

Tesis Doctoral

GEOMETRÍA LIPÍDICA EN LA
REGULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE
LA DINAMINA



Instituto
Biofisika
Institutua

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Ariana Velasco del Olmo

Diciembre 2018

Directores/as de Tesis

Dr. Vadim Frolov Buyanov

Dra. Anna Shnyrova Zhadan

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	15
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	21
1. Proceso de fisión en el contexto del tráfico intracelular de membrana.....	23
1.1. Morfogénesis de una vesícula de transporte.....	24
1.2. Mecanismo de hemifisión durante la escisión del cuello vesicular.....	27
2. La dinamina como catalizador de fisión.....	30
2.1. Estructura de la dinamina.....	31
2.2. Creación y detección de curvatura de membrana por las dinaminas.....	34
2.3. La dinamina como catalizador de la fisión de membrana.....	37
2.4. La membrana lipídica como regulador de la actividad de las dinaminas.....	40
2.4.1. Dependencia lipídica de la unión de la dinamina a la membrana.....	41
2.4.2. Parámetros mecánicos de la membrana lipídica que influyen en la creación de curvatura por parte de las dinaminas: observaciones experimentales.....	42
2.4.3. Parámetros mecánicos de membrana lipídica que influyen en la creación de curvatura por parte de las dinaminas: análisis teórico.....	45
3. Plantillas lipídicas para el estudio de los efectos de curvatura de las dinaminas..	48
4. Hipótesis y objetivos.....	51
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
1. Equipamiento y materiales.....	56
1.1. Formación de Bicapas Suspendidas Gigantes (BGSs) y Vesículas Gigantes Unilamilaes (GUVs).....	56
1.2. Vesículas Grandes Unilamilaes (LUVs).....	57
1.3. Nanotubos lipídicos (NTs).....	58
1.4. Lípidos.....	59
1.5. Purificación de proteínas.....	59
1.6. Tampones y sus componentes.....	60
1.7. Disolventes Orgánicos.....	61
1.8. Sondas Fluorescentes.....	61
1.9. Otros materiales.....	62
1.10. Microscopía óptica de epifluorescencia.....	62

1.11. Microscopía óptica confocal.....	63
1.12. Criomicroscopía electrónica.....	64
1.13. Fluorimetría.....	64
1.14. Otro equipamiento.....	64
1.15. Software de adquisición de datos.....	65
1.16. Software de análisis de datos.....	65
2. Métodos.....	66
2.1. Membranas modelo.....	66
2.1.1. Formación de vesículas multilaminares (MLVs).....	66
2.1.2. Formación de Vesículas Unilaminares Grandes (LUVs).....	69
2.1.3. Formación de Bicapas Gigantes Soportadas (BGSs).....	70
2.1.4. Preparación de Vesículas Unilaminares Gigantes (GUVs).....	72
2.1.5. Nanotubos lipídicos (NTs).....	73
2.1.6. Preparación de los parches planos de lípido a partir del reservorio de las microesferas.....	75
2.2. Purificación de proteínas.....	76
2.3. Espectroscopia de fluorescencia.....	77
2.3.1. Determinación del tamaño de LUVs.....	77
2.3.2. Mediciones de la polarización generalizada del Laurdan.....	77
2.4. Microscopía de fluorescencia.....	77
2.4.1. Imágenes de epifluorescencia.....	77
2.4.2. Permeabilidad de los BGSs.....	78
2.4.3. Caracterización de nanotubos lipídicos.....	79
2.4.4. Recuperación de fluorescencia tras un fotoblanqueo (FRAP).....	79
2.4.5. Remodelación de membrana por dinamina.....	80
2.5. Criomicroscopía electrónica.....	81
2.6. Medidas de fuerza mediante pinzas ópticas.....	82
2.7. Cuantificación bioquímica de la dinamina.....	82
2.7.1. Preferencia de unión de las dinaminas a la membrana.....	82
2.7.2. Actividad bioquímica GTPasa de la dinamina.....	83

CAPÍTULO 3 DESARROLLO DE SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE REMODELACIÓN DE MEMBRANA..... 87

1. Conceptos básicos de la formación de Bicapas Gigantes Suspendidas.....	89
1.1. La curvatura y el choque osmótico facilitan la formación de los BGSs.....	90
1.2. La formación de BGSs depende del reservorio lipídico.....	95
2. Permeabilidad de los BGSs.....	97

3. Remodelación de membrana.....	99
4. Discusión.....	100

CAPÍTULO 4 INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS CON CURVATURA EN LA FUNCIÓN DE LA DINAMINA..... 107

1. Introducción.....	109
2. Mecánica de la membrana lipídica: interacción entre DOPC y DOPE.....	111
2.1. Papel de la fosfatidiletanolamina en el ordenamiento lipídico en membranas	111
2.2. Caracterización de NTs lipídicos con diferentes concentraciones de PE.....	116
3. Influencia de DOPE en la función de Dyn1 y Dyn2.....	122
3.1. Composiciones lipídicas de membranas para estudio de la acción de las dinaminas.....	123
3.2. Adsorción de dinaminas sobre liposomas grandes (LUVs).....	124
3.3. Tubulación de membrana mediada por la Dyn1 y la Dyn2.....	125
3.4. Aspectos mecánicos de la tubulación producida en BGSs por la Dyn1 y la Dyn2.....	129
3.5. Modelo de tubulación por dinaminas dependiente de DOPE.....	133
4. Discusión.....	135

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES..... 141

CAPÍTULO 6 BIBLIOGRAFÍA..... 147

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AEBSF	4-(2-aminoetil) benceno sulfonil fluoruro hidrociorhídrico
AP1	Proteínas adaptadoras 1
AP2	Proteínas adaptadoras 2
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
BCA	Ácido bicincinínico
BGSs	Bicapas Gigantes Suspendidas
BrainSM	Esfingomielina del cerebro
BSA	Sérum Bovino de Albúmina
BSE	Elemento de señalización, del inglés <i>bundle signaling element</i>
Chol	Colesterol
COPI	Complejo proteico de recubrimiento I
COPII	Complejo proteico de recubrimiento II
COPs	Complejos proteicos de recubrimiento
crioEM	Crio-microscopía electrónica
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

DOPS	1,2-dioleoil-Sn-glicero-3-fosfo-L-Serina
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano
DTT	1,4-dithiothreitol
Dyn	dinamina
Dyn1	Isoforma 1 de las dinaminas clásicas
Dyn2	Isoforma 2 de las dinaminas clásicas
Dyn3	Isoforma 3 de las dinaminas clásicas
EDTA	Ácido etilenodiaminatetraacético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetraacético
FRAP	Recuperación de fluorescencia después de un fotoblanqueo
Dominio G	Dominio GTPasa
GDP	Guanosin 5'-difosfato
GED	Dominio efector GTPasa
GP	Polarización Generalizada
GSK3 β	Glucógeno sintasa quinasa 3 Beta
GTP	Guanosín-5-trifosfato
GTPasa	Guanosín-5-trifosfatasa
GUVs	Vesículas Unilaminares Gigantes
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine ethanol sulfónico
J_s	Curvatura espontánea
k	Módulo de rigidez a la flexión

k_B	Constante de Boltzmann; $1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K
KCl	Cloruro potásico
KK114	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-n-kk114, StarRed
KO	Knockout
Laurdan	6-dodecanoil-n,n-dimetil-2-naftilamina
LUV	Vesícula unilaminar grande
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MLV	Vesícula multilaminar
NA	Apertura Numérica
NaCl	Cloruro Sódico
NT	Nanotubo
OPC	1-oleoyl-2-hidrox-sn-glicero-3-fosfocolina
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PDB	Banco de datos proteicos
PE	Fosfatidiletanolamina
PH	Dominio de homología pleckstrina
P _i	Fosfato libre
PI	Fosfatidilinositol
PI(3,4,5)P ₃	Fosfadilinositol-3,4,5-trisfosfato
PI(3,4)P ₂	Fosfadilinositol-3,4-bisfosfato

PI(4,5)P ₂	Fosfadilinositol-4,5-bisfosfato
PI3P	Fosfadilinositol-3-fosfato
PI4P	Fosfadilinositol-4-fosfato
PMT	Tubo fotomultiplicador
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PRD	Dominio enriquecido en prolina-arginina
PS	Fosfatidilserina
Rh-dOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-n-(lisamina rodamina b sulfonil)
ROI	Región de interés
SH3	Domino de homología a Src 3
SNARE	Receptores de proteína de unión a factor sensible n-etilmaleimida
SUPER	Bicapas soportadas con exceso de reservorio de membrana.
SUV	Vesículas unilamlares pequeñas
<i>T</i>	Temperatura
TRH	Trehalosa
VL1	Bucle variable 1
VL3	Bucle variable 3
σ	Tensión lateral

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Proceso de fisión en el contexto del tráfico intracelular de membrana.

La principal característica de las células eucariotas es la compartimentación funcional del espacio intracelular. Para mantener la integridad funcional y metabólica del citoplasma, las células eucarióticas dependen de un sistema eficiente de tráfico de membranas (Cheung *et al.*, 2008; Liu, Lukiyanchuk and Schmid, 2011), que se traduce en un eficaz intercambio de material e información entre los distintos compartimentos dentro y fuera de la célula (Cheung *et al.*, 2008). Este tráfico se basa en la formación de pequeñas vesículas que se separan de la membrana madre por un proceso de escisión o fisión de membrana mediante estructuras tubulares con curvaturas superiores a 0.2 nm^{-1} (calculadas en el plano medio de la bicapa), evitando así que los orgánulos terminen conectados, mezclando sus contenidos y perdiendo su función y/o especialización (Lenz, Morlot and Roux, 2009; Arumugam and Bassereau, 2015; Jarsch, Daste and Gallop, 2016). Tal tráfico vesicular está implicado en procesos tan importantes como la internalización de nutrientes, la infección viral, la señalización de los receptores, el reciclaje de vesículas sinápticas, el tráfico vesicular del aparato de Golgi, etc (Cheung *et al.*, 2008; Canton and Battaglia, 2012). El intercambio de moléculas y señales por medio del tráfico vesicular requiere un control dinámico de la membrana en el interior de la célula (Renard, Johannes and Morsomme, 2018) para lo cual la célula usa una maquinaria proteica específica para cada etapa del proceso.

1.1. Morfogénesis de una vesícula de transporte

El primer paso en la formación de una vesícula de transporte es la gemación de la membrana madre. En la mayoría de los casos, este paso implica el ensamblaje de una capa de proteínas en la cara citosólica de la membrana en gemación, las cuales se encargan de recluir la carga correcta y de imponer la forma esférica a la membrana (Bonifacino and Glick, 2004). Esta capa proteica puede estar formada por distintos complejos proteicos, tales como los COPII, COPI, clatrina con adaptadores AP-1 y clatrina con adaptadores AP-2 (ver Figura 1.1) (Bonifacino and Glick, 2004; McMahon and Boucrot, 2015; Dacks and Robinson, 2017). Una vez formada la yema esférica, se produce la formación del cuello tubular que une la vesícula creada a la membrana madre. Este cuello sigue evolucionando, extendiéndose y estrechándose debido a las fuerzas longitudinales causadas, por ejemplo, por la acción del citoesqueleto de actina (Benarroch, 2012). En la etapa final de la formación de la vesícula de transporte, este cuello se debe diseccionar de tal forma que la función de barrera de la membrana no se vea comprometida, es decir, evitando pérdidas del material transportado (Campelo and Malhotra, 2012; Dacks and Robinson, 2017). Es importante resaltar aquí que incluso un diminuto poro de 1 nm puede llegar a consumir la vesícula rápidamente debido al limitado volumen de la vesícula (Falanga et al., 2009; Campelo and Malhotra, 2012). Por analogía a los eventos de fusión sin fugas, se ha propuesto que la fisión se realiza a través de la formación de un estado intermedio llamado de *hemifisión* (Frolov and Zimmerberg, 2010; Campelo and Malhotra, 2012), dónde la monocapa lipídica interna se rompe y se resella antes que la externa (Frolov and Zimmerberg, 2010). Para que el estado de hemifisión sea alcanzado, es necesario que el diámetro del cuello se estreche hasta distancias comparables con el grosor de la bicapa lipídica, es decir, alrededor de 5 nm en diámetro (Frolov and Zimmerberg, 2009). Debido al alto coste energético que ello supone, este proceso está mediado por proteínas especializadas en la creación de alta curvatura de membrana que normalmente son recluidas al cuello de membrana en los momentos finales de la formación de la vesícula, como ocurre con las GTPasas de la familia de las dinaminas (Dyn) o el complejo ESCRT. En algunos casos, como en el de las vesículas recubiertas por COPs, la escisión del cuello se realiza por las proteínas del revestimiento, por ejemplo, la Sar1. Todas estas proteínas

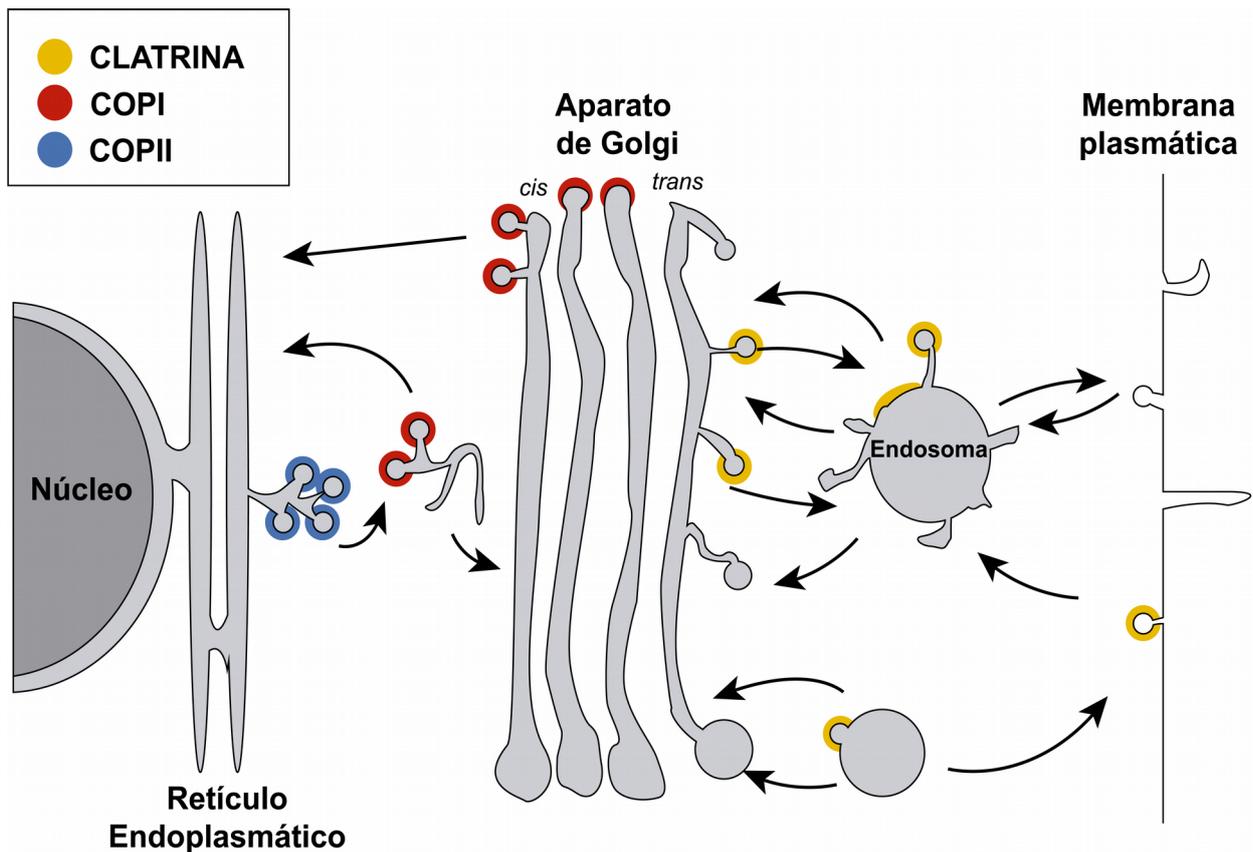


Figura 1.1 Representación esquemática de las principales vías de tráfico de membranas en células eucariotas.

especializadas en la escisión de membrana, se encargan de constreñir el cuello hasta los diámetros necesarios para alcanzar el proceso de hemifisión, provocando la fisión de la membrana (Frolov *et al.*, 2015). Entonces, la vesícula de transporte se separa de la membrana quedando cargada con las moléculas derivadas del interior de compartimento “donante” (Alberts, 1985). Finalmente, al producirse la separación de la vesícula de su membrana madre, el revestimiento de COPII, COPI o clatrina se desensambla y se recicla para rondas consecutivas de gemación (Bonifacino and Glick, 2004). Guiada por el citoesqueleto y transportada por los motores moleculares (quinesinas y miosinas), la vesícula es dirigida al compartimento específico “acceptor” (Bonifacino and Glick, 2004; Xiao *et al.*, 2016). Una vez alcanzado este compartimento y con el fin de descargar su contenido, la membrana de la vesícula se fusiona con la membrana diana. Esta fusión está normalmente mediada por el ensamblaje de complejos SNARE que acercan las dos membranas, además de

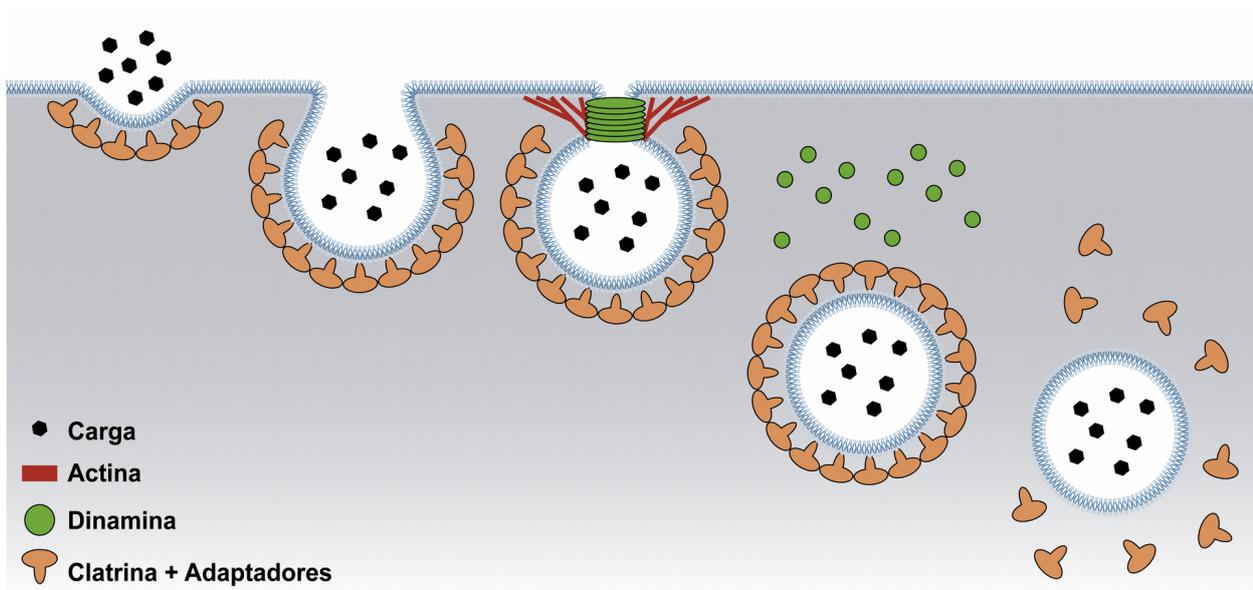


Figura 1.2 Proceso esquemático de la endocitosis mediada por clatrina.

catalizar todo el proceso. Todos estos pasos se repiten de forma consecutiva y constituyen las bases del transporte vesicular (McMahon and Boucrot, 2015).

Este trabajo está enfocado a los mecanismos fundamentales del proceso de fisión de membrana sin pérdidas de contenido. Trataremos esta fisión “fisiológica” desde la perspectiva biofísica, considerando las energías y las fuerzas que actúan en el proceso. Nuestro objetivo a largo plazo será extraer los mecanismos fundamentales de la remodelación de la bicapa lipídica durante la fisión impulsada por la maquinaria de proteínas especializadas

Con este propósito en mente, consideremos primero la energética de la formación de la vesícula y su fisión (ver Figura 1.2). Es evidente que para conseguir la extrema curvatura necesaria para que se produzca la fisión del cuello de la vesícula se requiere de un gran aporte energético (Jarsch, Daste and Gallop, 2016). Por ello, procederemos a analizar de manera aproximada la energía necesaria para alcanzar la fisión durante el tráfico de membrana.

1.2. Mecanismo de hemifisión durante la escisión del cuello vesicular

El cuello de membrana es una estructura diminuta, nanoconfinada, con una escala de longitud característica de 10 nm. Por tanto, sólo unos pocos complejos de proteínas están generalmente involucrados en las transformaciones del cuello que conducen a su fisión. Por otro lado, el número de moléculas lipídicas (las cuales tienen un tamaño mucho menor al de las proteínas) en el cuello es grande (entre cien y mil). En consecuencia, la parte lipídica del cuello es comúnmente considerada en términos de mecánica macroscópica de la membrana. En este marco, la fisión del cuello es impulsada por el estrés elástico asociado a la constricción del cuello. En la aproximación más simple, este estrés se define por la rigidez a la flexión de la bicapa lipídica. En principio, la bicapa es un objeto extremadamente blando (Lindahl and Edholm, 2000; Frolov *et al.*, 2015). A escala micrométrica, esta ausencia de rigidez se manifiesta en grandes ondulaciones térmicas (Lindahl and Edholm, 2000; Tarazona, Chacón and Bresme, 2013), con una energía característica de $1 k_B T$ por modo, donde k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. Sin embargo, a escala submicrométrica, relevante para las membranas celulares, la resistencia a la flexión se vuelve más sustancial (Tarazona, Chacón and Bresme, 2013). En la aproximación más simple, esta resistencia está definida por el módulo de rigidez a la flexión (k) de la curvatura media de $\kappa = 20k_B T$. Así, la transformación completa de una bicapa lipídica en una vesícula tiene un costo energético de $8\pi\kappa \approx 500k_B T$ (Aeffner *et al.*, 2012). Para una vesícula de 100 nm de diámetro, la energía por unidad de área sigue siendo relativamente pequeña ($\approx 10^{-2}k_B T/nm^2$), por lo tanto, la energía que deben aportar las proteínas que forman el revestimiento de la vesícula (por ejemplo, la clatrina) no es tan alto. Sin embargo, si la curvatura aumenta 10 veces ($\varnothing=10$ nm) se necesita una energía igual a $1k_B T/nm^2$. Estas curvaturas son intrínsecas para los cuellos de vesículas antes de su fisión (Frolov and Zimmerberg, 2010; Campelo and Malhotra, 2012; Deserno, 2015). Aunque los cuellos de membrana tienen una forma de silla de montar diferente a la esfera, una energía de $1k_B T/nm^2$ es una estimación

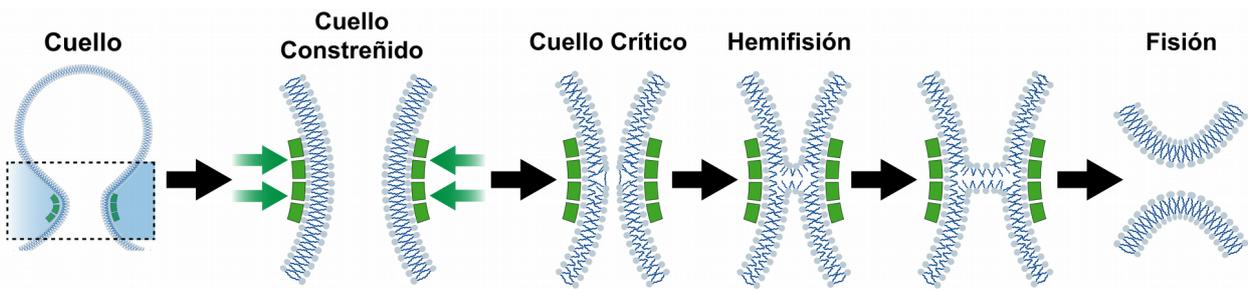


Figura 1.3 Fisión de membrana a través de la hemifisión. Algunas proteínas se colocan en el borde o alrededor del cuello para constreñirlo y liberar la vesícula formada.

razonable del estrés de curvatura que se acumula en la bicapa lipídica del cuello constreñido (Kuzmin *et al.*, 2001; Frolov and Zimmerberg, 2010; Deserno, 2015).

De hecho, el estrés de curvatura acumulado en la monocapa interna del cuello es crítico para el inicio de la hemifisión. Cuando se alcanza la curvatura crítica el estrés producido por la curvatura es tan grande que se produce una desviación en la orientación respecto a la normal de los lípidos de la membrana (Frolov *et al.*, 2015; Mattila *et al.*, 2015). Esta desviación permite un empaquetamiento mucho más efectivo de las colas lipídicas, además de que hace disminuir las energías asociadas a la remodelación local de la membrana (Shnyrova *et al.*, 2013). Como consecuencia, la parte hidrofóbica de los lípidos de la monocapa luminal del cuello de membrana se gira quedando expuestas al medio acuoso (Kuzmin *et al.*, 2001). Aparece entonces una fuerza atractiva entre las colas lipídicas de esta monocapa, que acaba dirigiendo todo el proceso (Frolov and Zimmerberg, 2010). A continuación, la monocapa luminal del cuello de membrana se sella de forma espontánea (Bashkirov *et al.*, 2008; Schmid and Frolov, 2011; Frolov *et al.*, 2015; Mattila *et al.*, 2015). Se trata de un mínimo local de energía donde la monocapa interna ha sufrido una transformación topológica, mientras que la interna todavía es continua. Este estado recibe el nombre de *hemifisión* (Frolov *et al.*, 2015; Mattila *et al.*, 2015) (ver Figura 1.3). La creación de este estado de *hemifisión* constituye la principal barrera de energía para alcanzar la escisión del cuello, pues la transición de la *hemifisión* a la fisión completa requiere un menos esfuerzo (Kozlovsky and Kozlov, 2003; Mattila *et al.*, 2015).

Es importante destacar que la constricción del cuello también puede llevar a la formación de un poro (Bassereau *et al.*, 2018). Por tanto, la ruta de la *hemifisión* "clásica" solo es una de las muchas rutas posibles para la fisión, que pueden incluir la

formación de poros transmembrana a lo largo del proceso. A día de hoy, solo hemos comenzado a comprender los factores moleculares y las fuerzas que definen la elección de la vía de fisión. Lo que es evidente es que tanto las proteínas de fisión como los lípidos pueden contribuir. Por ejemplo, la geometría de la proteína puede definir la vía de constricción. La constricción cilíndrica, típica para las proteínas especializadas en fisión como las dinaminas, conduce a una acumulación específica de estrés en la monocapa interna del cuello, lo que promueve la hemifisión. A su vez, un mejor acoplamiento de los lípidos al estrés producido por la flexión (por ejemplo, los lípidos poli-insaturados (Pinot *et al.*, 2014) permite una mayor constricción sin desestabilización del cuello, lo que nuevamente facilita la *hemifisión*. Así, el efecto producido por proteínas creadoras de curvatura sobre la membrana puede variar en función de las características de la bicapa lipídica y de su alrededor (Shibata *et al.*, 2009; Frolov and Zimmerberg, 2010). Por ejemplo, las proteínas incrustadas o que actúan sobre una bicapa de lípidos más flexible (baja tensión superficial y rigidez a la flexión), tendrían un mayor impacto sobre la curvatura (Kuzmin *et al.*, 2001; Derganc, Antony and Čopič, 2013; Deserno, 2015).

En esta tesis supondremos que la deformación producida en la membrana mediante la acción proteica depende de un número limitado de parámetros que son: (1) la densidad superficial de la proteína, (2) las propiedades mecánicas de la membrana (tensión lateral y rigidez a la flexión) y (3) la geometría de la membrana (Simunovic *et al.*, 2015). Para comprobar esta hipótesis, elegiremos a la superfamilia de las GTPasas dinaminas como modelo de proteína especializada en la remodelación de la membrana durante su fisión.

2. La dinamina como catalizador de fisión

Las dinaminas son uno de los reguladores más importantes de los múltiples eventos de transporte de membrana. Están involucradas en la constricción del cuello vesicular, así como en la estabilización del sitio de fisión (Canton and Battaglia, 2012). Son proteínas multidominio de 100 kDa que obtienen energía de la hidrólisis de la molécula de GTP para producir la disrupción de la membrana. Esta superfamilia fue descubierta en 1989, cuando Shpetner y Vallee observaron cómo una GTPasa mecano-química parecía unirse a los microtúbulos en células de cerebros bovinos (Shpetner and Vallee, 1989). Originalmente, se pensaba que, al igual que la dineína y la quinesina, esta proteína presentaba una actividad de hidrólisis de nucleótidos estimulada por los microtúbulos (Shpetner and Vallee, 1992). Sin embargo, esta proteína adquiere su relevancia años más tarde, cuando se llevan a cabo estudios sobre un mutante (Shibire) de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). El producto genético de dicho mutante presentaba alrededor del 90% de pares de bases idénticas con la dinamina, sugiriendo funcionalidades básicas similares (van der Blik and Meyerowitz, 1991). Sin embargo, cuando la temperatura ambiente aumentaba, las moscas sufrían parálisis y sus células mostraban defectos en la endocitosis causados por la mutación. Las imágenes de microscopía electrónica de las vesículas sinápticas y las invaginaciones de la membrana plasmática en presencia de los mutantes Shibire muestran zonas más densas alrededor de sus cuellos (Koenig and Ikeda, 1989). Posteriormente, en estudios con marcaje inmunofluorescente se confirmó que dichos “collares” estaban formados por proteínas de dinamina (Guha *et al.*, 2003). La reconstitución *in vitro* de la dinamina purificada reveló que estos collares de dinamina se forman para producir escisión del cuello de la vesícula (Danino, Moon and Hinshaw, 2004; Bashkirov *et al.*, 2008). Desde estos descubrimientos iniciales, los extensos análisis mecanísticos han demostrado que las dinaminas pueden autoensamblarse en una maquinaria autosuficiente de fisión de membrana que utiliza energía de la hidrólisis de GTP para constreñir y cortar el cuello de la vesícula (Antonny *et al.*, 2016). Esta actividad mecanoquímica, es decir, la transformación de la energía de la hidrólisis de GTP en una deformación mecánica de la membrana, es un distintivo de la superfamilia de las dinaminas. Las dinaminas se dividen en dos grandes grupos: las proteínas similares a la dinamina, que tienen cuatro o menos de cuatro dominios; y las dinaminas clásicas, que tienen cinco dominios

(Praefcke and McMahon, 2004). Hay tres isoformas clásicas en mamíferos: dinamina 1 (Dyn1), dinamina 2 (Dyn2) y dinamina 3 (Dyn3). Las diferentes dinaminas operan en varios lugares de las células, desde la membrana plasmática hasta las membranas de los orgánulos, realizando tanto la fusión como la fisión de la membrana. Centraremos este trabajo en dos de las isoformas de "clásicas" presentes en mamíferos, la Dyn1 y la Dyn2.

La Dyn1, es la isoforma más estudiada y se expresa principalmente en las neuronas, encargándose de mediar el reciclaje de vesículas sinápticas en los terminales presinápticos (Faelber *et al.*, 2011). Estudios recientes han demostrado que la Dyn1 también se expresa ampliamente en células no neuronales. Sin embargo, al igual que ocurre en la sinapsis neuronal, se encuentra principalmente inactiva en estado estacionario debido a la fosforilación por parte de la quinasa constitutivamente activa GSK3 β (Srinivasan *et al.*, 2018). Gracias a los estudios en ratones con knockout de Dyn1 (Dyn1-KO), se reveló la importancia que tenía esta proteína en los procesos celulares. Un ratón con Dyn1-KO se mantiene con vida un tiempo reducido y muestra defectos en la endocitosis de vesículas sinápticas durante los períodos de alta actividad neuronal (Faelber *et al.*, 2013). El knockout de la Dyn2 lleva a la muerte de ratones en la etapa embrional (Faelber *et al.*, 2011). El knockout de la Dyn2 lleva a la muerte de ratones en estadio embrional (Faelber *et al.*, 2013). Asimismo, a lo largo de los últimos años, ha sido posible identificar mutaciones genéticas de la Dyn2 que llevan a enfermedades congénitas en humanos, como por ejemplo, formas raras de la miopatía centronuclear autosómica dominante o la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (revisado en (Durieux *et al.*, 2010; Liu, Lukiyanchuk and Schmid, 2011)). Por tanto, saber cómo afectan estas mutaciones al proceso de la división de las membranas celulares podría ayudar al tratamiento y la comprensión del origen de este tipo de enfermedades.

