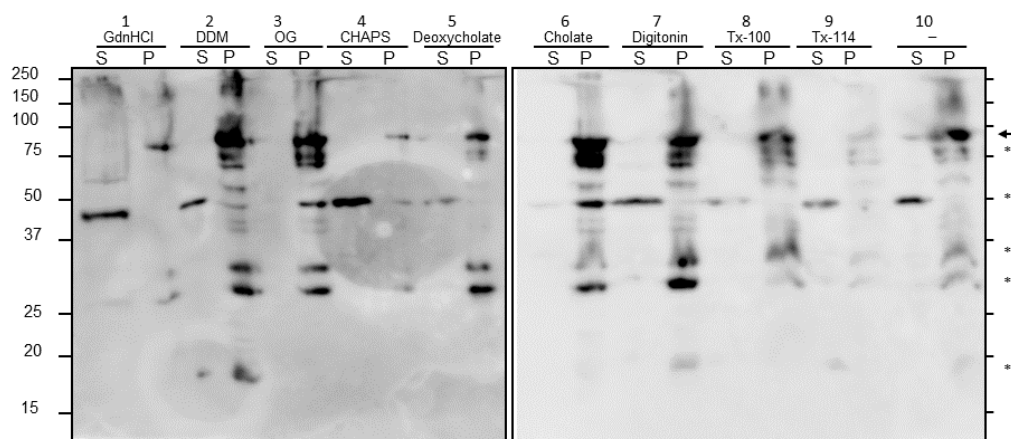


Figura 5.11: Las fracciones solubles (S) y sedimentadas de Mfn1-IMVs a 1 mg/mL incubados durante 2 h a 20 °C con 6M Cloruro de guanidinio o 2% (p/v) de detergentes. GdnCl: Cloruro de guanidinio, DDM: Dodecil- $\beta$ -D-maltosido, OG: $\beta$ -octilglucosido, CHAPS: 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato, Tx-100: Triton X-100, Tx-114: Triton X-114, -: sin detergente. la flecha indica la posición de Mfn1. El western blot ha sido revelado con Anti-MFN1 (D-10) (Cuadro 3.3).

10), así que probablemente la ausencia de esta banda en OG (muestra 3) es resultado de su degradación o inestabilidad después ser incubado con el detergente. La incapacidad de solubilizar Mfn1 con los detergentes utilizados requiere más ensayos variando el tiempo de incubación y la temperatura. No obstante hemos continuado Mfn1-IMVs ya que presentan un sistema reconstituido.

## 5.7. Ensayo de mezcla de lípidos totales de Mfn1-IMVs por transferencia de energía no radiativa

La transferencia de energía no radiativa (FRET; *del inglés*: Förster Resonance Energy Transfer) es un mecanismo de transferencia de energía entre dos fluoróforos donde el primer fluoróforo se excita mediante la absorción de un fotón de luz<sup>213,214</sup>. La fusión entre las membranas lipídicas tiene como consecuencia la mezcla del contenido lipídico proveniente de ambas bicapas, de modo que los lípidos de una membrana pueden difundirse a la otra membrana y viceversa. Un ensayo basado en FRET se usa típicamente determinar el intercambio de lípidos<sup>215</sup> y consiste en marcar una población de membranas con sondas fluorescentes lipídicas que actúan como donante y aceptor a una concentración suficiente para producir FRET. El comportamiento del FRET también nos proporciona información la presencia de eventos intermedios como la adhesión o hemi-fusión de membranas<sup>216</sup>.

Figura 5.12 izq. muestra los espectros de fluorescencia Mfn1-IMVs marcados con la pareja de fluoróforos NBD-PC (Cuadro 3.11) como donante y Rho-PE (Cuadro 3.11) como aceptor en diferentes proporciones molares. La relación molar 1:5 de donante sobre aceptor es aquí óptima para poder la presencia de una señal fluorescente emitida por Rho-PE después de excitar a NBD-PC.

La fusión de los Mfn1-IMVs marcados con Mfn1-IMVs no marcados conduce a una dilución de los fluoróforos presentes en las membranas marcadas al aumentar la distancia entre ellas y tiene como consecuencia la una disminución de la eficacia

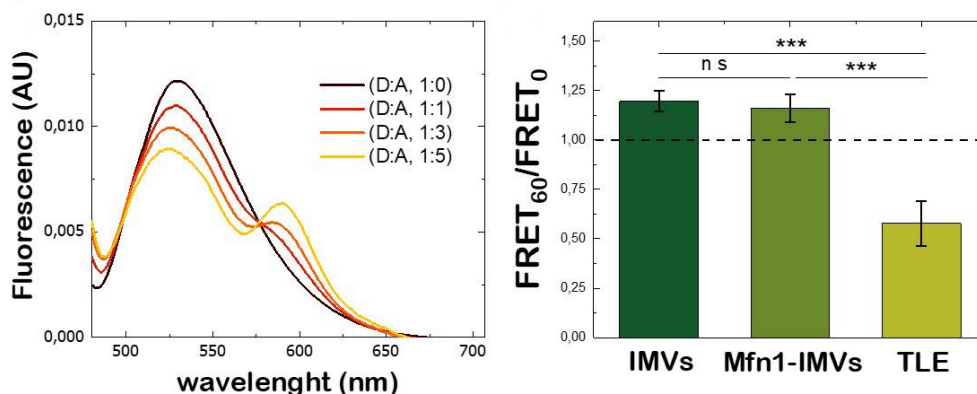


Figura 5.12: Ensayo de mezcla de lípidos totales de IMV. **A)** Espectros de emisión de fluorescencia de IMV marcados con NBD-PC (donante, D) y RhoPE (aceptor, A) en diferentes proporciones molares. La longitud de onda de excitación fue de 460 nm. Los picos a 523 y 593 nm corresponden a la emisión máxima de fluorescencia del donante y aceptor, respectivamente. Se observó un FRET óptimo de NBD a Rodamina en relaciones molares de 1: 5 entre el donante y el aceptor. **B)** Ratio de eficiencia FRET de los IMV (izq.), Mfn1-IMV (medio) y *E. coli* LUV TLE (dcha.), antes y después de 60 minutos de incubación con GTP 10 mM.

de FRET tras la excitación del donante. Debido a que la presencia de Mfn1 podría conducir a la fusión de vesículas tras la hidrólisis de GTP, examinamos la fusión entre Mfn1-IMVs y comparamos el resultado con experimentos de fusión entre Mfn1-IMVs con IMVs en ausencia de Mfn1.

Sorprendentemente, para ambos casos observamos un aumento promedio del  $\sim 20\%$  de la eficiencia FRET (Figura 5.12 dcha.). No observamos disminución de FRET lo cual debe haber fusión de membranas. Este resultados sugiere la presencia de eventos de remodelación de las membranas, como la agregación, en lugar de la esperada fusión. Para comprobar esta posibilidad examinamos como un experimento de control la fusión espontánea de membrana de vesículas grandes (LUV; *del inglés*: Large Unilamellar Vesicles) de extracto de lípidos totales de *E. coli*. Este extracto de lípidos está libre de proteínas. En presencia de 10 mM de GTP se observa la disminución de la señal FRET. Dentro de la escala de tiempo experimental medida esta disminución de FRET corresponde a una dilución de los fluoróforos presentes y una fusión espontánea de la membrana (Figura 5.12 dcha.).

## 5.8. La remodelación de la membrana mediados por Mfn1

Los resultados obtenidos con los experimentos FRET indican que existen eventos de remodelación de membranas en presencia de Mfn1. Para visualizar los eventos de remodelación de la membrana mediados por Mfn1 por microscopia confocal, empleamos vesículas unilamelares gigantes (GUV; *del inglés*: Giant Unilamellar Vesicles). Las GUVs están compuestas de POPC y DOGS-NTA (mol% de 80:20) (Cuadro 3.11). El lípido DOGS-NTA permite decorar la superficie de las GUVs con proteínas que llevan una cola de histidina.

Aquí mezclamos las GUVs con la fracción non-solubilizada de las Mfn1-IMVs (ns-Mfn1-IMV) (Sección 5.6) para el termino-N de Mfn1 que lleva una cola de histidina se

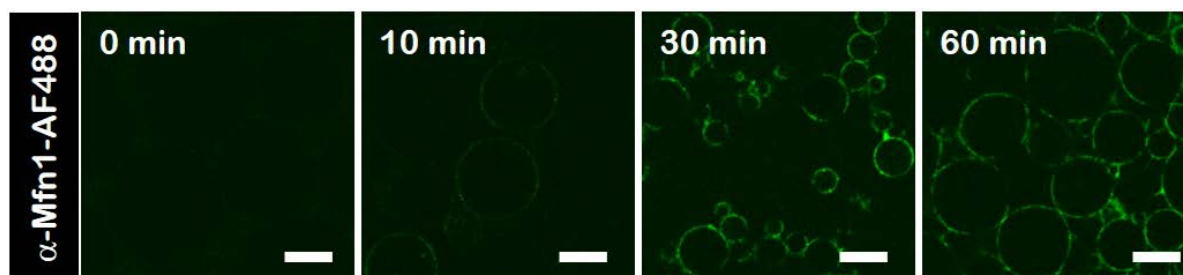


Figura 5.13: Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal que muestran la serie temporal de la unión (**fila superior**) y liberan (**fila central**) del anticuerpo  $\alpha$ -Mfn1-488 contra *hs* Mfn1 inmovilizado en la superficie de GUV POPC / DOGS-NTA. Antes de la incubación con los GUV POPC / DOGS-NTA, *hs* Mfn1 se incubó con  $\alpha$ -Mfn1-488 (señal verde). Las barras de escala son 10  $\mu$ m.

asocia con la superficie de las GUVs (Mfn1-GUV). Para confirmar la unión específica de Mfn1 con DOGS-NTA en la superficie de GUV POPC/DOGS-NTA utilizamos el anticuerpo monoclonal conjugado Alexa Fluor 488 Mfn1 ( $\alpha$ -Mfn1-488). Después de añadir  $\alpha$ -Mfn1-488 se observamos una aumento de señal fluorescente a lo largo del contorno de las vesícula durante la incubación (Figura 5.13).

La adición de imidazol hasta una concentración final de 150 mM eliminó completamente el nítido contorno fluorescente de los GUV. El imidazol interrumpe la interacción del lípido DOGS-NTA y los residuos de histidina de la proteína Mfn1 y la proteína desalojada regresa a la solución tampón. (Figura 5.14)

Como prueba adicional de la interacción específica entre Mfn1 y DOGS-NTA mezclamos GUVs de POPC (sin DOGS-NTA) con ns-Mfn1-IMVs y  $\alpha$ -Mfn1-488, así como GUVs POPC/DOGS-NTA con la fracción non-solubilizada de IMV de *E. coli* nativos sin Mfn1 (ns-IMVs) y  $\alpha$ -Mfn1-488. En ambos experimentos no se formó un nítido contorno fluorescente alrededor las GUVs, pero observamos más bien una señal fluorescente débil y difusa del fondo diluida en el tampón (Figura 5.15).

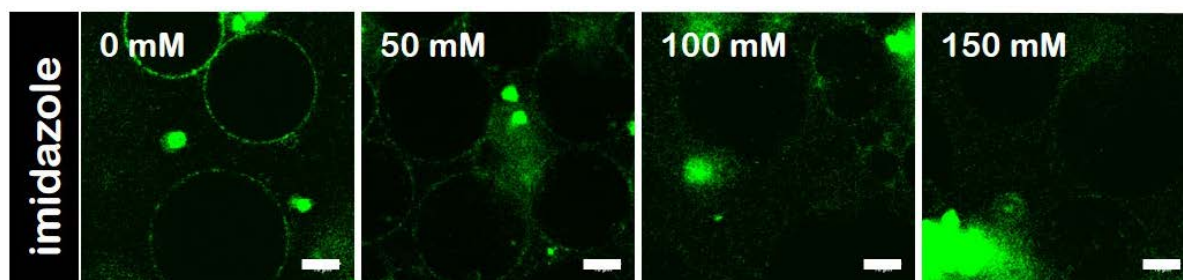


Figura 5.14: Para liberar el *hs* Mfn1 enlazado de los GUV POPC / DOGS-NTA, se agregaron cantidades crecientes de imidazol a la muestra. Las barras de escala son 10  $\mu$  m.

Se obtuvo una prueba adicional de la interacción específica entre los lípidos Mfn1 y NTA etiquetados con histidina incubando GUVs POPC (sin DOGS-NTA) con *hs* Mfn1 y su anticuerpo fluorescente, así como los GUV POPC / DOGS-NTA con solubilizados nativo *E. coli* IMV que no contenían *hs* Mfn1 y el anticuerpo fluorescente Mfn1. En estas condiciones, no observamos un contorno fluorescente discreto de GUV sino más bien una señal de fondo débil, difusa y diluida del buffer (Figura 5.15).

Para visualizar la remodelación de la membranas incubamos las Mfn1-GUVs con GTP y  $MgCl_2$  a una concentración final de 10 mM y 2.5 mM respectivamente y

observamos la formación de áreas de adhesión individuales y múltiple entre GUVs adyacentes (Figura 5.16B). A nuestra sorpresa, la incubación de Mfn1-GUVs con GDP también conduce a la formación de eventos de adhesión individuales y múltiples entre las GUVs adyacentes (Figura 5.16C). Estos resultados sugieren que, en ambas condiciones podríamos observar el estado de Mfn1 unido a GDP ya que el GTP se hidroliza y el nucleótido no se disocia de la proteína.