2.1. Estructura de la dinamina

Las dinaminas clásicas poseen cinco dominios diferenciados y un 30% de homología en su estructura primaria, localizándose las mayores diferencias en el

extremo C-terminal, dónde se producen las interacciones con proteínas auxiliares (Raimondi *et al.*, 2011). Los cinco dominios de las dinaminas son (ver Figura 1.4-a):

N-terminal

- 
- **Dominio GTPasa (dominio G):** Este dominio es el encargado de realizar la hidrólisis de la molécula de GTP (Raimondi *et al.*, 2011; Schmid and Frolov, 2011).
 - **Dominio intermedio:** dominio involucrado en el autoensamblaje de la dinamina (Raimondi *et al.*, 2011; Schmid and Frolov, 2011).
 - **Dominio de homología pleckstrina (dominio PH,** del inglés “pleckstrin homology”). Dominio responsable de llevar a cabo la interacción con los lípidos de la membrana (Raimondi *et al.*, 2011; Schmid and Frolov, 2011) mediante una inserción parcial de su bucle variable e hidrofóbico VL1 dentro del núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica. Esta inserción, se hace necesaria en los procesos de generación de curvatura (Raimondi *et al.*, 2011; Schmid and Frolov, 2011).
 - **Dominio efector GTPasa (GED,** del inglés “GTPase effector domain”), que al igual que el dominio medio, se encarga del autoensamblaje de dinamina (Raimondi *et al.*, 2011; Schmid and Frolov, 2011).
 - **Dominio enriquecido en Prolina-arginina (PRD,** del inglés “Proline-arginine rich domain”), el cual media las interacciones de unión con numerosas proteínas auxiliares que contienen el dominio SH3 (Raimondi *et al.*, 2011; Schmid and Frolov, 2011).

C-Terminal

Los datos cristalográficos de la Dyn1 humana revelan que las hélices del dominio medio y la región N-terminal de GED constituyen un *tallo* (del inglés “stalk”). Este tallo media el autoensamblaje de polímeros de la proteína. Por otro lado, el dominio G se asienta sobre el *bundle signaling element* (BSe) o *cuello*. Está formado por tres hélices derivadas de secuencias provenientes de los extremos N-terminal y C-terminal del dominio G y de la región C-terminal del GED, respectivamente (ver Figura 1.4-b). Este complejo BSE funcionaría como un conector flexible entre el dominio GTPasa y el tallo (Pucadyil and Schmid, 2008). En consecuencia, en solución, la dinamina existe como un tetrámero “cerrado” formado por la interacción del tallo y el dominio PH (ver Figura 1.4-c). se favorece su polimerización y pasa a formar un dímero “abierto” (ver Figura 1.4-d) (Faelber *et al.*, 2011; Ford, Jenni and Nunnari, 2011; Reubold *et al.*, 2015; Antony *et al.*, 2016; Ramachandran and Schmid, 2018) donde una hélice proteica rodea la membrana lipídica de manera que los dominios PH están orientados hacia la membrana, facilitando su interacción con la bicapa (Reubold *et al.*, 2015). Los dominios GTPasa están dispuestos en la capa

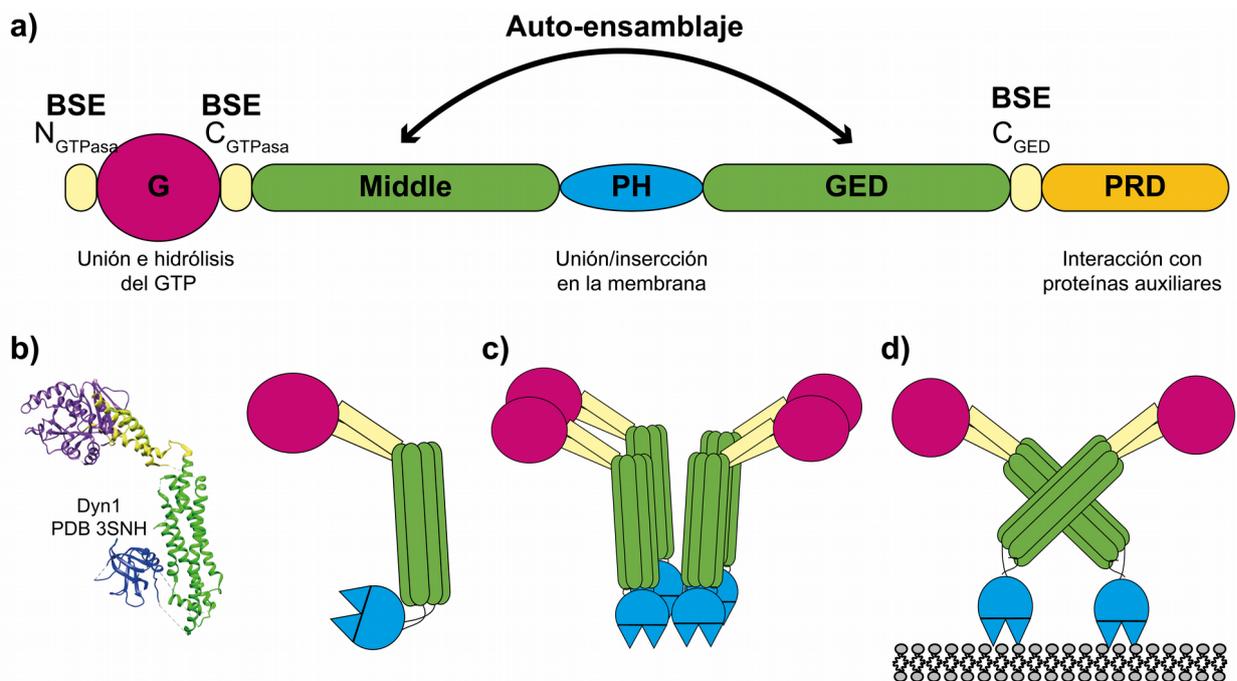


Figura 1.4. a) Estructura de una dinamina clásica. b) Estructura cristalina del monómero de la Dyn1- Δ PRD (documento PDB: 3SNH) (izquierda) y surepresentación esquemática del monómero (derecha). c) Representación esquemática del tetrámero formado por la dinamina en solución. d) Representación esquemática del dímero formado por la dinamina en presencia de membrana lipídica.

externa de este andamio proteico (Ramachandran *et al.*, 2007) y orientados dos a dos en direcciones opuestas (Ford, Jenni and Nunnari, 2011), optimizando la disposición del centro catalítico para maximizar la cantidad de energía extraída de la posterior hidrólisis del GTP (Ramachandran *et al.*, 2007; Reubold *et al.*, 2015) (ver Figura 1.5-b).

2.2. Creación y detección de curvatura de membrana por las dinaminas

Los datos procedentes de experimentos *in vivo*, mostraron cómo la dinamina se autoensambla en oligómeros de diferentes tamaños en el cuello de las vesículas de membrana recubiertas por clatrina (Merrifield *et al.*, 2002; Ehrlich *et al.*, 2004; Taylor, Lampe and Merrifield, 2012; Liu, Mattila and Schmid, 2013; Cocucci, Gaudin and Kirchhausen, 2014; Grassart *et al.*, 2014). Las mutaciones que interfieren con la actividad GTPasa de las dinaminas conducen a un aumento dramático del tamaño del collar formado por la dinamina en el cuello vesicular. En consecuencia, *in vitro*, en ausencia de GTP (en el denominado *apo-estado*), la Dyn1 forma polímeros helicoidales largos siendo capaz de deformar los liposomas en túbulos estrechos recubiertos de proteína, proceso denominado *tubulación de membrana* (Hinshaw and Schmid, 1995) (ver Figura 1.5-a). Además de poder deformar la membrana lipídica, la dinamina impone su geometría tras su polimerización sobre los túbulos de membrana (Ferguson and De Camilli, 2012). En particular, para la Dyn1, el polímero así ensamblado tiene un diámetro exterior de aproximadamente 50 nm (Morlot and Roux, 2013) con un paso helicoidal de aproximadamente 13 nm (Zhang and Hinshaw, 2001; Chen *et al.*, 2004) (ver Figura 1.5-b).

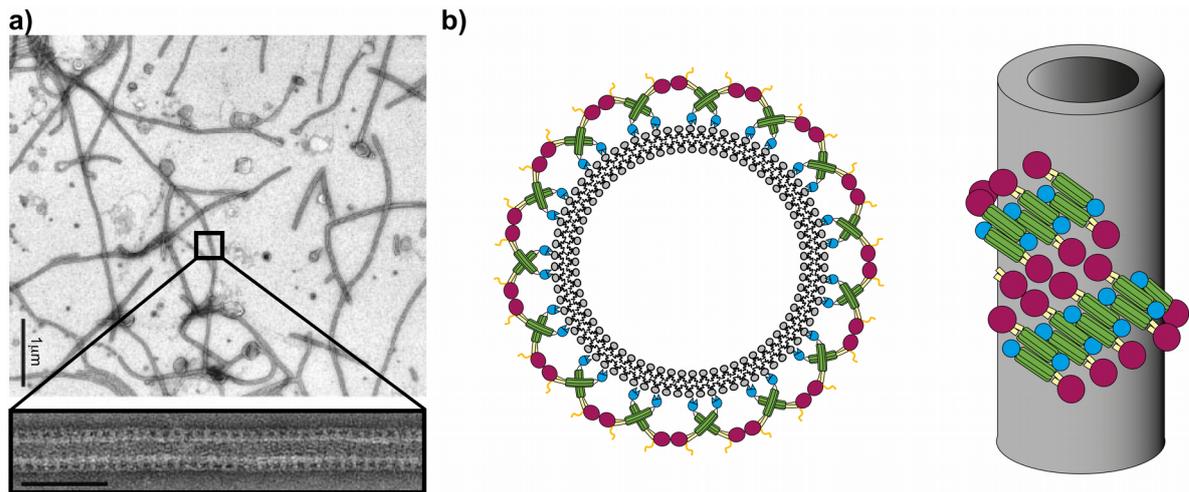


Figura 1.5. a) Oligomerización de la dinamina sobre membrana en ausencia de nucleótidos. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la tubulación de liposomas de DOPS. Barra de escala de $1\mu\text{m}$ (arriba) y 100nm (abajo). (Imagen adaptada con permiso de Sweitzer and Hinshaw, 1998) b) Autoligomerización de la dinamina sobre membrana. Representación esquemática de cómo la dinamina produce constricción en la membrana (en ausencia de GTP) (izquierda) y cómo se dispone alrededor de tubos (derecha).

La energía de polimerización de las dinaminas es bastante alta, alrededor de $4\text{ k}_B\text{T}$ por dímero de dinamina (Evseev and Bashkirov, 2008; Roux *et al.*, 2010). Por lo tanto, la polimerización helicoidal per se, contribuye significativamente a la constricción del cuello de la vesícula. Además, la oligomerización es fundamental para la actividad mecano-química de la dinamina, ya que los dominios GTPasa se enfrentan con los de los peldaños adyacentes, lo que facilita enormemente la dimerización G-G requerida para la hidrólisis de GTP. Así, la velocidad de hidrólisis aumenta hasta 100 veces tras el autoensamblaje helicoidal de dinaminas sobre la superficie de membrana, lo que permite una hidrólisis cooperativa de GTP que proporciona suficiente energía para la fisión.

Aunque la estructura de la hélice está determinada por interacciones evolutivas conservadas que rigen la oligomerización de la dinaminas, es también dependiente de la curvatura de las membranas lipídicas (Roux *et al.*, 2010). Al principio, este efecto se relacionó con la resistencia elástica de la bicapa lipídica, oponiéndose a la acción constrictiva de la proteína y, por lo tanto, inhibiendo el autoensamblaje helicoidal (Bashkirov *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2010). Más tarde se observó que el efecto dependía de la isoforma de dinamina utilizada en el ensayo de tubulación. Así,

aunque la estructuras primarias de los dominios PH de la Dyn1 y Dyn2 son bastante similares, estas isoformas exhiben distintas capacidades para el autoensamblarse y generación de curvatura de membrana (Liu *et al.*, 2011). La Dyn1 es capaz de inducir curvatura en la membrana y catalizar por sí misma la liberación de vesículas desde la membrana, mientras que la Dyn2 requiere de proteínas auxiliares para poder generar el mismo efecto (Menon and Schafer, 2013). Sin embargo, Dyn2 se puede autoensamblar sobre nanotubos lipídicos preformados. Estas observaciones hicieron que la Dyn1 se etiquetara como una proteína creadora de curvatura autosuficiente, mientras que la Dyn2 pasó a considerarse como una proteína sensor de curvatura (Liu *et al.*, 2011). De manera crucial, los mismos autores (el grupo de la Dra. Sandra Schmid) revelaron que las diferencias funcionales observadas entre la Dyn1 y la Dyn2 residen exclusivamente en el dominio PH de las proteínas: el intercambio del dominio PH provoca el cambio del correspondiente del fenotipo (de detección de curvatura a creación y viceversa). Más en detalle, el dominio PH se une a la membrana lipídica a través del bucle variable VL1 del dominio PH (Ramachandran *et al.*, 2009), y se orienta a través de otro bucle variable (VL3) (Mehrotra, Nichols and Ramachandran, 2014). El análisis de varias mutaciones puntuales en VL1 y VL3 reveló que los bucles son totalmente responsables del reconocimiento y la creación de la curvatura de la membrana por parte de las dos isoformas de la dinamina. Además de actividades en la membrana, cuando se comparó la actividad GTPasa de las dos isoformas, se observó que la Dyn2 tiene una actividad GTPasa intrínseca más alta que la Dyn1, efecto que se invierte cuando se mide dicha actividad bajo condiciones que promueven el autoensamblaje de la proteína sobre la membrana lipídica (actividad GTPasa estimulada) (Liu *et al.*, 2011; Neumann, Pucadyil and Schmid, 2013). No obstante, aún es necesario más trabajo para poder definir de forma clara las posibles diferencias existentes en el comportamiento de ambas isoformas.

Todas estas observaciones indican que el autoensamblaje y la actividad mecanoquímica de las dos isoformas sobre la membrana están reguladas por los lípidos a través de la interacción(es) dependiente(s) de la curvatura de membrana con el dominio PH. Descifrar este nuevo mecanismo de regulación es el objetivo principal del presente trabajo.

2.3. La dinamina como catalizador de la fisión de membrana

Para poder llevar a término la fisión de membrana, la constricción de membrana producida durante la oligomerización de la dinamina no es suficiente y haciéndose necesaria la obtención de energía extra mediante la hidrólisis de la molécula de GTP. Los análisis de criomicroscopía electrónica (crioEM) de hélices de dinamina, estabilizadas por análogos no hidrolizables de GTP, revelaron que la unión e hidrólisis de GTP causan la compactación progresiva de la hélice proteica. El diámetro externo de la hélice cambia de 50 a 40 nm, mientras que el diámetro luminal del túbulo de membrana se contrae por debajo de los 4 nm (Sundborger *et al.*, 2014). Mientras que estas altas curvaturas están asociadas con la fisión espontánea de la membrana (Kozlov *et al.*, 2014; Frolov *et al.*, 2015), el polímero de dinamina, rígido debido a los análogos de GTP no-hidrolizables usados, estabiliza el tubo de membrana altamente constreñido. Sin embargo, el modo en que la dinamina emplea la energía obtenida de la hidrólisis de GTP aún está por establecer.

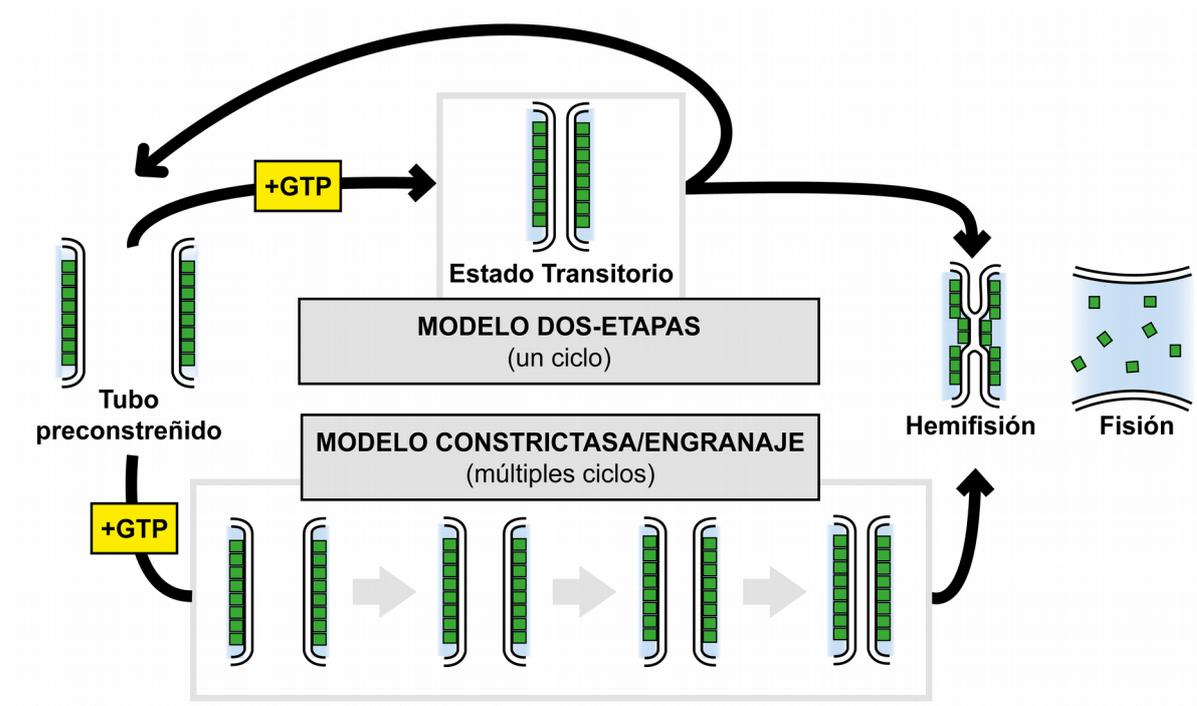


Figura 1.6. Modelos actuales de la fisión de membrana por dinaminas clásicas.

Actualmente existen dos modelos consensuados que tratan de explicar cómo se produce la fisión de membrana mediada por esta proteína (ver Figura 1.6).

En primer lugar, se encuentra el *modelo de dos etapas*. Este modelo propone que una vez que se ha producido el ensamblaje de la dinamina sobre la membrana lipídica, ocurre una constricción inicial del cuello de membrana (Bashkirov *et al.*, 2008; Pucadyil and Schmid, 2008). A continuación, el GTP se une a la proteína y se produce la dimerización G-G (dimerización de los dominios G dos a dos) (Chappie *et al.*, 2011). El análisis crio-EM reveló además que, en este estado de transición, antes de la finalización de la hidrólisis de GTP la proteína ya se encuentra en el estado de súper-constricción sobre la membrana en la que se ha ensamblado. La desestabilización de la membrana tiene lugar produciéndose la hemifisión estable en la membrana (Mattila *et al.*, 2015). La liberación del fosfato libre (GDP+Pi) coincide con la fisión completa de la membrana, terminando así el ciclo de la hidrólisis de GTP (Danino, Moon and Hinshaw, 2004; Mattila *et al.*, 2015) (ver Figura 1.7).

Por otro lado, está el *modelo constrictasa/engranaje*, el cual propone un mecanismo análogo al movimiento de la miosina sobre los filamentos de actina, pero con la dinamina desempeñando el papel de ambas al mismo tiempo (Chappie *et al.*, 2011; Ford, Jenni and Nunnari, 2011). El proceso comenzaría con el autoensamblaje de la dinamina alrededor del cuello de la membrana. La molécula de GTP se une a la dinamina y se produce la dimerización G-G. Se libera GDP + Pi (finalizando la hidrólisis de GTP) produciéndose la disociación de los dominios G-G. Tras varios ciclos de hidrólisis de GTP, la membrana alcanza el estado de súper-constricción. Una vez que la membrana se ha constreñido lo suficiente, ocurre la hemifisión de la membrana dando lugar a la fisión de la misma de forma espontánea (Morlot *et al.*, 2012; Cocucci, Gaudin and Kirchhausen, 2014). En este caso, el papel del desensamblaje de la dinamina no está claro. Por un lado, podría producirse debido a las tensiones que aparecen bajo el andamio de la dinamina durante la constricción de membrana, que se traducen en la rotura de la hélice que forma la proteína. Por otro lado, el desensamblaje podría deberse a que una vez que la membrana se ha fisionado, la hélice proteica pierde la unión a la membrana (Warnock, Baba and Schmid, 1997; Hinshaw, 2000; Liu *et al.*, 2011).

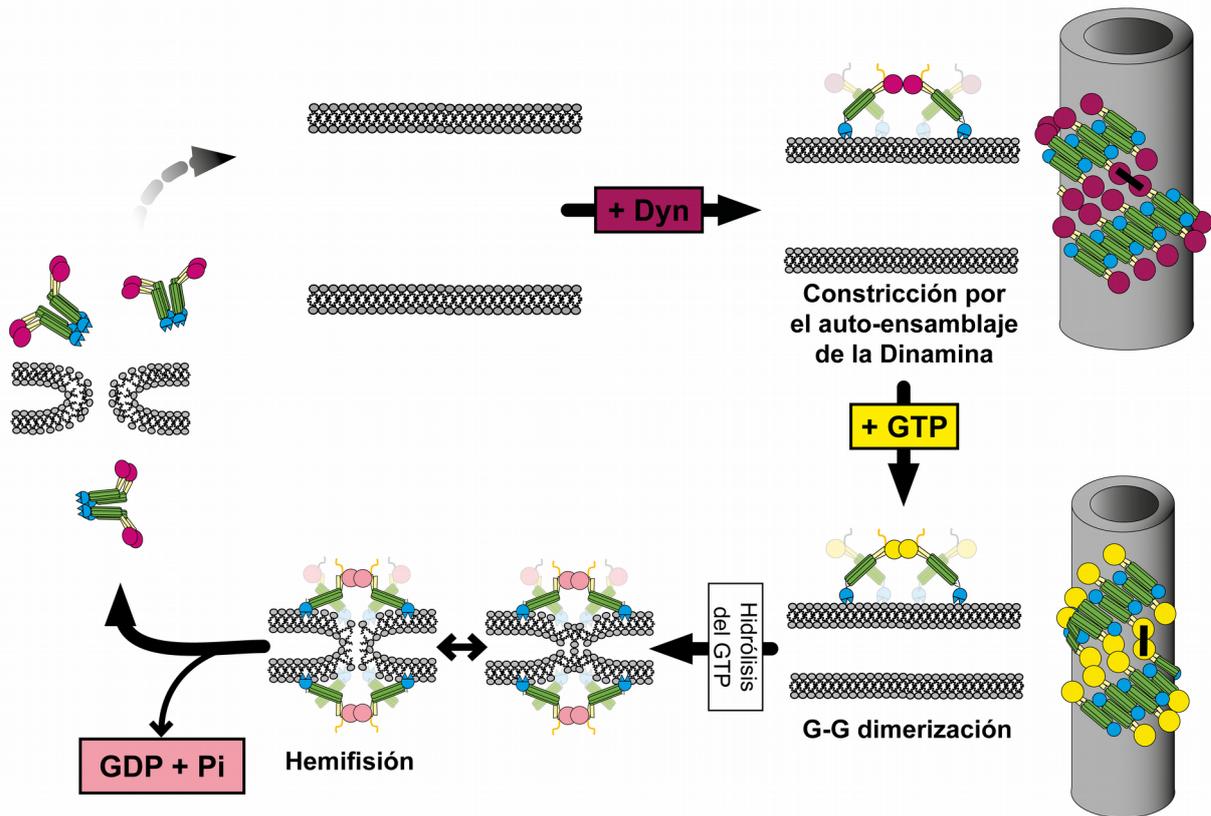


Figura 1.7 Cambios conformacionales de la dinamina para el modelo de fisión de membrana catalizada por dinamina en dos etapas. La primera etapa se representa en la línea superior, y la segunda etapa se representa en la línea inferior. En púrpura, dinamina en ausencia de nucleótidos; en amarillo, dinamina unida a GTP antes de su hidrólisis; y en rosa cuando está ligada al GDP.

Resumiendo las ideas principales de ambos modelos, en el primer modelo, se logra la mayor constricción durante el ensamblaje, mientras que la hidrólisis del GTP se usa para desestabilizar los dímeros G-G y así desensamblar el andamiaje de la dinamina. En el segundo modelo, la energía de la hidrólisis de GTP se traduce en trabajo mecánico para que los dominios GTPasa interactúen entre sí, lo que permite que un giro de la hélice camine sobre el adyacente (ver Figura 1.6) (Liu *et al.*, 2011; Neumann and Schmid, 2013).

En particular, ninguno de los modelos anteriores considera explícitamente el papel de los lípidos en el proceso de fisión. A este respecto, se analizaron las perturbaciones localizadas de las monocapas lipídicas mediante la inserción de VL1 en el marco del modelo de dos etapas (Shnyrova *et al.*, 2013). Se encontró que la

mutación que interfiere con la inserción de la membrana de VL1 inhibe la fisión. Además, el ciclo de hidrólisis de GTP de Dyn1 estaba directamente relacionado con la profundidad de inserción. Estos resultados indican claramente que las dinaminas no actúan exclusivamente como una fuerza de constricción masiva. También se basan en un conjunto de interacciones locales que pueden llegar a ser especialmente importantes para hélices de dinamina extremadamente cortas que operan *in vivo* (Shnyrova *et al.*, 2013). Los siguientes resultados indican que tales interacciones locales dependen de los lípidos de la membrana.

2.4. La membrana lipídica como regulador de la actividad de las dinaminas

La extrema curvatura de membrana es el resultado de la interacción entre la dinamina (unión, auto-oligomerización, cambios conformacionales debidos a la hidrólisis de GTP, etc.), los lípidos de la membrana y las fuerzas físicas involucradas en el proceso (Mattila *et al.*, 2015). Estas fuerzas deben manifestarse ya desde el principio del autoensamblaje de la dinamina en la membrana. De ahí que el objetivo principal de este trabajo es el de analizar el efecto de la deformación por flexión de la membrana lipídica producido por las isoformas de dinamina en ausencia de nucleótidos. En esta sección hablaremos de cómo los lípidos que componen la membrana podrían regular la función de las dinaminas, sobre todo durante la primera etapa del ciclo mecánico de la misma (ver el apartado 2.3). En primer lugar, se analizará cómo la unión de la proteína a la membrana está influenciada por la presencia de algunas especies de lípidos. Posteriormente, veremos cómo los parámetros mecánicos, los cuales están controlados por la composición lipídica de la membrana, afectan a la constricción de membrana mediada por la dinamina.

2.4.1. Dependencia lipídica de la unión de la dinamina a la membrana

El primer evento que hace posible la constricción de la membrana lipídica es la unión de la dinamina a ésta. El punto de unión de la proteína a la membrana controla el lugar donde se producirá la creación de la curvatura, por lo tanto, deberían existir ciertas interacciones dinamina-lípido específicas que regulan la actividad de la proteína.

Así, en 1996, Zheng y coautores mostraron cómo el dominio PH de la dinamina mostraba preferencia de unión hacia el fosfatidilinositol fosfatos (PIP) y la fosfatidilserina (PS) frente a otros fosfolípidos no cargados, donde la unión apenas era detectable (Zheng *et al.*, 1996). Este orden de preferencia de la unión a la membrana por parte de la dinamina es el siguiente $(PI(4,5)P_2) > (PI(3,4,5)P_3) > (PI(3,4)P_2) \gg (PI4P) > (PI3P) > PS$ (Klein *et al.*, 1998). Dado que la auto-oligomerización de la dinamina estimula la unión del dominio PH a la superficie de la membrana (Zheng *et al.*, 1996), esta selectividad de unión proteína-lípido afectaría a la función final de la proteína (De Marothy and Elofsson, 2015). De hecho, la actividad de tubulación mediada por dinamina, al igual que su unión a la membrana, fue más predominante en las membranas suplementadas con lípidos cargados que en las membranas lipídicas con una mayor cantidad de lípidos no cargados (Klein *et al.*, 1998; Ramachandran and Schmid, 2008). Además, a pesar de que el dominio PH de la dinamina se une con mayor preferencia al PIP respecto al PS, es capaz de formar y recubrir tubos en membranas procedentes de liposomas compuestos puramente por PS (Takei *et al.*, 1998). Sin embargo, estudios posteriores sobre la tubulación mediada por dinamina en ausencia de nucleótidos, mostraron que el único requisito necesario para que la proteína sea capaz de inducir curvatura en liposomas es la presencia de $PI(4,5)P_2$ en la composición de la membrana (Klein *et al.*, 1998).

También se ha caracterizado la inserción de la dinamina en la membrana en ausencia de nucleótidos. En éstos estudios se observó que el dominio PH se inserta más profundamente en membranas formadas por una única especie de lípido cargado, siendo notablemente mayor en el caso del PS (por encima del

PI(4,5)P₂). Por contrario, cuando se empleaban diferentes especies de lípido no cargado, solo se obtuvo una ligera inserción del dominio PH. Además, cuando se usaron membranas compuestas por más de una especie lipídica, la inserción de la dinamina fue únicamente detectada en membranas dopadas con PI(4,5)P₂ o ácido fosfatídico (Pa) (Sweitzer and Hinshaw, 1998; Burger *et al.*, 2000).

En resumen, el dominio PH de la dinamina, en concordancia con dominios PH de otras proteínas, puede unirse a los fosfolípidos de la membrana lipídica, siendo el PI(4,5)P₂ el fosfolípido con preferente para dicha unión. Esta preferencia de enlace sugiere que este dominio puede ser importante en el proceso de localización de la membrana diana por la dinamina (Roux *et al.*, 2006). Por tanto, PIP y PS son reguladores de la actividad de remodelación de la membrana por parte de las dinaminas (Zheng *et al.*, 1996). Es de destacar que la afinidad del dominio PH de Dyn1 por el PI(4,5)P₂ es relativamente baja. A concentraciones fisiológicas de PI(4,5)P₂ en la membrana (1 mol% en promedio) la Dyn1 no se une a la bicapa lipídica plana, mientras que se autoensambla fácilmente en nanotubos lipídicos preformados (Roux *et al.*, 2010; Shnyrova *et al.*, 2013). Por lo tanto, la unión a la membrana y la creación/detección de curvatura de membrana están estrechamente vinculadas para las dinaminas.

2.4.2. Parámetros mecánicos de la membrana lipídica que influyen en la creación de curvatura por parte de las dinaminas: observaciones experimentales

Los lípidos no solo pueden actuar como reguladores de la actividad de dinamina a través de la especificidad de unión. Cuando la dinamina se autoensambla, se forma un andamio proteico alrededor de la membrana que impone su curvatura intrínseca (Falkenburger *et al.*, 2010), obligando a la membrana a deformarse hasta adquirir esa acusada curvatura. Sin embargo, la membrana se opone a dicha deformación de forma más o menos pronunciada dependiendo de su elasticidad. Dado que la elasticidad de la membrana es función de su composición química (Zimmerberg and Kozlov, 2006), y de su geometría

actual, los lípidos actúan como reguladores de la creación de curvatura por parte de la proteína, siendo crucial para su función (Janmey and Kinnunen, 2006).

Aquí, el primer parámetro a ser considerado es la tensión lateral. En la mayoría de los casos, las proteínas que inducen curvatura en la membrana celular actúan de forma local, deformando sólo una pequeña parte de la membrana, por ejemplo, durante la formación del compartimento de transporte. Así, la membrana madre a partir de la cual se produce la egresión de este compartimento se puede considerar como un reservorio de membrana con su tensión característica. Una tensión lateral demasiado alta inhibe la deformación de la membrana (Shi and Baumgart, 2015). Igualmente, en ausencia de GTP, la dinamina no es capaz de deformar membranas con alta tensión superficial ya que su energía de polimerización es insuficiente para producir tubulación sobre la membrana de liposomas con estas tensiones laterales (Roux *et al.*, 2010; Shi and Baumgart, 2015). Por otra parte, si el tubo está preformado (por ejemplo, por motores moleculares u otra fuerza de tracción artificial), la tensión de la membrana actúa en sinérgica con la dinamina durante la constricción (Bashkirov *et al.*, 2008; Morlot *et al.*, 2012). Así la tensión lateral de la membrana regularía la fisión mediada por la dinamina durante la endocitosis al igual que lo hace con otros procesos celulares (Boulant *et al.*, 2011; Saleem *et al.*, 2015; Shi and Baumgart, 2015; Thottacherry *et al.*, 2017). Sin embargo, la tensión superficial de membrana no puede ser controlada mediante la composición de la misma.

Así, el segundo parámetro a considerar es la resistencia de la membrana a ser doblada, una función conocida de la composición lipídica (Bassereau, Sorre and Lévy, 2014). En ausencia de GTP, la actividad tubuladora de la dinamina sería más predominante en membranas suplementadas con PA (para el caso de lípidos cargados) y con fosfatidiletanolamina (Pe) (para el caso de los lípidos no cargados) (Takei *et al.*, 1998). Ambos lípidos tienen forma cónica con una pequeña cabeza hidrofílica, produciendo una desestabilización de la membrana que hace disminuir la rigidez a la flexión de la membrana. Una vez que el empaquetamiento lipídico de la membrana disminuye (Garcia-Manyes *et al.*, 2010; Kurczyk *et al.*, 2014), se facilita la inserción hidrofóbica de la hélice del dominio

PH de la dinamina. Este hecho explicaría por qué la dinamina se inserta mucho mejor en sistemas lipídicos que contienen PA (caso en el que se satisfaría la preferencia por lípidos cargados, al mismo tiempo que habría una disminución de la rigidez a la flexión) (Burger *et al.*, 2000)

Cuando se analizan las curvaturas características de los tubos creados por la dinamina en ausencia de GTP, se observa que el radio del tubo depende de la rigidez a la flexión de la membrana, de modo que se obtienen los tubos más anchos en membranas con alta rigidez a la flexión y tubos más estrechos en membranas de baja rigidez (Bashkirov *et al.*, 2008). Volviendo a los efectos producidos por los lípidos cónicos, en los estudios sobre la constricción cooperativa por endofilina y la dinamina de rata sobre membranas con diferentes cantidades de lípidos poli-insaturados, se observó que cuando la cantidad de estos lípidos aumenta, la rigidez a la flexión de la membrana disminuye produciéndose una mayor deformación de la membrana. El aumento de esta deformación sugiere que este tipo de lípidos podría influir de forma positiva en la creación de curvatura por parte de la dinamina (Pinot *et al.*, 2014).