Para confirmar esta hipótesis, realizamos el mismo experimento en presencia del  $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$ .  $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$  se une al sitio de unión de nucleótidos de Mfn1 donde la molécula de fluoruro imita el fosfato  $\gamma$  del GTP. La presencia del flúor evita la disociación de la molécula en GDP y fluoruro de aluminio y la Mfn1 permanece atrapada en el estado de transición de GTP<sup>130</sup>.

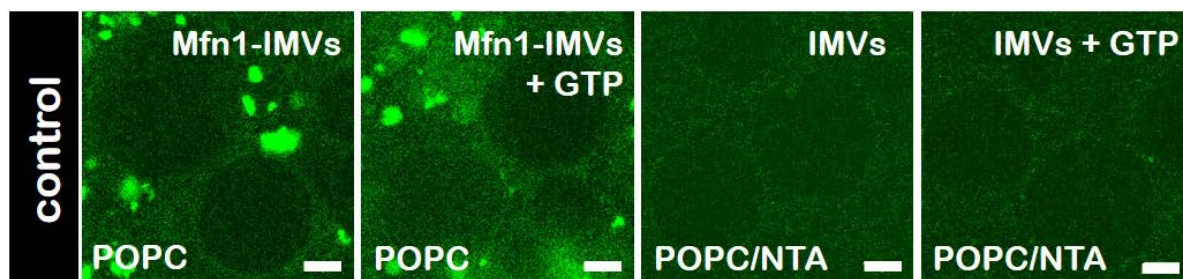


Figura 5.15: Ensayos de control (**fila inferior**), donde los GUV POPC (en ausencia de DOGS-NTA) se incubaron con Mfn1-IMV (**fila inferior, Mfn1-IMV**) o los GUV POPC / NTA se incubaron con solubilizados *E. coli* IMVs (**fila inferior, IMVs**) no mostró etiquetado del contorno de la GUV tras la incubación con  $\alpha$ -Mfn1-488. Para visualizar la presencia de GUV en las imágenes de fluorescencia de los experimentos de control, los datos en bruto no se corrigieron para las relaciones señal / ruido. La adición de GTP a estas muestras no promovió la adhesión de vesículas. Las barras de escala son  $10 \mu\text{m}$ .

Como sospechamos, no observamos ningún evento de adhesión de vesículas (Figura 5.16D) lo cual indica que en presencia de Mfn1 la hidrólisis GTP es importante para la adhesión *trans* de las membranas.  $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$  o  $\text{GDP}\cdot\text{BeF}_3^-$  ya mostraron formación de dímeros de Mfn1 (Sección 1.6.2)<sup>123</sup>. La ausencia de eventos de adhesión de membranas en presencia de  $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$  sugiere que se debe tratar de un dímero *cis* presente en la superficie de las GUVs. Hasta que no se hidroliza el GTP, el dímero de Mfn1 queda "bloqueado"<sup>14</sup> y no es capaz de catalizar la adhesión de membranas adyacentes. La hidrólisis de GTP desbloquea el estado de transición e induce una rotación de  $77^\circ$  del dominio de GTPasa reorientando la interfaz de unión de Mfn1<sup>14</sup>. Para asegurarnos que la adhesión de las vesículas no fue mediada por la presencia del anticuerpo  $\alpha$ -Mfn1-488 (Cuadro 3.3), repetimos los experimentos en ausencia  $\alpha$ -Mfn1-488, pero marcamos la membrana GUV con la sonda de lípidos fluorescentes Rh-PE (Cuadro 3.11). Como visto anteriormente la presencia de GTP o GDP también indujo eventos de la adhesiones únicas y múltiples, mientras que la incubación con  $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$  produjo ningún evento de adhesión entre vesículas (Figura figures:GUVAdh2).

Finalmente, para descartar que los eventos de adhesión observados se podrían generar por las interacciones non-específicas de proteínas presentes en la membrana citoplasmática de *E. coli* incubamos POPC GUVs (en ausencia de DOGS-NTA) con sn-Mfn1-IMVs y 10 mM de GTP o POPC/DOGS-NTA con IMVs (en ausencia de Mfn1) y 10 mM de GTP (Figura 5.15). Como visto anteriormente en ausencia de GTP, no se observaron eventos de adhesión en esas muestras.

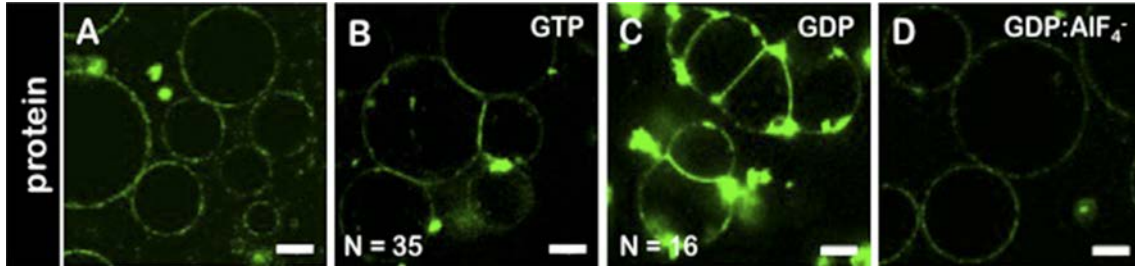


Figura 5.16: Adhesión de membrana de GUVs promovida por Mfn1. Imágenes de microscopía confocal de GUVs incubadas con solubilizado *E. coli* membranas internas que llevan Mfn1 y el anticuerpo  $\alpha$ -Mfn1-488 **A**) en ausencia de nucleótidos, **B**) en presencia de GTP, **C**) GDP y **D**) GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>. La composición lipídica de los GUV fue una relación POPC/DOGS-NTA 80/20 mol %. Las barras de escala son 10  $\mu$ m

## 5.9. La fuerza de adhesión entre las vesículas en presencia de GDP o GTP

Medimos la fuerza de adhesión dependiente de nucleótidos de las proteínas Mfn1 en pares de vesículas. Las imágenes de microscopía confocal mostraron que la forma de los sitios de contacto entre las GUV variaba desde una forma curva, consistente con un escenario de adhesión débil<sup>198</sup> a una interfaz plana, consistente con un escenario de adhesión fuerte<sup>217</sup> (ver Figuras 5.16 B, C y 5.17 F, G). La cuantificación de la fuerza de adhesión se basó en consideraciones geométricas a partir de la forma de vesículas adheridas independientemente de la naturaleza de las moléculas de unión. Se describen dos regímenes de adhesión dependiendo del estado de tensión de las vesículas adheridas<sup>218</sup>: 1) el régimen de adhesión débil y 2) el régimen de adhesión fuerte. En el régimen de adhesión débil ( $E_{adh} < 10^6$  J/m<sup>2</sup>), la forma de las vesículas resulta de la interacción entre la adhesión y la energía de flexión y el tabique entre vesículas exhibe una forma curva y en el régimen de adhesión fuerte ( $E_{adh} > 10^6$  J/m<sup>2</sup>), la rigidez de la flexión es insignificante y las vesículas forman una forma muy cercana a la tapa esférica.

En nuestro caso, los contactos curvos mostrados por las vesículas (Figura 5.17) fueron consistentes con una adhesión débil. Dependiendo de la fuerza de adhesión, se utilizaron diferentes enfoques para obtener la unión fuerza de las moléculas adherentes<sup>219-221</sup>. Ninguno de ellos proporcionó información sobre el origen de las interacciones físicas entre moléculas pero este procedimiento se ha utilizado ampliamente para determinar la energía de adhesión promovido por sistemas muy diferentes como fuerza de agotamiento osmótico inducido por depletors poliméricos<sup>220</sup>, interacciones de ligando y receptores<sup>222</sup> o la adhesión de vesículas inducida por electricidad<sup>221</sup>. Analizamos<sup>198</sup> múltiples eventos adhesivos y medimos los ángulos de contacto  $\psi_1$ ,  $\psi_2$  entre las GUVs que se adhieren (Figura 5.20 para más detalles). El módulo de flexión  $\kappa$  de las bicapas lipídicas, que es necesarios para estimar las tensiones laterales (ver Ecuación 4.1), se tomaron de los valores informados de POPC vesículas<sup>199</sup>. Finalmente, calculamos la energía de adhesión usando los valores experimentales del par promedios de ángulos y tensiones de vesículas adherentes usando la ecuación de Young (Ecuación 4.1). Medimos un fuerza de adhesión de  $E_{adh} = (2.7 \pm 0.7) 10^8$  J/m<sup>2</sup> después de la incubación de GTP que se mantenía sin cambios en  $E_{adh} = (2.7 \pm 0.5) 10^8$  J/m<sup>2</sup> cuando se incubaba con el GDP (Figura 5.21). Aunque la presencia del  $\alpha$ -Mfn1-488 no fue capaz de atar artificialmente los GUV y producir el inter-

faz de adhesión (ver Figura 5.13 y 5.16A), esta descrito que a alta concentración las inmunoglobulinas pueden inducir una interacción proteína-proteína artificial<sup>223</sup>. Para estimar el efecto del anticuerpo marcado sobre  $E_{adh}$  de las GUVs, también cuantificamos la fuerza de adhesión en presencia de GTP o GDP pero en ausencia de anticuerpo Mfn1. Obtuvimos  $E_{adh} = (1.4 \pm 0.3) 10^8 \text{ J/m}^2$  en presencia de GTP y  $E_{adh} = (1.8 \pm 0.5) 10^8 \text{ J/m}^2$  en presencia de GDP respectivamente (Figura 5.21).

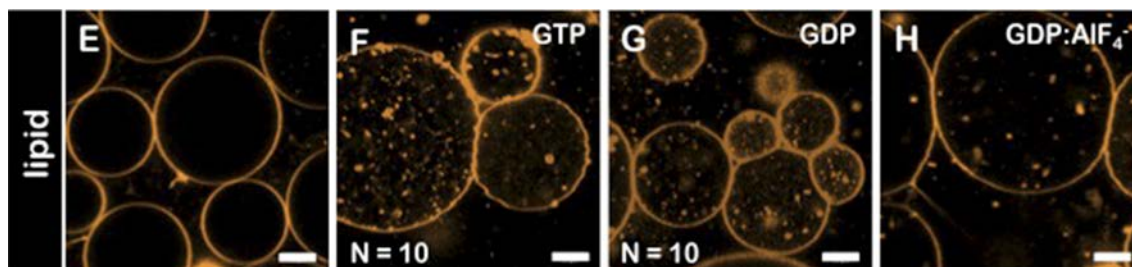


Figura 5.17: Adhesión de membrana de GUVs promovida por Mfn1. Imágenes de fluorescencia confocal de GUVs marcados con RhoPE **E**) en ausencia de nucleótidos, **F**) en presencia de GTP, **G**) GDP y **H**) GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>. La composición lipídica de los GUV fue una relación POPC/DOGS-NTA 80/20 mol%. Las barras de escala son 10  $\mu\text{m}$

## 5.10. Cambio de los diámetros promedio Mfn1-LUVs inducido por la presencia de GTP

Para obtener una estimación del tamaño de partícula de nuestras preparaciones en relación con la adhesión de las Mfn1-GUVs en presencia de GTP, determinamos los promedios de los diámetros de partículas mediante dispersión de luz dinámica (DLS) en un analizador de partículas ZetaPlus (Cuadro 3.10). Por su fragilidad, a la hora de procesar las muestras para este tipo de experimento no se pueden emplear GUVs. Equivalente a las preparaciones de los GUVs POPC/DOGS-NTA, preparamos unas LUVs de POPC/DOGS-NTA (80:20 mol%) y las incubamos con Mfn1-IMVs (Mfn-LUVs) en presencia de GTP.

Los LUVs POPC/DOGS-NTA solos presentan a 20 °C un diámetro promedio de  $98 \pm 1 \text{ nm}$ . Tras la incubación con Mfn1-IMV, el diámetro promedio de las Mfn1-LUVs aumentó a  $111 \pm 1 \text{ nm}$ . La presencia de GTP a una concentración final de 10 mM resultó de nuevo tras la incubación de 1 h en un aumento del diámetro promedio de  $121 \pm 2 \text{ nm}$  a  $145 \pm 3 \text{ nm}$ . Este aumento de  $\sim 32\%$  observado en el diámetro de las partículas apoya la adhesión de membranas mediado por Mfn1 tras la hidrólisis de GTP. Además, el índice de polidispersidad encontrado en todas las muestras (PDI  $< 0.2$ ) indica que la muestra era monodispersa.

### 5.10.1. Intercambio de lípidos durante los eventos de adhesión de las Mfn1-GUVs

La fusión completa de la membrana avanza a través de una serie de etapas intermedias que incluyen el enfoque y la deformación de la membrana (adhesión de membrana y hemifusión), que conduce a la mezcla de lípidos de las monocapas externas y la formación y desarrollo de un poro de fusión, que conduce a la mezcla de

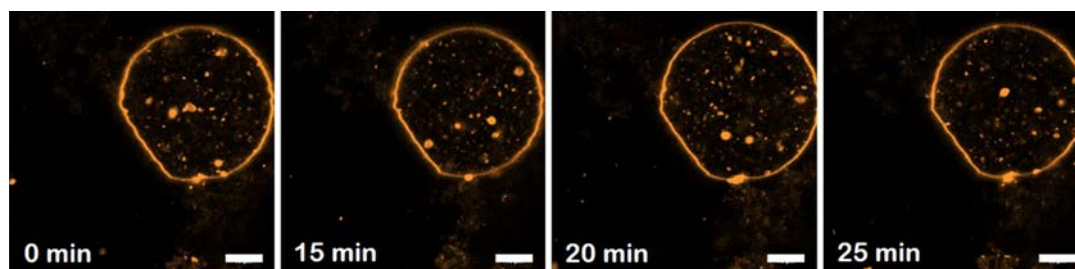


Figura 5.18: Evolución temporal del ensayo de mezcla de lípidos en GUVS con adhesión inducida por Mfn1. La mezcla de lípidos se controló cuando se observó la intensidad de fluorescencia en la vesícula no marcada después de la adhesión de dos GUV, uno de ellos marcado con Rh-PE (0.5 % mol). En el 90 % de los casos ( $N = 10$ ) no se observó redistribución de fluorescencia entre vesículas. Las barras de escala son  $10 \mu\text{m}$

los dos compartimentos acuosos<sup>224</sup>. Para determinar si la adhesión de la Mfn1-GUV produce hemi-fusión observamos la redistribución de la señal de fluorescencia entre dos vesículas adherentes cuando una vesícula está marcada con 0.5 mol % de Rh-PE y la otra queda sin marcaje. Después de la adhesión, solo se observó una señal débil de rodamina fluorescente en vesículas no fluorescentes (Figura 5.18). El aumento de la fluorescencia medida en vesículas no marcadas fue 2-10 veces menor que la relación teórica mostrada para vesículas que durante hemi-fusión<sup>225</sup>. Sin embargo, solo encontramos que el 10 % de los casos mostraron redistribución de lípidos (Figura 5.19).

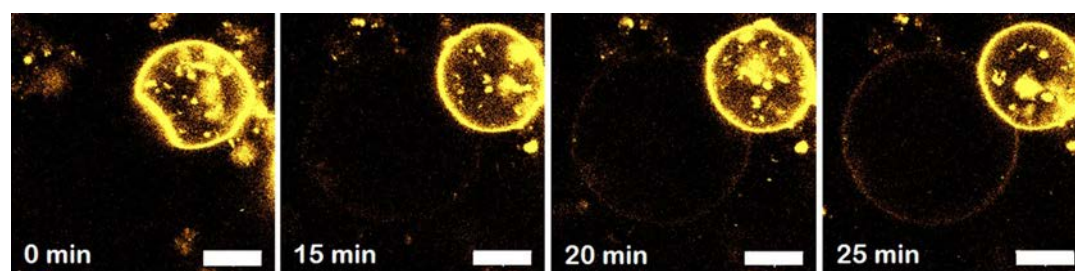


Figura 5.19: Evolución temporal del ensayo de mezcla de lípidos en GUVS con adhesión inducida por Mfn1. Solo en un caso, apareció una señal fluorescente en la vesícula no marcada. Las barras de escala son  $10 \mu\text{m}$

No podemos descartar una transferencia de lípidos de las estructuras membranosas presentes dentro en la muestra que no pertenecen a la vesícula adherida. En este momento nuestros resultados al respecto del intercambio lipídico y la formación de la hemi-fusión promovida por Mfn1 no es concluyente y requiere más experimentos en el futuro utilizando vesículas micro-manipuladas<sup>225</sup>.

## 5.11. La adhesión de membrana mediada por Mfn1 ocurre a través una unión cooperativa

En general, la cooperatividad de la unión entre las proteínas que promueven la adhesión a la membrana resulta de una disminución de la aspereza de las bicapas lipídicas con el número creciente de enlaces *trans* entre las proteínas parecido a una interacción de ligando-receptor. Estas interacciones reducen las ondulaciones y

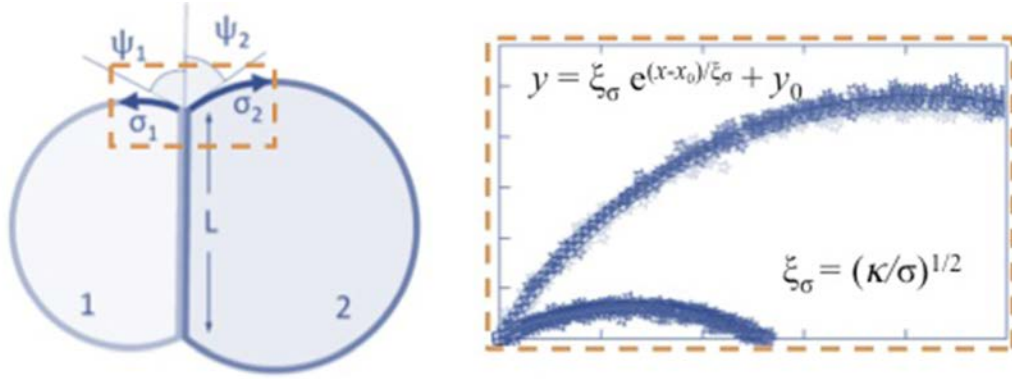


Figura 5.20: La cuantificación de la fuerza de adhesión. **A)** Diagrama esquemático de dos GUVs adheridos. Los ángulos de contacto se denotan con  $\psi_1$ ,  $\psi_2$  y las tensiones laterales con  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$ . El contorno de la vesícula se obtuvo de los píxeles con la máxima intensidad de fluorescencia (área ampliada; dcha.) y se ajustó a la función  $y = \xi_\sigma e^{(x-x_0)/\xi_\sigma} + y_0$  desde el borde del área de contacto hasta la asíntota en la membrana libre. Los valores de tensión lateral se calcularon usando la longitud de correlación  $\xi_\sigma = (\kappa/\sigma)^{1/2}$ , con el módulo de curvatura o rigidez  $\kappa = 10 \kappa_B T$  para las POPC GUVs<sup>199</sup>.

fluctuaciones térmicas de la membrana y facilitan la unión de moléculas de ligando-receptor adicionales<sup>201</sup>.

Para alterar la fuerza de adhesión titulamos la concentración de Mfn1 unida a la superficie a través de DOGS-NTA y medimos la fuerza de adhesión  $E_{adh}$  para GUV que contienen 10, 15, 20 y 25 %mol de DOGS-NTA en presencia del GDP. Por debajo de una concentración de 10 %mol de DOGS-NTA no observamos adhesión de Mfn1-GUVs. Se requiere una cantidad mínima de NTA para lograr la unión estable y evitar la desorción de moléculas que contienen histidinas a través de la formación de especies que estén unidas multivalentemente<sup>202,226</sup>. En general, las vesículas que contienen más lípidos DOGS-NTA exhiben una mayor fuerza de adhesión específica (Figura 5.22). La fuerza de adhesión  $E_{adh}$  aumenta hasta  $\sim 10^7$  J/m<sup>2</sup>. Del ajuste  $E_{adh} \propto (K_{2D})^2 [NTA]^4$  (Ecuación 4.6) obtuvimos un  $K_D' \approx 0.1$  nm<sup>2</sup> por molécula.

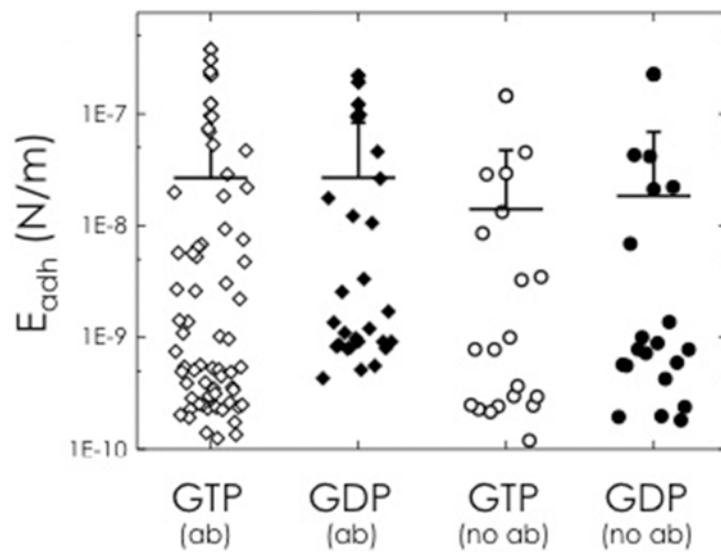


Figura 5.21: Fuerza de adhesión de las Mfn1-GUVs en presencia de GTP (N=35) o GDP (N= 16).

Este valor es 3 órdenes de magnitud más bajo que la constante de equilibrio de unión bidimensional obtenida para moléculas de alta afinidad como los anticuerpos<sup>221,227</sup>. Sin embargo, las interacciones promovidas por las moléculas Mfn1 son lo suficientemente fuertes como para contrarrestar las fuerzas de ondulación de las fluctuaciones de la membrana, pero no lo suficientemente como para impulsar la fusión completa de la membrana.

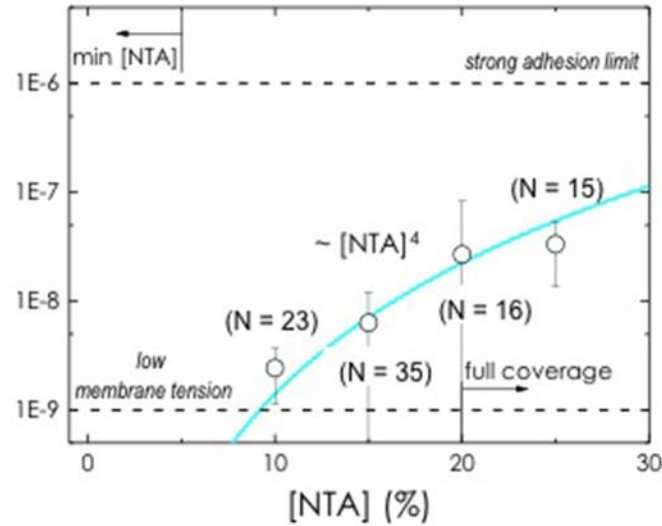
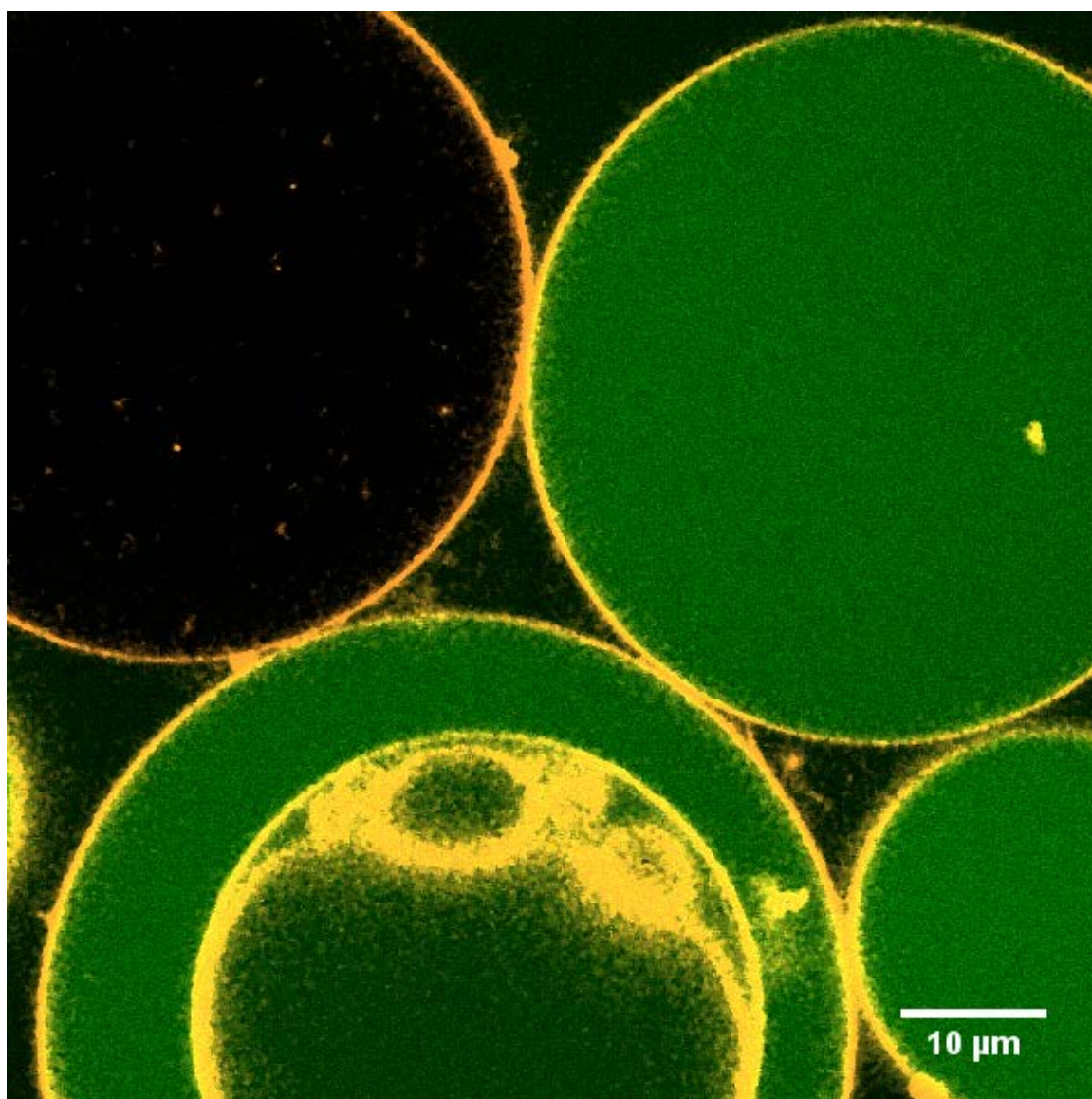


Figura 5.22: La fuerza de adhesión de Mfn1-GUVs en presencia de GDP en función de la concentración de NTA presente en las GUVs. Entre paréntesis se muestra el número de eventos de GUVs adheridos analizados.