Debido al hecho de que la dinamina se une a la membrana lipídica a través de la inserción de VL1 del dominio PH (Klein *et al.*, 1998), a parte de imponer su geometría a la membrana (Bashkirov *et al.*, 2008), los parámetros físicos de la membrana, en particular la tensión lateral y la rigidez a la flexión, pueden tener un efecto en la regulación de la función proteica (Campelo, McMahan and Kozlov, 2008). A su vez, como la rigidez a la flexión varía con la composición lipídica de la membrana, los lípidos se convierten de esta forma en reguladores del proceso de fisión mediados por dinamina.

En definitiva, la acción de la dinamina puede ser modulada no solo por la carga eléctrica de la membrana, sino también por su elasticidad relacionada con su composición molecular (Takei *et al.*, 1998; Roux *et al.*, 2006, 2010; Bashkirov *et al.*, 2008; Pinot *et al.*, 2014). Sin embargo, el mecanismo molecular de la regulación de la función de la dinamina aún está por clarificar. Mediante un análisis detallado de la tubulación y la constricción mediada por las isoformas Dyn1 y Dyn2 sobre membranas lipídicas con diferentes rangos de tensión superficial y rigidez a la flexión, este trabajo de tesis pretende aportar nueva

información necesaria para describir los detalles moleculares del proceso de fisión de la membrana mediado por las dinaminas clásicas.

2.4.3. Parámetros mecánicos de membrana lipídica que influyen en la creación de curvatura por parte de las dinaminas: análisis teórico

Los últimos 30 años de investigación han ayudado a comprender algunos aspectos del mecanismo de fisión de membrana mediado por la dinamina. Los dos modelos descritos más arriba proponen que la dinamina ha de constreñir la membrana lipídica como paso previo a la división de la misma. Las dos fuentes de energía para las dinaminas son su coordinada oligomerización y la posterior hidrólisis del GTP (Antonny *et al.*, 2016). Aquí examinaremos como esta energía es administrada por la Dyn1 y la Dyn2, teniendo en cuenta sus diferencias estructurales y funcionales. En estudios anteriores se observó que el autoensamblaje de la dinamina en ausencia de nucleótidos produce tubulación de liposomas (Sweitzer and Hinshaw, 1998; Praefcke and McMahon, 2004; Mattila *et al.*, 2015). Por tanto, se puede asumir que la polimerización helicoidal de las dinaminas en ausencia de GTP produce suficiente energía como para deformar la membrana lipídica y formar estructuras tubulares con acusada curvatura. No obstante, la producción de tubulación entre las isoformas varía, exhibiendo un mayor poder de creación de curvatura la Dyn1 (Liu *et al.*, 2011). Por esta razón, la diferente fuerza de polimerización entre ambas isoformas sería uno de los primeros aspectos a ser investigado. En primer lugar, necesitamos analizar la energía elástica que se necesita para formar un nanotubo lipídico a partir de una membrana plana (ver Figura 9) llegando a la siguiente relación:

$$\Delta E_{A \rightarrow B} = \Delta E_{\text{estiramiento}}(\sigma) + \Delta E_{\text{flexión}}(\kappa) - \Delta E_{\text{extracción-tubo}}(F) \quad (\text{Eq. 1})$$

Entonces, $\Delta E_{A \rightarrow B}$ tendría la forma:

$$\Delta E_{A \rightarrow B} = \sigma \Delta S_{A \rightarrow B} + \frac{1}{2} \kappa \frac{1}{R_{\text{tubo}}^2} \Delta S_{A \rightarrow B} - FL \quad (\text{Eq. 2})$$

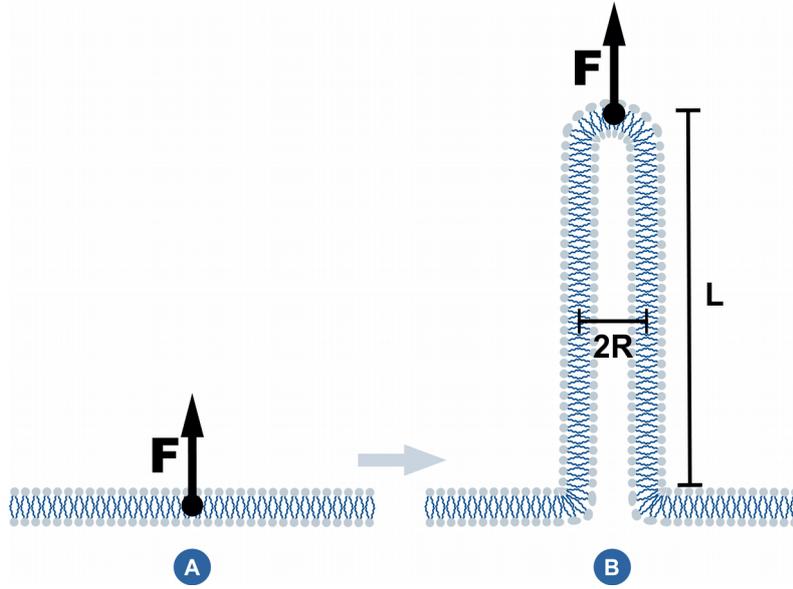


Figura 1.8. Proceso de formación de un tubo lipídico desde una superficie plana.

siendo $\Delta S_{A \rightarrow B}$ la diferencia de área de la membrana; κ , la rigidez a la flexión de la membrana; σ , tensión superficial de la membrana; R_{tubo} , el radio del tubo; L , la longitud del nanotubo y F , la fuerza necesaria para producir el nanotubo. Si la fuerza de polimerización de la dinamina, P , es la responsable de la extracción del nanotubo lipídico, la ecuación resulta como sigue:

$$\Delta E_{A \rightarrow B} = \sigma \Delta S_{A \rightarrow B} + \frac{1}{2} \kappa \frac{1}{R_{tubo}^2} \Delta S_{A \rightarrow B} - PL \quad (\text{Eq. 3})$$

Considerando que la longitud del tubo es constante, y usando el área de membrana de un cilindro, $\Delta S = S_{tubo} = 2\pi R_{tubo}L$, se puede reescribir la ecuación de la siguiente forma:

$$\Delta E_{A \rightarrow B} = 2\pi\sigma R_{tubo}L + \pi L \frac{\kappa}{R_{tubo}} - PL \quad (\text{Eq. 4})$$

En el punto de equilibrio (donde $\left(\frac{\partial E}{\partial R_{tubo}}\right)_{L=cte} = 0$), el R_{tubo} está relacionado con los parámetros elásticos de la membrana lipídica de la siguiente forma:

$$\boxed{R_{tubo} = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Por otra parte, si se asume una geometría con una curvatura constante:

$$\Delta E(R = R_{Tubo}) \rightarrow \Delta E_{Tubo} = 2\pi L\sqrt{2\kappa\sigma} - PL \quad (\text{Eq. 6})$$

La fuerza necesaria para formar un nanotubo lipídico está definida por:

$$\left(\frac{\partial E_{Tubo}}{\partial L}\right) = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} - P = 0 \quad (\text{Eq. 7})$$

Finalmente, la fuerza de polimerización mínima para generar un túbulo lipídico sería igual a:

$$P_{min} = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} \quad (\text{Eq. 8})$$

Los parámetros mecánicos (*rigidez a la flexión y tensión superficial*) de la membrana lipídica se pueden obtener a través de mediciones de fuerza en tubos lipídicos. Además, si se conoce uno de los parámetros, es posible obtener el radio de nanotubos y, por lo tanto, se puede caracterizar la geometría del nanotubo lipídico.

Por tanto, únicamente cuando la fuerza de polimerización de la dinamina satisface la ecuación (Eq. 9), se formará un nanotubo lipídico.

$$P \geq 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} \quad (\text{Eq. 9})$$

Por consiguiente existen 2 efectos acoplados de la mecánica lipídica en el proceso: un efecto sobre la polimerización (área de la membrana ocupada por la dinamina) y la curvatura final impuesta por la dinamina. Al ser la fuerza de polimerización de la dinamina sería siempre la misma, la producción de curvatura de la proteína dependería únicamente de la rigidez a la flexión de la membrana y la tensión superficial de la misma.

Por tanto, una buena estrategia para cuantificar la deformación de la membrana inducida por la dinamina sería la utilización de sistemas de membranas modelo con sus diferentes isoformas (Dyn1 y Dyn2) purificadas. De esta manera, algunos parámetros importantes como la concentración de proteínas, la composición de los lípidos, la rigidez a la flexión y la geometría de la membrana que no pueden ser controlados in vivo, pueden llegar a ser controlados

in vitro. Además, para poder investigar un proceso de remodelación de membrana se hace necesario utilizar plantillas de membrana con la capacidad de mostrar gradientes de curvatura de la membrana (Davis and Sowinski, 2008). Por esta razón, el primer objetivo de este trabajo será el desarrollo de nuevas membranas modelo que permitan una observación óptica por microscopía de amplios rangos de curvatura en un espectro controlado de tensiones.

3. Plantillas lipídicas para el estudio de los efectos de curvatura de las dinaminas

En la reconstitución de procesos de membrana in vitro, se utilizan habitualmente membranas modelo que imitan la geometría de orgánulos específicos. En el interior de la célula existen estructuras membranosas de todos los rangos de curvatura, desde estructuras de baja curvatura, como es el caso de la membrana plasmática con diámetros entre 1 y 120 μm , hasta estructuras de alta curvatura, como los tubos con diámetros de 5 nm correspondientes a los cuellos de vesículas y sitios de fisión/fusión la membrana. Los estudios de reconstitución en membranas modelo son una herramienta útil para comprender mejor la creación de curvatura en las células (Shnyrova and Zimmerberg, 2009). Sin embargo, las membranas modelo disponibles raramente se acercan a las curvaturas características que aparecen en los procesos de remodelación de membrana. A continuación, se revisarán y discutirán los principales enfoques y su aplicabilidad al estudio de la formación de túbulos de membrana por parte de las dinaminas.

Los liposomas con tamaños desde 50 nm hasta 1 μm , denominados **vesículas unilaminares grandes (LUVs)**, del inglés, “*Large Unilamellar Vesicles*”), se usan clásicamente para estudiar las deformaciones inducidas por proteínas a nanoescala (Sweitzer and Hinshaw, 1998; Saarikangas *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Kegulian *et al.*, 2015). Gracias al método de extrusión, que consiste en forzar pasar una suspensión de liposomas a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro definido, se pueden preparar liposomas con radios que varían desde los 30 a los 400 nm. Estos liposomas no

son perfectamente homogéneos, pero su distribución de tamaño puede evaluarse mediante microscopía electrónica o mediante la dispersión dinámica de la luz (Antonny, 2011). Debido a que los LUVs tienen tamaños por debajo de los límites de resolución óptica, son comúnmente utilizadas para caracterizar aspectos bioquímicos de la interacción dinamina-membrana (Zhao and Lappalainen, 2012; Busse *et al.*, 2013), tales como la asociación preferencial de la proteína a membranas de cierta curvatura y su auto-ensamblaje (Ramachandran and Schmid, 2008; Ramachandran *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Zhao and Lappalainen, 2012; Pinot *et al.*, 2014; Manni *et al.*, 2018) la actividad GTPasa estimulada por la curvatura de membrana (Leonard *et al.*, 2006), o la unión proteína-lípido (Leonard *et al.*, 2006; Ramachandran and Schmid, 2008; Wang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011).

Además, la crioEM aplicada a LUVs con gran porcentaje de lípidos con carga en su composición ha sido fundamental para los análisis ultraestructurales del autoensamblaje de las dinaminas y su actividad constrictora dependiente de GTP. Resulta que la Dyn1 es capaz de tubular estos liposomas, es decir, producir tubos de geometría cilíndrica recubiertos por el andamio proteico con un diámetro exterior de aproximadamente 50 nm (Sweitzer and Hinshaw, 1998), interno de 20 nm y con un paso de hélice de unos 13 nm. En presencia de GTP, la Dyn1 cambia su conformación reduciendo su diámetro externo hasta los 40 nm y el interno hasta los 10 nm, con un paso de hélice de 9,4 nm (Chen *et al.*, 2004; Danino, Moon and Hinshaw, 2004). Sin embargo, nunca se ha realizado un análisis crioEM comparativo entre las isoformas de las dinaminas clásicas.

En este trabajo pretendemos caracterizar cómo se comportan las isoformas Dyn1 y Dyn2 durante la tubulación de la membrana. Se planea calificar y cuantificar las diferencias estructurales que se puedan producir entre los túbulos formados por la Dyn1 y la Dyn2 sobre LUVs con diferentes rigideces a la flexión. Si bien hay varios medios para incrementar la rigidez a la flexión de la membrana (por ejemplo, mediante la adición de especies lipídicas “rígidas”, como el colesterol, que produce el ordenamiento de las colas de los lípidos (Seu *et al.*, 2006; Alwarawrah, Dai and Huang, 2010; Dimova, 2014), el ablandamiento de la bicapa lipídica se ha estudiado en menor grado. Hasta ahora se han identificado dos formas principales para ablandar la membrana. La primera se ha asociado con la poli-insaturación de las colas lipídicas (Pinot *et al.*, 2014; Manni

et al., 2018) y la segunda con la geometría molecular de las especies de lípidos, teniendo en cuenta que los lípidos cónicos promueven el ablandamiento de la bicapa lipídica (Fuller and Rand, 2001; Seu *et al.*, 2006; Dimova, 2014; Shi and Baumgart, 2015). En este trabajo seguimos la segunda ruta.

Aunque los experimentos con LUV (Sweitzer and Hinshaw, 1998) fueron determinantes para desentrañar los detalles moleculares de la constricción de la membrana mediada por la dinamina, aún queda por demostrar si los resultados obtenidos son específicos para las plantillas de membrana utilizadas. El sistema LUV tiene una limitación obvia, principalmente relacionada con el pequeño tamaño de las vesículas. La deformación de una LUV esférica (como con un balón de fútbol o un globo) produce inevitablemente un aumento de la tensión lateral de la membrana. Por lo tanto, es probable que la tubulación masiva de los LUVs esté asociada con la ruptura de la membrana (causada por el aumento de esta tensión), el efecto que se debe evitar en el contexto de la fisión fisiológica.

Otro modelo de membrana utilizado para el estudio de la interacción de la dinamina con la membrana son las vesículas unilamelares gigantes (GUVs) (Raucher and Sheetz, 1999; Neumann, Pucadyil and Schmid, 2013). GUVs son liposomas de tamaño celular (entre 1 y 100 μm) que pueden imitar la estructura básica del compartimento de todas las células biológicas (Walde *et al.*, 2010). Una de las principales ventajas de los GUVs es que, debido a sus grandes dimensiones (por encima del límite de resolución óptica), son fácilmente visibles y micromanipulables bajo un microscopio óptico, lo que permite la observación directa de fenómenos biofísicos relevantes a nivel de la membrana lipídica (Walde *et al.*, 2010; Dimova, 2014) Así se hace posible la obtención de imágenes para la reconstitución estructural de la membrana, la medición de la cinética de las transiciones entre diferentes morfologías (Zhang *et al.*, 2012) y la caracterización mecánica de la bicapa lipídica (Dimova, 2014). Sin embargo, la morfología de los GUV, incluso más que la de las LUVs, es sensible a las alteraciones de la mecánicas y composicionales de las membranas (Méléard *et al.*, 1998; Stachowiak, Hayden and Sasaki, 2010). Por ello uno de los objetivos de este trabajo será el desarrollo de una membranas lipídicas modelo mecánicamente robustas. Dichas plantillas de membrana se utilizarán para investigar cómo los lípidos regulan diferencialmente la actividad de curvatura y la mecanoquímica de la Dyn1 y la Dyn2.

4. Hipótesis y objetivos

Las hipótesis de este trabajo son:

- La rigidez aparente de la membranas modelo gobierna la(s) función(es) de la dinamina(s).
- Las isoformas de dinamina se adaptan a diferentes rigideces de membrana.

Los objetivos de este trabajo son:

- Creación y caracterización de membranas modelos para la visualización y cuantificación de la actividad de membrana de la dinamina.
- Análisis de los efectos de la rigidez a la flexión en la deformación de membrana producida por las isoformas 1 y 2 de las dinaminas clásicas.
- Análisis de los efectos de la rigidez a la flexión sobre la actividad GTPasa de las isoformas 1 y 2 de las dinaminas clásicas.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Equipamiento y materiales

1.1. Formación de Bicapas Suspendidas Gigantes (BGSs) y Vesículas Gigantes Unilaminares (GUVs)

Vórtex	2x ³ , Velp Scientifica [®] , Italia.
Película de Teflon [®]	Película de Teflón con 0,02” de grosor, y 24” de ancho, VS002X24, Fluoro-plastics Inc., EEUU.
Microesferas	Microesferas de Óxido de Silicio, Ø=40 µm, C-SI-O-40, Ref# 140256 Corpuscular, EEUU.
Película de Parafina	Película de Parafilm [®] M de 4”, SPI supplies, EEUU.
Bomba Peristáltica	2C 7,0 mbar, Vacuumbrand, Alemania.
Evaporador Rotatorio	vv micro, Heidolph, Alemania.
Mechero	MT-30, Master appliance Corp., EEUU.
Capilares de pared delgada	GB 150-10, Science Products, Alemania.

Tubos de microcentrífuga	Tubos Safe-Lock, 1,5 mL, Eppendorf, Alemania.
Agitador de microtubos con temperatura	Thermal Shake Lite 460-0249, VWR, EEUU.
Cubreobjetos	Cubreobjetos redondos N°1 de cristal con un $\varnothing=25$ mm, Ref# 41001125, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs, Alemania.
Cámara de observación de microscopía	QR-40LP para cubreobjetos circulares de $\varnothing=25$ mm, Warner Instruments, EEUU.
Gas de Argón comprimido	Alphagaz™, Air Liquide, Francia

1.2. Vesículas Grandes Unilamilaes (LUVs)

Vórtex	2x ³ , Velp Scientifica®, Italia.
Película de Teflon®	Película de Teflón con 0,02'' de grosor, y 24'' de ancho, VS002X24, Fluoro-plastics Inc., EEUU.
Bomba Peristáltica	2C 7,0mbar, Vacuumbrand, Alemania.
Evaporador Rotatorio	vv micro, Heidolph, Alemania.
Agitador-calefactor magnético	ARE, Velp Scientifica, Italia.
Tubos de microcentrífuga	Tubos Safe-Lock, 1,5 mL, Eppendorf, Alemania.
Película de Parafina	4'' Parafilm® M Barrier Film, SPI supplies, EEUU.
Gas Argón comprimido	Alphagaz™, Air Liquide, Francia.
Nitrógeno líquido	Air Liquide, Francia.
Gas Nitrógeno comprimido	Alphagaz™, Air Liquide, Francia.
Extrusora para liposomas	Lipex Extruder, Transferra, Canadá.
Membranas de policarbonato	Membranas Whatman® Nuclepore™ Track-etched $\varnothing=25$ mm, con tamaño de poro de 0,1 μm . Ref#110605, Merk-Millipore, Alemania.

Baño termostático CBN 18-30, Heto-Holten, Alemania.

1.3. Nanotubos lipídicos (NTs)

Película de Teflón®	Película de Teflón con 0,02” de grosor, y 24” de ancho, VS002X24, Fluoro-plastics Inc., EEUU.
Microesferas	Microesferas de Óxido de Silicio, Ø=40 µm, C-SI-O-40, Ref# 140256 Corpuscular, EEUU.
Película de Parafina	Película de Parafilm® M de 4”, SPI supplies, EEUU.
Bomba Peristáltica	2C 7,0 mbar, Vacuumbrand, Alemania.
Evaporador Rotatorio	vv micro, Heidolph, Alemania.
Mechero	MT-30, Master appliance Corp., EEUU.
Capilares de pared delgada	GB 150-10, Science Products, Alemania.
Tubos de microcentrífuga	Tubos Safe-Lock, 1,5 mL, Eppendorf, Alemania.
Cubreobjetos	Cubreobjetos redondos No,1 con cristal de diámetro de 25mm, Ref# 41001125 Waldemar Knittel Glasbearbeitungs, Alemania.
Cubreobjetos	Cubreobjetos redondos No,1 con cristal de diámetro de 15mm, Ref# 41001115 Waldemar Knittel Glasbearbeitungs, Alemania.
Cámara de observación de microscopía	QR-40LP para cubreobjetos circulares de 25 mm, Warner Instruments, EEUU.
Argón comprimido	Alphagaz™, Air Liquide, Francia.
Láminas adhesiva doble cara	SecureSeal Adhesive Sheet SA-S-1L, Grace Bio-Labs, EEUU.

1.4. Lípidos

- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 18:1 (Δ^9 -cis) PC, DOPC
 Ref# 850375 Avanti Polar Lipids Inc., EEUU
- 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 16:0-18:1 PC, POPC
 Ref# 850457 Avanti Polar Lipids Inc., EEUU
- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 18:1 (Δ^9 -cis) PE, DOPE
 Ref# 850725 Avanti Polar Lipids Inc., EEUU
- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal sódica), 18:1 PS, DOPS
 Ref# 840035 Avanti Polar Lipids Inc., EEUU
- L- α -fosfadilinositol-4,5-bisfosfato (Cerebro, Porcino) (Sal amónica), PI(4,5)P₂
 Ref# 840046 Avanti Polar Lipids Inc., EEUU
- Colesterol (Lana ovina, >98%), Chol
 Ref# 700000 Avanti Polar Lipids Inc., EEUU
- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Lisamina rodamina B sulfonil) (sal amónica), 18:1 Liss Rhod PE, Rh-dOPE
 Ref# 810150 Avanti Polar Lipids Inc., EEUU
- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoethanolamina-N-KK114, Abberior STAR RED-dOPE
 Ref# 2-0301-011-0 Abberior GmbH, Alemania.
- 6-dodecanoil-N,N-dimetil-2-naftilamina, Laurdan
 Ref# 40227 Sigma, Sigma-aldrich, EEUU.

1.5. Purificación de proteínas

- | | |
|----------------------------------|--|
| Células de insecto Sf9 | Línea celular de tejido ovárico pupal de Spodoptera frugiperda, Ref# 89070101, Sigma, Sigma-aldrich, EEUU. |
| Coctel de Inhibidor de proteasas | cOmpete Tablets EASYpack Ref# 04693116001, Roche, Alemania. |

Rotor Ti70	Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc, EEUU.
Centrífuga	Ultra Optima L90K Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc, EEUU.
Centrífuga	Heraeus™ Biofuge™ Stratos, Ref# 75005283 Thermo Fisher Scientific, EEUU.
Sonicador	Soniprep 150, MSE, Reino Unido.
GST Microesferas	Pierce™ Glutathione Magnetic Agarose Microesferas, Ref# 78601, ThermoFisher Scientific Inc., EEUU
Agitador-calefactor magnético	ARE, Velp Scientifica, Italia.
Columna Cromatografía por gravedad	Columns Econo-Pac®, Bio-rad, Bio-Rad Laboratories, Inc, EEUU
Kit de análisis de proteínas BCA	Ref# 23227, ThermoFisher Scientific Inc., EEUU
Concentradores de Proteína	Filtros de centrifugación, Amicon Ultra -0,5ml, Merk-Millipore, Alemania

1.6. Tampones y sus componentes

Cloruro Potásico, KCl	Ref# P9333, SigmaUltra, Sigma-aldrich, EEUU.
Cloruro Sódico, NaCl	Ref# S7653, SigmaUltra, Sigma-aldrich, EEUU.
Tampón de HEPES	1M pH 7,3 Ref# BP299 Fisher Bio reagents, Thermo Fisher Scientific, EEUU.
Ácido Etilenodiaminatetraacético en solución, EDTA	0,5M, pH 8,0 Ref# 03690, FlReino Unidoa, Sigma-aldrich, EEUU.

Ácido

Etilenoglicoltetraacético, EGTA Ref# E3889, Sigma, Sigma-aldrich, EEUU.

1,4-dithiothreitol, DTT Ref# GE17-1318-01, Sigma, Sigma-aldrich, EEUU

Cloruro Magnésico, MgCl₂ Ref# 63069, Sigma, Sigma-aldrich, EEUU

Cloruro Cálcico, CaCl₂ Ref# 21115, FlReino Unido Analytical, Sigma-aldrich, EEUU

Sacarosa Ref# 84097, Sigma, Sigma-aldrich, EEUU

D-(+)-Trehalosa dihidratada Ref# T9449, Sigma, Sigma-aldrich, EEUU

Serum Bovino de Albúmina (BSa) Ref# 10829410, Thermo Scientific, EEUU

1.7. Disolventes Orgánicos.

Cloroformo grado HPLC Ref# 366927, Sigma-aldrich, EEUU.

Metanol grado ≥ 99,8 % NORMAPUR Ref# 20847, VWR, EEUU.

Etanol grado ≥ 99,5 % EMSURE Ref# 100983, Merk Millipore, EEUU

1.8. Sondas Fluorescentes

HiLyte™ 488 sal amina TFA

Ref# AS-81162 AnaSpec Inc., EEUU

Fluoresceina Isotiocianato–dextrano, 3.000 – 5.000 MW

Ref# FD4 Sigma, Sigma-aldrich, EEUU

Fluoresceina Isotiocianato–dextrano, 10.000 MW

Ref# FD10S Sigma, Sigma-aldrich, EEUU

Fluoresceina Isotiocianato–dextrano, 40.000 MW

Ref# FD40S Sigma, Sigma-aldrich, EEUU

1.9. Otros materiales

Columnas desaladoras por centrifugación	Ref# 89882, ThermoFisher Scientific Inc., EEUU
Cubetas de Fluorescencia	Ref# MAPM-f10-100, Labbox, España
Geles de electroforesis SDS-PAGE	Geles Precise para proteínas de 4-20%, Ref# 25224 Thermo-Scientific, EEUU.

1.10. Microscopía óptica de epifluorescencia

Microscopio invertido Eclipse Ti-e, Nikon, Japón

Lente	CFI S Plan Fluor ELWD 40X (NA=0,60), Nikon, Japón
Lente	CFI Apo TIRF 100X Oil (NA=1,49), Nikon, Japón
Cámara	CASCADE II, Photometrics, EEUU
Lámpara de Fluorescencia	pE-4000, Cooled, Reino Unido
Unidad de PC	Dell Inc., EEUU.
Mesa óptica	Newport, EEUU.
Filtro de fluorescencia	560/585, FF560/25 TRITC, Semrock, EEUU.
Filtro de fluorescencia	485/505, FF01-485/20 FITC, Semrock, EEUU.

Microscopio invertido IX-70, Olympus, Japón

Lente	UPlanFL N 10X/0,30 (NA=0,30), Olympus, Japón.
Lente	LUCPlan FL N 40X/0,60(NA=0,60), Olympus, Japón.
Lente	UAp o 150X/1,45 Oil TIRFM (NA=1,45), Olympus, Japón.
Cámara	iXon EM+, Andor, Irlanda.
Cámara	Zyla 5.5 sCMOS, Andor, Irlanda.
Lámpara de Fluorescencia	Series 120PC Q, X-cite, Lumen dynamics, EEUU.
Filtro de fluorescencia	560/585, FF560/25 TRITC, Semrock, EEUU.
Filtro de fluorescencia	485/505, FF01-485/20 FITC, Semrock, EEUU.
Filtro de fluorescencia	649/662, FF01-649/13 CY-5, Semrock, EEUU.
PC workstations	Dell Inc., EEUU.
Mesa Optica	Newport, EEUU.

1.11. Microscopía óptica confocal**Microscopio confocal TCS SP5 II, Leica Microsystems GmbH, Alemania**

Detectores Fotomultiplicadores (PMT)	Air-cooled R9624 Hamamatsu Photonics, Japón.
Lente	HCX PL APO 63x/1,20 W CORR lbd.blue (NA=1,2) Leica Microsystems GmbH, Alemania.
Lente	HCX PL FLUOTAR 100x/1,30 Oil (NA=1,4) Leica Microsystems GmbH, Alemania.
Unidad de PC	Dell Inc., EEUU.

Mesa óptica Newport, EEUU.

1.12. Criomicroscopía electrónica

Crio-microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) JEM-2200FS/CR, JEOL Inc., Tokio, Japón.

Cámara CCD	16 megapíxeles, (4096 x 4096 píxeles) modelo 895 US4000, GATAN, EEUU.
Software	JEM-toolbox, TEMography.com, Japón.
Robot de vitrificación automático	Vitrobot, FEI, Holanda.
Sistema de recubrimiento de alto vacío para evaporación de carbón y descarga luminiscente.	MED 020, BALTEC, Suiza.
Rejillas de carbono tipo “holey”	R2/2, Quantifoil [®] , Quantifoil Instruments GmbH, Alemania.

1.13. Fluorimetría

Fluorímetro QuantaMaster 40 espectrofluorímetro, PTI, Horiba Scientific, EEUU.

1.14. Otro equipamiento

Osmómetro Cryoscopic osmometer, Osmomat 300, Gonotec, Alemania.

Baño sonicador	FB15049, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, EEUU.
Papel medidor de pH	Macherey-Nagel, Alemania.
Balanza	CP32025, Sartorius, Alemania.
Balanza	CP225D, Sartorius, Alemania.
Balanza	ME36S-0CE, Sartorius, Alemania.
Mini centrífuga	2507/11, Nahita, Japón.
Centrífuga	Biocen 22 R, Ortoalresa, España.
Sistema de purificación de agua	Ultrapure Direct-Q® 3 UV, Merck-Millipore, Alemania.
Pipetas de un canal con volumen variable	0,1-2, 2-20, 20-200, 100-1000, Discovery Comfort, HTL, Alemania.
Lector de placas	Synergy HT, BioTek Instruments Inc., EEUU.
Análisis de tamaño de partícula	Zetasizer Nano S, Malvern Panalytical Instruments Ltd., Reino Unido.

1.15. Software de adquisición de datos

PTI FelixGX, Horiba Scientific, EEUU.

Micro-Manager 1,4, version 1, Micro-Manager, NIH, EEUU.

LAS AF 2,6,3 Leica Microsystems GmbH, Alemania.

1.16. Software de análisis de datos

Image J 64, 1,50n, NIH, EEUU

Origin 8 SR4, OriginLab Inc., EEUU

Matlab R2016b, The Mathworks Inc., EEUU

IBM® SPSS® Statistics v22, IBM Corp.©, EEUU

2. Métodos

2.1. Membranas modelo

2.1.1. Formación de vesículas multilaminares (MLVs)

Todas las membranas modelo utilizadas en este trabajo tienen como punto de partida la formación de vesículas multilaminares (MLVs). La composición lipídica junto con la concentración de lípido utilizada para la preparación de los diferentes MLVs usados en esta tesis están recogidas en la Figura 2.1 y la Tabla 2.2.

Los pasos seguidos para formar MLVs fueron los siguientes (ver Figura 2.1):

1. El volumen necesario de cada stock de lípido fue mezclado en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL safe-lock Eppendorf®.
2. Tras secar bajo vacío durante 15 min se observó la formación de una película lipídica sobre las paredes del microtubo

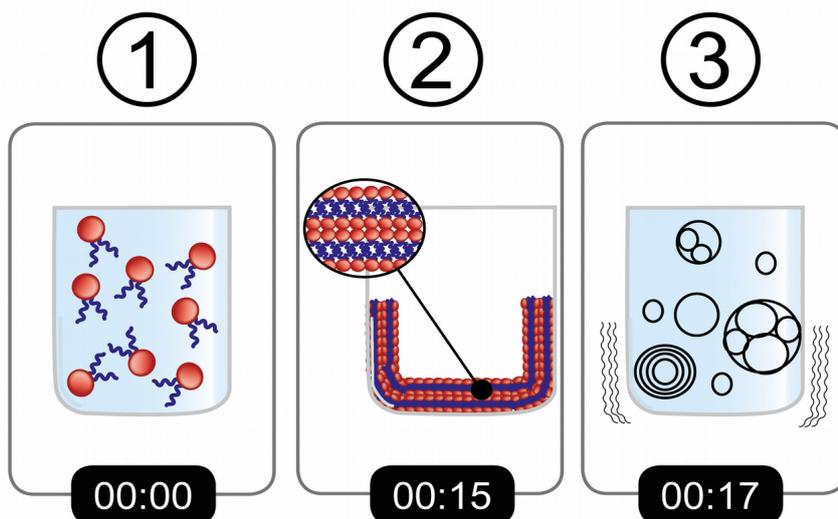


Figura 2.1 Formación de vesículas multilaminares (MLVs).

- La película lipídica se hidrató con agua Milli-Q a temperatura ambiente vórtexando vigorosamente hasta que la película lipídica se separó totalmente de la pared del tubo, formándose así las MLVs. (Para preparar LUVs, la película se hidrató con el tampón de trabajo correspondiente a 60°C durante 1 h).