## Capítulo 6

## DISCUSIÓN



La dinámica mitocondrial juega un papel fundamental en el mantenimiento de las funciones fisiológicas de las mitocondrias. Las mitocondrias son orgánulos dinámicos e interconectados que se someten a eventos continuos de fusión y fisión para garantizar una homeostasis mitocondrial<sup>228</sup> y proporcionar el suministro constante de energía en forma de ATP<sup>16,229</sup>. La disfunción de la dinámica mitocondrial (disfunción mitocondrial) está asociada con diversas enfermedades humanas.

Las proteínas Drp1 (proteína relacionada con la dinamina 1), Mfn1 y Mfn2 (mitofusinas 1 y 2) y Opa1 (la proteína de atrofia óptica 1), todas ellas homologas de la dinamina y miembros de la superfamilia DLP (*del inglés*: Dynamin-like proteins), controlan la dinámica mitocondrial a través de la remodelación de las membranas mitocondriales. Drp1 actúa durante la fisión, mientras que Mfn1, Mfn2 y Opa1 operan durante la fusión mitocondrial. No obstante, otros miembros de esta familia de proteínas actúan en membranas de diferentes orgánulos<sup>8</sup>.

Las proteínas DLP son GTPasas, proteínas que hidrolizan GTP y que comparten características mecánicas comunes durante su modo de acción que incluye la dimerización y un cambio de conformación en cada monómero tras la unión e hidrólisis de GTP<sup>230,231</sup>. Sin embargo, la afinidad de las DLPs por el GTP es baja en comparación con las GTPasas de la familia Ras, que a su vez interactúan con proteínas auxiliares como el factor de intercambio del nucleótido guanina (GEF; *del inglés*: Guanine nucleotide-Exchange Factors) o las proteínas activadoras del nucleótido guanina (GAP; *del inglés*: Guanine nucleotide-Activating Proteins). Ambas proteínas controlan la hidrólisis de GTP y garantizan la unión del nucleótido con una alta afinidad<sup>232</sup>. Las proteínas DLP carecen de factores auxiliares para su función.

## La fusión mitocondrial

La fusión mitocondrial consiste en la unión física de los orgánulos y se inicia por el acercamiento y anclaje de las membranas externas mitocondriales (MEM) proveniente de mitocondrias adyacentes que progresa a su fusión que es *a posteriori* seguido por el anclaje y la fusión de sus membranas internas mitocondriales (MIM)<sup>97</sup>. Alternativamente, si en cada proceso solo una valva de cada bicapa está involucrada en el proceso de fusión, se dice que las bicapas están hemifundidas. En la hemifusión, los componentes lipídicos de la valva exterior de las dos bicapas pueden mezclarse, pero las valvas internas se mantienen en su estado inicial. La fusión de membranas biológicas casi siempre está promovida y regulada por la acción de proteínas asociadas a la membrana.

La estructura cristalina disponible del mutante Mfn1<sub>IM</sub>, que carece de ambos segmentos transmembranas, dimeriza en presencia de GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> pero permanece monomérico en presencia de GTP, GDP o ausencia de nucleótido<sup>123</sup> (Figura 1.14 y 6.1 A). GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> mimetiza la estructura de GTP donde el fluoro de aluminio se posiciona como el fosfato  $\gamma$  del GTP<sup>233</sup> y se emplea con frecuencia en estudios funcionales y cristalográficos de GTPasas<sup>234</sup>. GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> y Mfn1<sub>IM</sub> forman un complejo ternario con mayor estabilidad termodinámica con respecto a un complejo de Mg-GDP-Mfn1<sub>IM</sub><sup>235</sup>. El desplazamiento del Mg<sup>2+</sup> reduce la hidrólisis de GTP y permite atrapar el complejo ternario en un estado conformacional transitorio conocido como el estado de transición de GTP (*del inglés*: GTP transition state)<sup>236</sup>.

Este estado se visualiza en nuestras preparaciones con Mfn1-GUV en presencia de GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> (Figura 5.16 D). No se observan eventos de adhesión de Mfn1-GUVs,

por lo tanto, suponemos que Mfn1 reside en un estado de fusión incompetente o en reposo ya que el material se comporta como GUVs sin Mfn (Figura 5.15).

De acuerdo con la literatura disponible, nuestros datos sugieren que las proteínas Mfn1 residen como dímero *cis* (ligado a GTP) "bloqueado"proviendo de la misma membrana que se disocia tras la hidrólisis del nucleótido. La unión e hidrólisis de GTP solo procede tras la formación del dímero de Mfn1<sub>IM</sub>, donde el estado de transición de GTP se produce a través de la presencia de iones de sodio o potasio en su sitio catalítico<sup>131</sup>. La dimerización de Mfn1 esta principalmente mediada a través de grupos hidrófobo y puentes salinos dentro de la interfaz de dominio GTPasa a través de la unión de nucleótidos. Por lo tanto, si la hidrólisis de GTP desencadena entre otros procesos la fisión y fusión mitocondrial, se debería controlar al actividad GTPasica para que no se desperdicia GTP mediante hidrólisis continua<sup>237</sup>.

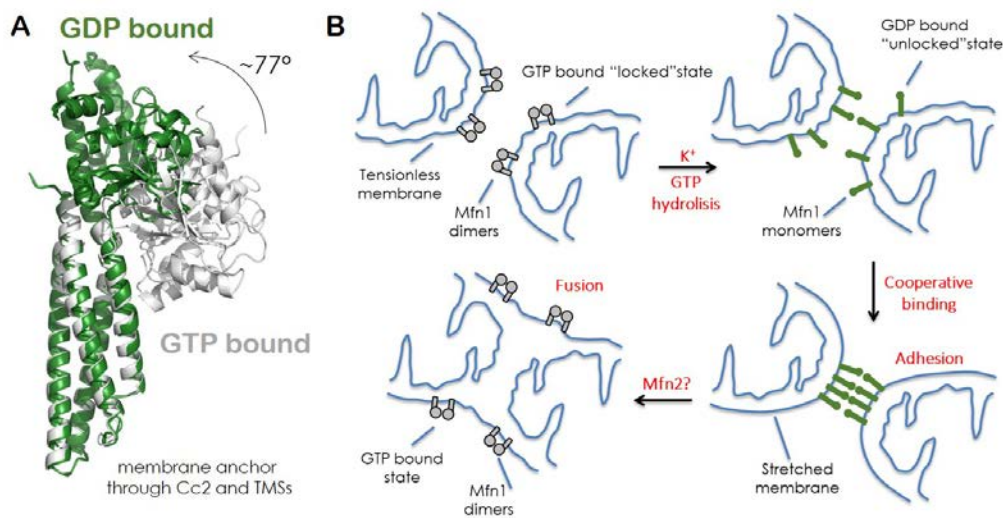


Figura 6.1: **Modelo de trabajo para el papel de Mfn1 en la fusión de membranas mitocondriales externas.** **A)** Estructura cristalina de la construcción MFN1 (sin Cc2 y dominios transmembrana; pdb 5GOE (verde; <sup>14,101</sup>) y pdb 5YEW (gris; <sup>14</sup>). El cambio conformacional del dominio de GTPasa con respecto al primer dominio de bobina en espiral Cc1 se indica con una flecha. **B)** Un posible escenario para la fusión de la membrana mitocondrial.

Tras la hidrólisis de GTP, los dominios G de Mfn1 muestra una rotación de  $\sim 77^\circ$  ligado a un cambio conformacional en el dominio HR1 (Figura 6.1 A). La rotación del dominio G interrumpe la interacción dimérica *cis* y convierte Mfn1 en forma monomérica que mantiene unida el nucleótido en forma de GDP. Este cambio conformacional también se interpretó como el golpe de fuerza (*del inglés: power stroke*) necesario para la fusión de membrana<sup>14,101</sup>. Los monómeros no permiten la formación de Mfn1 dímeros *cis* debido a un cambio de su geometría que tiene como resultado el desplazamiento del interfaz de interacción. La presencia de cationes monovalentes y GTP modula la interfaz de unión de este complejo dimérico<sup>14</sup>. Estos monómeros ahora pueden interactuar en *trans* con otras proteínas Mfn1:GDP extendidas presentes en membranas adyacentes (Figura 6.1 B; véase en el sentido de las agujas del reloj desde la parte superior izquierda).

Nuestros datos, muestran que la adhesión de membranas se produce non solo en presencia de GTP pero también en presencia de GDP (Figura 5.16 C). Esto nos indica que la hidrólisis del nucleótido por Mfn1 es fundamental para la adhesión de

las membranas. En ningún caso observamos la fusión de las membranas, por lo tanto, sugerimos que la fusión completa de la membrana requiere factores adicionales como la presencia de la proteína Mfn2. La formación y la estequiometría de los complejos de proteínas heterotípicas (Mfn1/Mfn2) puede ser importante para controlar la cinética de fusión mitocondrial<sup>110</sup>, una característica que parece conservarse para otros miembros de la familia de la dinamina<sup>238</sup> como se observa para la atlastina (ALT), una proteína de membrana involucrada en la fusión del retículo endoplásmico (ER)<sup>120,135</sup>. La presencia de GTP induce un dímero ALT relativamente débil que se ve reforzado por el  $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$ <sup>239</sup>.

Según sus secuencias y predicciones estructurales Mfn1 y Mfn2 son muy similares, pero *in vitro* se ha demostrado que las proteínas purificadas difieren en sus actividades GTPasicas durante la fusión. Mfn2 exhibió una mayor afinidad de unión por GTP que Mfn1, pero Mfn1 exhibió una mayor actividad GTPasica<sup>102</sup>. Esta diferencia podría ser parte de una regulación global. El momento exacto de la hidrólisis del GTP podría ser activados por la disponibilidad de iones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , presentes en el sitio de unión a nucleótidos dentro del dominio-G de Mfn1<sup>101,123</sup>. Recientemente, una región dentro de la secuencia proteica de Mfn1, localizado cerca del dominio-G y que se extiende hasta el dominio HR1, nombrado MISR (MISR; *del inglés*: mitofusin isoform-specific region) o región específica de isoforma de mitofusina fue identificado<sup>240</sup>. El intercambio de esta región entre Mfn1 y Mfn2 resalta su importancia y muestra que MISR contribuye al autoensamblaje de Mfn1 dirigido GTP. Probablemente, MISR puede tener un papel importante en la regulación de la actividad fusogénica de Mfn1 en la interacción consigo misma o conjunto con Mfn2<sup>240</sup>. En BDLP, una DLP bacteriana, la región homóloga a MISR está definida como la “bisagra” 1.11 que responsable de mediar un cambio conformacional y transformar la proteína de un estado abierto a un estado cerrado<sup>128,129</sup>.

## El Modelo de Cooperatividad

La afinidad de interacción y la fuerza de adhesión entre membranas están determinadas principalmente por la distancia entre las membranas adyacentes que se ve alterada por ondulaciones de la membrana causado por fluctuaciones térmicas, con una amplitudes hasta 100 nm, relacionado con el movimiento browniano de las moléculas (Figura 6.2 arriba). La formación de dímeros de Mfn1 es estadísticamente más fácil dentro de la misma membrana (*cis*) que en las membranas adyacentes (*trans*). Tras la formación de dímeros de Mfn *trans*, las amplitudes de las fluctuaciones de la membrana disminuyen y una membrana más rígida facilita la formación de dímeros Mfn *trans* adicionales (Figura 6.2 abajo).

Nosotros observamos que la adhesión de las Mfn1-GUVs y las fuerzas de adhesión se correlacionan con la disponibilidad y la formación cooperativa de dímeros de Mfn1 *trans* en el interfaz de adhesión<sup>201</sup> (Figura 5.22). Con una concentración de proteína baja, las ondulaciones de la membrana evitan la adhesión de la membrana (Figura 6.2 arriba), mientras que una concentración de proteína alta conduce a una unión adhesión cooperativa entre las dos bicapas lipídica (Figura 5.22 y 6.2 abajo). Imágenes de criomicroscopía electrónica de mitocondrias aisladas sugieren que Fzo1p, el homólogo de Mfn en levadura, es responsable del anclaje y la adhesión de mitocondrias adyacentes. Se cree que Fzo1p puede llevar las funciones de ambas proteínas Mfn1 y Mfn2<sup>106</sup>. Una interacción de proteína-proteína *trans* inicialmente débil se fortalece de manera cooperativa y conduce finalmente hacia una fusión de

membrana en el borde de la zona de membrana adherida en lugar y entre los dímeros de *trans* Fzo1p<sup>118</sup>.

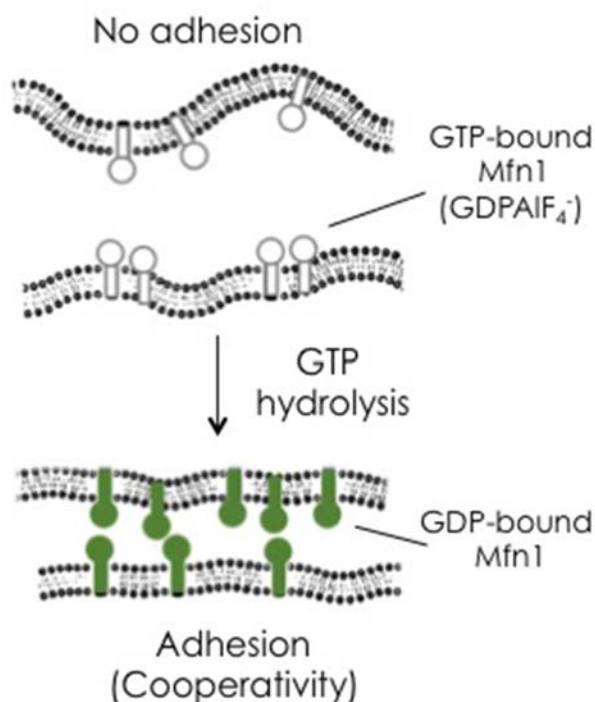


Figura 6.2: Esquema del mecanismo de la cooperatividad de las proteínas Mfn1 en Mfn1-GUVs. **Arriba)** A baja concentraciones de proteína expuesto a la superficie de las Mfn1-GUVs las ondulaciones repulsivas de la membrana evitan la adhesión de la membrana. **Abajo)** Una alta concentraciones de proteína expuesto a la superficie de las Mfn1-GUVs conduce a una unión cooperativa de las contrapartidas de la bicapa lipídica. Los datos se ajustaron a la ecuación 4.8

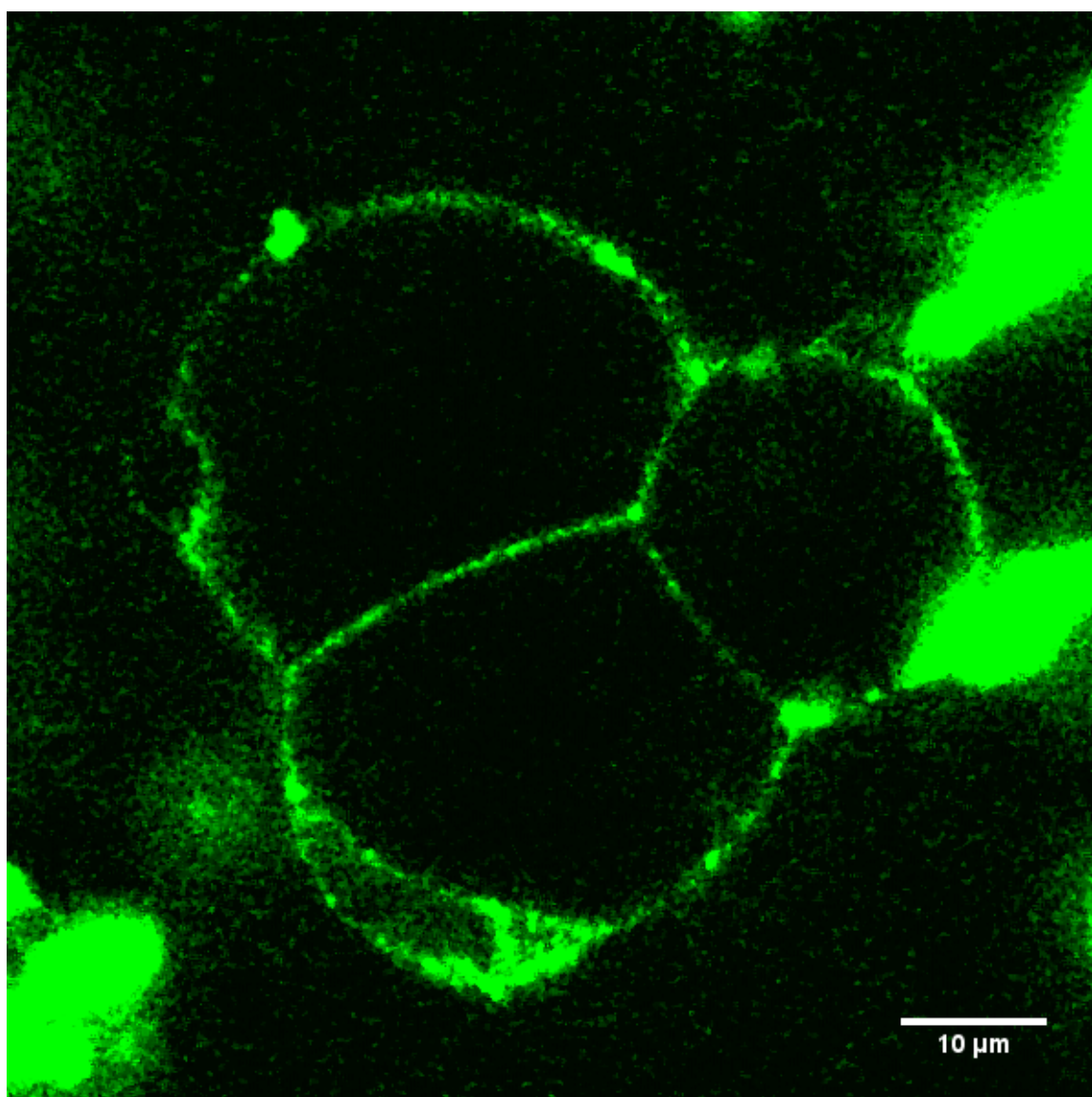
En lugar de una fusión de membranas promovida por la presencia de una proteína fusogénica, la fusión de la membrana puede estar iniciada por la curvatura local de la membrana, como descrito para la fusión de vesículas sinápticas y para la fusión de célula a célula<sup>85,241</sup>. Ya que el espacio entre las MEM acopladas (aproximadamente 2 nm) es demasiado pequeño para acomodar las proteínas de MFN1<sup>118</sup>, estas proteínas pueden acumularse en el borde del sitio de adhesión, lo que resulta en un efecto de aglomeración de proteínas que posiblemente genere una deformación local en las MEM para facilitar la fusión<sup>242,243</sup>. En nuestros experimentos, además de la adhesión Mfn1-GUVs, observamos casos únicos de mezcla de lípidos. Estos casos no fueron estadísticamente significativos para confirmar el intercambio de lípidos entre GUV adheridos (Figura 5.18 y 5.19). La ausencia de intercambio de lípidos indica la falta de estructuras de hemi-fusión de lípidos, un proceso que es clave para la fusión de membrana<sup>225</sup>.

La mezcla de lípidos independiente de proteínas y la posterior fusión de membranas es eficiente solo para vesículas altamente curvadas (con un diámetro de 100-200 nm<sup>113</sup>) o el resultado de la desestabilización de la membrana por la presencia de lípidos no bicapa<sup>244,245</sup> (no mostrado). Para evaluar el papel de la composición lipídica, incluimos hasta 50 mol % de DOPE<sup>246</sup> en la composición bicapa, pero no observamos ningún evento de fusión o colapso de Mfn1-GUVs que evolucionara de dos vesículas adherentes a una vesícula esférica (datos no mostrados).



## Capítulo 7

## CONCLUSIÓN



La presente tesis doctoral permite extraer conclusiones sobre la adhesión de membranas mediada por la GTPasa mitocondrial Mfn1, que se encuentra en la membrana externa de las mitocondrias. Mfn1 fue producida en bacteria y unida específicamente a la superficie de membranas de vesículas lipídicas gigantes (Mfn1-GUVs) a través un grupo histidina (en Mfn1) y lípidos-NTA (en las vesículas). Las membranas miméticas fueron utilizadas como plataforma para visualizar procesos de adhesión cuando se incubaron con diferentes nucleótidos, que producen diferentes estados conformacionales de la proteína cuya función en las etapas de la secuencia temporal de la fusión son aún desconocidas. De los resultados de este trabajo se derivan las siguientes conclusiones:

- La proteína Mfn1 humana de longitud completa (*homo sapiens* Mfn1) se produjo heterológamente en *Escherichia coli*.
- Se aislaron vesículas de membrana interna de *E. coli* (Mfn1-IMVs) que contienen la Mfn1 humana. La orientación del sitio catalítico se distribuye ~50:50 hacia ambos lados de la membrana.
- La proteína Mfn1 humana de longitud completa producida heterológamente en *E. coli* muestra capacidad de hidrolizar GTP.
- Experimentos de FRET *in vitro* muestran la existencia de un intermedio de fusión (adhesión o remodelación) entre Mfn1-IMVs en presencia de GTP pero no se observa ningún evento parecido compatible con fusión de la membrana.
- Mediante microscopía de fluorescencia confocal se demostró la acumulación específica de Mfn1 en la superficie de GUVs a través el anticuerpo Anti-MFN1-Alexa 488
- La adhesión entre Mfn1-GUVs se inició tras la incubación con GTP o GDP.
- No se observa adhesión entre Mfn1-GUVs en presencia de GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>, un compuesto no-hidrolizable que mimetiza GTP y que atrapa el proteína en un estado de transición de GTP.
- Medimos fuerza de adhesión mediada por Mfn1 de  $E_{adh} = (2.7 \pm 0.7) 10^8 \text{ J/m}^2$  en presencia de GTP y  $E_{adh} = (2.7 \pm 0.5) 10^8 \text{ J/m}^2$  en presencia de GDP
- La adhesión se produce de forma cooperativa.

# Bibliografía

- [1] Z. Wang and M. Wu. Phylogenomic reconstruction indicates mitochondrial ancestor was an energy parasite. *Plos One*, 9(10):11, 2014.
- [2] T. Cavalier-Smith. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev*, 57(4):953–94, 1993.
- [3] M. M. NASS and S. NASS. Intramitochondrial fibers with dna characteristics. i. fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol*, 19:593–611, 1963.
- [4] L. Ernster and G. Schatz. Mitochondria: a historical review. *The Journal of Cell Biology*, 91(3):227–255, 1981.
- [5] John O. Holloszy. Regulation of mitochondrial biogenesis and glut4 expression by exercise. *Comprehensive Physiology*, 2011.
- [6] Sang-Bing Ong and Derek J. Hausenloy. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 88(1):16–29, 2010.
- [7] J. R. Friedman, L. L. Lackner, M. West, J. R. DiBenedetto, J. Nunnari, and G. K. Voeltz. Er tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 334(6054):358–62, 2011.
- [8] R. Ramachandran. Mitochondrial dynamics: The dynamin superfamily and execution by collusion. *Semin Cell Dev Biol*, 76:201–212, 2018.
- [9] X. Liu, Y. Zhang, M. Ni, H. Cao, R. A. J. Signer, D. Li, M. Li, Z. Gu, Z. Hu, K. E. Dickerson, S. E. Weinberg, N. S. Chandel, R. J. DeBerardinis, F. Zhou, Z. Shao, and J. Xu. Regulation of mitochondrial biogenesis in erythropoiesis by mtorc1-mediated protein translation. *Nat Cell Biol*, 19(6):626–638, 2017.
- [10] Michael T. Ryan and Nicholas J. Hoogenraad. Mitochondrial-nuclear communications. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1):701–722, 2007.
- [11] Nahuel Zamponi, Emiliano Zamponi, Sergio A. Cannas, Orlando V. Billoni, Pablo R. Helguera, and Dante R. Chialvo. Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. *Scientific Reports*, 8(1):363, 2018.
- [12] H. Chen and D. C. Chan. Physiological functions of mitochondrial fusion. *Mitochondrial Research in Translational Medicine*, 1201:21–25, 2010.
- [13] C. A. Galloway, H. Lee, and Y. Yoon. Mitochondrial morphology-emerging role in bioenergetics. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(12):2218–2228, 2012.

- [14] L. M. Yan, Y. B. Qi, X. F. Huang, C. T. Yu, L. Lan, X. Y. Guo, Z. H. Rao, J. J. Hu, and Z. Y. Lou. Structural basis for gtp hydrolysis and conformational change of mfn1 in mediating membrane fusion. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(3):233–+, 2018.
- [15] George E. Palade. The fine structure of mitochondria. *The Anatomical Record*, 114(3):427–451, 1952.
- [16] Immo E. Scheffler. *Mitochondria*. Wiley-Liss, New York, 1999.
- [17] D. R. Richardson, D. J. Lane, E. M. Becker, M. L. Huang, M. Whitnall, Y. Sur-yo Rahmanto, A. D. Sheftel, and P. Ponka. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(24):10775–82, 2010.
- [18] Chunxin Wang and Richard J. Youle. The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics*, 43(1):95–118, 2009.
- [19] I. Scott. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion*, 10(4):316–20, 2010.
- [20] Inmaculada Martínez-Reyes and Navdeep S. Chandel. Mitochondrial tca cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11(1):102, 2020.
- [21] Edmund R. S. Kunji, Antoniya Aleksandrova, Martin S. King, Homa Majd, Valerie L. Ashton, Elizabeth Cerson, Roger Springett, Mikhail Kibalchenko, Sotiria Tavoulari, Paul G. Crichton, and Jonathan J. Ruprecht. The transport mechanism of the mitochondrial adp/atp carrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(10):2379–2393, 2016.
- [22] Nigel Turner. *Mitochondrial Metabolism and Insulin Action*. InTech, 2013.
- [23] Peter Mitchell. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784):144–148, 1961.
- [24] Peter Mitchell and Jennifer Moyle. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, 213(5072):137–139, 1967.
- [25] G. Lenaz and M. L. Genova. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal*, 12(8):961–1008, 2010.
- [26] R. Fato, M. Battino, M. Degli Esposti, G. Parenti Castelli, and G. Lenaz. Determination of partition and lateral diffusion coefficients of ubiquinones by fluorescence quenching of n-(9-anthroyloxy)stearic acids in phospholipid vesicles and mitochondrial membranes. *Biochemistry*, 25(11):3378–90, 1986.
- [27] C. R. Hackenbrock, B. Chazotte, and S. S. Gupte. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*, 18(5):331–68, 1986.