Capítulo 3		
Principios de formación de BGSs	POPC:Rh-dOPE (99:1%mol) DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (25:24:30:15:5:1%mol)	1 g/L 1 g/L
La formación de BGSs depende del reservorio lipídico	POPC:Rh-dOPE (99:1%mol) DOPC:Rh-dOPE (99:1%mol)	0,33 g/L, 1 g/L, 2 g/L 0,25 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L
Cómo afecta el tampón de hidratación a los BGSs	DOPS:Chol:Rh-dOPE (89:10:1%mol) POPC:Rh-dOPE (99:1%mol)	0,5 g/L _(KCl) , 1 g/L _(Sacarosa) 1g/L
Permeabilidad de los BGSs	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (25:24:30:15:5:1%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (40:6,5:30:15:5:3,5%mol)	1 g/L
Remodelación de Membrana	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (40:6,5:30:15:5:3,5%mol)	1 g/L

Tabla 2.1. Composiciones y concentraciones lipídicas para los MLVs utilizados en el Capítulo 3 de este manuscrito.

Capítulo 4		
Polarización Generalizada de Laurdan	DOPC:Laurdan (99,9:0,1%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Laurdan(79,9:20:0,1%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Laurdan(59,9:40:0,1%mol)	1 g/L
	POPC:Laurdan(99,9:0,1%mol)	1 g/L
	POPC:DOPE:Laurdan(79,9:20:0,1%mol)	1 g/L
	POPC:DOPE:Laurdan(66,5:33,3:0,1%mol)	1 g/L
	POPC:DOPE:Laurdan(59,9:40:0,1%mol)	1 g/L
Caracterización de NTs Lipídicos	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:Rh-dOPE (44,5:10:30:15:0,5%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:Rh-dOPE (29,5:25:30:15:0,5%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:Rh-dOPE (19,5:35:30:15:0,5%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:Rh-dOPE (9,5:45:30:15:0,5%mol)	1 g/L
Tubulación de membrana mediada por la Dyn (Imagen Confocal)	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (40:8:30:15:5:2%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (25:23:30:15:5:2%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (15:33:30:15:5:2%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (5:43:30:15:5:2%mol)	1 g/L
Remodelación de Membrana por crioEM	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ (41:10:30:15:4%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ (6:45:30:15:4%mol)	1 g/L
Constricción de membrana mediada por la Dyn	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (40:6,5:30:15:5:3,5%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (25:21,5:30:15:5:3,5%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (15:31,5:30:15:5:3,5%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ :Rh-dOPE (5:41,5:30:15:5:3,5%mol)	1 g/L
Unión de membrana de la Dyn y Actividad GTPasa de la Dyn	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ (41:10:30:15:4%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ (26:25:30:15:4%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ (16:35:30:15:4%mol)	1 g/L
	DOPC:DOPE:Chol:DOPS:PI(4,5)P ₂ (6:45:30:15:4%mol)	1 g/L

Tabla 2.2 Composiciones y concentraciones lipídicas para los MLVs utilizados en el Capítulo 4 de este manuscrito.

2.1.2. Formación de Vesículas Unilaminares Grandes (LUVs)

La formación de LUVs está representada en la Figura 2.2 y se puede resumir con los siguientes pasos:

1. Los MLVs se formaron siguiendo el paso 2.1.1 Formación de vesículas multilaminares (MLVs), sustituyendo el agua Milli-Q por el tampón de hidratación correspondiente (ver Tabla 2.3).

Tampón de hidratación	
Polarización Generalizada de Laurdan	KCl:HEPES:EDTA (150:20:1mM)
Remodelación de Membrana por crioEM Unión de membrana de la Dyn	Sacarosa:HEPES (300:1 mM)
Actividad GTPasa de la Dyn	NaCl:HEPES:EDTA:MgCl ₂ (150:20:1mM)

Tabla 2.3. Tampón de hidratación para los diferentes LUVs preparados en esta tesis.

2. Los MLVs se sometieron a 10 ciclos congelación en nitrógeno líquido seguida de una descongelación en agua a ~35°C hasta la descongelación total de la mezcla. Este proceso permitió la fusión de las vesículas, formándose vesículas de mayor tamaño.

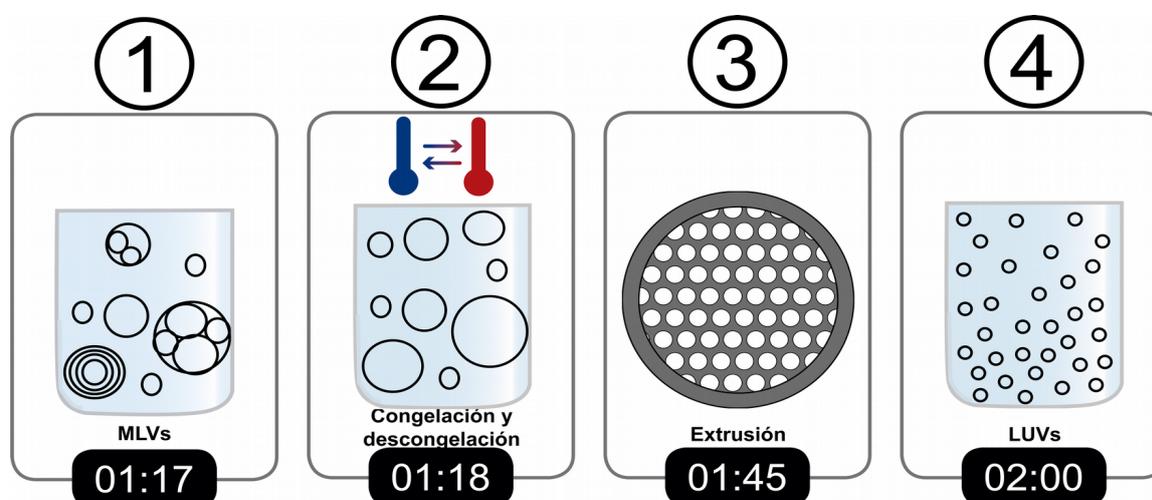


Figura 2.2. Representación esquemática de la formación de vesículas unilaminares grandes (LUVs)

- Las vesículas se pasaron 10 veces a través de filtros de policarbonato con el tamaño del poro deseado (100 o 400 nm) aplicando una presión de 20 bar a 55°C.

2.1.3. Formación de Bicapas Gigantes Soportadas (BGSs)

La formación de BGSs se compone de los pasos que se encuentran recogidos en la Figura 2.3:

- La formación de BGSs se inicia con la formación de MLVs según el apartado 2.1.1 Formación de vesículas multilamlares (MLVs).
- 10 μ L de MLVs fueron depositados formando 4 gotas sobre una placa petri recubierta con una fina película de Teflón®. A cada gota de MLVs se le añadió una pequeña cantidad de microesferas de sílice de 40 μ m de

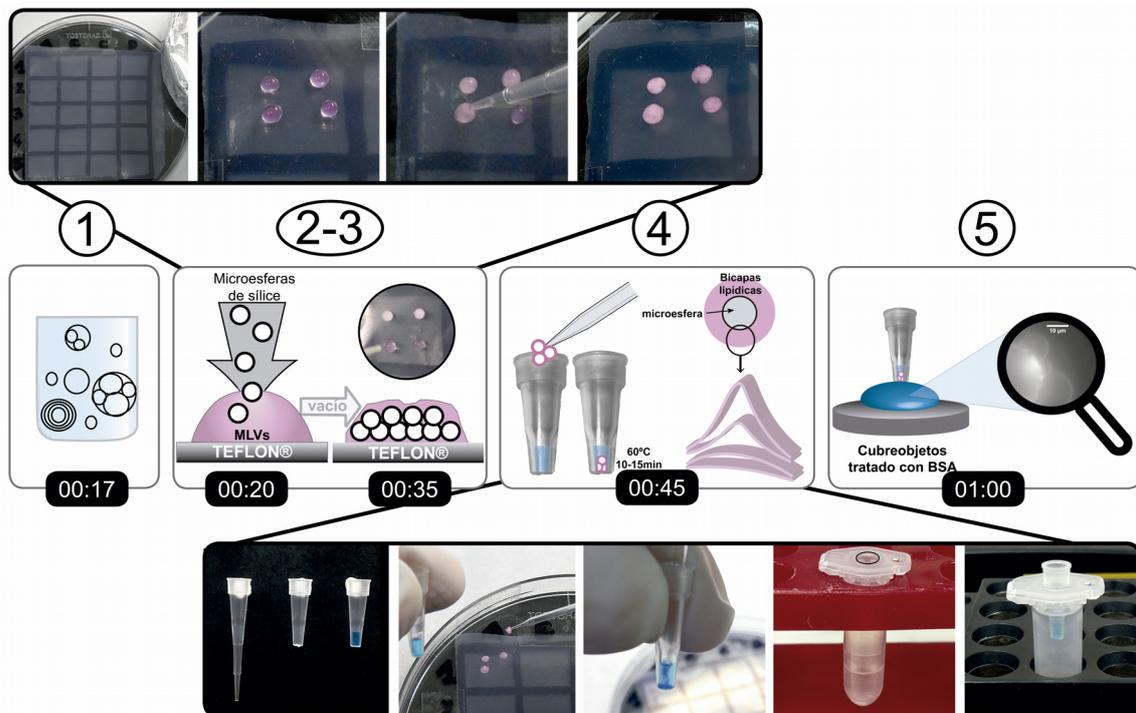


Figura 2.3. Pasos en la formación de BGSs. Barra de escala 10 μ m.

diámetro. Para ello una punta de micropipeta conteniendo 1 μL de precipitado de microesferas de sílice de 40 μm se puso en contacto con cada una de las gotas de MLVs. Las microesferas precipitaron dentro de las gotas.

3. Las gotas conteniendo las microesferas se secaron durante 15 min en vacío, dando lugar a la formación de una película multilaminar sobre la superficie de las microesferas.
4. Con la ayuda de un capilar de vidrio de patch-clamp cerrado en la punta con calor, las microesferas conteniendo el film lipídico se depositaron en una punta de micropipeta de 10 μL (cortada por encima del nivel de 2 μL) previamente se llenó con 5 μL de tampón de hidratación deseado (ver Figura 2.4). Las lamelas lipídicas sobre las microesferas fueron así prehidratadas durante 10-15 min a 60 °C.
5.
 - a) Se preparó la cámara de observación de microscopía. Para ello, un cubreobjetos de vidrio circular de 25 mm y anchura 0,13 mm se sometió a una limpieza por sonicación en etanol al 70% durante 30 min. Después se lavó 3 veces en agua Milli-Q para eliminar cualquier resto de etanol que pudiese quedar. A continuación, se realizó un tratamiento con BSA para minimizar la adhesión de lípidos al vidrio. Para ello, el cubreobjetos se depositó sobre una solución de 0.1 g/L de BSA durante 15 min y se lavó en agua Milli-Q durante 5 minutos. Una vez montada la cámara de observación con el cubreobjeto así tratado, se añadió el tampón de trabajo (KCl: HEPES: EDTA (150:20:1 mM) en el caso del Capítulo 3 y NaCl: HEPES: EDTA (150:20:1 mM) + 0,5 μM de Dyn en el caso del Capítulo 4). La cámara de observación se montó sobre la mesa del microscopio óptico.
 - b) Las microesferas de sílice prehidratadas se transfirieron a la cámara de observación de microscopía previamente preparada. Este paso se realizó simplemente tocando la superficie del tampón de trabajo con la punta de plástico cortada. Las microesferas con los BGSs fueron depositadas

sobre la superficie del cubreobjetos de la cámara de observación debido a la gravedad. Los BGSs comenzaron a estabilizarse alcanzando su tamaño final en unos 15 min.

Tampones de prehidratación	
Diferentes tampones de prehidratación para la formación de BGSs.	Sacarosa:HEPES (1M:1mM) KCl:HEPES (0,5M:1mM)
Cómo afecta la concentración del tampón de prehidratación a la formación de los BGSs.	Sacarosa:HEPES (0,3M:1mM) Sacarosa:HEPES (0,6M:1mM) Sacarosa:HEPES (1M:1mM) Sacarosa:HEPES (1,5M:1mM) Sacarosa:HEPES (2M:1mM) Trehalosa:HEPES (0,3M:1mM) Trehalosa:HEPES (0,6M:1mM) Trehalosa:HEPES (1M:1mM) Trehalosa:HEPES (1,5M:1mM)
Diferentes sacáridos como tampones de prehidratación.	Trehalosa:HEPES (1M:1mM) Sacarosa:HEPES (1M:1mM)
Permeabilidad de los BGSs. Remodelación de membrana. Influencia de los lípidos con curvatura con la función de la dinamina.	Trehalosa:HEPES (1M:1mM)

Tabla 2.4. Tampones de prehidratación de BGSs utilizados.

2.1.4. Preparación de Vesículas Unilamlares Gigantes (GUVs)

Los GUVs han sido preparados usando las mejoras que ofrecen las microesferas en la hidratación de bicapas lipídicas. Los pasos a seguir fueron los siguientes (ver Figura 2.4):

1. Se siguieron los pasos 1 a 4 del protocolo para la formación de BGSs (apartado 2.1.3).
2. Las microesferas fueron transferidas al tampón de trabajo (KCl:HEPES:EDTA (150:10:1mM) para Capítulo 3 y NaCl:HEPES:EDTA (150:20:1mM) para Capítulo 4). A continuación, se llenó un tubo de

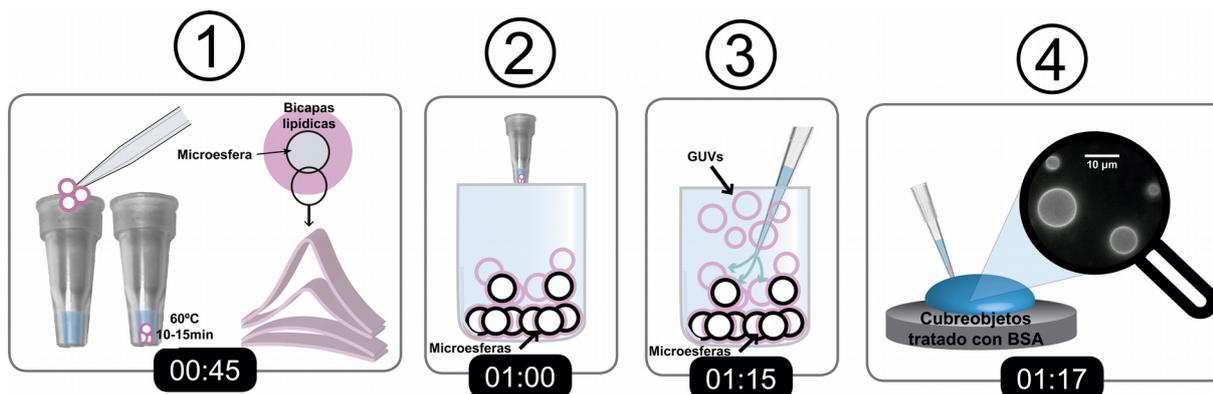


Figura 2.4. Formación de GUVs a partir de BGSs.

micro-centrífuga de 1.5 mL con 30-40 μL del tampón de trabajo. Los BGS fueron transferidos al microtubo tocando la superficie del tampón con la punta de plástico cortada. Las microesferas se depositaron en el fondo del tubo por gravedad.

3. Tras la estabilización de los BGSs a los ~ 15 min, se realizaron 3 agitaciones cuidadosas con una micropipeta de 50 μL para soltar las BGSs de las microesferas. Las BGSs se cerraron y formaron GUVs que flotaban en el sobrenadante de la mezcla, mientras que las microesferas formaron el pellet por gravedad.
4. Se preparó la cámara de observación de la forma idéntica al paso 5.a del apartado 2.1.3. 2-3 μL del sobrenadante que contenía los GUVs se traspasó a la cámara de observación para su posterior observación por microscopía óptica.

2.1.5. Nanotubos lipídicos (NTs)

Los nanotubos lipídicos (NTs) fueron preparados usando el reservorio lipídico de las microesferas de sílice. Los pasos están explicados a continuación y representados en la Figura 2.5.

1. Se formó el reservorio lipídico sobre las microesferas (ver pasos 1-3 del apartado 2.1.3).
2. Se cortaron 2 tiras de lámina adhesiva de doble cara de aproximadamente 2x20 mm. Estas tiras fueron pegadas sobre un cubreobjetos de $\varnothing=25\text{mm}$ previamente tratado con BSA (paso 5.2. del apartado 2.1.3). A continuación, se colocó otro cubreobjetos de $\varnothing=15\text{mm}$ (también tratado con BSA) sobre las tiras adhesivas formándose así un canal.
3. El canal formado se llenó con 20-30 μL del tampón de trabajo (NaCl:HEPES:EDTA (150:10:1 mM)). Por último, se hicieron rodar las microesferas con reservorio lipídico a lo largo del canal.

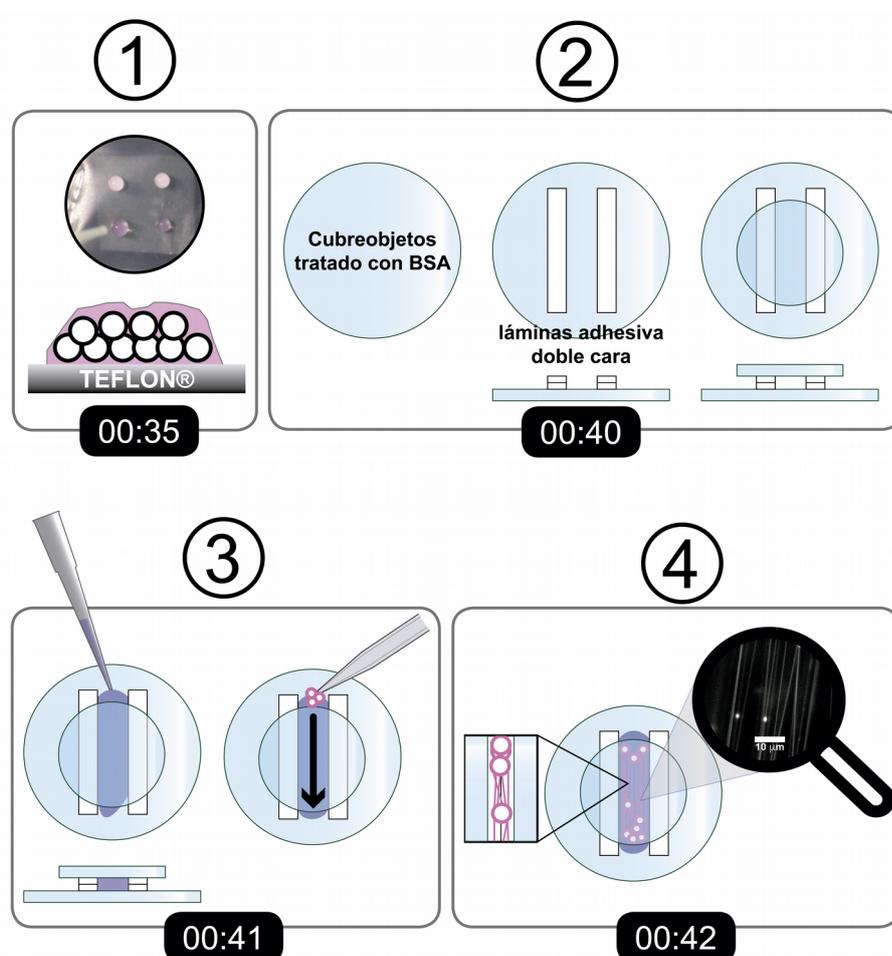


Figura 2.5. Formación de NTs lipídicos.

- Los NTs lipídicos se formaron entre las microesferas y fueron observados por microscopía óptica.

2.1.6. Preparación de los parches planos de lípido a partir del reservorio de las microesferas

Los parches planos fueron formados como se describió previamente en (Pucadyil and Schmid, 2010). Los pasos necesarios para su formación son los siguientes (ver Figura 2.6):

- Se formó el reservorio lipídico sobre las microesferas (ver pasos 1-3 del apartado 2.1.3).
- Las microesferas fueron depositadas en el tampón de trabajo (ver Tabla 1.5) de la cámara de observación de microscopía con la ayuda de una pipeta de vidrio de patch-clamp. **Importante:** En este caso, el cubreobjetos no debe ser tratado con BSA, pero si debe ser lavado siguiendo el protocolo descrito en el paso 5.2. del apartado 2.1.3. La adherencia a la superficie del cristal del cubreobjetos limpio hace que la película lipídica se deposite desde la microesfera al cubreobjetos.

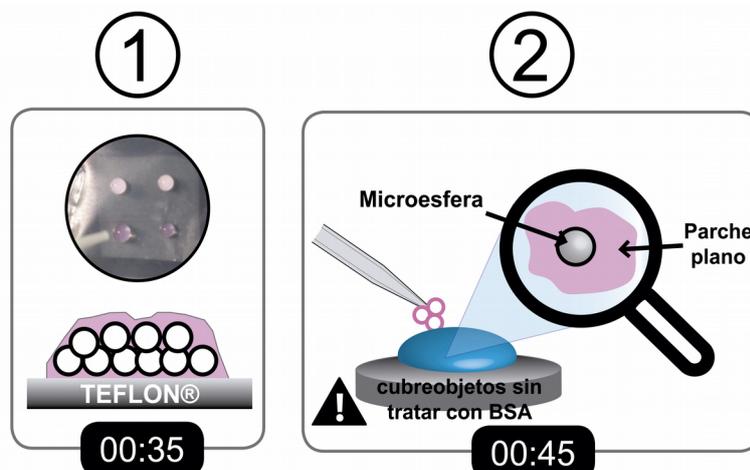


Figura 2.6. Formación de parches planos.

Tampón de trabajo	
CAPÍTULO 3	KCl:HEPES:EDTA(150:20:1mM)
	Sacarosa:HEPES (0,3M:1mM)
	Sacarosa:HEPES (0,6M:1mM)
	Sacarosa:HEPES (1M:1mM)
	Sacarosa:HEPES (1,5M:1mM)
	Sacarosa:HEPES (2M:1mM)
	Trehalosa:HEPES (0,3M:1mM)
	Trehalosa:HEPES (0,6M:1mM)
	Trehalosa:HEPES (1M:1mM)
Trehalosa:HEPES (1,5M:1mM)	
CAPÍTULO 4	NaCl:HEPES:EDTA(150:20:1mM)

Tabla 2.5 Tampones de trabajo utilizados para la formación de parches lipídicos en este trabajo.

2.2. Purificación de proteínas

Los plásmidos necesarios para la purificación de la Dyn1 así como las alícuotas de Dyn2-aTTO utilizadas en este trabajo han sido amablemente proporcionados por el grupo de la Dra. Sandra L. Schmid del UT Southwestern Medical Center en Dallas, Texas, EE.UU. Las proteínas han sido purificadas a partir de células de insecto por afinidad en dominios SH3 recombinantes (Neumann, Pucadyil and Schmid, 2013) siguiendo los protocolos descritos previamente (Stowell *et al.*, 1999). Tras la diálisis final, se realizó una cuantificación colorimétrica de la proteína total presente en la muestra por medio de un ensayo BCA comercial basado en la reacción de Biuret (la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por la proteína en un medio alcalino). La proteína estándar utilizada fue la albúmina del sérum bovino, BSA. Los valores para la curva estándar y para las muestras de proteínas se midieron a una longitud de onda de emisión de 562 nm utilizando un lector de placas.

2.3. Espectroscopia de fluorescencia

2.3.1. Determinación del tamaño de LUVs

El tamaño de las LUV se midió mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) con un equipo Zetasizer a temperatura ambiente. La muestra se preparó con 50 μL de liposomas a 1 g/L en 2 mL de tampón de trabajo.

2.3.2. Mediciones de la golarización generalizada del Laurdan.

50 μL de una disolución a 1 g/L de LUVs de 100 nm en diámetro dopados con 0,1 %mol de Laurdan en su composición fueron diluidos en 2 mL de KCl:HEPES:EDTA (150:20:1 mM). Mediante fluorimetría, se adquirieron los espectros de fluorescencia de emisión de las muestras para $\lambda_{\text{em}}=400\text{-}600$ nm cuando eran excitados a $\lambda_{\text{ex}}=360$ nm con agitación constante a temperatura ambiente. Para obtener el blanco de fluorescencia de la muestra, se analizó el espectro de emisión del tampón de trabajo sin LUVs.

2.4. Microscopía de fluorescencia

2.4.1. Imágenes de epifluorescencia

Las imágenes de fluorescencia de las diferentes membranas modelo se realizaron mediante un microscopio invertido Eclipse Ti-e de Nikon (con objetivos x40 y x100) equipado con las cámaras CASCADE II, y Zyla 5.5 sCMOS de

Andor, controladas por el software μ Manager (Edelstein *et al.*, 2010). Las muestras fueron iluminadas mediante una fuente de epifluorescencia Cooled a la menor potencia posible para minimizar el fotoblanqueo de la muestra. El filtro 560/585 (FF560/25 TRITc) fue usado para monitorizar el canal de membranas marcadas con Rh-dOPE. Las imágenes fueron recogidas con un tiempo de exposición de 100 ms y analizadas usando ImageJ. La fluorescencia del fondo fue sustraída de cada imagen antes de ser analizada.

2.4.2. Permeabilidad de los BGSs

Para preparar BGSs y GUVs con sonda fluorescente encapsulada, se disolvió la sonda en Trehalosa:HEPES (1M:1mM) a una concentración de 0.5-1 g/L (dependiendo de la intensidad de emisión de fluorescencia de la sonda). Este tampón se usó en la etapa de prehidratación de los BGSs, asegurando así la encapsulación de la sonda. Una vez depositados los BGSs y los GUVs en la cámara de observación de microscopía, la muestra se perfusionó cuidadosamente hasta hacer desaparecer la fluorescencia de fondo de la muestra. Pasados 10 min se tomaron imágenes usando un microscopio invertido Eclipse Ti-e de Nikon (con objetivos x40 y x100) equipado con las cámaras CASCADE II, y Zyla 5.5 de Andor, controladas por el software μ Manager (Edelstein *et al.*, 2010). Las muestras fueron iluminadas mediante una fuente de epifluorescencia Cooled a la menor potencia posible para minimizar el fotoblanqueo de la muestra. El filtro 560/585 (FF560/25 TRITc) fue usado para monitorizar el canal de membranas marcadas con Rh-dOPE y el filtro 485/505 (FF01-485/20 FITc) para el canal de las sondas encapsuladas marcadas con Alexa488 o un fluoróforo similar. Las imágenes fueron recogidas con un tiempo de exposición de 200 ms, con un tamaño de 2048x2048 píxeles y analizadas usando ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). La fluorescencia de fondo fue sustraída de cada imagen antes de ser analizada.

2.4.3. Caracterización de nanotubos lipídicos

La caracterización de los NTs lipídicos se realizó con un microscopio confocal TCS SP5 II con un objetivo de inmersión en agua 63x. Las imágenes de 1024×1024 píxeles fueron captadas con un paso de $0.21 \mu\text{m}$ en dirección z a una velocidad de escaneo de 400 Hz. Las muestras se excitaron a través de una línea de láser iónico de argón a 543 nm al 12% de potencia. La fluorescencia de emisión se detectó a través de un PMT establecido entre 555 nm y los 695 nm, con una ganancia de 800 V. La fluorescencia del fondo fue sustraída de cada imagen antes de ser analizada.

Para cada experimento con NTs se realizó una calibración de intensidad de fluorescencia con un parche plano obtenido a partir de las microesferas en las mismas condiciones. La normalización del perfil de fluorescencia se realizó dividiendo el perfil de fluorescencia de los NTs por la intensidad media de fluorescencia de los parches lipídicos utilizados para la calibración, tal y como se describe en la sección de Resultados.

2.4.4. Recuperación de fluorescencia tras un fotoblanqueo (FRAP)

Con el fin de caracterizar el número de membranas de los parches planos lipídicos, se realizó un ensayo FRAP. Se utilizó un microscopio confocal TCS SP5 II con un objetivo de inmersión en agua X63. El tamaño de la imagen fue de 512×512 píxeles y una velocidad de escaneo de 400 Hz con $111,5 \mu\text{m}$ de orificio. Las muestras se excitaron a través de una línea de láser iónico de argón a 543 nm al 85% de la potencia durante 10 min para provocar el blanqueo del parche de la bicapa lipídica y al 17% de la potencia para su observación posterior. La fluorescencia de la emisión se detectó a través de un PMT establecido en 555nm - 695nm con una ganancia de 850 V cada minuto durante los 45 min posteriores al foto-blanqueo. La fluorescencia de fondo fue sustraída de cada imagen antes de ser analizada.

2.4.5. Remodelación de membrana por dinamina

Las dinaminas (Dyn1 y Dyn2) se añadieron a los BGSs y a los GUVs para tener una concentración de trabajo de 0.5 μM final en la cámara de observación. Ambos casos fueron monitorizados en un microscopio confocal. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal TCS SP5 II. El tamaño de las imágenes fue de 512×512 píxeles con un tamaño de paso en z de 0.21 μm y una velocidad de escaneo de 400 Hz. Para muestras marcadas con Rh-DOPE se usó un objetivo de inmersión en agua 63x. La excitación de la fluorescencia se realizó a través de una línea de láser de iones de argón a 488 nm al 25% de la potencia y la línea de láser de iones de argón a 543 nm al 14% de la potencia. La fluorescencia de

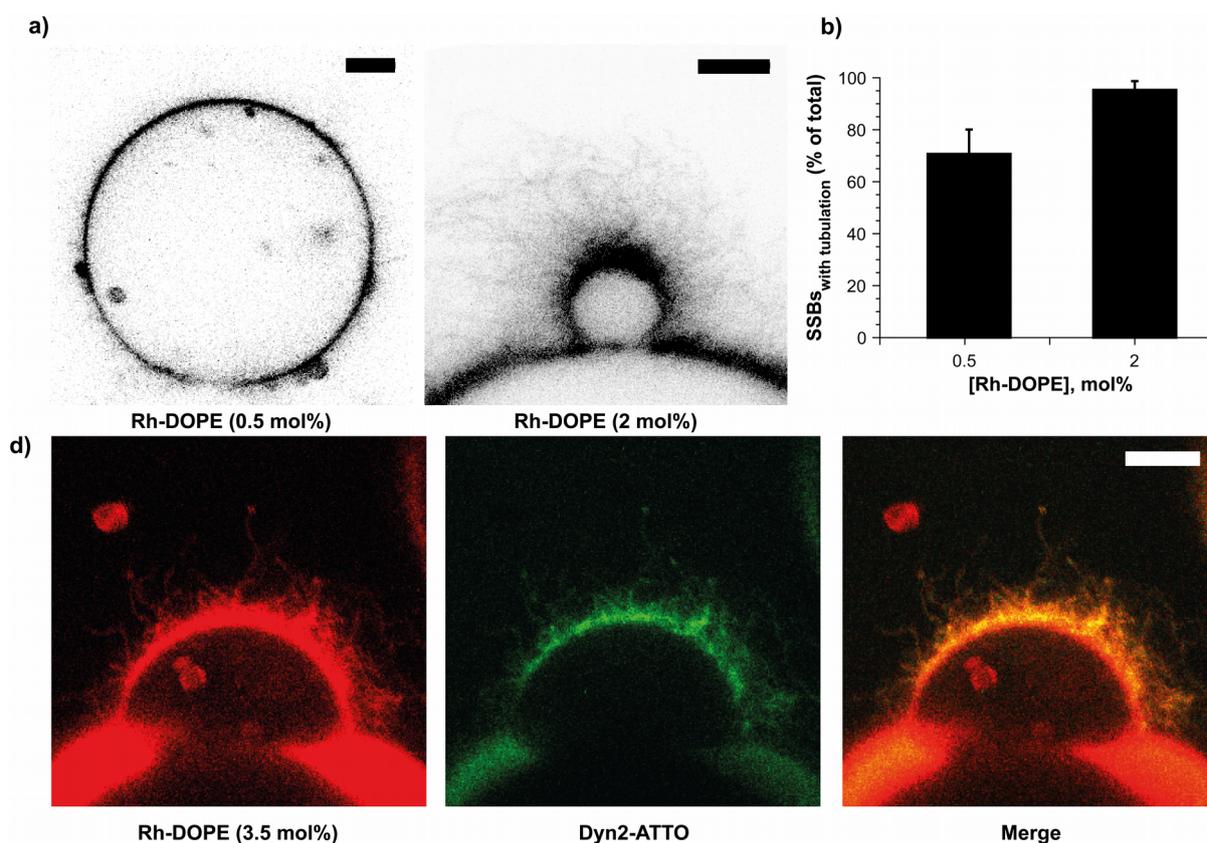


Figura 2.7. Variación de concentración de Rh-dOPE. a) BGSs con [DOPE]=45 %mol con la membrana tubulada por la Dyn2 con [Rh-dOPE]=0,5 %mol (izquierda) y [Rh-dOPE]=2 %mol (derecha). b) BGSs con tubulación (% del total) para composición lipídica dónde [DOPE]=45 %mol para poblaciones con diferentes concentración de fluoroforo. c) Cuantificación del radio de la tubulación en BGSs creada por Dyn2-aTTO cuando [DOPE]=35 %mol.

emisión se detectó usando PMTs establecidos para las longitudes de onda 495 nm, 530 nm y 555 nm, 695 nm con una ganancia de 850 V. La fluorescencia de fondo fue sustraída de cada imagen antes de ser analizada. Las imágenes fueron recogidas tras 20 min de incubación de las dinaminas con las plantillas lipídicas.