- 
- [28] A. Kroger and M. Klingenberg. The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain. *Eur J Biochem*, 34(2):358–68, 1973.
- [29] B. Chance and G. R. Williams. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature*, 176(4475):250–4, 1955.
- [30] J. S. Sousa, E. D’Imprima, and J. Vonck. Mitochondrial respiratory chain complexes. *Subcell Biochem*, 87:167–227, 2018.
- [31] R. Guo, J. Gu, S. Zong, M. Wu, and M. Yang. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J*, 41(1):9–20, 2018.
- [32] A. Signes and E. Fernandez-Vizarra. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes i-v and supercomplexes. *Essays Biochem*, 62(3):255–270, 2018.
- [33] J. A. Letts and L. A. Sazanov. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol*, 24(10):800–808, 2017.
- [34] I. Wittig and H. Schägger. Supramolecular organization of atp synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1787(6):672–80, 2009.
- [35] I. Ramirez-Camacho, O. Flores-Herrera, and C. Zazueta. The relevance of the supramolecular arrangements of the respiratory chain complexes in human diseases and aging. *Mitochondrion*, 47:266–272, 2019.
- [36] M. L. Genova and G. Lenaz. A critical appraisal of the role of respiratory supercomplexes in mitochondria. *Biol Chem*, 394(5):631–9, 2013.
- [37] E. J. Boekema and H. P. Braun. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem*, 282(1):1–4, 2007.
- [38] R. Acin-Perez, P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos, and J. A. Enriquez. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*, 32(4):529–39, 2008.
- [39] H. Eubel, L. Jansch, and H. P. Braun. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. supercomplexes and a unique composition of complex ii. *Plant Physiol*, 133(1):274–86, 2003.
- [40] I. Arnold, K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart, and H. Schägger. Yeast mitochondrial f1f0-atp synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo j*, 17(24):7170–8, 1998.
- [41] H. Schägger and K. Pfeiffer. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo j*, 19(8):1777–83, 2000.
- [42] F. Minauro-Sanmiguel, S. Wilkens, and J. J. García. Structure of dimeric mitochondrial atp synthase: novel f0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35):12356–8, 2005.
-

- [43] Sergio J. Couch-Cardel, Salvador Uribe-Carvajal, Stephan Wilkens, and Jose J. Garcia-Trejo. Structure of dimeric flfo-atp synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 2010.
- [44] Werner Kühlbrandt. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 13, 2015.
- [45] N. Hirokawa and R. Takemura. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*, 6(3):201–14, 2005.
- [46] B. A. Scalettar, J. R. Abney, and C. R. Hackenbrock. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(18):8057–61, 1991.
- [47] M. Germain, J. P. Mathai, H. M. McBride, and G. C. Shore. Endoplasmic reticulum bik initiates drp1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J*, 24(8):1546–56, 2005.
- [48] R Ramachandran and SL Schmid. The dynamin superfamily. *Current Biology*, 28(8):R411–R416, 2018.
- [49] Nahuel Zamponi, Emiliano Zamponi, Sergio A. Cannas, Orlando V. Billoni, Pablo R. Helguera, and Dante R. Chialvo. Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. *Scientific Reports*, 8(1):363, 2018.
- [50] L. L. Xie, F. Shi, Z. Tan, Y. Li, A. M. Bode, and Y. Cao. Mitochondrial network structure homeostasis and cell death. *Cancer Sci*, 109(12):3686–3694, 2018.
- [51] S. Martens and H. T. McMahon. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7):543–56, 2008.
- [52] N. Ishihara, H. Otera, T. Oka, and K. Mihara. Regulation and physiologic functions of gtpases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxid Redox Signal*, 19(4):389–99, 2013.
- [53] Stephen L. Archer. Mitochondrial dynamics — mitochondrial fission and fusion in human diseases. *New England Journal of Medicine*, 369(23):2236–2251, 2013.
- [54] N. Zemirli, E. Morel, and D. Molino. Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *Int J Mol Sci*, 19(2), 2018.
- [55] M. Kompare and W. B. Rizzo. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol*, 15(3):140–9, 2008.
- [56] L. R. Gray, S. C. Tompkins, and E. B. Taylor. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci*, 71(14):2577–604, 2014.
- [57] Paul de Laat, Richard Rodenburg, and Jan Smeitink. *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Disorders*, pages 337–359. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014.

- 
- [58] A. Ohtake, K. Murayama, M. Mori, H. Harashima, T. Yamazaki, S. Tamaru, Y. Yamashita, Y. Kishita, Y. Nakachi, M. Kohda, Y. Tokuzawa, Y. Mizuno, Y. Moriyama, H. Kato, and Y. Okazaki. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: Exome sequencing for disease gene identification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(4):1355–1359, 2014.
- [59] M. Filosto, G. Tomelleri, P. Tonin, M. Scarpelli, G. Vattei, N. Rizzuto, A. Padovani, and A. Simonati. Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci Rep*, 27(1-3):23–30, 2007.
- [60] J. Kuzmicic, V. Parra, H. E. Verdejo, C. López-Crisosto, M. Chiong, L. García, M. D. Jensen, D. A. Bernlohr, P. F. Castro, and S. Lavandero. Trimetazidine prevents palmitate-induced mitochondrial fission and dysfunction in cultured cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol*, 91(3):323–36, 2014.
- [61] J. Kuzmicic, A. Del Campo, C. López-Crisosto, P. E. Morales, C. Pennanen, R. Bravo-Sagua, J. Hechenleitner, R. Zepeda, P. F. Castro, H. E. Verdejo, V. Parra, M. Chiong, and S. Lavandero. [mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure]. *Rev Esp Cardiol*, 64(10):916–23, 2011.
- [62] David C. Chan. Fusion and fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annual Review of Genetics*, 46(1):265–287, 2012.
- [63] E. Bossy-Wetzel, M. J. Barsoum, A. Godzik, R. Schwarzenbacher, and S. A. Lipton. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol*, 15(6):706–16, 2003.
- [64] Amandeep Singh, Martin Wirtz, Nadeene Parker, Matthew Hogan, John Strahler, George Michailidis, Sarah Schmidt, Antonio Vidal-Puig, Sabrina Diano, Philip Andrews, Martin D. Brand, and Jeffrey Friedman. Leptin-mediated changes in hepatic mitochondrial metabolism, structure, and protein levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31):13100–13105, 2009.
- [65] D. P. Kelly and R. C. Scarpulla. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes and Development*, 18(4):357–368, 2004.
- [66] M. D. Brand, A. L. Orr, I. V. Perevoshchikova, and C. L. Quinlan. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *Br J Dermatol*, 169 Suppl 2:1–8, 2013.
- [67] D. E. Handy and J. Loscalzo. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*, 16(11):1323–67, 2012.
- [68] F. J. Larsen, T. A. Schiffer, E. Weitzberg, and J. O. Lundberg. Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides. *Free Radic Biol Med*, 53(10):1919–28, 2012.
-

- [69] R. J. Mailloux, X. Jin, and W. G. Willmore. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biol*, 2:123–39, 2014.
- [70] S. Züchner, I. V. Mersiyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E. L. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, Y. Parman, O. Evgrafov, P. D. Jonghe, Y. Takahashi, S. Tsuji, M. A. Pericak-Vance, A. Quatrone, E. Battaloglu, A. V. Polyakov, V. Timmerman, J. M. Schröder, J. M. Vance, and E. Battaloglu. Mutations in the mitochondrial gtpase mitofusin 2 cause charcot-marie-tooth neuropathy type 2a. *Nat Genet*, 36(5):449–51, 2004.
- [71] Hsiuchen Chen and David C. Chan. Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics*, 18(R2):R169–R176, 2009.
- [72] J. Moslehi, R. A. DePinho, and E. Sahin. Telomeres and mitochondria in the aging heart. *Circ Res*, 110(9):1226–37, 2012.
- [73] E. Sahin, S. Colla, M. Liesa, J. Moslehi, F. L. Müller, M. Guo, M. Cooper, D. Kotton, A. J. Fabian, C. Walkey, R. S. Maser, G. Tonon, F. Foerster, R. Xiong, Y. A. Wang, S. A. Shukla, M. Jaskelioff, E. S. Martin, T. P. Hefferman, A. Protopopov, E. Ivanova, J. E. Mahoney, M. Kost-Alimova, S. R. Perry, R. Bronson, R. Liao, R. Mulligan, O. S. Shirihai, L. Chin, and R. A. DePinho. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*, 470(7334):359–65, 2011.
- [74] E. Sahin and R. A. DePinho. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(6):397–404, 2012.
- [75] G. W. Dorn, R. B. Vega, and D. P. Kelly. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes and Development*, 29(19):1981–1991, 2015.
- [76] J. Qi, F. Wang, P. Yang, X. Wang, R. Xu, J. Chen, Y. Yuan, Z. Lu, and J. Duan. Mitochondrial fission is required for angiotensin ii-induced cardiomyocyte apoptosis mediated by a sirt1-p53 signaling pathway. *Front Pharmacol*, 9:176, 2018.
- [77] D. C. Chan. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease. *Annu Rev Pathol*, 15:235–259, 2020.
- [78] T. Yu, J. L. Robotham, and Y. Yoon. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8):2653–8, 2006.
- [79] G. Twig, A. Elorza, A. J. Molina, H. Mohamed, J. D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S. E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B. F. Py, J. Yuan, J. T. Deeney, B. E. Corkey, and O. S. Shirihai. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*, 27(2):433–46, 2008.

- 
- [80] Y. J. Lee, S. Y. Jeong, M. Karbowski, C. L. Smith, and R. J. Youle. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators fis1, drp1, and opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*, 15(11):5001–11, 2004.
- [81] E. Smirnova, D. L. Shurland, S. N. Ryazantsev, and A. M. van der Bliek. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol*, 143(2):351–8, 1998.
- [82] Katherine Labbé, Andrew Murley, and Jodi Nunnari. Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1):357–391, 2014.
- [83] F. Legros, A. Lombès, P. Frachon, and M. Rojo. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*, 13(12):4343–54, 2002.
- [84] C. Delettre, G. Lenaers, J. M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquelles, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, and C. P. Hamel. Nuclear gene opa1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, 26(2):207–10, 2000.
- [85] G. J. Praefcke and H. T. McMahon. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2):133–47, 2004.
- [86] K. Sousounis, C. E. Haney, J. Cao, B. Sunchu, and P. A. Tsonis. Conservation of the three-dimensional structure in non-homologous or unrelated proteins. *Hum Genomics*, 6:10, 2012.
- [87] M. Bramkamp. Structure and function of bacterial dynamin-like proteins. *Biol Chem*, 393(11):1203–14, 2012.
- [88] O. Daumke and G. J. K. Praefcke. Mechanisms of gtp hydrolysis and conformational transitions in the dynamin superfamily. *Biopolymers*, 109(2), 2018.
- [89] P. P. Zhu, A. Patterson, B. Lavoie, J. Stadler, M. Shoeb, R. Patel, and C. Blackstone. Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3a (spg3a) protein atlastin. *J Biol Chem*, 278(49):49063–71, 2003.
- [90] M. Aebi, J. Fah, N. Hurt, C. E. Samuel, D. Thomis, L. Bazzigher, J. Pavlovic, O. Haller, and P. Staeheli. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human mx proteins. *Mol Cell Biol*, 9(11):5062–72, 1989.
- [91] R. Kalia, R. Y. Wang, A. Yusuf, P. V. Thomas, D. A. Agard, J. M. Shaw, and A. Frost. Structural basis of mitochondrial receptor binding and constriction by drp1. *Nature*, 558(7710):401–405, 2018.
- [92] E. Klinglmayr, J. Wenger, S. Mayr, E. Bossy-Wetzler, and S. Puehringer. Purification, crystallization and x-ray diffraction analysis of human dynamin-related protein 1 gtpase-ged fusion protein. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 68(Pt 10):1217–21, 2012.
-

- [93] Katja Faelber, Song Gao, Martin Held, York Posor, Volker Haucke, Frank Noé, and Oliver Daumke. *Chapter Fifteen - Oligomerization of Dynamin Superfamily Proteins in Health and Disease*, volume 117, pages 411–443. Academic Press, 2013.
- [94] H. Chen, S. A. Detmer, A. J. Ewald, E. E. Griffin, S. E. Fraser, and D. C. Chan. Mitofusins mfn1 and mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160(2):189–200, 2003.
- [95] S. Meeusen, R. DeVay, J. Block, A. Cassidy-Stone, S. Wayson, J. M. McCaffery, and J. Nunnari. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related gtpase mgm1. *Cell*, 127(2):383–95, 2006.
- [96] Aurélien Olichon, Laurent J Emorine, Eric Descoins, Laetitia Pelloquin, Laetitia Brichese, Nicole Gas, Emmanuelle Guillou, Cécile Delettre, Annie Valette, Christian P Hamel, Bernard Ducommun, Guy Lenaers, and Pascale Belenguer. The human dynamin-related protein opa1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters*, 523(1-3):171–176, 2002.
- [97] S. Meeusen, J. M. McCaffery, and J. Nunnari. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*, 305(5691):1747–52, 2004.
- [98] Florence Malka, Olwenn Guillery, Carmen Cifuentes-Diaz, Emmanuelle Guillou, Pascale Belenguer, Anne Lombès, and Manuel Rojo. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO reports*, 6(9):853–859, 2005.
- [99] H. Chen, A. Chomyn, and D. C. Chan. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, 280(28):26185–92, 2005.
- [100] S. Pich, D. Bach, P. Briones, M. Liesa, M. Camps, X. Testar, M. Palacin, and A. Zorzano. The charcot-marie-tooth type 2a gene product, mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of oxphos system. *Hum Mol Genet*, 14(11):1405–15, 2005.
- [101] Y. L. Cao, S. X. Meng, Y. Chen, J. X. Feng, D. D. Gu, B. Yu, Y. J. Li, J. Y. Yang, S. Liao, D. C. Chan, and S. Gao. Mfn1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature*, 542(7641):372–+, 2017.
- [102] N. Ishihara, Y. Eura, and K. Mihara. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via gtpase activity. *J Cell Sci*, 117(Pt 26):6535–46, 2004.
- [103] S. Hoppins. The regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 29:46–52, 2014.
- [104] S. Hoppins, J. Horner, C. Song, J. M. McCaffery, and J. Nunnari. Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol*, 184(4):569–81, 2009.

- 
- [105] S. Hoppins, L. Lackner, and J. Nunnari. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76:751–80, 2007.
- [106] M. Rojo, F. Legros, D. Chateau, and A. Lombes. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane gtpase fzo. *J Cell Sci*, 115(Pt 8):1663–74, 2002.
- [107] A. Santel and M. T. Fuller. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, 114(Pt 5):867–74, 2001.
- [108] A. Santel, S. Frank, B. Gaume, M. Herrler, R. J. Youle, and M. T. Fuller. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci*, 116(Pt 13):2763–74, 2003.
- [109] S. Mattie, J. Riemer, J. G. Wideman, and H. M. McBride. A new mitofusin topology places the redox-regulated c terminus in the mitochondrial intermembrane space. *J Cell Biol*, 217(2):507–515, 2018.
- [110] T. Koshiba, S. A. Detmer, J. T. Kaiser, H. Chen, J. M. McCaffery, and D. C. Chan. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305(5685):858–62, 2004.
- [111] F. Anton, J. M. Fres, A. Schauss, B. Pinson, G. J. Praefcke, T. Langer, and M. Escobar-Henriques. Ugo1 and mdm30 act sequentially during fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion. *J Cell Sci*, 124(Pt 7):1126–35, 2011.
- [112] M. M. Cohen and D. Tareste. Recent insights into the structure and function of mitofusins in mitochondrial fusion. *F1000Res*, 7, 2018.
- [113] F. Daste, C. Sauvanet, A. Bavdek, J. Baye, F. Pierre, R. Le Borgne, C. David, M. Rojo, P. Fuchs, and D. Tareste. The heptad repeat domain 1 of mitofusin has membrane destabilization function in mitochondrial fusion. *EMBO Rep*, 19(6), 2018.
- [114] M. M. Cohen, E. A. Amiott, A. R. Day, G. P. Leboucher, E. N. Pryce, M. H. Glickman, J. M. McCaffery, J. M. Shaw, and A. M. Weissman. Sequential requirements for the gtpase domain of the mitofusin fzo1 and the ubiquitin ligase scfmdm30 in mitochondrial outer membrane fusion. *J Cell Sci*, 124(Pt 9):1403–10, 2011.
- [115] M. Escobar-Henriques and F. Anton. Mechanistic perspective of mitochondrial fusion: tubulation vs. fragmentation. *Biochim Biophys Acta*, 1833(1):162–75, 2013.
- [116] M. Escobar-Henriques, B. Westermann, and T. Langer. Regulation of mitochondrial fusion by the f-box protein mdm30 involves proteasome-independent turnover of fzo1. *J Cell Biol*, 173(5):645–50, 2006.
- [117] T. Shutt, M. Geoffrion, R. Milne, and H. M. McBride. The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Rep*, 13(10):909–15, 2012.
-

- [118] T. Brandt, L. Cavellini, W. Kühlbrandt, and M. M. Cohen. A mitofusin-dependent docking ring complex triggers mitochondrial fusion in vitro. *Elife*, 5, 2016.
- [119] B. Antonny, C. Burd, P. De Camilli, E. Chen, O. Daumke, K. Faelber, M. Ford, V. A. Frolov, A. Frost, J. E. Hinshaw, T. Kirchhausen, M. M. Kozlov, M. Lenz, H. H. Low, H. McMahon, C. Merrifield, T. D. Pollard, P. J. Robinson, A. Roux, and S. Schmid. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J*, 35(21):2270–2284, 2016.
- [120] L. J. Byrnes and H. Sodermann. Structural basis for the nucleotide-dependent dimerization of the large g protein atlastin-1/spg3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(6):2216–21, 2011.
- [121] J. A. McNew, H. Sodermann, T. Lee, M. Stern, and F. Brandizzi. Gtp-dependent membrane fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 29:529–50, 2013.
- [122] M. A. Betancourt-Solis, T. Desai, and J. A. McNew. The atlastin membrane anchor forms an intramembrane hairpin that does not span the phospholipid bilayer. *J Biol Chem*, 293(48):18514–18524, 2018.
- [123] Y. Qi, L. Yan, C. Yu, X. Guo, X. Zhou, X. Hu, X. Huang, Z. Rao, Z. Lou, and J. Hu. Structures of human mitofusin 1 provide insight into mitochondrial tethering. *J Cell Biol*, 215(5):621–629, 2016.
- [124] Y. J. Li, Y. L. Cao, J. X. Feng, Y. Qi, S. Meng, J. F. Yang, Y. T. Zhong, S. Kang, X. Chen, L. Lan, L. Luo, B. Yu, S. Chen, D. C. Chan, J. Hu, and S. Gao. Structural insights of human mitofusin-2 into mitochondrial fusion and cmt2a onset. *Nat Commun*, 10(1):4914, 2019.
- [125] A. Franco, R. N. Kitsis, J. A. Fleischer, E. Gavathiotis, O. S. Kornfeld, G. Gong, N. Biris, A. Benz, N. Qvit, S. K. Donnelly, Y. Chen, S. Mennerick, L. Hodgson, D. Mochly-Rosen, and G. W. II Dorn. Correcting mitochondrial fusion by manipulating mitofusin conformations. *Nature*, 540(7631):74–79, 2016.
- [126] X. Huang, X. Zhou, X. Hu, A. S. Joshi, X. Guo, Y. Zhu, Q. Chen, W. A. Prinz, and J. Hu. Sequences flanking the transmembrane segments facilitate mitochondrial localization and membrane fusion by mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(46):E9863–E9872, 2017.
- [127] E. F. Pai, U. Krengel, G. A. Petsko, R. S. Goody, W. Kabsch, and A. Wittinghofer. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of h-ras p21 at 1.35 a resolution: implications for the mechanism of gtp hydrolysis. *Embo j*, 9(8):2351–9, 1990.
- [128] H. H. Low, C. Sachse, L. A. Amos, and J. Lowe. Structure of a bacterial dynamin-like protein lipid tube provides a mechanism for assembly and membrane curving. *Cell*, 139(7):1342–52, 2009.
- [129] Harry H. Low and Jan Löwe. A bacterial dynamin-like protein. *Nature*, 444:766, 2006.

- 
- [130] Klaus Scheffzek, Mohammad Reza Ahmadian, Wolfgang Kabsch, Lisa Wiesmüller, Alfred Lautwein, Frank Schmitz, and Alfred Wittinghofer. The ras-rasgap complex: Structural basis for gtpase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science*, 277(5324):333–339, 1997.
- [131] J. S. Chappie, S. Acharya, M. Leonard, S. L. Schmid, and F. Dyda. G domain dimerization controls dynamin’s assembly-stimulated gtpase activity. *Nature*, 465(7297):435–40, 2010.
- [132] L. J. Byrnes, A. Singh, K. Szeto, N. M. Benveniste, J. P. O’Donnell, W. R. Zipfel, and H. Sondermann. Structural basis for conformational switching and gtp loading of the large g protein atlastin. *Embo j*, 32(3):369–84, 2013.
- [133] M. L. Rennie, S. A. McKelvie, E. M. Bulloch, and R. L. Kingston. Transient dimerization of human mxa promotes gtp hydrolysis, resulting in a mechanical power stroke. *Structure*, 22(10):1433–45, 2014.
- [134] L. Yan, S. Sun, W. Wang, J. Shi, X. Hu, S. Wang, D. Su, Z. Rao, J. Hu, and Z. Lou. Structures of the yeast dynamin-like gtpase sey1p provide insight into homotypic er fusion. *J Cell Biol*, 210(6):961–72, 2015.
- [135] X. Bian, R. W. Klemm, T. Y. Liu, M. Zhang, S. Sun, X. Sui, X. Liu, T. A. Rapoport, and J. Hu. Structures of the atlastin gtpase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(10):3976–81, 2011.
- [136] F. Wu, X. Hu, X. Bian, X. Liu, and J. Hu. Comparison of human and drosophila atlastin gtpases. *Protein Cell*, 6(2):139–46, 2015.
- [137] Ypd media. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(9):pdb.rec12315, 2010.
- [138] S. J. Singer. A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure. *Ann N Y Acad Sci*, 195:16–23, 1972.
- [139] David L Nelson and Michael M Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth edition, 2004.
- [140] G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2):112–24, 2008.
- [141] P. R. Cullis and B. de Kruijff. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim.Biophys.Acta*, 559(4):399, 1979.
- [142] Ryugo Tero, Kohei Fukumoto, Toshinori Motegi, Miyu Yoshida, Michio Niwano, and Ayumi Hirano-Iwata. Formation of cell membrane component domains in artificial lipid bilayer. *Scientific Reports*, 7(1):17905, 2017.
- [143] Ronald N. McElhaney and Mark E. Tourtellotte. The relationship between fatty acid structure and the positional distribution of esterified fatty acids in phosphatidyl glycerol from mycoplasma laidlawii b. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 202(1):120–128, 1970.
-

- [144] P. Rock, M. Allietta, Jr. Young, W. W., T. E. Thompson, and T. W. Tillack. Organization of glycosphingolipids in phosphatidylcholine bilayers: use of antibody molecules and fab fragments as morphologic markers. *Biochemistry*, 29(36):8484–90, 1990.
- [145] Bodil Ramstedt and J. Peter Slotte. Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Letters*, 531(1):33–37, 2002.
- [146] P. J. Brennan, P. F. Griffin, D. M. Lösel, and D. Tyrrell. The lipids of fungi. *Prog Chem Fats Other Lipids*, 14 Pt 2(0):49–89, 1974.
- [147] J. Henriksen, A. C. Rowat, E. Brief, Y. W. Hsueh, J. L. Thewalt, M. J. Zuckermann, and J. H. Ipsen. Universal behavior of membranes with sterols. *Biophys J*, 90(5):1639–49, 2006.
- [148] Joshua Zimmerberg and Klaus Gawrisch. The physical chemistry of biological membranes. *Nature Chemical Biology*, 2(11):564–567, 2006.
- [149] P. A. Janmey and P. K. J. Kinnunen. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biology*, 16(10):538–546, 2006.
- [150] X. Cheng and J. C. Smith. Biological membrane organization and cellular signaling. *Chemical Reviews*, 119(9):5849–5880, 2019.
- [151] D.L. Nelson, A.L. Lehninger, and M.M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, 2008.
- [152] R.B. Gennis. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Springer New York, 1989.
- [153] X. Lin, A. A. Gorfe, and I. Levental. Protein partitioning into ordered membrane domains: Insights from simulations. *Biophys J*, 114(8):1936–1944, 2018.
- [154] Carolyn M. Ott and Vishwanath R. Lingappa. Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict. *Journal of Cell Science*, 115(10):2003–2009, 2002.
- [155] N. F. Morales-Pennington, J. Wu, E. R. Farkas, S. L. Goh, T. M. Konyakhina, J. Y. Zheng, W. W. Webb, and G. W. Feigenson. GUV preparation and imaging: minimizing artifacts. *Biochim Biophys Acta*, 1798(7):1324–32, 2010.
- [156] R. Skrzypek, S. Iqbal, and R. Callaghan. Methods of reconstitution to investigate membrane protein function. *Methods*, 147:126–141, 2018.
- [157] W. Helfrich. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Naturforsch C*, 28(11):693–703, 1973.
- [158] G. M. El Maghraby, B. W. Barry, and A. C. Williams. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, 34(4-5):203–22, 2008.
- [159] C. Peetla, A. Stine, and V. Labhasetwar. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm*, 6(5):1264–76, 2009.

- 
- [160] L. Chernomordik, A. Chanturiya, J. Green, and J. Zimmerberg. The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition. *Biophys J*, 69(3):922–9, 1995.
- [161] L. V. Chernomordik and J. Zimmerberg. Bending membranes to the task: structural intermediates in bilayer fusion. *Curr Opin Struct Biol*, 5(4):541–7, 1995.
- [162] L. Chernomordik, M. M. Kozlov, and J. Zimmerberg. Lipids in biological membrane fusion. *J Membr Biol*, 146(1):1–14, 1995.
- [163] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–5, 1970.
- [164] J. Zimmerberg, S. S. Vogel, T. Whalley, I. Plonsky, A. Sokoloff, A. Chanturia, and L. V. Chernomordik. Intermediates in membrane fusion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 60:589–99, 1995.
- [165] A. W. Y. Leung, C. Amador, L. C. Wang, U. V. Mody, and M. B. Bally. What drives innovation: The canadian touch on liposomal therapeutics. *Pharmaceutics*, 11(3), 2019.
- [166] E. Lebègue, C. Farre, C. Jose, J. Saulnier, F. Lagarde, Y. Chevalier, C. Chaix, and N. Jaffrezic-Renault. Responsive polydiacetylene vesicles for biosensing microorganisms. *Sensors (Basel)*, 18(2), 2018.
- [167] Julian Whitelegge. Lipid modulation of membrane protein function. *Cell Chemical Biology*, 25(7):803–804, 2018.
- [168] C.R. Jacobs, H. Huang, and R.Y. Kwon. *Introduction to Cell Mechanics and Mechanobiology*. Garland Science, 2013.
- [169] D. Needham, T. J. McIntosh, and E. Evans. Thermomechanical and transition properties of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biochemistry*, 27(13):4668–4673, 1988.
- [170] W. Helfrich and R. M. Servuss. Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Nuovo Cimento D Serie*, 3:137, 1984.
- [171] K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham, and E. Evans. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys J*, 79(1):321–7, 2000.
- [172] A. Diz-Muñoz, D. A. Fletcher, and O. D. Weiner. Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends Cell Biol*, 23(2):47–53, 2013.
- [173] S. C. Tan, T. Yang, Y. Gong, and K. Liao. Rupture of plasma membrane under tension. *J Biomech*, 44(7):1361–6, 2011.
- [174] G. Espinosa, I. López-Montero, F. Monroy, and D. Langevin. Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(15):6008–6013, 2011.
-