Se estableció que la cantidad mínima de Rh-DOPE en la membrana necesaria para poder observar los NTs formados a partir de las membranas con un 35-45 %mol de DOPE era de 2 %mol (ver Figura 2.7-a). Sin embargo, para la cuantificación del radio de los túbulos producidos por la Dyn1 y Dyn2 a partir de los BGSs fue necesario aumentar el porcentaje molar de Rh-DOPE en la mezcla hasta el 3.5 %mol. Para ello, se realizaron Z-stacks con un paso de 0.21 μm . Las imágenes se obtuvieron como time-lapse con 1,25 fps para suplir el movimiento flotación de los NTs. En ambos casos, para facilitar el reconocimiento de los BGSs tubulados, se utilizaron Dyn2-ATTO o Dyn1 marcada con GFP (ver Figura 2.7-b). Aquí también se realizaron calibraciones diarias de fluorescencia del NT tomando imágenes de parches planos con las mismas microesferas que las utilizadas en la formación de BGSs. La normalización del perfil de fluorescencia se realizó dividiendo el perfil de fluorescencia de los NTs por la intensidad media de fluorescencia de los parches lipídicos utilizados para la calibración.

2.5. Criomicroscopía electrónica

Se incubaron 300 μM de LUVs de 400 nm con 0.5 μM de Dyn2 en NaCl:HEPES:EDTA (150:20:1 mM) en un volumen final de 50 μL durante toda la noche a temperatura ambiente. Las muestras fueron recogidas y vitrificadas en nitrógeno líquido usando un FEI Vitrobot en rejillas de carbono Quantifoil R 2/2 recubiertas con una capa delgada y agujereada de carbono. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio crio-electrónico de barrido de emisión de campo operando a 200kV con una magnificación de detector de 40000x.

2.6. Medidas de fuerza mediante pinzas ópticas

En estos experimentos, realizados en colaboración con el laboratorio de Dr. Ibarra (IMDEA Nanociencia, Madrid) se utilizó un instrumento de pinzas ópticas de doble haz con propagación de contador equipado con sensores de fuerza de momento de luz, que es capaz de medir la fuerza directamente (Dziedzic *et al.*, 2003) Los dos láseres se enfocan a través de lentes de microscopios opuestas que generan una sola trampa óptica. Los nanotubos proteína-lípidos se generaron in situ de la siguiente manera. Microesferas de poliestireno de 5 μm con reservorio lipídico pre-hidratado (dopados con 0,2 %mol de biotinaPC en su composición y preparadas según el apartado 2.1.3, pasos 1-3) se introdujeron en la cámara experimental que contenía el tampón de trabajo a $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Una microesfera se atrapó con la trampa óptica y se puso en contacto con otra microesfera de 2 μm cubierta con estreptavidina e inmovilizada con anterioridad por succión en una punta de micropipeta. Ambas microesferas se separaron con una velocidad inicial constante de extracción de 0,1 m/s para formar un tubo. Los ciclos de extensión-acortamiento se realizaron en tubos individuales a diferentes velocidades de extracción para obtener el rango de velocidades para las cuales la pipeta se desplaza linealmente a una velocidad calibrada fija. Los datos se recopilaron con una alta resolución temporal (500 Hz), de fuerza ($<1\text{pN}$) y posición (1-10 nm).

2.7. Cuantificación bioquímica de la dinamina

2.7.1. Preferencia de unión de las dinaminas a la membrana

Los ensayos de unión liposoma-dyn se realizan por medio de un experimento de sedimentación como se describe en (Leonard *et al.*, 2006).

1. Se incubaron 300 μM de LUVs de 400 nm con 0,5 μM de Dyn2 en NaCl:HEPES:EDTA (150:20:1 mM) y un volumen final de 50 μL durante 20 min a 37°C.
2. Las mezclas se centrifugaron a 14.000 r.p.m. (20.800 g) durante 20 min en una micro-centrífuga refrigerada a 4°C para obtener las fracciones de sobrenadante (S) y sedimento (P).
3. La fracción de sedimento que contenía liposomas se resuspendió en 50 μL del mismo tampón para obtener volúmenes iguales de fracciones S y P.
4. Las muestras se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE geles 4-20% que se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

2.7.2. Actividad bioquímica GTPasa de la dinamina

Se realizó una cuantificación colorimétrica de la actividad GTPasa de la proteína por medio de ensayos de GTPasa estimulados por liposomas cuantificando el fosfato libre desprendido en la reacción usando el carbinol verde Malaquita, como se describe en (Leonard et al., 2006):

1. Se incuban 300 μM de LUVs de 400 nm con 0,5 μM de Dyn2 en NaCl:HEPES:EDTA:MgCl₂ (150:20:1:2 mM) un volumen final de 50 μL durante toda la noche a temperatura ambiente.
2. Se añadió GTP para obtener una concentración final de 1 mM en solución y la mezcla se incubó 15 min a 37°C.
3. A continuación, se paró la reacción añadiendo EDTA para obtener una concentración final de 100 mM.
4. Se añadieron 150 μL de la solución de carbinol verde Malaquita* (molibdato de amonio: verde malaquita (10:1 mM en HCl 1N)) se determinó la absorbancia a 650 nm utilizando un lector de microplacas.

*Preparación del carbinol verde malaquita (molibdato de amonio: verde malaquita (10:1 mM en HCl 1N)):

1. Se disolvieron 34 g de Malaquita Verde en 40 mL de HCl (1M).
2. Se disolvieron 1 g de molibdato de amonio en 14 mL de HCl (4M).
3. Por último se mezclaron ambas disoluciones y se enrasaron con agua Milli-Q hasta los 100 mL. La mezcla se guardó a 4°C evitando el contacto con la luz.
5. Se generó una curva estándar de $[Pi]=10-100 \mu M$ para cada experimento y se lee en paralelo.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DE SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE REMODELACIÓN DE MEMBRANA

Resultados y Discusión

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DE SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE REMODELACIÓN DE MEMBRANA

1. Conceptos básicos de la formación de Bicapas Gigantes Suspendidas

Parte del presente trabajo se centró en el desarrollo de un nuevo sistema de membranas modelo que permitiera un análisis eficaz de la remodelación de las membranas por parte de las dinaminas clásicas. Dicho sistema, que pasó a denominarse **Bicapas Suspendidas Gigantes (BSGs)**, está basado en el proceso de hidratación espontánea de películas lipídicas depositadas sobre microesferas de sílice con curvaturas de 10^{-1} - 10^{-2} m^{-1} . A continuación se detallan las características básicas de este nuevo sistema modelo de membrana.

1.1. La curvatura y el choque osmótico facilitan la formación de los BGSs

Los protocolos clásicos para la formación de GUVs, tales como los basados en la *hidratación suave* (Reeves and Dowben, 1969) o en la utilización de un campo eléctrico (*electroformación*) (Angelova and Dimitrov, 1986), normalmente requieren de largos procedimientos y suelen presentar limitaciones respecto a la composición lipídica o los tampones utilizados (Walde *et al.*, 2010). Técnicas más recientes, suelen requerir el uso de procedimientos microfluídicos (Karamdad *et al.*, 2015) o de litografía blanda, lo que implica el uso de equipamiento especializado no disponibles aún en todos los laboratorios bioquímicos. Por tanto, mejorar los métodos clásicos y facilitar su uso al mayor número en investigadores posible se antoja necesario.

Aquí hemos tomado el método de la *hidratación suave* como base para desarrollar un método propio de formación de bicapas de tamaño micrométrico. Por lo general, la hidratación de películas lipídicas se lleva a cabo sobre superficies planas (Reeves and Dowben, 1969; Tsumoto *et al.*, 2009; Walde *et al.*, 2010; Shohda, Takahashi and

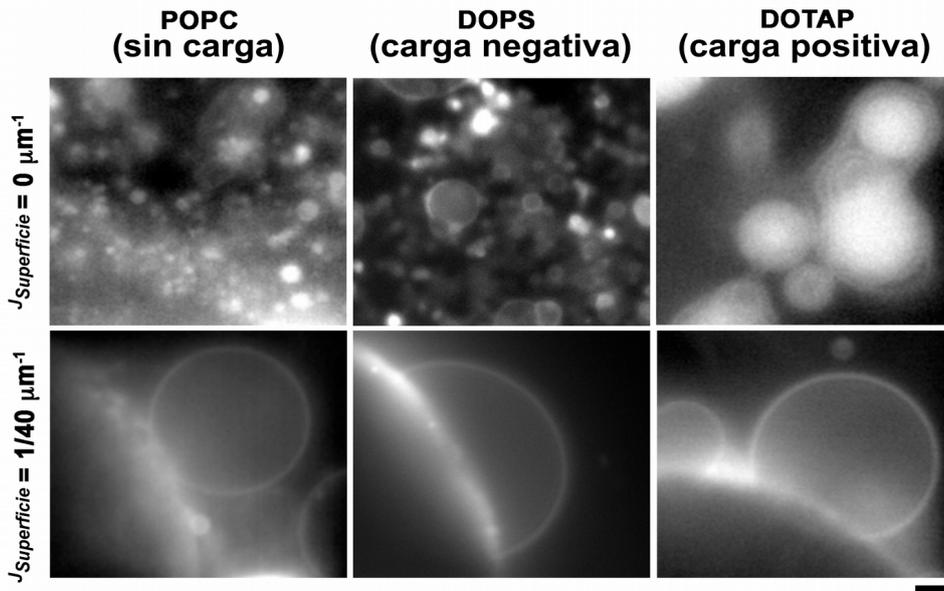


Figura 3.1. La curvatura promueve el proceso de hidratación de bicapas lipídicas. Comparación entre el proceso de hidratación de una bicapa lipídica depositada sobre la superficie plana de un cubreobjetos (arriba) y una microsfera (abajo). Barra de escala igual a 5μm

Suyama, 2015). Sin embargo, hemos notado que cuando el proceso de hidratación se hace sobre una superficie con suficiente curvatura, la hidratación es mucho más rápida y no está restringida a ninguna composición lipídica, pudiéndose formar BGSs incluso a partir de películas que contienen especies lipídicas cargadas (ver Tabla 3.1). La curvatura de la superficie tiene un efecto sistemático sobre la hidratación de las lamelas. De hecho, las superficies con curvaturas esféricas de $0.2\text{-}0.02\ \mu\text{m}^{-1}$ (por ejemplo, microesferas de sílice de $5\text{-}60\ \mu\text{m}$ de diámetro) permiten una hidratación eficiente de las membranas lipídicas en pocos segundos. Tanto las películas lipídicas altamente cargadas (99% molar de DOPS o DOTAP) como las no cargadas (99% molar de POPc) se hidratan fácilmente en las microesferas de sílice en soluciones 1M de disacáridos trehalosa (TRH) o sacarosa, formando protuberancias en forma de esferas de membrana unilamelares gigantes, las BGSs (ver Figura 3.1). Es de notar que el tamaño de los BGSs no depende del tipo de disacárido usado en la etapa de la prehidratación (ver Figura 3.3). Sin embargo, hemos elegido la TRH para la formación de los BGSs debido a su demostrada acción protectora de proteínas y membranas biológicas frente al estrés causado por la ósmosis, entre otros (Luzardo *et al.*, 2000; Chiu, Kelly and Walz, 2011; Roy *et al.*, 2016). Curiosamente, las mismas condiciones de hidratación producen solo pequeñas estructuras multilamelares para ambas composiciones en superficies planas (ver Figura 3.1). Por lo tanto, la curvatura del sustrato permite la producción de BGSs a partir de prácticamente cualquier composición lipídica (ver Tabla 3.1), eliminando así la restricción de la composición de los métodos de hidratación suave clásicos (Rodríguez, Pincet and Cribier, 2005), generalmente limitados a una pequeña cantidad de carga en la membrana. Además, los protocolos de hidratación suave generalmente requieren horas para la formación de GUVs, mientras que la curvatura del sustrato acelera dramáticamente el proceso de hidratación. Así, se observan estructuras unilamelares de tamaño micrométrico en el primer minuto después del primer contacto de la película lipídica con la solución de TRH (ver Figura 3.2). Este efecto de curvatura no es específico de las microesferas de sílice. GSB también se forman sobre microesferas de dióxido de titanio, microesferas de poliestireno, alambres de platino o estructuras SU8 con curvaturas en el mismo rango de $0.2\text{-}0.02\ \mu\text{m}^{-1}$. Por lo tanto, la curvatura del sustrato es la fuerza impulsora principal para la velocidad y eficiencia observadas en la hidratación de la película lipídica.

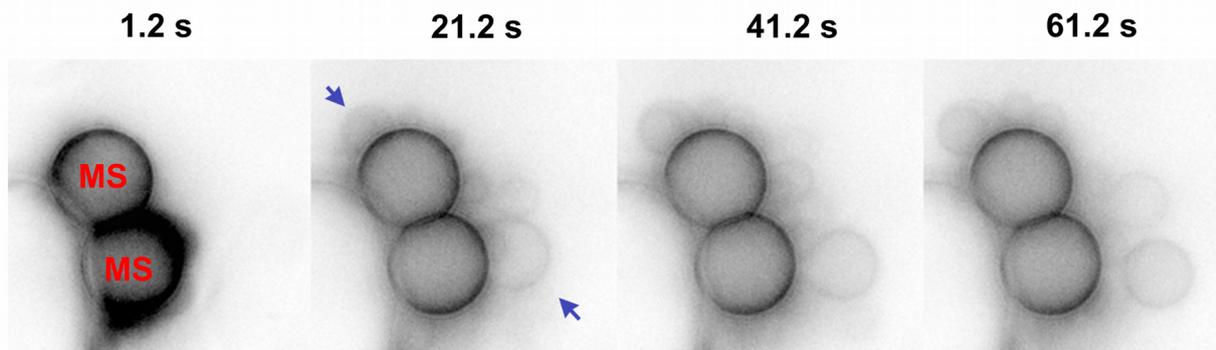


Figura 3.2 Proceso de hidratación inicial de las lamelas del BGS en trehalosa (TRH). Las bicapas lipídicas del reservorio de la microesfera se separan rápidamente durante la etapa de hidratación formando bicapas casi esféricas. La barra de escala es 2 μm .

Además de proporcionar la curvatura adecuada para la hidratación inicial, el acoplamiento estable de la BGSs a las microesferas de sílice brinda ventajas adicionales a esta plantilla de membrana, lo que la hace particularmente útil en estudios biofísicos y bioquímicos. Al estar firmemente inmovilizadas, las BGSs son fácilmente micromanipulables y la observación de sus membranas mediante microscopía de fluorescencia de alta resolución se hace de forma fácil. Además, el BGSs-microesfera se puede transferir fácilmente de una solución a otra, incluidos los tampones fisiológicamente relevantes (ver Materiales y Métodos) adecuados para la reconstitución adecuada de la funcionalidad de la proteína y la membrana *in vitro*. Si bien, ha habido varios métodos para formar GUV en condiciones fisiológicas (Reeves and Dowben, 1969; Rodriguez, Pincet and Cribier, 2005; Węgrzyn *et al.*, 2011; Shnyrova *et al.*, 2013; Carravilla *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2017), tienen una composición limitada y requieren mucho tiempo o requieren de los enfoques más avanzados para su producción (Stein *et al.*, 2017). Sin embargo, la simple reubicación de los BGSs prehidratados con disacárido a solución salina tamponada con fosfato o tampón de trabajo (KCl 150 mM, Hepes 20 mM, EDTA 1 mM) dio lugar a un aumento aún mayor del área de la membrana de los BGSs. La diferencia en la osmolaridad entre la solución 1M de TRH dentro del BGS y el tampón externo genera una afluencia de agua que produce la inflación y la consiguiente fusión de los BGSs prehidratados con disacárido, mientras que la solución de disacárido dentro del BGS es intercambiada lentamente por el tampón externo. Como resultado, en tan solo unos minutos se produce la formación de BGSs estables de 5-100 micras de

tamaño y que contienen un tampón fisiológico a ambos lados de sus membranas. El tamaño final de la plantilla de BGS podría ajustarse aún más cambiando la concentración de disacárido (TRH o sacarosa) en la etapa de prehidratación, es decir, cambiando el choque osmótico en la etapa de hidratación final de la formación de los BGSs (ver Figura 3.3). Por lo tanto, nuestro nuevo protocolo permite la producción rápida de plantillas de membrana unilamelares gigantes a partir de composiciones lipídicas fisiológicamente relevantes y en soluciones iónicas también fisiológicas.

Composiciones lipídicas que forman BGSs*	
Lípidos	%Mol
POPC	100
DOPC	100
DOPC:DOPE	66:34
DOPC:Chol	70:30
DOPC:DOPS	70:30
DOPC:DOPS:Chol	45:25:30
DOPC:DOPE:DOPS:Chol	30:30:30:10
DOPC:DOPE:DOPS:Chol	30:25:15:30
DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P ₂	27:26:15:30:2
DOPC:DOPE:DOPS:Chol:PI(4,5)P ₂	10:45:15:30:5
DOPS	100
DOPS:Chol	90:10
DOPC:Chol:OPC	40:30:30
DOPC:Chol:OPC	40:40:20
Chol:OPC	50:50
DOPC:DOPS:brainSM	50:30:20
DOTAP	100

Tabla 3.1. Composiciones lipídicas probadas con éxito en la formación de BGSs. *Entre un 0,5-1%mol de cada composición corresponde a Rh-DOPE.

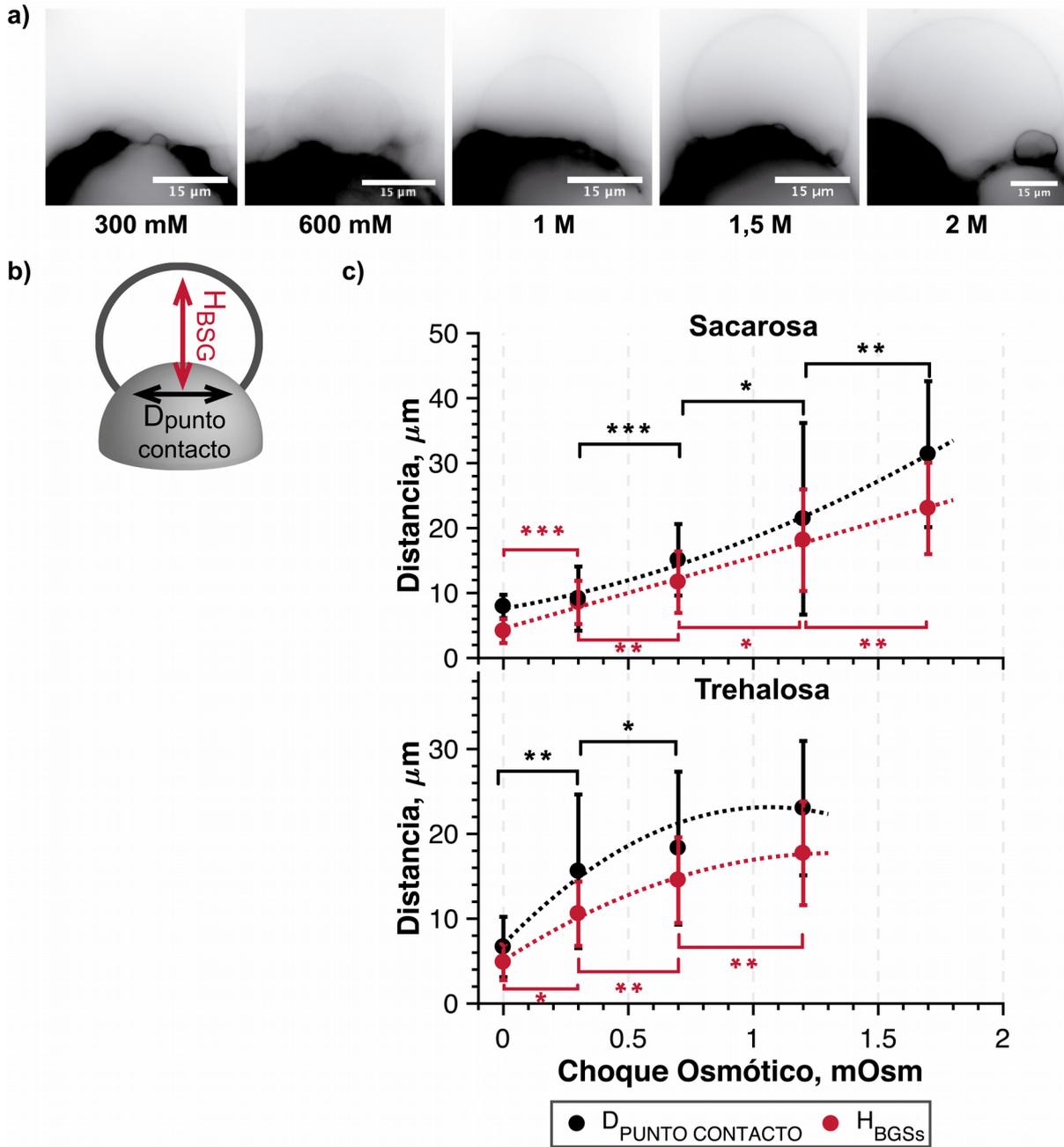


Figura 3.3 a) Imágenes de fluorescencia de BGSs hidratados con diferente concentración de sacarosa. Las barras de escala son 15 μm. b) Esquema de un BGSs y la consideración de sus dimensiones. Distancia entre los ángulos de contacto de las BGSs, $D_{\text{ANGULO CONTACTO}}$; y la distancia entre la membrana de los BGSs y la línea que une los dos ángulos de contacto con la microesfera, H_{BGSs} . c) Variación de las dimensiones de los BGSs (μm) con la concentración de sacarosa (arriba) y trehalosa (abajo). Negro: $D_{\text{ANGULO CONTACTO}}$. Rojo: H_{BGSs} . ***Significativamente diferente para $p < 0,001$. **Significativamente diferente para $p < 0,05$. * Significativamente diferente para $p < 0,1$. Barras de error es desviación estándar.

1.2. La formación de BGSs depende del reservorio lipídico

Observamos que la formación de las BGSs depende de la cantidad de lípido depositado inicialmente en la microesfera. Para cuantificar dicha dependencia, medimos el área del reservorio lipídico de las microesferas mediante el método desarrollado anteriormente por Pucadyil y Schmid (Pucadyil and Schmid, 2010). Este método se basa en la atracción electrostática entre los lípidos y el cristal de un cubreobjetos limpio. Así, al depositar las microesferas con film lipídico deshidratado directamente sobre una gota de tampón a su vez depositada sobre un cubreobjetos limpio, la membrana del reservorio de las microesferas se esparce sobre el cristal formando parches planos de membrana (ver Materiales y Métodos).

El área de extensión de los parches se puede normalizar con respecto al área de la correspondiente microesfera, $\frac{A_{Parche}}{A_{Microesfera}}$ (ver Figura 3.4-a). De ésta forma se observa que cuando el reservorio lipídico es grande (correspondiente a parches planos cuyas áreas son aproximadamente el triple del área de la microesfera, ver Figura 3.4-b y Tabla 3.2), se forman estructuras micrométricas multilamelares. Al contrario, cuando la cantidad de lípido depositada es demasiado pequeña, la formación de BGSs está

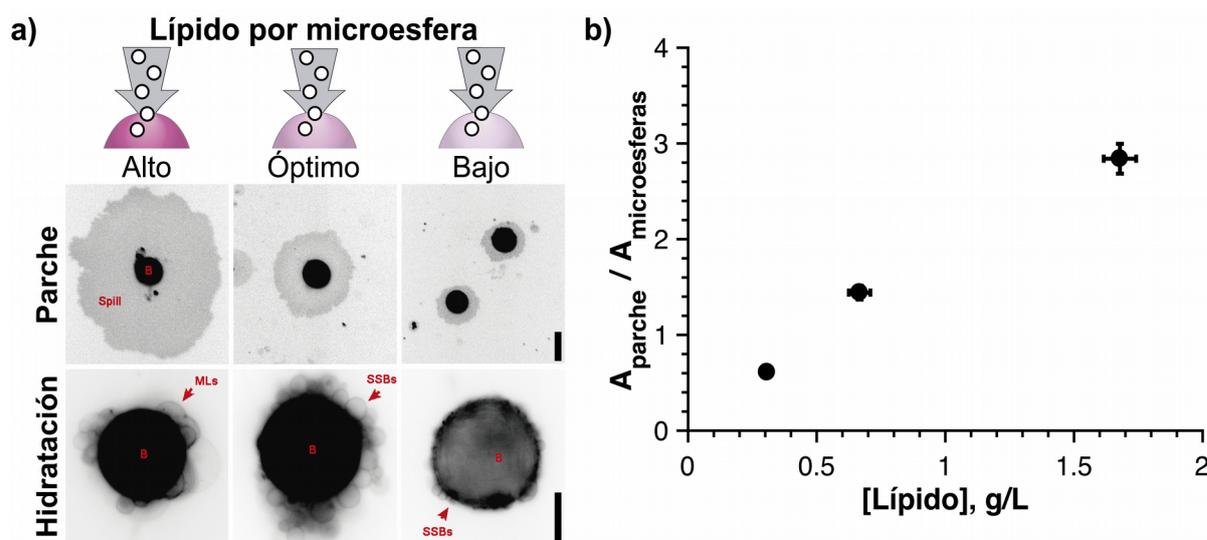


Figura 3.4. a) Esparcimiento e hidratación de la membrana lipídica a partir de microesferas. Barra de escala es 40 μm (arriba) y 20 μm (abajo). b) Área del parche de membrana plana normalizada por el área de la microesfera según la concentración de lípido depositada.

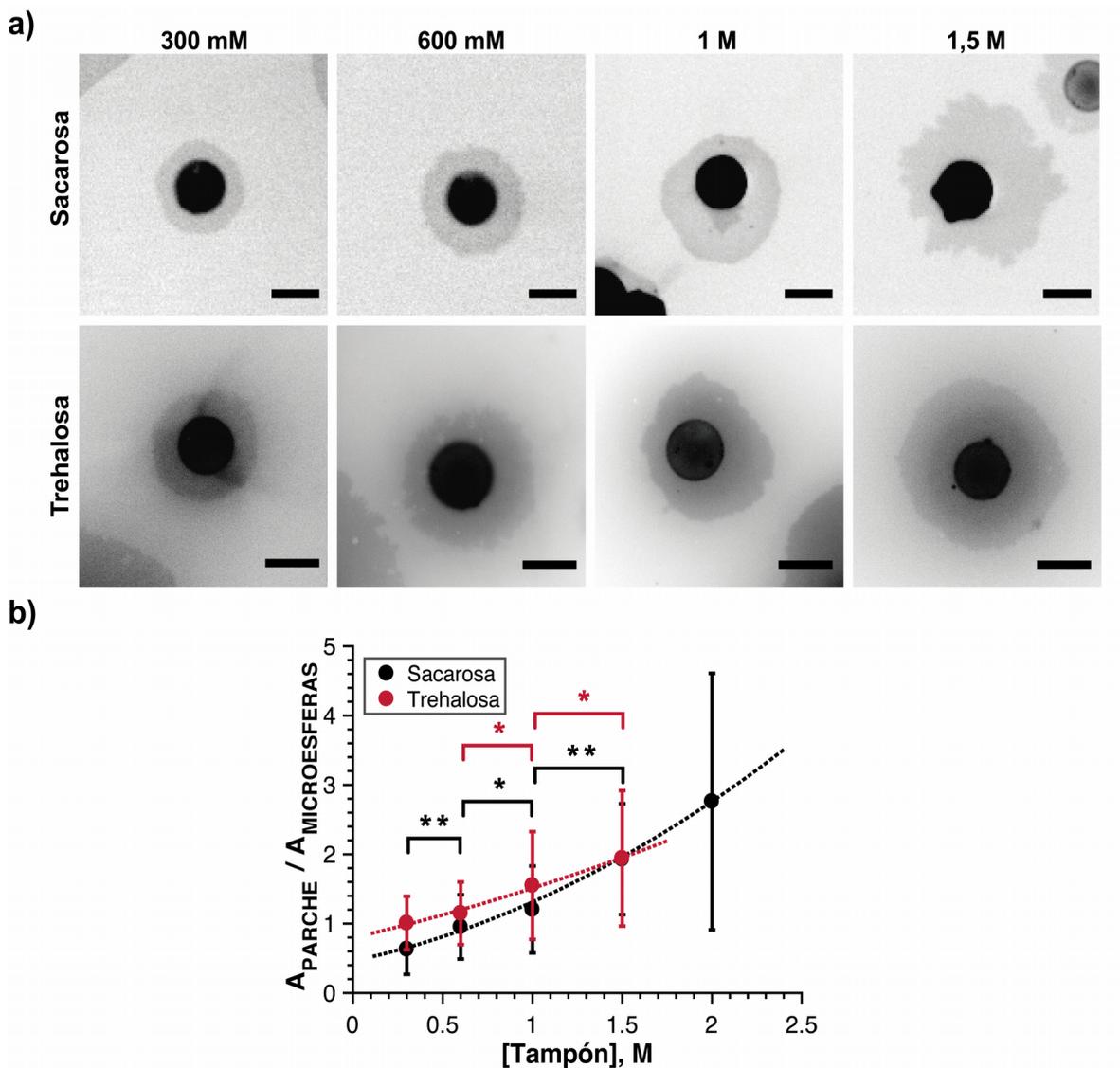


Figura 3.5. a) Parches planos del reservorio de microesferas en diferentes concentraciones de sacárido. Las barras de escala son 40 μm . b) Tamaño del reservorio lipídico en diferentes sacáridos. El área de los parches de membrana plana formados a partir del reservorio lipídico de las microesferas se encuentra normalizado por el área de la microesfera correspondiente. c) Comparación del área normalizado de los parches de membrana para bicapas soportadas sobre microesferas en diferentes concentraciones de sacarosa y trehalosa. El área de parche de membranas plana del reservorio se encuentra normalizado por el área de la microesfera correspondiente. **Significativamente diferente para $p < 0,001$. *Significativamente diferente para $p < 0,05$.

inhibida debido a la insuficiencia del reservorio lipídico. La formación de los BGSs es óptima cuando el área del reservorio lipídico que cubre la microesfera es ~ 1.5 veces mayor que el área de la microesfera. Por tanto, la cantidad de lípido depositada inicialmente sobre las microesferas controla la formación, así como la lamelalidad de los BGSs.

Otro factor que controla la cantidad de reservorio disponible en las microesferas es la concentración del disacárido utilizado en el tampón de prehidratación (ver Figura 3.3 y Figura 3.5). El área de la membrana esparcida desde las microesferas con una misma cantidad de lípido en su superficie, aumenta con el aumento de la concentración de sacarosa (ver Figura 3.5). Por tanto, el área de bicapas hidratadas crece cuando se usan tampones de prehidratación con mayor concentración de sacáridos (ver Figura 3.4). Por otra parte, el reservorio lipídico de las microesferas no se ve afectado por el tipo de disacárido utilizado en la prehidratación de las muestras, ya que el tamaño de los parches de membrana es muy similar tanto para el caso de la sacarosa como para la trehalosa (ver Figura 3.5).

	No BGSs		BGSs		MLVs	
	[Lípido], g/L	$\frac{A_{Parche}}{A_{Microesfera}}$	[Lípido], g/L	$\frac{A_{Parche}}{A_{Microesfera}}$	[Lípido], g/L	$\frac{A_{Parche}}{A_{Microesfera}}$
DOPC	0,25	0,75±0,3	0,50	1,59±0,4	1	2,95±0,8
POPC	0,33	0,56±0,2	1	1,14±0,4	2	2,79±1,3

Tabla 3.2 Área del parche plano de membrana normalizado por el área de la correspondiente microesfera según la concentración de lípido depositada para las composiciones lipídicas DOPC y el POPC.

2. Permeabilidad de los BGSs

Con el objetivo de averiguar si la membrana lipídica formada por los BGSs está completamente cerrada o existe algún tipo de permeabilidad iónica a través de los puntos de contacto con la microesfera, se encapsuló la sonda fluoresceína mediante compuestos de diferentes tamaños moleculares: HiLyte™ (M=530,45 Da), Dextranos fluoresceína de 3kDa (radio de Stokes~14Å); Dextranos fluoresceína de 10kDa (radio de Stokes~23Å) y Dextranos fluoresceína 40kDa (radio de Stokes~45Å). Se observó que una vez formados los BGSs, las sondas eran encapsuladas en el volumen interno de los BGSs. Sin embargo, a los 10 minutos de formación, solo el 30% de las BGSs prehidratados en presencia de Hilyte™ permanecieron con sonda fluorescente en su volumen interno.

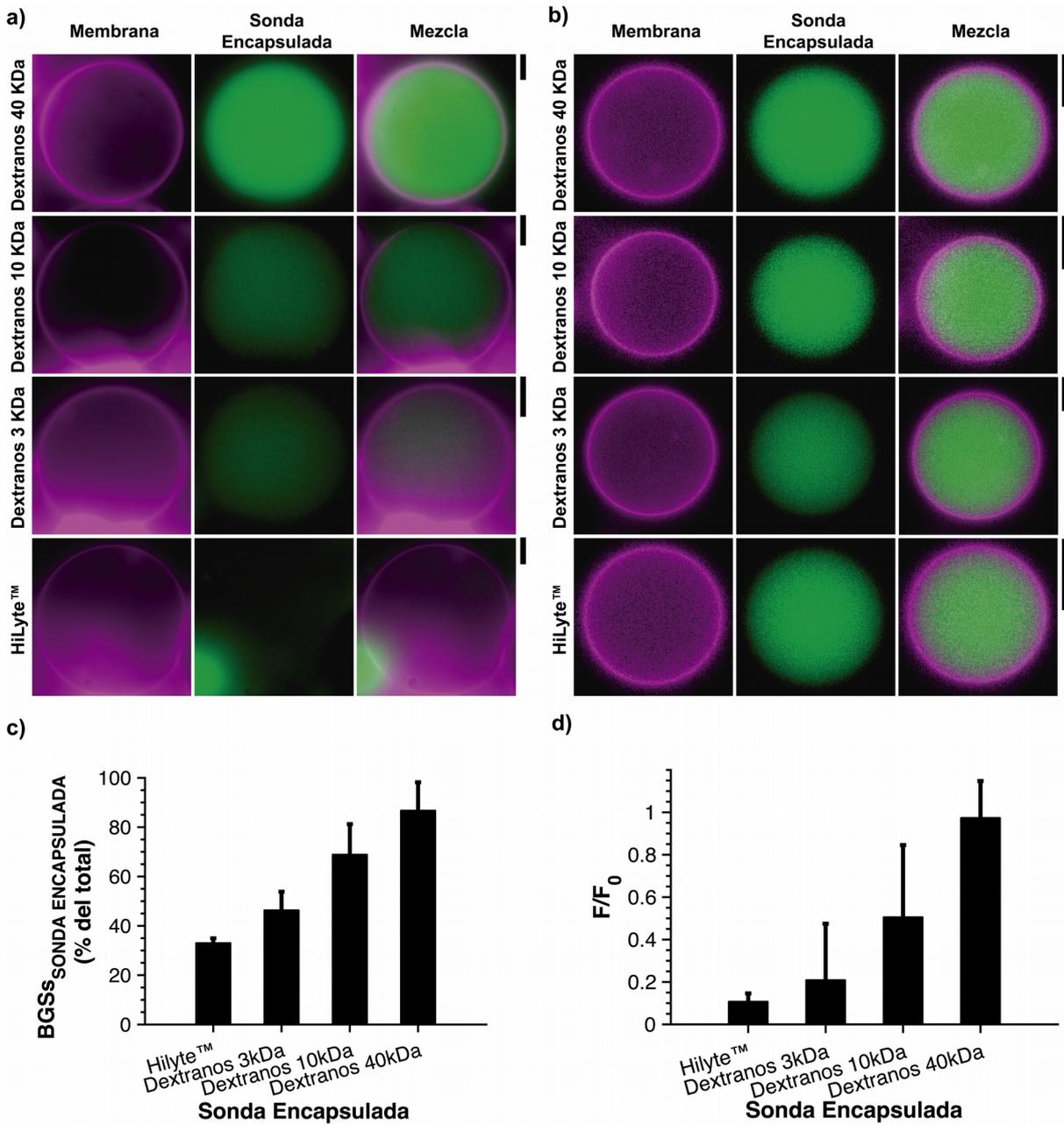


Figura 3.6 Encapsulación de sondas en el volumen interno de las BGSs. a) BGSs con diferentes sondas fluorescentes encapsuladas a los 10 minutos de entrar en contacto con el bufer salino. El canal magenta es el canal correspondiente a la membrana lipídica (marcada con RhDOPe) y el canal verde corresponde a la sonda encapsulada. b) GUVs obtenidos a partir de BGSs encapsulando las mismas sondas que en A. En A y B las barras de escala son 5 μm . c) Análisis de BGSs con sonda encapsulada a los 10 min de entrar en contacto con el tampón salino (% del total). d) Intensidad de fluorescencia de BGS normalizada por intensidad de fluorescencia de GUVs para las diferentes sondas encapsuladas en los BGSs a los 10 min de incubación con tampón salino (N=4).

Además, se observó que a medida que el tamaño de la sonda encapsulada aumentaba, la retención de la misma dentro del BSG era más efectiva, llegando a ser del ~85% para las sondas más grandes (ver Figura 3.6-a,c). Este efecto indicaba la existencia de una zona

de contacto permeable a pequeños solutos en el perímetro de contacto entre el reservorio de los BSGs y las microesferas.

Para cuantificar estos puntos permeables del sistema BSGs-microesfera, se cuantificó la cantidad de sonda que permanece en el volumen interno del BSGs tras los 10 min. Para ello se midió la fluorescencia media del volumen interior de los BSGs, F (ver Figura 3.6-a) que se normalizó por la fluorescencia media del volumen interior de GUVs encapsulando la misma sonda fluorescente (ver Figura 3.6-b). Debido a la impermeabilidad de los GUVs, la sonda fluorescente no es capaz de escapar de su interior, proporcionando así la máxima intensidad de fluorescencia posible para cada sonda, F_0 . Así se confirmó que la cantidad de sonda que se mantiene encapsulada en los BSGs tras 10 min aumenta con el tamaño de la sonda. El 90% del HiLyte™ abandona el interior de los BSGs. Para los dextranos de 3kDa es el 80% y alrededor del 50% para los dextranos de 10kDa. Finalmente, sólo el 10% de los dextranos de 40kDa es capaz de abandonar los BSGs (ver Figura 3.6-d).

Este resultado aporta suficiente evidencia para la existencia de ciertos poros en el perímetro de contacto de los BSGs con las microesferas por los que pequeñas moléculas llegarían a difundir, mientras que se convierte en una barrera física para moléculas de mayor tamaño.

3. Remodelación de membrana

Para probar las BSGs como modelo de membrana para estudio de remodelación por dinaminas, utilizamos la isoforma de dinamina más estudiada, la Dyn1 y comparamos la tubulación que esta proteína induce en GUVs y BSGs. La Figura 3.7 es una imagen representativa en la que se observa cómo la membrana del GUVs presenta menos tubulación por área que en el caso de la membrana del BSGs. Además, si se pone atención a las características de esta tubulación, se ve cómo los túbulos de membrana formados en GUVs son mucho más cortos que los formados en BSGs, donde alcanzan varios micrómetros de longitud. Dicho efecto se explica por la existencia de un reservorio

lipídico en los BGSs, mientras que los GUVs presentan limitaciones debido a la relación área/volumen intrínseco a este tipo de sistemas de membrana cerrados.

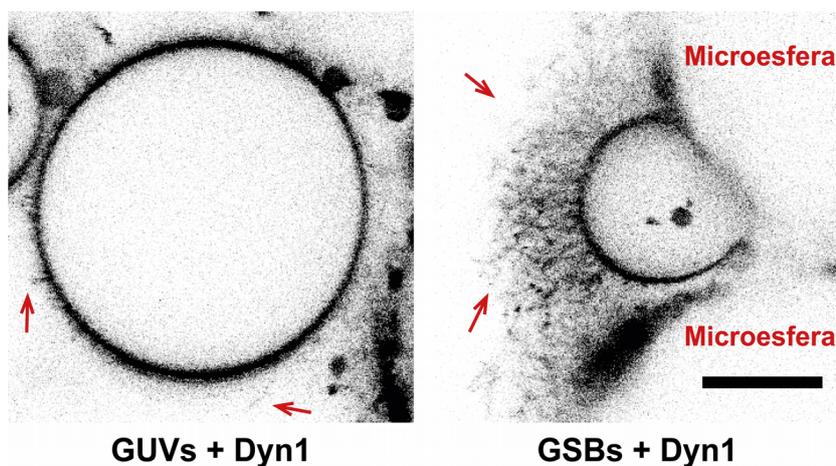


Figura 3.7. Tubulación mediada por dinamina 1 (Dyn1) en GUVs y BGSs. $[\text{Dyn1}] = 0,5 \mu\text{M}$. La barra de escala es $5 \mu\text{m}$.

4. Discusión

Mediante la formación de las Bicapas Gigantes Soportadas se hace posible la obtención rápida de membranas micrométricas de prácticamente cualquier composición lipídica. Las membranas resultantes están inmovilizadas en la superficie de las microesferas lo que facilita la observación de procesos de membrana por microscopía de alta resolución, así como una fácil micromanipulación de la membrana.

Comúnmente se usan las vesículas unilamelares gigantes (GUVs), sistemas de membrana cerrados sin reservorio lipídico, como modelo de membrana para desentrañar las interacciones proteína-lípido en el tráfico de la membrana celular (Shnyrova *et al.*, 2007; Schmid, Richmond and Fletcher, 2015). Al igual que los BGSs descritos en este trabajo, los GUVs se han usado como reservorio para formar los nanotubos lipídicos (Evans *et al.*, 1996; Heinrich *et al.*, 2010; Roux, 2013; Prévost *et al.*, 2017). Sin embargo, uno de los problemas más grandes con el sistema GUV es su inherente restricción

volumen-área, lo que resulta en su extrema sensibilidad morfológica a fuerzas externas, como la presión osmótica (Wollert *et al.*, 2009; Ogłęcka *et al.*, 2012; Chabanon *et al.*, 2017). En consecuencia, la interpretación de los cambios en la morfología de la membrana después de la adición masiva de una proteína o producto químico de interés no siempre es simple para las GUVs. Además, la membrana del GUV es accesible sólo desde el lado externo, lo que dificulta, sino imposibilita, controlar la asimetría de la membrana y evaluar simultáneamente los procesos de membrana de topología opuesta. En relación con esto, la falta de conectividad entre el interior y el exterior del GUV es el mayor obstáculo para el uso de enfoques basados en patch-clamp con este modelo de membrana (Garten *et al.*, 2017). Finalmente, las GUV requieren de una inmovilización física sobre un sustrato para sus manipulaciones a micro o nanoescala (Lira *et al.*, 2016).

Karlsson y coautores desarrollaron un método que permitió la fácil inmovilización y la micromanipulación de las GUV (Onoue *et al.*, 2009). Este método se basó en el método clásico de hidratación suave (Akashi *et al.*, 1996), pero introdujo una modificación clave que consistía en deshidratar la película lipídica en un espacio delimitado, es decir, formando gotas sobre la superficie de un cubreobjetos. Los GUV obtenidos a través de la rehidratación de dichas películas se observan fácilmente y se micromanipulan utilizando un objetivo de alta potencia de un microscopio óptico (Karlsson *et al.*, 2001). Sin duda la hidratación espontánea de las lamelas tiene muchas ventajas para la preparación de GUVs, pero este método está limitado a composiciones de membrana sin lípidos cargados. Sin embargo, las especies lipídicas cargadas son un factor clave en los eventos de tráfico de membrana que ocurren en las células. Si bien la hidratación de las lamelas con especies lipídicas cargadas (tanto positivas como negativas) y no cargadas se puede lograr mediante un calentamiento intenso del sistema y una cuidadosa preparación basada en el “spin-coating” de la película lipídica (Gozen *et al.*, 2012) , dicha modificación del protocolo de hidratación suave requiere de un equipo especial y dificulta el control de la propagación de la película lipídica deshidratada inicial. Además, la preparación de los GUV directamente sobre el vidrio del cubre objetos de la cámara de observación limita enormemente la versatilidad del sistema e interfiere con las imágenes de microscopía de fluorescencia de alta resolución.

Pucadyil y Schmid desarrollaron otro enfoque para estudiar los eventos de remodelación de membranas en el que lograron combinar los tres tipos de plantillas de membranas microscópicas clásicas. Las bicapas soportadas con exceso de reservorio de membrana, el llamado SUPER (de las siglas en inglés de SuPported Bilayers with Excess Membrane Reservoir) se fabrican a partir de membranas soportadas en la superficie curva de una microesfera de sílice del tamaño de unas micras. Las membranas resultantes, supuestamente formadas a través de la ruptura osmótica y la fusión posterior de vesículas unilamelares grandes en la superficie de la microesfera, poseen un reservorio lipídico que permite que los SUPER se remodelen fácilmente por proteínas especializadas, como, por ejemplo, las dinaminas (Pucadyil and Schmid, 2008). Esta plantilla se puede formar con membranas relevantes para los eventos endocíticos, es decir, que contienen cantidades significativas de especies de lípidos cargadas. Los SUPER se transfieren fácilmente de una solución a otra por gravedad, lo que abre la posibilidad de utilizar una caracterización bioquímica adicional. Además, el tamaño del soporte de sílice permite observar fácilmente los SUPER mediante microscopía óptica y la inmovilización adicional provista por las microesferas hace que estas membranas se micromanipulen fácilmente.

Esencialmente, las BGSs descritos en este trabajo son una combinación entre una hidratación suave controlada en el espacio y el enfoque SUPER. Al igual que los SUPER, se utilizan microesferas de sílice para la formación y manipulación de las capas lipídicas. Pero, a diferencia de los SUPER, aquí se deposita una multicapa lipídica sobre las microesferas. Las microesferas proporcionan un soporte curvado propiciando el hinchamiento de las bicapas lipídicas. La prehidratación de las diferentes láminas de bicapa se realiza bajo tampones de disacáridos. Los disacáridos son capaces de crear un enlace de hidrógeno con el grupo de la cabeza de los fosfolípidos, reemplazando las moléculas de agua en el espacio interlamelar (Crowe *et al.*, 1988). De aquí en adelante, en el proceso de la hidratación, aparece una diferencia en la presión osmótica gradual, desde el exterior hasta la superficie de la microesfera (Tsumoto *et al.*, 2009). Así, el tamaño medio de los BGS puede ser controlado mediante la concentración del tampón de hidratación. A mayor concentración de éste, las bicapas lipídicas inferiores son mejor hidratadas, ya que una mayor cantidad de moléculas de agua del volumen interlamelar son sustituidas por el disacárido. La mayor ventaja de la trehalosa frente a la sacarosa en esta etapa de prehidratación está relacionada con su acción protectora, ya que se ha

demostrado que este disacárido es un agente protector natural usado por células tanto vegetales como animales (Pereira and Hünenberger, 2008; Chiu, Kelly and Walz, 2011; Brüning *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2016). La trehalosa aumenta la estabilidad de las membranas celulares en situación de estrés tales como la deshidratación, congelación o cambios de la presión osmótica (Luzardo *et al.*, 2000; Brüning *et al.*, 2014). Por ello, la trehalosa se convierte en el tampón de prehidratación más adecuado para la formación de BGSs.

Un factor clave del sistema BGS es el reservorio lipídico de las microesferas, que permite controlar la formación de las membranas unilamelares de manera fácil mediante la regulación de la cantidad inicial de lípidos depositados sobre las microesferas. Así, un exceso de lípido en el reservorio se traduce en la formación de estructuras multilamelares. Al contrario, cuando no hay suficiente reservorio, se produce la formación de los SUPER en vez de los BGSs. Es importante notar que la cantidad óptima de lípido depositado sobre la microesfera es dependiente de la composición lipídica usada. Por ello, es recomendable realizar una calibración previa para encontrar este óptimo para cada composición (Ver Tabla 3.2.).

La existencia de un reservorio lipídico en los BGSs facilita en gran medida la reconstitución de los procesos de remodelación de la membrana. Dicho reservorio permite reducir la tensión lateral de la membrana al proporcionar membrana extra durante la remodelación de la membrana (por ejemplo, su tubulación). Esto no ocurre con un sistema de membrana cerrada, como la de los GUVs, donde la tensión de membrana limita la inducción de curvatura por parte de las proteínas (Stachowiak, Hayden and Sasaki, 2010). Por tanto, el reservorio de membrana se convierte en una gran ayuda a la hora de visualizar el autoensamblaje y la tubulación de proteínas remodeladoras de membrana como la dinamina.

Por otra parte, hemos demostrado la permeabilidad de moléculas pequeñas a través de los puntos de contacto de los BGSs y las microesferas. Esta accesibilidad directa es una característica única para el sistema BGS y por ello constituye una de las mayores ventajas de los BGSs sobre otros sistemas microscópicos (como los GUVs o los SUPER) usados normalmente para la visualización en tiempo real de los procesos de membrana. Así, las moléculas con un radio de Stokes de menos de 20 Å, como los disacáridos

utilizados en la prehidratación (la sacarosa y la trehalosa poseen radios Stokes por debajo de 5 Å (Schultz and Solomon, 1961), difunden libremente a través los puntos de contacto de los BGSs. Sin embargo, moléculas con tamaños superiores permanecen en el volumen interior de los BGSs durante períodos de tiempo más largos. Además, las moléculas con un radio de Stokes por encima de los 20 Å, interfieren en el proceso de hidratación e hinchamiento de las lamelas. Por tanto, los BGSs pueden controlar su volumen interno de forma dinámica, algo que no ocurre con otros modelos de membrana. Además, creemos que esta propiedad puede ser utilizada para encapsular eficientemente macromoléculas (por ejemplo, proteínas) dentro de los BGSs o realizar estudios donde sea necesario la aplicación de medidas eléctricas, como el patch-clamp.

CAPÍTULO 4

INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS CON CURVATURA

EN LA FUNCIÓN DE LA DINAMINA

Resultados y Discusión

CAPÍTULO 4

INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS CON CURVATURA EN LA FUNCIÓN DE LA DINAMINA

1. Introducción

Existen varios factores que afectan la mecánica de la membrana en las células, incluyendo simples cambios en la composición lipídica, la segregación y ordenamiento de los lípidos y los diversos efectos de proteínas y las redes proteicas que interactúan con la bicapa lipídica. Muchos de esos efectos conllevan una complejidad intrínseca y específica de subsistemas de membrana. Fuera de esta complejidad, la geometría molecular de las especies lipídicas se mantiene como general, primordial y químicamente codificada (con la importancia que ello supone para la regulación biológica). La geometría molecular ha estado implicada durante mucho tiempo en la regulación de la fusión y la fisión de la membrana, procesos que involucran intermedios de membrana extremadamente curvados (revisado en (L. V Chernomordik and Kozlov, 2003)). Hasta ahora, la geometría lipídica se ha traducido en un término estático que define la curvatura preferible de una monocapa lipídica (denominada curvatura intrínseca, (Frolov, Shnyrova and Zimmerberg, 2011)).

Para una monocapa de un solo componente, el término de energía de flexión pasa a ser $\frac{k(J-J_S)}{2}$, lo que ilustra que la curvatura intrínseca ayuda a formar intermedios altamente curvados. Sin embargo, se ha reconocido que el efecto es dinámico, acoplado a

la reorganización lipídica impulsada por las preferencias de curvatura de las especies individuales (Stachowiak, Hayden and Sasaki, 2010; Bashkirov *et al.*, 2011; Callan-Jones, Sorre and Bassereau, 2011). El efecto de este comportamiento dinámico sobre la maquinaria proteica de fusión/fisión es el menos estudiado. Sin embargo, los lípidos cónicos capaces de sufrir una reorganización por preferencia de curvatura (por ejemplo, DOPE) son abundantes en la célula y su concentración se ha mantenido distinta para los diferentes orgánulos a lo largo de la evolución (Guan *et al.*, 2013), lo que sugiere un papel fundamental desempeñado por estas especies en la regulación de la biogénesis de membrana. Por ello, en este trabajo nos centramos en el efecto de DOPE sobre dos de las isoformas de las dinaminas clásicas, la Dyn1 y la Dyn2.

La geometría intrínseca de lípidos como el DOPE les impide formar bicapas estables, motivo por el cual se denominan lípidos de “no-bicapa” (Bashkirov *et al.*, 2011). Es además a destacar que el DOPE es el lípido con curvatura intrínseca negativa más abundante en las membranas lipídicas eucarióticas y que se encuentra involucrado en procesos de fisión de membrana fisiológicamente relevantes (Evseev and Bashkirov, 2008; Vance and Tasseva, 2013). Es de suponer que su relevancia en dichos procesos viene dada por su capacidad de influir en la elasticidad de la membrana lipídica debido a su geometría no cilíndrica (Kurczy *et al.*, 2014). Por ello, empezamos caracterizando los distintos parámetros de la membrana puramente lipídica que puedan verse afectados por la presencia de este lípido.

2. Mecánica de la membrana lipídica: interacción entre DOPC y DOPE

2.1. Papel de la fosfatidiletanolamina en el ordenamiento lipídico en membranas

La fosfatidilcolina (Pc) es el lípido de más abundante en las membranas eucariotas, representando más del 50% del fosfolípido total. En particular, la dioleoilglicerofosfocolina (DOPc) es uno de las especies lipídicas más empleadas *in vitro* y posee una curvatura intrínseca ligeramente negativa ($J_s = -0,09 \text{ nm}^{-1}$ (Kollmitzer *et al.*, 2013)), por lo que forma bicapas planas estables con un mínimo estrés de empaquetamiento (definido como $\frac{k(J-J_s)^2}{2} \approx \frac{kJ_s^2}{2}$). Por otro lado, tal y como ha sido mencionado antes, la dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) es una de las especies de lípido de no-bicapa más abundantes (su J_s varía desde 0,33 a 0,4 nm^{-1} según estudios anteriores, (Kollmitzer *et al.*, 2013)). En condiciones fisiológicas, el DOPE no forma bicapas estables debido a un estrés residual muy elevado, pero si lo hace cuando es mezclado con el DOPC hasta un 60% mol. Sin embargo, la incorporación de este lípido a la estructura final de una bicapa así formada ha sido raramente verificada de forma directa.

Para verificar dicha incorporación, hemos medido los cambios de la densidad de empaquetamiento de la membrana mediante cambios en la polarización generalizada de la sonda *Laurdan* (Parasassi *et al.*, 1998) (ver Figura 4.1-a). El *Laurdan* fue diseñado y sintetizado en 1979, por Weber y Farris para estudiar el fenómeno de la relajación dipolar (Weber and Farris, 1979). La cola hidrófoba del ácido graso láurico que éste posee, permite la solubilización de la sonda dentro de bicapas de fosfolípidos, ubicando el resto fluorescente hacia el entorno acuoso (ver Figura 4.1-b). La excitación de esta molécula se produce a la longitud de onda de 360 nm. El momento dipolar de la “cabeza” de *Laurdan* aumenta con la excitación de la luz.

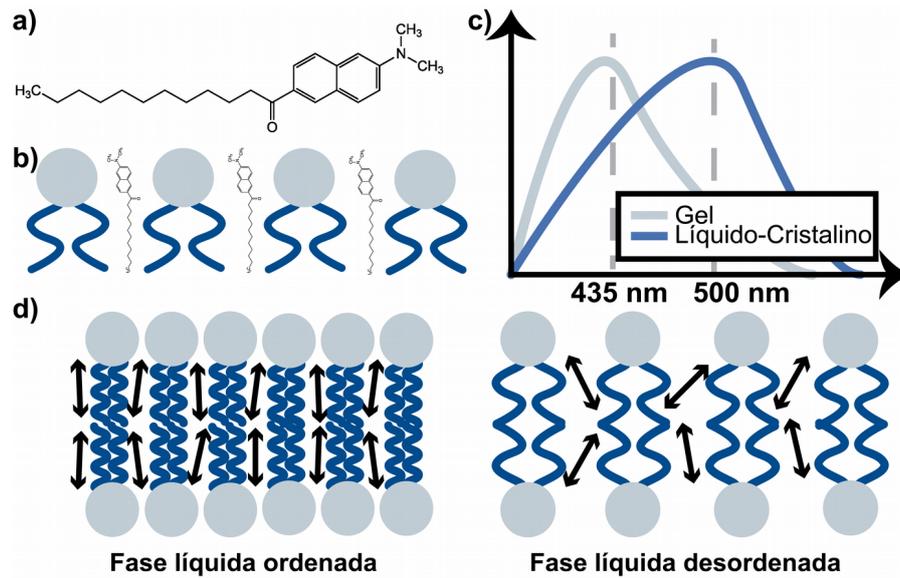


Figura 4.1 a) Estructura química del Laurdan. b) La cola hidrófoba del ácido graso láurico permite la solubilización de la sonda dentro de bicapas de fosfolípidos, ubicando el resto fluorescente hacia el entorno acuoso. c) Espectros de emisión de Laurdan para lípidos en fase gel y lípidos en fase líquido-cristalina. d) El dipolo de Laurdan (flechas) es diferente entre fase líquida ordenada (izquierda) y desordenada (derecha), siendo responsable del desplazamiento hacia el rojo observado en diferentes fases.

Este incremento dipolar produce una reorientación de los dipolos disolventes circundantes produciendo un cambio en el espectro de emisión hacia el rojo para el caso de solventes polares. Cuando el Laurdan se encuentra en membranas lipídicas, esta relajación dipolar se ve afectada por su entorno. Para el caso de membranas con lípidos en fase gel, el máximo de emisión de Laurdan se centra en 435 nm. Por el contrario, cuando los lípidos están en una fase líquida-cristalina, la reorientación del agua a lo largo del dipolo excitado presenta un máximo de emisión centrado en 500 nm (ver Figura 4.1-c,d) (Sanchez *et al.*, 2007). Para medir este desplazamiento, se utiliza la función de *polarización generalizada (GP)*, la cual se define como:

$$GP = \frac{I_{500} - I_{435}}{I_{500} + I_{435}} \quad (\text{Eq. 10})$$

siendo I_{435} y I_{500} las intensidades de emisión a la longitud de onda de 435 nm y de 500 nm respectivamente (Harris, Best and Bell, 2002).

Las descripciones de las composiciones lipídicas usadas para preparar liposomas grandes ($\varnothing=100$ nm) usados para medir la densidad de empaquetamiento lipídico están recogidas en la siguiente tabla:

Muestra	DOPC	DOPE	Laurdan		Muestra	POPC	DOPE	Laurdan	
DOPC	99,9	0	0,1	%mol	POPC	99.9	0	0,1	%mol
DOPC:DOPE 4:1	79,9	20	0,1	%mol	POPC:DOPE 4:1	79.9	20	0,1	%mol
DOPC:DOPE 1:1	49,9	50	0,1	%mol	POPC:DOPE 2:1	65.9	33	0,1	%mol
					POPC:DOPE 1:1	49.9	50	0,1	%mol

Tabla 4.1. Composiciones de membranas para el estudio del ordenamiento lipídico por medio de la sonda Laurdan.

Los valores de GP obtenidos a partir de las muestras de la Tabla 4.1 (ver Figura 4.2-c,E y Tabla 4.2) indican que estas membranas se encuentran en estado fluido (Parasassi *et al.*, 1990; Harris, Best and Bell, 2002; Sanchez *et al.*, 2007; Kaiser *et al.*, 2009). Para las membranas formadas con DOPC, cuando la concentración de DOPE es el 20% molar de su composición, no se produce ninguna variación significativa en la densidad de empaquetamiento lipídico (ver Figura 4.2-b), pues los espectros de emisión de Laurdan coinciden para ambos casos (ver Figura 4.2-c). No obstante, cuando la cantidad de DOPE aumenta en la mezcla hasta el 50 % molar, el ordenamiento de la membrana también aumenta, siendo significativamente diferente al de las membranas lipídicas compuestas sólo por DOPC (ver Figura 4.2-b). En los espectros para la mezcla de DOPC:DOPE (1:1), el pico observado a 435 nm en el espectro de emisión aumenta en intensidad respecto a las composiciones anteriores, indicando un aumento en la densidad del empaquetamiento lipídico de la membrana (ver Figura 4.2-c). Al sustituir el DOPC por el POPC sucede algo similar al caso anterior (ver Figura 4.2-d,e). Cuando el DOPE conforma el 20 % molar de la membrana, el ordenamiento lipídico de la membrana no se ve alterado respecto a las membranas puras de POPC (ver Figura 4.2-e). Aun así, los espectros de emisión del Laurdan para ambas muestras no se solapan (ver Figura 4.2-d), presentando diferencias en el pico correspondiente a 435 nm. Sin embargo, esta diferencia no se vuelve significativa hasta que la cantidad de DOPE en la membrana es al menos un 33% molar. Así, cuando la membrana está compuesta en un 50% por DOPE el espectro de emisión es muy diferente al de las membrana compuesta sólo por POPC. Aparece un pico a 435 nm mucho más acusado que en el caso de DOPC:DOPE (1:1) (ver Figura 4.2-b,d). Notoriamente, la diferencia entre los valores de GP de las

muestras compuestas al 50% por DOPE y las membranas de formadas sólo por PC es la misma. Además, el empaquetamiento de las membranas varía de igual forma si se usa DOPC o POPC.

$$\begin{aligned} |GP(DOPC : DOPE_{1:1}) - GP(DOPC)| &= 0,13 \\ |GP(POPC : DOPE_{1:1}) - GP(POPC)| &= 0,13 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 11})$$

Muestra	GP	Diámetro, nm
DOPC	-0,21±0,05	131,4±25,4
DOPC:DOPE (1:4)	-0,16±0,04	143,2±18,0
DOPC:DOPE (1:1)	-0,08±0,07	156,9±37,0
POPC	-0,12±0,03	125,3±17,4
POPC:DOPE(1:4)	-0,08±0,02	127,4±16,0
POPC:DOPE(1:2)	-0,03±0,07	147,8±13,3
POPC:DOPE(1:1)	0,007±0,07	145,7±46,4

Tabla 4.2 Valores de Polarización Generalizada (GP) y diámetro para liposomas compuestos por diferentes cantidades de DOPC:DOPE y POPC:DOPE.

Otra conclusión importante es que la densidad de empaquetamiento viene dada por las interacciones PE-PC y no es debido a cambios de curvatura de los liposomas, ya que todos los tamaños de los liposomas de las mezclas de la Tabla 4.1 son similares (ver Tabla 4.2). No obstante, cuando la cantidad de DOPE aumenta en la membrana, la variabilidad en el tamaño de los liposomas también aumenta, coincidiendo con un supuesto ablandamiento de la membrana (ver Figura 4.2-c,E y Tabla 4.2).

Para resumir, hemos visto un relativo incremento de la polarización generalizada debido a la presencia de DOPE en membranas compuestas tanto por DOPC como POPC. Dicho incremento indica un aumento en la densidad de empaquetamiento de la membrana debido a una presión entrópica adicional asociada a la condensación espacial de las colas expandidas del DOPE. Estos datos confirman la incorporación de DOPE proporcional a la relación DOPE/lípido en la mezcla inicial. Sin embargo, también nos preguntamos cual es el efecto del DOPE sobre los parámetros mecánicos globales de la bicapa lipídica.

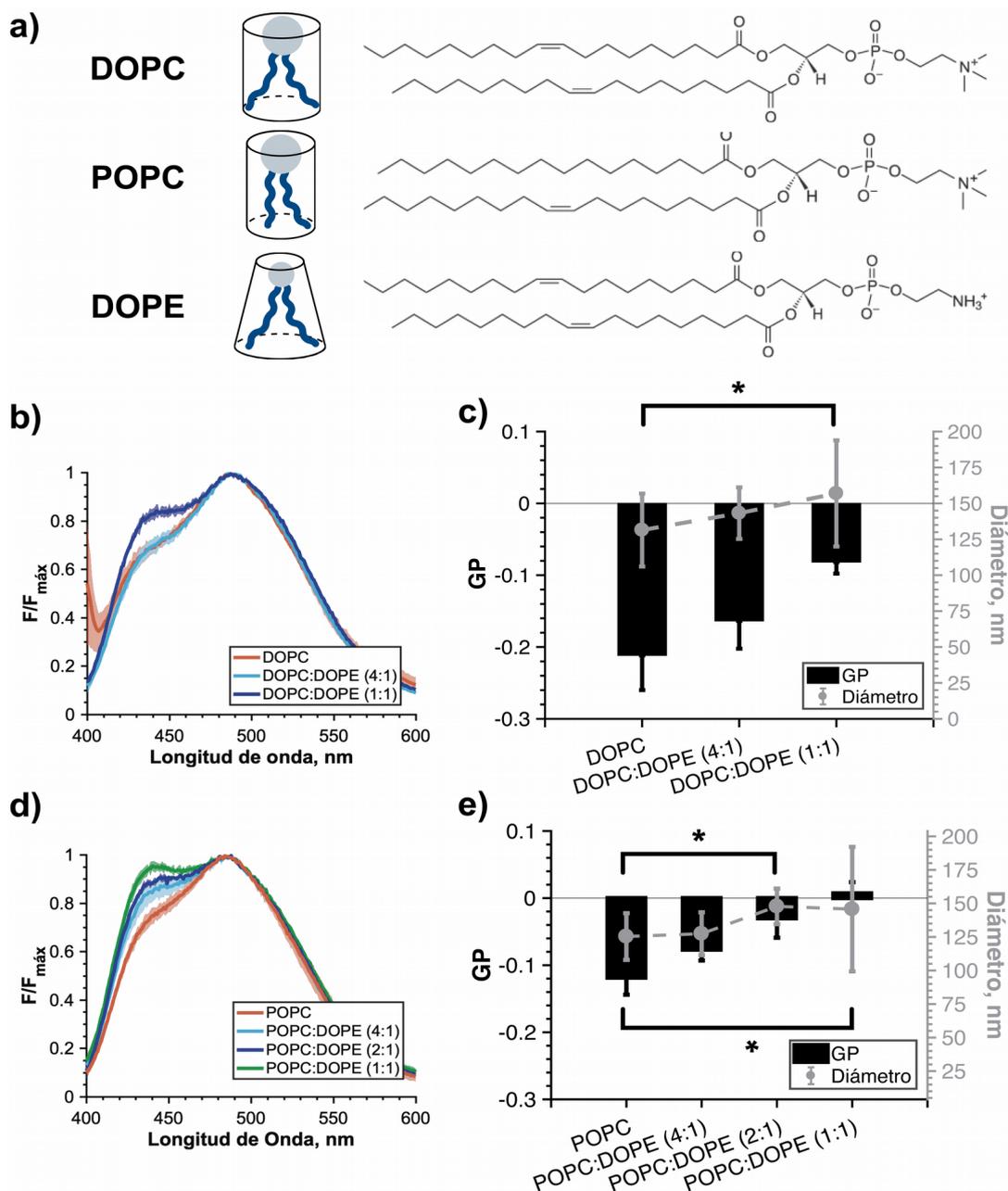


Figura 4.2 a) Estructura química de DOPC, POPC y DOPE. b) Espectro de emisión de Laurdan (excitación a 350 nm) para DOPC, DOPC:DOPE (4:1) y DOPC:DOPE (1:1). (Media \pm SD, n=3) c) Valores calculados de Polarización Generalizada (GP) (barras) y el tamaño medio para los liposomas (punteado en gris) compuestos por DOPC, DOPC:DOPE (4:1) y DOPC:DOPE (1:1). La GP está calculada usando las intensidades de 435 nm y 500 nm del espectro de emisión. *Significativamente diferentes con $p < 0.05$. (Media \pm SD, n=3). d) Espectro de emisión de Laurdan (excitación a 350 nm) para POPC, POPC:DOPE (4:1), POPC:DOPE (2:1) y POPC:DOPE (1:1). (Media \pm SD n=3). e) Valores calculados de Polarización Generalizada (GP) (barras) y el tamaño medio para los liposomas (punteado en gris) compuestos por POPC, POPC:DOPE (4:1)), POPC:DOPE (2:1) y POPC:DOPE (1:1). La GP está calculada usando las intensidades de 435 nm y 500 nm del espectro de emisión. (Media \pm SD, n=3) *Significativamente diferentes con $p < 0.05$.