- [175] E. A. Evans. Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests. *Biophys J*, 43(1):27–30, 1983.
- [176] E. R. Catapano, L. R. Arriaga, G. Espinosa, F. Monroy, D. Langevin, and I. López-Montero. Solid character of membrane ceramides: A surface rheology study of their mixtures with sphingomyelin. *Biophysical Journal*, 101(11):2721–2730, 2011.
- [177] I. López-Montero, E. R. Catapano, G. Espinosa, L. R. Arriaga, D. Langevin, and F. Monroy. Shear and compression rheology of langmuir monolayers of natural ceramides: Solid character and plasticity. *Langmuir*, 29(22):6634–6644, 2013.
- [178] David H. Boal. *Mechanics of the cell*. Cambridge University Press, Cambridge ; New York, 2002.
- [179] E. Sackmann. *Chapter 5 - Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles*, volume 1, pages 213–304. North-Holland, 1995.
- [180] Thomas R. Weikl. Membrane-mediated cooperativity of proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, 69(1):521–539, 2018.
- [181] R. Dimova, U. Seifert, B. Pouligny, S. Förster, and H. G. Döbereiner. Hyperviscous diblock copolymer vesicles. *The European Physical Journal E*, 7(3):241–250, 2002.
- [182] D. Gingell and J. A. Fornes. Demonstration of intermolecular forces in cell adhesion using a new electrochemical technique. *Nature*, 256(5514):210–1, 1975.
- [183] J. Steinkühler, J. Agudo-Canalejo, R. Lipowsky, and R. Dimova. Modulating vesicle adhesion by electric fields. *Biophys J*, 111(7):1454–1464, 2016.
- [184] Reinhard Lipowsky and Udo Seifert. Adhesion of vesicles and membranes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 202(1):17–25, 1991.
- [185] A. M. van der Bliek, Q. Shen, and S. Kawajiri. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(6), 2013.
- [186] K. Faelber, S. Gao, M. Held, Y. Posor, V. Haucke, F. Noé, and O. Daumke. Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 117:411–43, 2013.
- [187] N. Shai, E. Yifrach, C. W. T. van Roermund, N. Cohen, C. Bibi, L. IJlst, L. Cavellini, J. Meurisse, R. Schuster, L. Zada, M. C. Mari, F. M. Reggiori, A. L. Hughes, M. Escobar-Henriques, M. M. Cohen, H. R. Waterham, R. J. A. Wanders, M. Schuldiner, and E. Zalcvar. Systematic mapping of contact sites reveals tethers and a function for the peroxisome-mitochondria contact. *Nat Commun*, 9(1):1761, 2018.

- 
- [188] F. Bürmann, N. Ebert, S. van Baarle, and M. Bramkamp. A bacterial dynamin-like protein mediating nucleotide-independent membrane fusion. *Mol Microbiol*, 79(5):1294–304, 2011.
- [189] David Tareste and Aurélien Roux. *Common Energetic and Mechanical Features of Membrane Fusion and Fission Machineries*, book section 16, pages 421–469. Springer International Publishing, Cham, 2018.
- [190] F. Baneyx and G. Georgiou. In vivo degradation of secreted fusion proteins by the escherichia coli outer membrane protease ompT. *J.Bacteriol.*, 172(1):491, 1990.
- [191] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y., second edition edition, 1989.
- [192] G. Bertani. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, p2, and other experimental systems. *J Bacteriol*, 186(3):595–600, 2004.
- [193] G. Del Sal, C. Manfioletti G Fau Schneider, and C. Schneider. The ctab-dna precipitation method: a common mini-scale preparation of template dna from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*, 7(5):514–20, 1989.
- [194] C. van der Does, J. de Keyzer, M. van der Laan, and A. J. Driessen. Reconstitution of purified bacterial preprotein translocase in liposomes. *Methods Enzymol*, 372:86–98, 2003.
- [195] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7, 1977.
- [196] N. Chen and S. Zheng. [application research of protein test by using biuret reagent]. *Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi*, 38(6):458–60, 2014.
- [197] A. Gupta and S. L. Stockham. Negative interference of icteric serum on a bichromatic biuret total protein assay. *Vet Clin Pathol*, 43(3):422–7, 2014.
- [198] R.M. Servuss and Helfrich W. Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions. *Journal de Physique*, 50:809–827, 1989.
- [199] R. Rodriguez-Garcia, L. R. Arriaga, M. Mell, L. H. Moleiro, I. Lopez-Montero, and F. Monroy. Bimodal spectrum for the curvature fluctuations of bilayer vesicles: pure bending plus hybrid curvature-dilation modes. *Phys Rev Lett*, 102(12):128101, 2009.
- [200] M. Dembo, D. C. Torney, K. Saxman, and D. Hammer. The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*, 234:55–83, 1988.
- [201] Heinrich Krobath, Bartosz Różycki, Reinhard Lipowsky, and Thomas R. Weikl. Binding cooperativity of membrane adhesion receptors. *Soft Matter*, 5:3354–3361, 2009.
-

- [202] Jeffrey A. Nye and Jay T. Groves. Kinetic control of histidine-tagged protein surface density on supported lipid bilayers. *Langmuir*, 24:4145–9, 2008.
- [203] N. C. Stellwagen. Accurate molecular weight determinations of deoxyribonucleic acid restriction fragments on agarose gels. *Biochemistry*, 22(26):6180–5, 1983.
- [204] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy (2nd Edition)*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- [205] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7):671–5, 2012.
- [206] Miglena I. Angelova and Dimiter S. Dimitrov. Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 81(0):303–311, 1986.
- [207] Víctor G. Almendro Vedia, Paolo Natale, Su Chen, Francisco Monroy, Véronique Rosilio, and Iván López-Montero. iguvs: Preparing giant unilamellar vesicles with a smartphone and lipids easily extracted from chicken eggs. *Journal of Chemical Education*, 94(5):644–649, 2017.
- [208] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350–4, 1979.
- [209] P. Natale, T. Bruser, and A. J. Driessen. Sec- and tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1778(9):1735–56, 2008.
- [210] J. Knol, L. Veenhoff, W. J. Liang, Pj F. Henderson, G. Leblanc, and B. Poolman. Unidirectional reconstitution into detergent-destabilized liposomes of the purified lactose transport system of streptococcus thermophilus. *J. Biol. Chem.*, 271(26):15358, 1996.
- [211] P. A. Lanzetta, L. J. Alvarez, P. S. Reinach, and O. A. Candia. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.*, 100:95, 1979.
- [212] S. Rajesh, M. Overduin, and B. B. Bonev. Nmr of membrane proteins: Beyond crystals. *Adv Exp Med Biol*, 922:29–42, 2016.
- [213] R. B. Sekar and A. Periasamy. Fluorescence resonance energy transfer (fret) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*, 160(5):629–33, 2003.
- [214] J. R. Silvius and I. R. Nabi. Fluorescence-quenching and resonance energy transfer studies of lipid microdomains in model and biological membranes. *Mol Membr Biol*, 23(1):5–16, 2006.
- [215] P. Mattjus, J. G. Molotkovsky, J. M. Smaby, and R. E. Brown. A fluorescence resonance energy transfer approach for monitoring protein-mediated glycolipid transfer between vesicle membranes. *Anal Biochem*, 268(2):297–304, 1999.

- 
- [216] K. Truong and M. Ikura. The use of fret imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr Opin Struct Biol*, 11(5):573–8, 2001.
- [217] N. Puff, A. Lamazière, M. Seigneuret, G. Trugnan, and M. I. Angelova. Hdls induce raft domain vanishing in heterogeneous giant vesicles. *Chem Phys Lipids*, 133(2):195–202, 2005.
- [218] U. Seifert and R. Lipowsky. Adhesion of vesicles. *Physical Review A*, 42(8):4768–4771, 1990.
- [219] R.M. Servuss and Helfrich W. Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions. *Journal de Physique*, 50:809–827, 1989.
- [220] Y. Sun, C. C. Lee, and H. W. Huang. Adhesion and merging of lipid bilayers: a method for measuring the free energy of adhesion and hemifusion. *Biophys J*, 100(4):987–95, 2011.
- [221] J. Steinkühler, B. Rózycki, C. Alvey, R. Lipowsky, T. R. Weikl, R. Dimova, and D. E. Discher. Membrane fluctuations and acidosis regulate cooperative binding of 'marker of self' protein cd47 with the macrophage checkpoint receptor sirp $\alpha$ . *J Cell Sci*, 132(4):pii: jcs216770., 2018.
- [222] A. Boulbitch, Z. Gутtenberg, and E. Sackmann. Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophys J*, 81(5):2743–51, 2001.
- [223] A. McPherson and J. A. Gavira. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 70(Pt 1):2–20, 2014.
- [224] L. V. Chernomordik and M. M. Kozlov. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 15(7):675–83, 2008.
- [225] J. Heuvingh, F. Pincet, and S. Cribier. Hemifusion and fusion of giant vesicles induced by reduction of inter-membrane distance. *Eur Phys J E Soft Matter*, 14(3):269–76, 2004.
- [226] Ramūnas Valiokas, Goran Klenkar, Ali Tinazli, Annett Reichel, Robert Tampé, Jacob Piehler, and Bo Liedberg. Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid groups: Characterization and application. *Langmuir*, pages 4959–4967, 2008.
- [227] S. C. Kuo and D. A. Lauffenburger. Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength. *Biophys J*, 65(5):2191–200, 1993.
- [228] G. W. Dorn. Evolving concepts of mitochondrial dynamics. *Annu Rev Physiol*, 81:1–17, 2019.
- [229] J. E. Walker. The atp synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*, 41:1–16, 2013.
- [230] O. Daumke and A. Roux. Mitochondrial homeostasis: How do dimers of mitofusins mediate mitochondrial fusion? *Current Biology*, 27(9):R353–R356, 2017.
-

- [231] R. Gasper, S. Meyer, K. Gotthardt, M. Sirajuddin, and A. Wittinghofer. It takes two to tango: regulation of g proteins by dimerization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(6):423–9, 2009.
- [232] A. Hennig, R. Markwart, M. A. Esparza-Franco, G. Ladds, and I. Rubio. Ras activation revisited: role of gef and gap systems. *Biol Chem*, 396(8):831–48, 2015.
- [233] J. Bigay, P. Deterre, C. Pfister, and M. Chabre. Fluoroaluminates activate transducin-gdp by mimicking the gamma-phosphate of gtp in its binding-site. *Febs Letters*, 191(2):181–185, 1985.
- [234] Y. Jin, Jr. Molt, R. W., and G. M. Blackburn. Metal fluorides: Tools for structural and computational analysis of phosphoryl transfer enzymes. *Top Curr Chem (Cham)*, 375(2):36, 2017.
- [235] T. L. Macdonald and R. B. Martin. Aluminum ion in biological systems. *Trends Biochem Sci*, 13(1):15–9, 1988.
- [236] J. L. Miller, C. M. Hubbard, B. J. Litman, and T. L. Macdonald. Inhibition of transducin activation and guanosine triphosphatase activity by aluminum ion. *J Biol Chem*, 264(1):243–50, 1989.
- [237] B. Westermann. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(12):872–84, 2010.
- [238] E Schrepfer and L Scorrano. Mitofusins, from mitochondria to metabolism. *Molecular Cell*, 61(5):683–694, 2016.
- [239] J. Hu and T. A. Rapoport. Fusion of the endoplasmic reticulum by membrane-bound gtpases. *Semin Cell Dev Biol*, 60:105–111, 2016.
- [240] SR Sloat, BN Whitley, EA Engelhart, and S Hoppins. Identification of a mitofusin specificity region that confers unique activities to mfn1 and mfn2. *Molecular Biology of the Cell*, 30(17):2309–2319, 2019.
- [241] J. P. Richard, E. Leikina, R. Langen, W. M. Henne, M. Popova, T. Balla, H. T. McMahon, M. M. Kozlov, and L. V. Chernomordik. Intracellular curvature-generating proteins in cell-to-cell fusion. *Biochem J*, 440(2):185–93, 2011.
- [242] M. M. Kozlov, F. Campelo, N. Liska, L. V. Chernomordik, S. J. Marrink, and H. T. McMahon. Mechanisms shaping cell membranes. *Curr Opin Cell Biol*, 29:53–60, 2014.
- [243] J. C. Stachowiak, E. M. Schmid, C. J. Ryan, H. S. Ann, D. Y. Sasaki, M. B. Sherman, P. L. Geissler, D. A. Fletcher, and C. C. Hayden. Membrane bending by protein-protein crowding. *Nat Cell Biol*, 14(9):944–9, 2012.
- [244] Manami Nishizawa and Kazuhisa Nishizawa. Curvature-driven lipid sorting: coarse-grained dynamics simulations of a membrane mimicking a hemifusion intermediate. *Journal of Biophysical Chemistry*, 1(2):86–95, 2010.

- [245] M. Rappolt, A. Hickel, F. Bringezu, and K. Lohner. Mechanism of the lamellar/inverse hexagonal phase transition examined by high resolution x-ray diffraction. *Biophys J*, 84:3111–22, 2003.
- [246] C. Lonez, M. F. Lensink, E. Kleiren, J. M. Vanderwinden, J. M. Ruyschaert, and M. Vandenbranden. Fusogenic activity of cationic lipids and lipid shape distribution. *Cell Mol Life Sci*, 67(3):483–94, 2010.