2.2. Caracterización de NTs lipídicos con diferentes concentraciones de PE

Los nanotubos lipídicos (NTs) han sido extensamente usados como plantillas para caracterizar los parámetros mecánicos de la membrana (Wilson-Kubalek *et al.*, 1998; Bashkirov, 2007; Roux, 2013). Además, las curvaturas de estos NTs son similares a los cuellos de membrana donde se polimeriza la dinamina durante la endocitosis. Por ello, hemos empleado los NTs para determinar cómo afecta la presencia de PE a los parámetros mecánicos de las membranas que contienen PC. La rigidez a la flexión puede ser medida como $\kappa = \frac{F \cdot R_{NT}}{2\pi}$, donde F es la fuerza de tracción (fuerza axial aplicada para extraer el NT del reservorio de membrana, ver Figura 1.8). Realizamos estas medidas mediante una combinación de microscopía de fluorescencia y medidas de fuerza con pinzas ópticas (en colaboración con el grupo del Dr. Ibarra, IMDEA Nanociencia, Madrid). Como queríamos seguir usando los NTs como plantillas lipídicas para la reconstitución de la acción de las dinaminas, hemos usado composiciones lipídicas biomiméticas que contenían especies lipídicas cargada además de una cantidad de colesterol (Chol) y fosfatilserina (PS) similar a los niveles de la membrana plasmática (Raucher and Sheetz, 1999) (ver Tabla 4.3). Los NTs se formaron rodando las microesferas con reservorio lipídico sobre un cubreobjetos previamente tratado con BSA (ver Materiales Métodos).

DOPC	DOPE	Chol	DOPS	Rh-dOPE	
44,5	10	30	15	0,5	%mol
29,5	25	30	15	0,5	%mol
19,5	35	30	15	0,5	%mol
9,5	45	30	15	0,5	%mol

Tabla 4.3. Relación molar para la composición lipídica de los reservorios de los NTs.

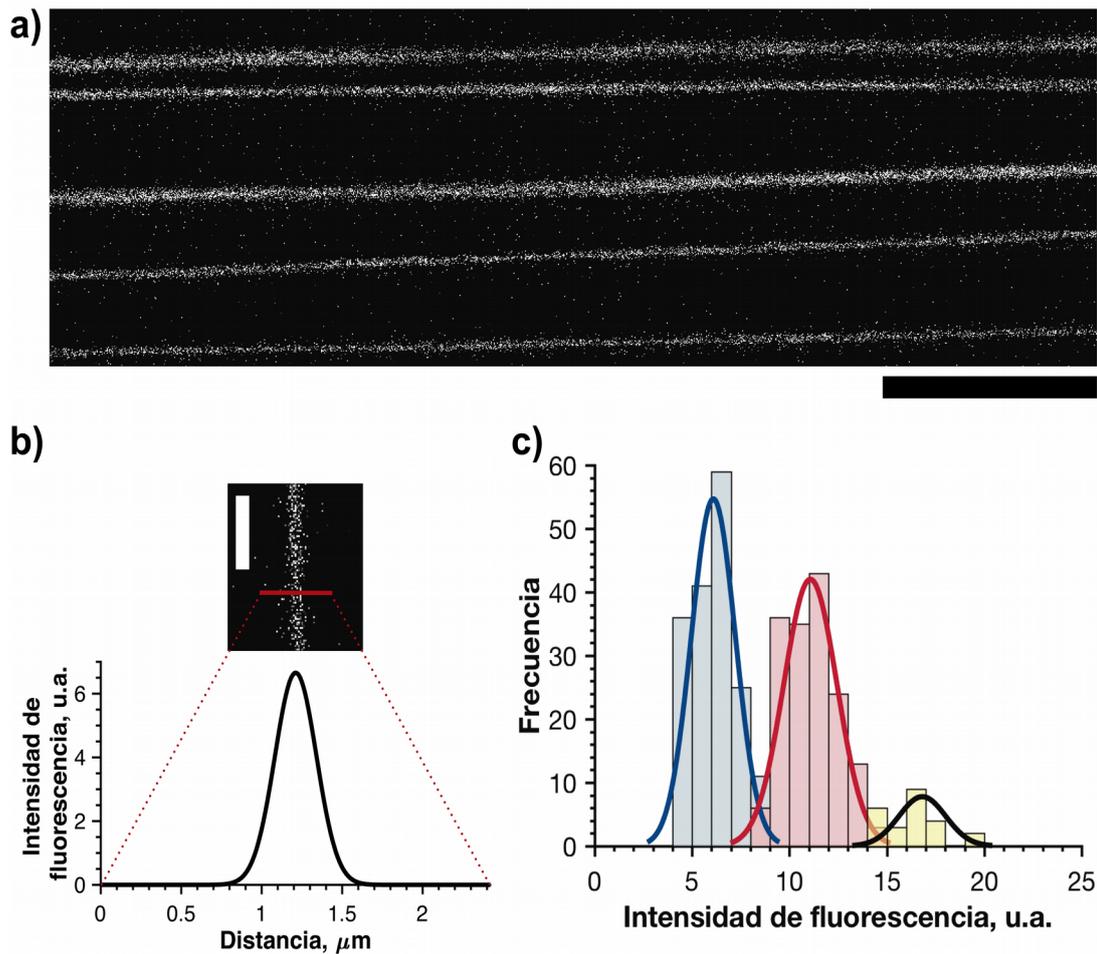


Figura 4.3. a) NTs lipídicos formados tras rodar microesferas de sílice con reservorio lipídico. Barra de escala 10 μm. b) Perfil transversal de intensidad de fluorescencia para un NT. Barra de escala 2 μm. c) Histograma de valores máximos de perfiles de intensidad de fluorescencia de los NTs. En azul se indica la distribución de intensidades correspondientes a los NTs unilaminares; en rojo, distribución de intensidades de NTs dobles, y finalmente en amarillo los triples. (N=365)

A fin de discriminar los NTs unilaminares de los NTs multilaminares, se tomó el perfil transversal de intensidad de fluorescencia de cada tubo (ver Figura 4.3-b). A continuación, se midió como elemento representativo de cada NT su correspondiente máximo de intensidad de fluorescencia del perfil transversal. El histograma de todos estos valores (ver Figura 4.3-c), posee tres distribuciones normales diferentes, que suponemos corresponden a diferentes números de lamelas en los tubos analizados. Por tanto, para seleccionar aquellos NT que son unilaminares se realizó el análisis previo de su perfil transversal de intensidad de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia de NT unilamelares depende de su radio en base a la siguiente premisa: en objetos por debajo del límite de difracción óptica, la intensidad total de fluorescencia es proporcional al área neta de la membrana (Kunding *et al.*, 2008). Para calcular la relación que existe entre la intensidad total de fluorescencia y la unidad de área de membrana correspondiente, se analizaron las imágenes de parches planos de membrana formados por derrames del reservorio lipídico de las microesferas utilizadas para obtener los NTs (ver Figura 4.4-a y Materiales y métodos). Se calcularon las intensidades de fluorescencia integradas de al menos tres regiones de interés (ROIs) de diferente tamaño sobre la imagen de cada parche (tras haber realizado una previa sustracción de la señal de fondo). Al representar la intensidad de fluorescencia de diferentes ROIs frente al área de los ROIs se confirmó su dependencia (ver Figura 4.4-b). De acuerdo con esto, la intensidad de fluorescencia integrada de las imágenes de NTs lipídicos se pudo transformar en unidades de área usando la siguiente ecuación:

$$I_{ROI} = \delta A \quad (\text{Eq. 12})$$

dónde I_{ROI} , es la intensidad de fluorescencia integrada por ROI; A el área del parche plano correspondiente, y que éste caso coincide con el área de la ROI; y δ es la *constante de calibración*.

Por otra parte, para estar seguros de que las imágenes de los parches de membrana utilizadas para la calibración están formadas por una sola bicapa lipídica, se observó la *recuperación de fluorescencia tras de un fotoblanqueo (FRAP)*. Así, para un parche compuesto de una sola bicapa, la mitad de la fluorescencia se recupera después de algunos minutos, mientras que, en un parche de doble bicapa, tiene lugar una recuperación de 75 % de fluorescencia del valor inicial (ver Figura 4.4-c). Este efecto se puede explicar en base a que la difusión de lípidos dentro del parche se realiza únicamente en las bicapas lipídicas que no están en contacto con el cubreobjetos. En el parche de una bicapa, solo se encuentra disponible una capa de lípidos mientras que, en el doble, la difusión de lípidos se puede hacer en tres capas. La calibración de la intensidad de fluorescencia integrada por área de la membrana se realizó diariamente y previa a la obtención y análisis de las imágenes de los NTs (Dar, Kamerkar and Pucadyil, 2015).

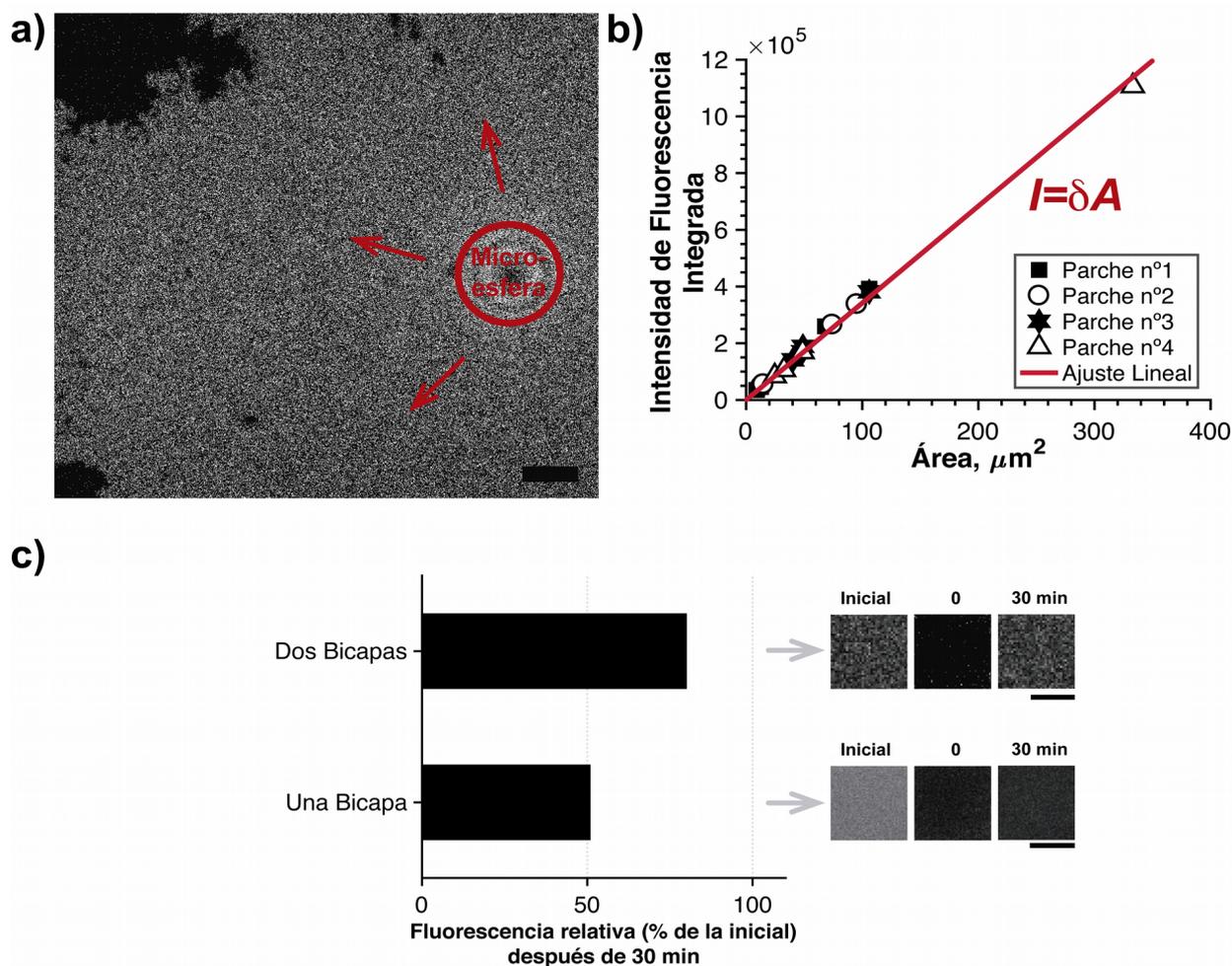


Figura 4.4 a) Ejemplo de parche lipídico usado para la calibración de fluorescencia por unidad de área. Barra de escala 5 μm . b) Intensidad de fluorescencia total por unidad de área del ROI. c) Recuperación de la fluorescencia tras un fotoblanqueamiento para un parche lipídico de una y dos bicapas. A la izquierda, la fluorescencia media relativa (% de la inicial) después de 30 minutos tras el fotoblanqueamiento. A la derecha, imagen de fluorescencia confocal inicial, 0, 30 min después del fotoblanqueamiento para un parche lipídico de una y dos bicapas. Barras de escala son igual a 5 μm .

A continuación, se formaron NTs lipídicos con las composiciones lipídicas de la Tabla 4.3. Para calcular el radio de los NTs, se midió la intensidad integrada de una ROI rectangular con dirección longitudinal y centrada en cada tubo, I_{ROI} . I_{ROI} es directamente proporcional al área del NT a través de la constante de calibración δ según la (Eq. 12). Considerando que la intensidad de fluorescencia de un NT unilamellar de longitud L_{ROI} corresponde al área de un cilindro de la misma longitud, entonces la (Eq. 12) se puede reescribir como:

$$\frac{I_{ROI}}{\delta} = 2\pi R_{NT} L_{ROI} \quad (\text{Eq. 13})$$

dónde R_{NT} es el radio del NT y δ es la constante de calibración obtenida a partir de parches planos de membrana unilamellar descritos más arriba. Por tanto:

$$R_{NT} = \frac{I_{ROI}}{2\pi\delta L_{ROI}} \quad (\text{Eq. 14})$$

Los valores de radios de los NTs obtenidos siguiendo la (Eq. 14) se encuentran recogidos en la Tabla 4.4 y la Figura 4.5-a.

[DOPE], %mol	Radio medio, nm	N
10	92,94 ± 25,7	51
25	78,86 ± 16,7	65
35	63,51 ± 18,2	42
45	49,48 ± 8,4	23

Tabla 4.4 Radio medio para NTs con diferente concentración de DOPE en sus composiciones.

Dichos valores muestran como el incremento de DOPE en la composición lipídica de la membrana está linealmente relacionada con una disminución de los radios de los NTs. El descenso en el número de NTs analizados con cantidades más grandes de DOPE se debe al aumento de NTs multilamelares (ver Figura 4.5-b). Vemos cómo los cambios de los valores de GP se traducen en una aparente disminución de la rigidez a la flexión de las membranas. Este resultado era inesperado, ya que para especies de lípido simples la rigidez a la flexión viene dada predominantemente por la composición de las colas lipídicas (Fuller and Rand, 2001; Garcia-Manyes *et al.*, 2010).

Para resolver este dilema hemos colaborado con el grupo de Dr. Bashkirov (Instituto de Medicina Físico-Química, Moscú, Rusia), quien aplicó la técnica del pinzamiento electrostático (Bashkirov *et al.*, 2008; Shnyrova *et al.*, 2013) para medir la rigidez a la flexión instantánea y efectiva de las membranas de los NTs. Mientras, y según lo esperado, la rigidez instantánea permanece sin cambios tras la sustitución de DOPC por DOPE (mismas colas lipídicas), el modulo efectivo de flexión decae dramáticamente, reflejando la redistribución molecular inducida por las preferencias de curvatura del DOPE (Bashkirov *et al.*, 2011).

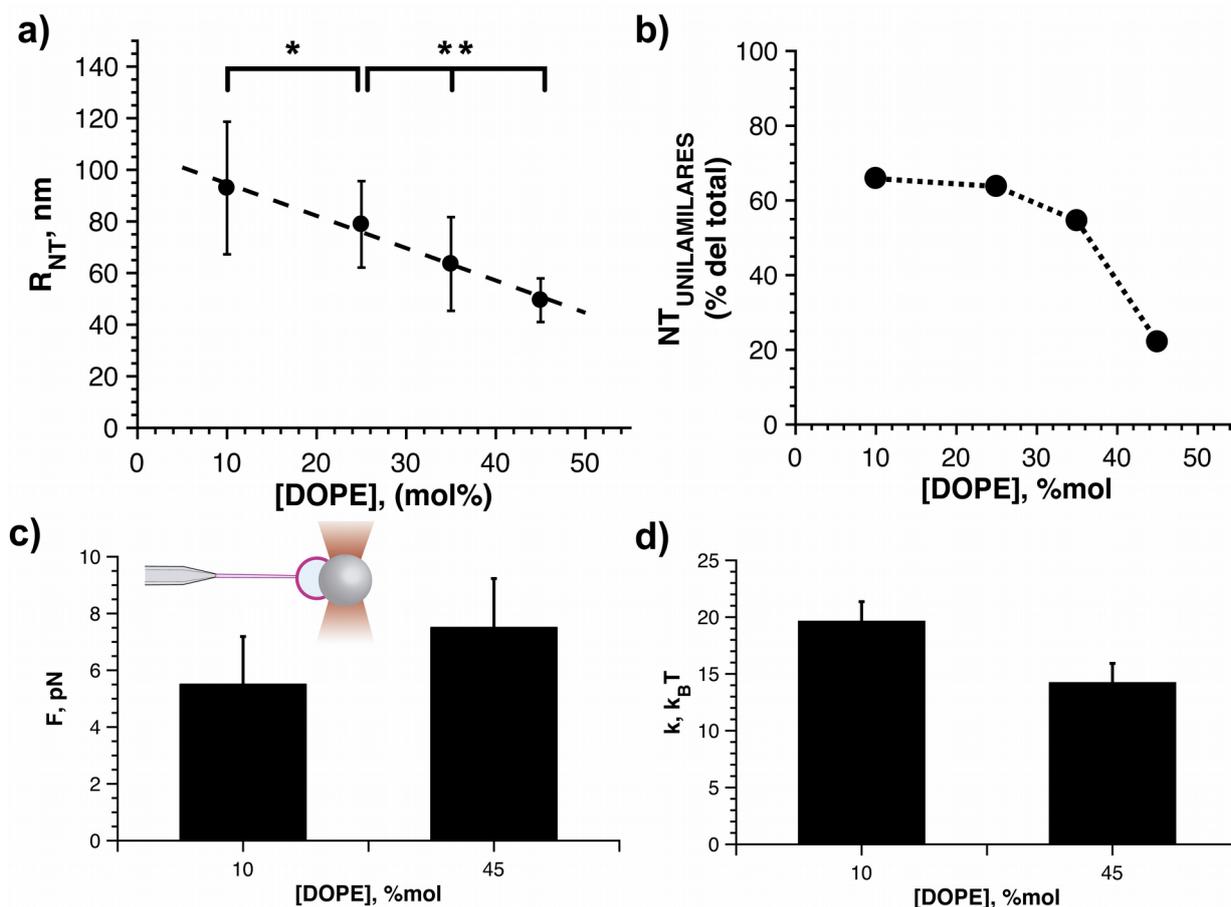


Figura 4.5 a) Radio medio para NTs con diferentes concentraciones de DOPE en su composición. Las barras de error indican desviación estándar. ([DOPE]=10 % mol, N=51; [DOPE]=25 % mol, N=65; [DOPE]=35 % mol, N=42; [DOPE]=45 % mol, N=23) *Significativamente diferentes con $p < 0.05$. **Significativamente diferentes con $p < 0.001$. b) NTs unilamilares (% del total) según la cantidad de DOPE en sus membranas. ([DOPE]=10 % mol, N=82; [DOPE]=25 % mol, N=101; [DOPE]=35 % mol, N=76; [DOPE]=45 % mol, N=103). c) Fuerza de extracción de tubos de membranas con un 10 %mol y 45 %mol de DOPE en su composición. $N \geq 10$. Medidas de fuerza realizadas por medio de las pinzas ópticas en colaboración con el grupo del Dr. Ibarra, IMDEA Nanociencia, Madrid. d) Rigidez a la flexión resultante de las medidas realizadas por las pinzas ópticas.

Es notorio que para un 10 %mol y un 45% mol de DOPE los datos del grupo de Dr. Bashkirov coinciden con los datos obtenidos en este trabajo (ver Figura 4.6). Anteriormente, análisis teóricos revelaron que la redistribución lipídica lleva a un decremento del módulo de flexión (k) (Claessens *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2009), independientemente de la curvatura de membrana en el segundo orden. Así, para una mezcla binaria:

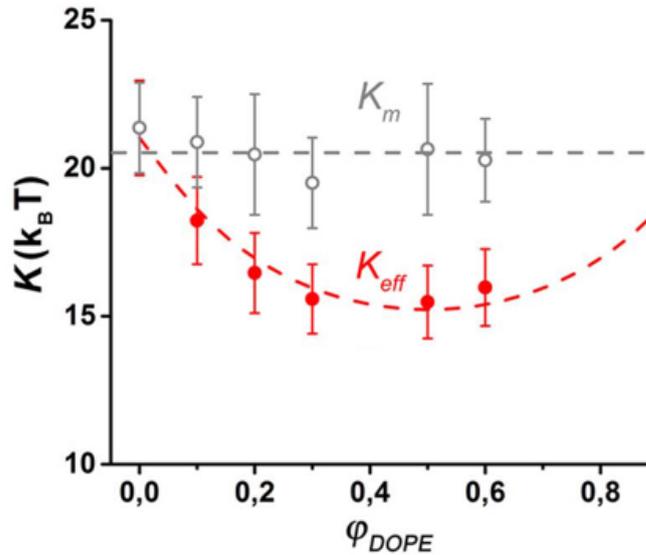


Figura 4.6 Rigidez a la flexión instantánea (gris) y tras la redistribución del DOPE (rojo) de membranas compuestas por DOPC:DOPE:colesterol según concentración de DOPE (datos del laboratorio de Dr. Bashkirov, Instituto de Medicina Físico-Química, Moscú).

$$\kappa_{eff} = \kappa_m - \Delta\kappa \quad (\text{Eq. 15})$$

siendo $\Delta\kappa = \frac{a\varphi_{PE}(1-\varphi_{PE})\cdot J_{PE}^2}{k_B T}$, donde a es el área por lípido en el plano neutro de la monocapa, φ_{PE} es la fracción del área de DOPE y J_{PE} es la curvatura espontánea del DOPE.

Por tanto, el DOPE puede afectar de forma universal la rigidez a la flexión de la membrana cuando sufre una deformación localizada (facilitando el intercambio con la membrana madre del reservorio). El siguiente paso fue investigar cómo este mecanismo de acción del DOPE afecta a las isoformas de las dianaminas clásicas.

3. Influencia de DOPE en la función de Dyn1 y Dyn2

Tras confirmar el efecto que tiene el DOPE sobre la rigidez de las membranas lipídicas, quisimos ver como este efecto se correlaciona con la actividad de curvatura de las proteínas, y en particular, la acción tubuladora de las dinaminas Dyn1 y la Dyn2.

Para ello hemos empleado las BGSs, ya que su gran reservorio lipídico permite que la tensión de la membrana se mantenga baja y constataste ante la acción de las proteínas.

3.1. Composiciones lipídicas de membranas para estudio de la acción de las dinaminas

Las composiciones lipídicas utilizadas, al igual que en caso anterior, se basaron en una variación de la cantidad de DOPE respecto al DOPC según la Tabla 4.3. Sin embargo, para asegurar el correcto anclaje y funcionamiento de las dinaminas, las membranas fueron dopadas con un 0,5; 4 y 5 %mol de PI(4,5)P₂ (ver Tabla 4.5).

DOPC	DOPE*	Chol	DOPS	PI(4,5)P ₂	
44,5	10	30	15	0,5	
41	10	30	15	4	%mol
40	10	30	15	5	
29,5	25	30	15	0,5	
26	25	30	15	4	%mol
25	25	30	15	5	
19,5	35	30	15	0,5	
16	35	30	15	4	%mol
15	35	30	15	5	
9,5	45	30	15	0,5	
6	45	30	15	4	%mol
5	45	30	15	5	

Tabla 4.5. Composición lipídica de los BGSs. *Para experimentos de microscopía confocal, una pequeña porción de DOPE fue marcada con Rh-DOPE (ver materiales y métodos).

3.2. Adsorción de dinaminas sobre liposomas grandes (LUVs)

Comenzamos cuantificando la adsorción de las dos isoformas de las dinaminas a los LUVs con moderada curvatura. Para ello, las dinaminas (0,5 μM final) se incubaron con 150 μM de LUVs durante 10 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 g durante 10 min. El pellet y el sobrenadante fueron analizados mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE con tinción Coomassie Blue. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 4.7. Ambas isoformas se unen de manera proporcional a la concentración de DOPE cuando la concentración de PI(4,5)P₂ en la membrana es pequeña (0,5 mol%, Figura 4.4-a). Este efecto se puede explicar en base a una disminución en el estrés de empaquetamiento de la monocapa en contacto con las proteínas, lo que sugiere una curvatura espontanea positiva para la parte de las dinaminas que se inserta en la membrana, es decir, la contraria al DOPE. Por tanto, el primer efecto observado de PE es sobre la adsorción, facilitando la inserción de la dinamina al crear una curvatura positiva en la membrana.

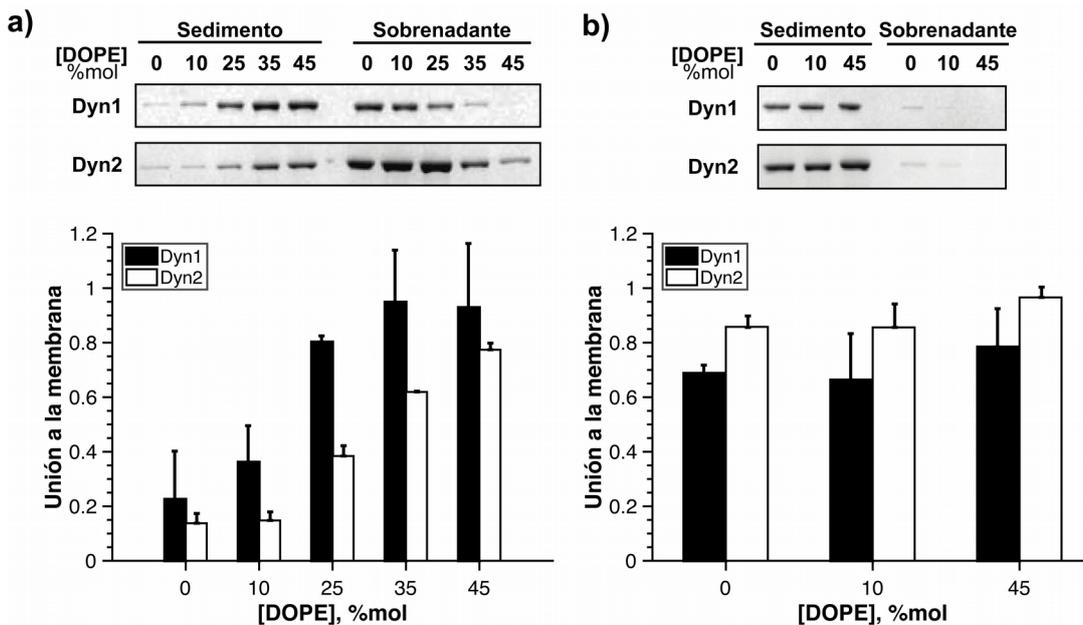


Figura 4.7 Dependencia de unión de las dinaminas de la concentración de DOPE en la membrana. a) Análisis de unión de la Dyn1 y Dyn2 a LUVs con un 0,5 %mol de PI(4,5)P₂. b) Análisis de unión de Dyn2 a LUVs con un 4 %mol de PIP₂. En ambos casos, la unión a la membrana fue cuantificada normalizando la cantidad de la proteína en el pellet (obtenida a partir del gel en A teniendo en cuenta la dilución) por la cantidad de Dyn2 total añadida a los LUVs.

A mayor concentración de PI(4,5)P₂ (4%mol, Figura 4.7-b), la dependencia de la unión a la membrana de la concentración del PE decae de manera drástica, en concordancia con las dos posibles orientaciones del dominio PH, que llevan a dos posibles modos de su unión a la membrana (Ramachandran *et al.*, 2009). A continuación, se evaluó la creación de curvatura en el sistema de bicapas gigantes suspendidas (BGSs).

3.3. Tubulación de membrana mediada por la Dyn1 y la Dyn2

Mediante microscopía de fluorescencia confocal se realizó una cuantificación de la tubulación de la membrana mediada por las dinaminas. Ambas isoformas (Dyn1 y Dyn2) fueron añadidas en una concentración final de 0.5 μ M a las BGSs preformadas en la celda de observación. Después de 20 minutos, las membranas se deformaron para formar túbulos membranosos muy curvados Figura 4.8. Se observó que, en el caso de la Dyn1, la longitud y el número de los túbulos aumenta cuando la rigidez a la flexión de la membrana disminuye, es decir, cuando aumenta el contenido de DOPE en la membrana. Para las membranas más blandas ([DOPE]=45 %mol), la Dyn1 tubula tanto la membrana que llega a agotar el reservorio lipídico de las BGSs. Es de notar que la Dyn1 puede llegar a deformar, aunque en menor grado, las membranas con un bajo contenido de DOPE. Sin embargo, a bajas concentraciones de DOPE en la membrana, la acción de la Dyn2 sobre la membrana queda prácticamente inhibida (ver Figura 4.9-a). La Dyn2 es capaz de tubular membranas con un contenido mínimo del 25% de DOPE. Para mayores concentraciones de DOPE, se repite la tendencia observada para la Dyn1, es decir, la cantidad y longitud de tubos aumenta con la concentración de DOPE en la membrana. La cuantificación de dicha acción de tubulación para ambas isoformas está recogida en la Tabla 4.6 y en la Figura 4.9-a. El porcentaje de BGSs tubulados por la Dyn1 no varió con la cantidad de DOPE en las membranas. La Dyn1 produce tubulación en el ~92% de las membranas, independientemente de la composición lipídica de éstas. Sin embargo, la Dyn2 no tubula todas las BGSs (ver Figura 4.9-a), dando lugar a dos

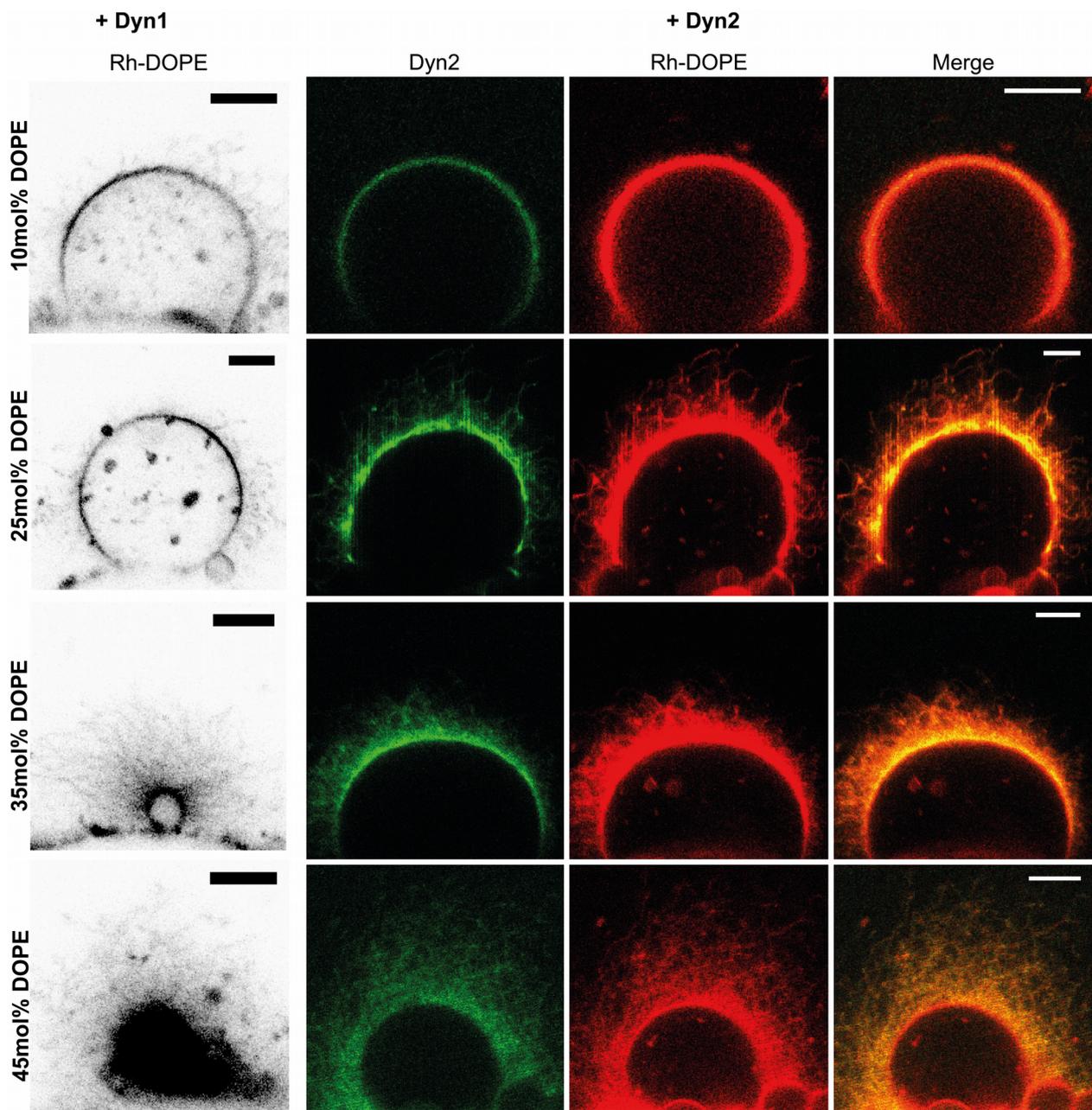


Figura 4.8. Tubulación de BGSs por Dyn1 y Dyn2 para membranas con diferente contenido de DOPE. Barras de escala son 5 μm . $[\text{Dyn}] = 0,5 \mu\text{M}$.

poblaciones: una con tubulación, y otra con ausencia de ella (ver Figura 4.9-b). El porcentaje de membranas con tubulación aumenta significativamente con el aumento de DOPE en la composición de la membrana. De hecho, para los BGSs con la membrana más rígida ($[\text{DOPE}] = 10 \text{ \%mol}$), la Dyn2 produce tubulación en menos del 10% de las BGSs. No obstante, el porcentaje de BGSs tubulados aumenta hasta el

95% cuando la [DOPE]=45 %mol, igualándose o incluso superando en eficiencia de tubulación a la isoforma Dyn1.

[DOPE], %mol	Dyn1		Dyn2	
	BGSs _{tubulados} (% del total)	N	BGSs _{tubulados} (% del total)	N
10	93,84 ± 2,1	105	9,10 ± 5,6	107
25	90,16 ± 3,8	84	56,32 ± 8,7	102
35	89,87 ± 0,4	106	79,20 ± 3,9	177
45	93,30 ± 2,2	46	95,33 ± 3,4	97

Tabla 4.6. Cuantificación de la tubulación en BGSs mediada por la Dyn1 y la Dyn2.

Para estudiar con más detalle las diferencia en el efecto de tubulación de la Dyn2 sobre membranas rígidas ([DOPE]=10 %mol) y membranas mucho más blandas ([DOPE]=45 %mol) realizamos experimentos de criomicroscopía electrónica. Para ello, formamos liposomas de 400 nm con un 10 %mol y 45 %mol de DOPE (resto composición según Tabla 4.5) y las incubamos con 0,5 μ M de Dyn2 durante toda la noche. A continuación, las muestras fueron criogenizadas y observadas con un JEM-2200FS/CR. Cómo se puede observar en la Figura 4.9-e, para membranas con un

10 %mol de DOPE la Dyn2 no llega a formar tubos lipídicos y sólo recubre la membrana de los liposomas. Sin embargo, cuando la concentración de DOPE asciende al 45 %mol, la Dyn2 transforma los liposomas en tubos, confirmando así los resultados obtenidos previamente por microscopía confocal. Por tanto, la Dyn2 produce un mayor número de membranas con tubulación con el descenso de la rigidez a la flexión de la membrana.

La influencia de la rigidez de la membrana en el comportamiento de la Dyn2 también se ve reflejada en la actividad bioquímica de esta proteína (ver Figura 4.9-d). Así, el aumento de la tubulación (observado tras incubación toda la noche la Dyn2 con LUVs) se correlaciona con una mayor actividad GTPasa, estimulada por el autoensamblaje de Dyn2 en estructuras helicoidales. La cantidad de fosfato (Pi) liberado después de 15 minutos de incubación de la Dyn2 con liposomas de 400 nm

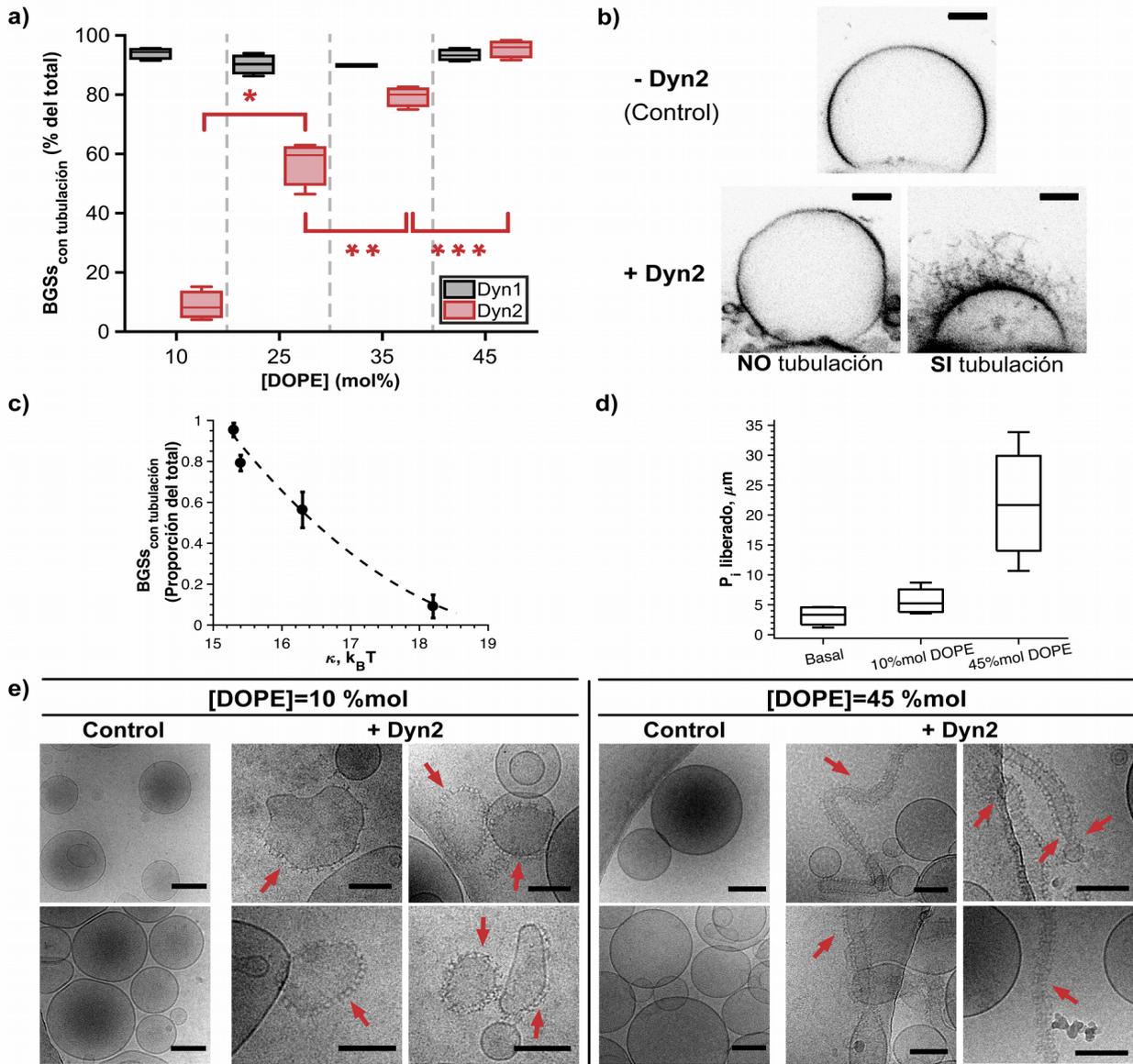


Figura 4.9. a) Cuantificación de la tubulación de BGSs por parte de la Dyn1 (negro) y Dyn2 (rojo) para composiciones con diferente contenido de DOPE. (N=3). ***Significativamente diferentes con $p < 0.001$. **Significativamente diferentes con $p < 0.01$. *Significativamente diferentes con $p < 0.05$. b) Ejemplo de tubulación observada por microscopía confocal. BGSs en ausencia de Dyn2 (arriba) y en presencia de $0.5 \mu\text{M}$ de Dyn2 (abajo). [DOPE]=35 %mol. Barras de escala $5 \mu\text{m}$. c) BGSs con tubulación (proporción del total) por Dyn2 para diferentes rigideces a la flexión. (Media \pm desviación estándar). d) Actividad GTPasa estimulada para la Dyn2 medida como cantidad de Pi liberado tras 15 min de incubación con GTP. e) Imágenes de criomicroscopía electrónica de liposomas de 400 nm incubados durante toda la noche con $0,5 \mu\text{M}$ de Dyn2. Barras de escala 100 nm . Las flechas rojas indican el andamiaje de la Dyn2.

(GTPasa estimulada) en presencia de 1 mM de GTP es mayor para membranas con un 45% mol de DOPE que para las que tienen un 10% molar de este lípido.

3.4. Aspectos mecánicos de la tubulación producida en BGSs por la Dyn1 y la Dyn2

Para caracterizar en detalle la tubulación producida por la Dyn1 y la Dyn2, hemos medido los radios de los túbulos creados por éstas isoformas en membranas con diferentes rigideces a la flexión (ver Tabla 4.7 y Figura 4.10). El análisis de estos radios se realizó siguiendo la misma estrategia que la empleada con los NTs lipídicos explicada en la sección anterior (ver apartado 2.2 Caracterización de NTs lipídicos con diferentes concentraciones de PE).

DOPE (%mol)	Dyn1		Dyn2	
	Radio medio (nm)	N	Radio medio (nm)	N
10	8,64 ± 5,2	26	20,58 ± 7,6	8
25	10,85 ± 2,7	12	12,81 ± 5,2	22
35	10,91 ± 1,6	11	6,47 ± 2,2	34
45			4,64 ± 1,2	10

Tabla 4.7. Radio medio de tubos resultantes de la tubulación de BGSs por Dyn1 y Dyn2 en membranas con diferentes concentraciones de DOPE.

Al igual que en el caso de los porcentajes de BGSs tubulados, los radios de los túbulos inducidos por la Dyn1 permanecen sin cambios significativos al aumentar la cantidad de DOPE en la membrana (ver Figura 4.10-a). Así, para todas las membranas testadas se encontró que los valores para los radios de tubos formados por la Dyn1 estaban cerca de los 10 nm, valor similar al documentado en estudios anteriores de varios grupos (Sweitzer and Hinshaw, 1998; Chen *et al.*, 2004; Danino, Moon and Hinshaw, 2004; Roux *et al.*, 2010). Dado que en las membranas que contienen un 45 %mol de DOPE la Dyn1 produce un elevado número de túbulos (ver Figura 4.8), este punto fue excluido del análisis, ya que la cantidad de túbulos

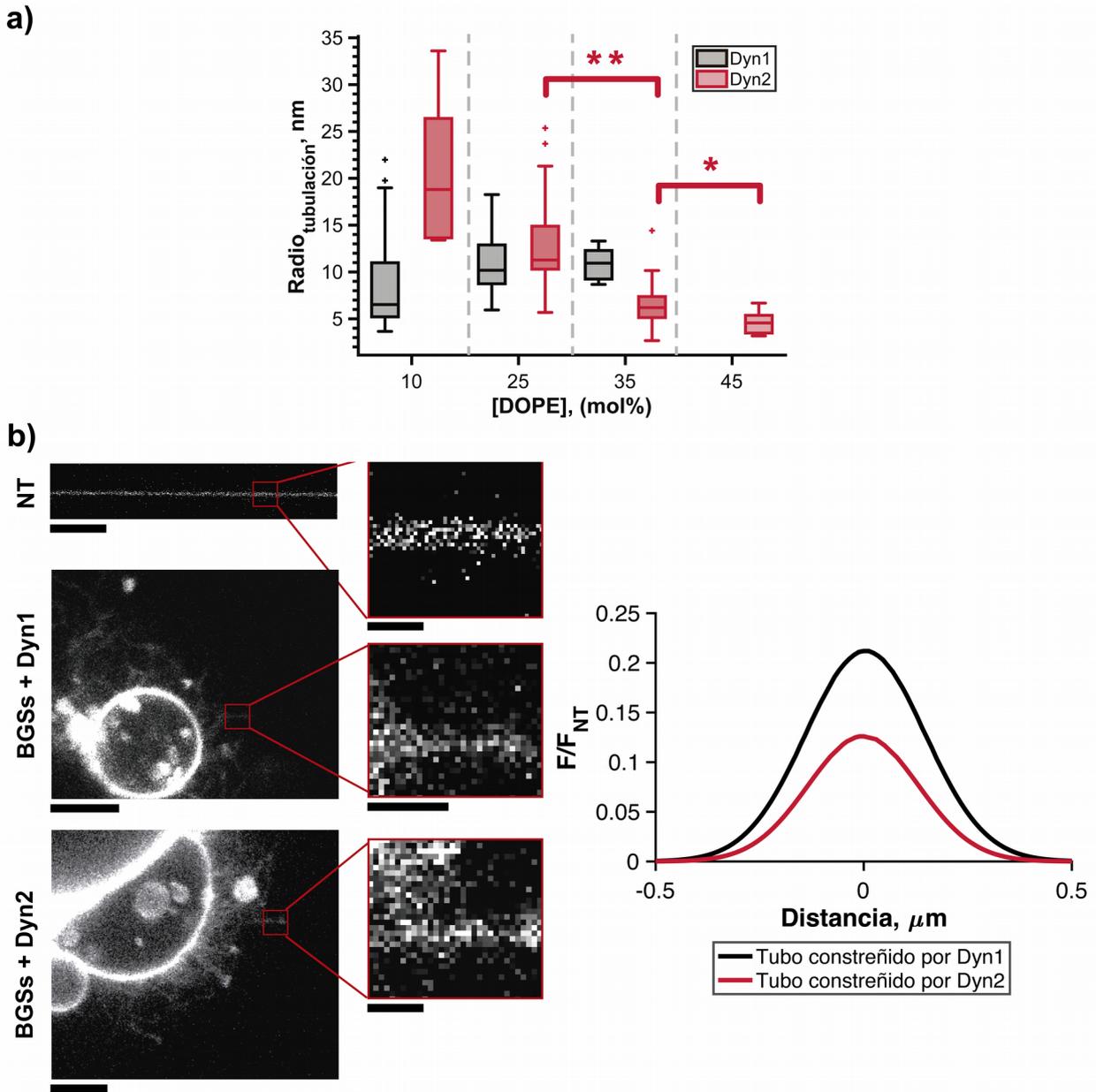


Figura 4.10 a) Radio de la tubulación producida por Dyn1 (negro) y Dyn2 (rojo) para BGSs con membranas con diferentes cantidades de DOPE. **Significativamente diferentes para $p < 0.01$. *Significativamente diferentes para $p < 0.05$. b) Izquierda, imágenes de un NT y tubos extendidos por la Dyn1 y Dyn2 a partir de las membranas de BGSs. En los tres casos, las membranas contienen un 35% mol de DOPE. Barras de escala 5 μm , siendo 1 μm en las zonas amplificadas. Derecha, correspondientes perfiles transversales de fluorescencia tras sustraer la señal de fondo y normalizados por el máximo de fluorescencia del perfil transversal de un NT lipídico.

complicaba la selección de tubos individuales. Además, el gran fondo de fluorescencia impedía un análisis cuantitativo de los mismos.

En el caso de la tubulación mediada por la Dyn2, se observa cómo el radio característico de los tubos producidos por esta proteína disminuye con el aumento de la cantidad de DOPE en la membrana (ver Tabla 4.7 y Figura 4.10-a,b). Una forma muy visual de comparar la constricción de membrana producida por la Dyn1 y la Dyn2 es representar sus radios normalizados frente a un tubo lipídico sin constricción (ver Figura 4.10-b, derecha). En este caso se observa que, el perfil de fluorescencia refleja la diferencia en el poder de constricción del tubo por parte de las dos isoformas proteicas ($R_{\text{TUBE},35\% \text{mol DOPE}} = 63,51 \pm 18,2 \text{ nm}$).

La tubulación mediada por las dinaminas fue previamente asociada a la formación del polímero helicoidal de una geometría predeterminada que impone su geometría sobre la superficie del tubo lipídico (Danino, Moon and Hinshaw, 2004; Roux *et al.*, 2010). Sin embargo, las medidas por microscopía de fluorescencia revelaron una variabilidad significativa en el radio (ver Figura 4.10-a). Dicha variabilidad podía estar relacionada con las diferencias intrínsecas de la tensión lateral de la membrana modelo, así como posibles errores metodológicos (ver Figura 4.11-a). Sin embargo, el análisis por crioEM confirmó que la variabilidad en la media del radio de tubulación estaba también relacionada con la diferente proporción de recubrimiento del tubo por parte de la dinamina. Esencialmente, hemos detectado dos tipos de recubrimiento: el patrón regular correspondiente a las hélices de dinamina y la cobertura irregular dispersada

Así, mientras que el patrón regular ha sido aceptado como dominante para la Dyn1 (Danino, Moon and Hinshaw, 2004), hemos establecido que la Dyn2 produce constricción irregular sobre nanotubos lipídicos blandos, con una probabilidad aproximadamente igual al del patrón helicoidal regular (ver Figura 4.11-c,d). Sorprendentemente, la constricción irregular es en promedio más fuerte, induciendo una curvatura de membrana muy alta y cercana a las asociadas con la fisión de la membrana (Frolov *et al.*, 2015). Estas observaciones corroboran la conjetura propuesta con anterioridad de que la fisión de la membrana requiere el desensamblaje de la hélice regular de la dinamina (Bashkirov *et al.*, 2008; Shnyrova *et al.*, 2013).

La dependencia de la concentración de DOPE observada tanto en la probabilidad de tubulación como de la curvatura estacionaria final de los túbulos constreñidos por

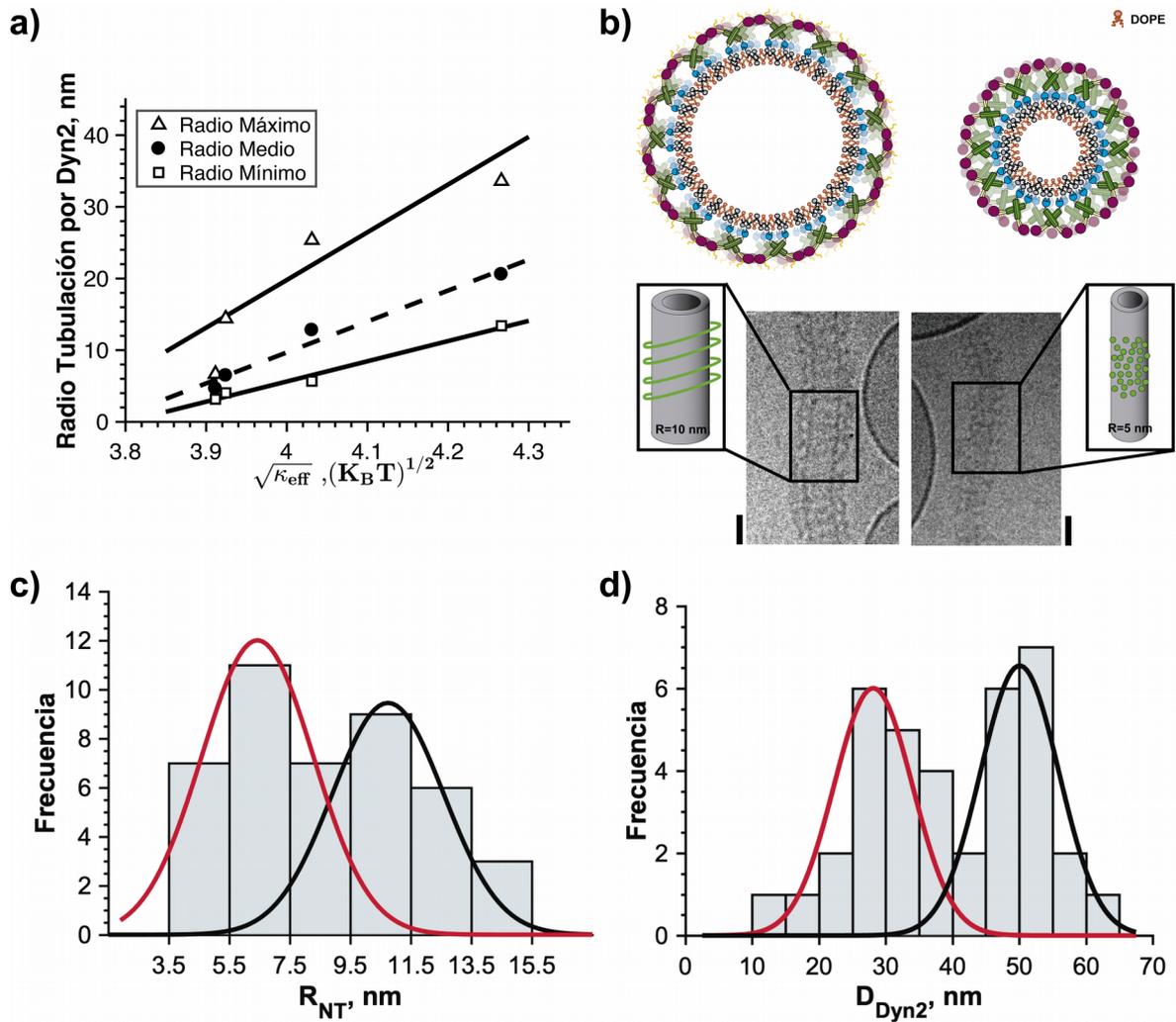


Figura 4.11. Análisis EM del recubrimiento del NT lipídico por parte de las dinaminas. a) Variabilidad del radio de NTs medido por microscopía de fluorescencia. B. Dos tipos de cobertura de proteínas: helicoidal regular (izquierda) y desordenada (derecha). c-d) Histogramas que cuantifican la variabilidad de la geometría de los nanotubos con un 45% de DOPE tras su constricción por la Dyn2. Se muestran la variabilidad de los radios de los NTs lipídicos (c) y el diámetro exterior de los andamios de dinamina (d).

la Dyn2, puede explicarse con un simple modelo que asume que la concentración de dinamina en la superficie del nanotubo varía en sincronía con la de DOPE (esencialmente, ambos los componentes se “codistribuyen” entre el reservorio y las membranas tubulares para minimizar las tensiones elásticas). Sin embargo, la constricción de membrana llevada a cabo por la Dyn1 no aparenta ninguna dependencia de los cambios de rigidez de la membrana analizados en este trabajo. Ello sugiere que, aun a pesar de ser semejantes estructuralmente, ambas isoformas de la dinamina funcionan en un contexto biológico diferente.

Sin embargo, la constricción de membrana llevada a cabo por la Dyn1 no aparenta ninguna dependencia de los cambios de rigidez de la membrana analizados en este trabajo. Ello sugiere que, aun a pesar de ser semejantes estructuralmente, ambas isoformas de la dinamina funcionan en un contexto biológico diferente.

3.5. Modelo de tubulación por dinaminas dependiente de DOPE

La (Eq. 9) demuestra que una fuerza axial mayor que la energía elástica por unidad de longitud del tubo lipídico es un requisito para la iniciación de la tubulación. En el caso de la Dyn1, la fuerza es generada por la polimerización helicoidal, resultando en una geometría fija e independiente de los lípidos (Danino, Moon and Hinshaw, 2004), en concordancia con nuestros resultados (ver Figura 4.11-b). Sin embargo, hemos detectado una correlación entre la variabilidad del radio de nanotubos puramente lipídicos y los constreñidos por la Dyn1 de la misma composición, indicando que la Dyn1 es sensible a la mecánica lipídica (Bashkirov *et al.*, 2008).

Para la Dyn2 esta dependencia lipídica es mucho más pronunciada. En primer lugar, y de acuerdo a observaciones previas (Liu *et al.*, 2011) la tubulación producida por esta proteína en membranas con un bajo contenido de DOPE, es decir, con una rigidez a la flexión efectiva moderada, es muy ineficiente (ver Figura 4.9). La tubulación fue analizada en presencia constante de la Dyn2 en solución, por lo que el efecto observado no puede ser achacado a una disminución de la unión de la Dyn2 a las membranas prácticamente planas de las BGSs. Además, los experimentos se llevaron a cabo con membranas con un alto contenido de PI(4,5)P₂ en las membranas para asegurar la máxima unión de la proteína (ver Figura 4.7). De forma notoria, un descenso moderado del módulo efectivo de flexión (k_{eff}) mediante el incremento de la concentración de DOPE permite una tubulación masiva (ver Figura 4.9). Para explicar este efecto hemos usado un simple modelo que considera la inserción local de los dímeros de la Dyn2 como un pequeño agente creador de curvatura. Si asumimos

que para un tubo estacionario producido por la Dyn2 la fuerza axial es cercana al cero, entonces, combinando la (Eq. 9) y la (Eq. 15) obtenemos:

$$\Sigma = \frac{1}{2}\kappa_1(J - J_1)^2 + \frac{1}{2}\kappa_2(J - J_2)^2 \quad (\text{Eq. 16})$$

donde J es la curvatura del monotúbulo (en la superficie trans-monocapa), $\kappa_{1,2}$ y $J_{1,2}$ son los módulos de flexión efectivos (ver (Eq. 15)) y las curvaturas intrínsecas de las monocapas interior y exterior del tubo, respectivamente, y Σ es un parámetro que mide la diferencia entre la densidad de la energía de polimerización de la Dyn2 y la

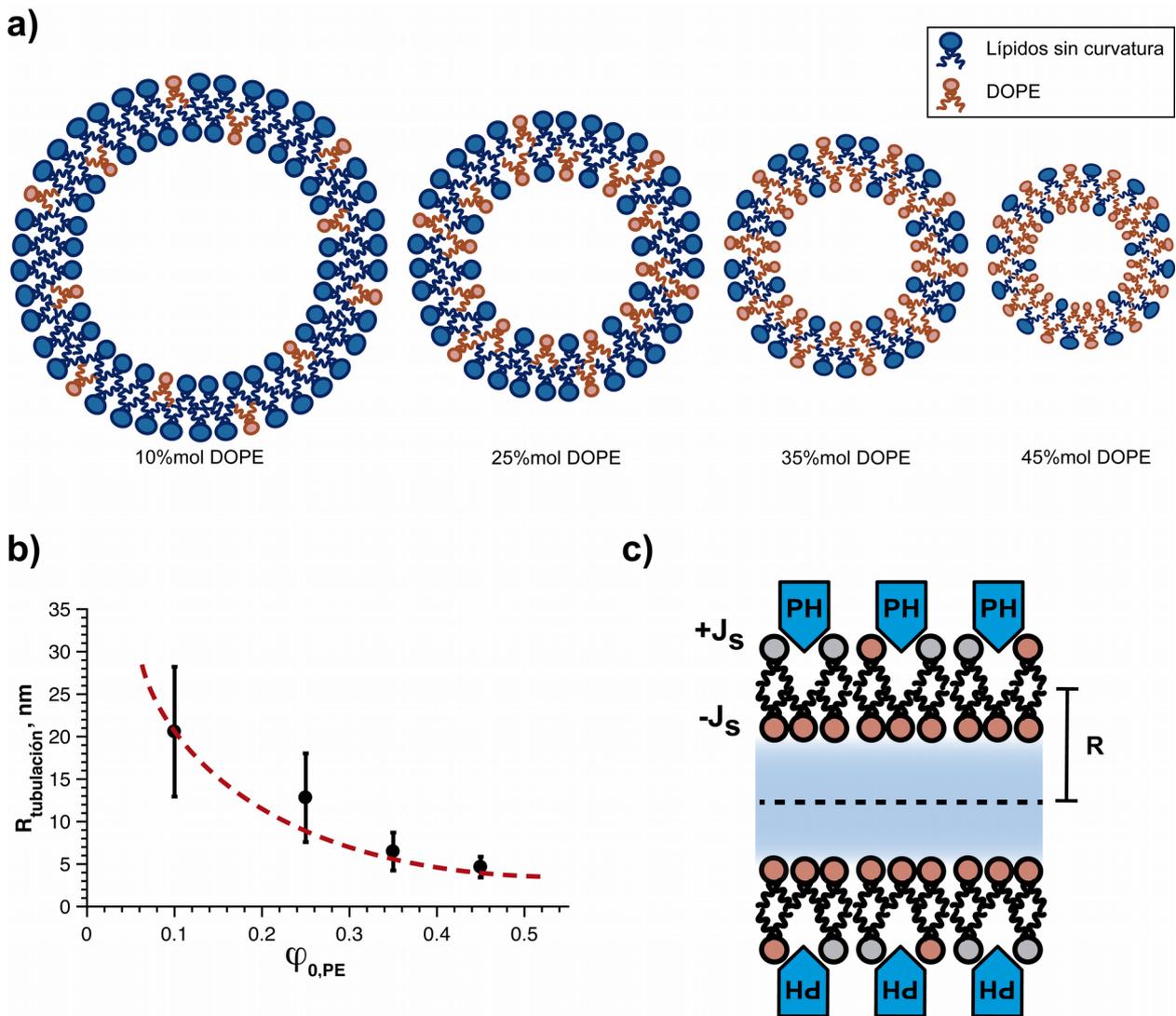


Figura 4.12 Modelo de modulación de la creación de curvatura de membrana por Dyn2 por DOPE. a) Dibujo ilustrando la redistribución de DOPE entre las monocapas interna y externa de un nanotubo lipídico. b) La curvatura del nanotubo (mostrada en negro) sigue de cerca los cambios de la curvatura espontánea de la membrana del nanotubo debido a la adición de DOPE. La curva roja muestra el ajuste con la (Eq. 16). c) Dibujo ilustrando el acoplamiento de las curvaturas espontáneas de las monocapas interna y externa de un nanotubo recubierto de Dyn2.

tensión lateral de la membrana del nanotubo. Además, asumimos que en su estado desordenado, sin una geometría predeterminada (ver Figura 4.11), la Dyn2 se co-distribuye con DOPE que tiene a acumularse en la monocapa interna del nanotubo (ver Figura 4.12-a). Tras ajustar la dependencia del radio del NT de la concentración de DOPE con la (Eq. 16) se observa que el radio del nanotubo sigue de cerca la curvatura espontánea de la monocapa impuesta por el DOPE (ver Figura 4.12-b). Además, de la (Eq. 16) se deduce que si Σ es pequeño (tal y como se espera para la Dyn2; debido a que ya se demostró con anterioridad que es una mala creadora de curvatura (Liu *et al.*, 2011)), la Dyn2 ha de codistribuirse con el DOPE en la monocapa externa para hacer que su curvatura intrínseca esté cerca de J (ver Figura 4.12-c). Por lo tanto, el aumento de la actividad de creación de curvatura de la Dyn2 mediada por el DOPE parece tener una naturaleza entrópica relacionada con la curvatura intrínseca del dímero Dyn2 unido a la membrana. Aunque el problema requiera una investigación más profunda, suponemos que la Dyn2 se caracteriza por una mayor actividad de curvatura local y una menor energía de polimerización, ambas probablemente relacionadas con la estructura única del dominio PH de Dyn2 que interactúa con la membrana.

4. Discusión

El DOPE como regulador de la remodelación de membrana

Aunque el DOPE no es capaz de formar una bicapa lipídica estable por sí sólo (Janmey and Kinnunen, 2006), es un componente abundante de las membranas celulares que está involucrado en diferentes vías de señalización y síntesis de lípidos, así como en procesos de remodelación de membrana, particularmente su fusión y fisión (Janmey and Kinnunen, 2006; Kozlov, McMahon and Chernomordik, 2010). El área de la cabeza del PE es más pequeña que la de PC, lo que explica la gran curvatura negativa de la monocapa lipídica hecha de DOPE (Separovic and Gawrisch, 1996; Fuller and Rand, 2001; Seu *et al.*, 2006). Una curvatura negativa grande ha sido muchas veces asociada

con los estados genéricos intermedios no-bicapa de fusión y fisión de la membrana, el llamado tallo (“*stalk*”) lipídico (Zimmerberg and Kozlov, 2006). Dado que la geometría molecular del DOPE coincide estrechamente con la del *stalk*, este lípido se ha señalado durante mucho tiempo, como facilitador de la formación del *stalk*, función confirmada por muchos estudios experimentales (L. V. Chernomordik and Kozlov, 2003; Aefferer *et al.*, 2012; Frolov *et al.*, 2015). Por otro lado, varios estudios apuntan a una participación más general del DOPE en la regulación de la mecánica de membrana. A pesar de que la presencia de DOPE en la membrana aumenta la densidad de empaquetamiento de las colas lipídicas (ver Figura 4.12) (Separovic and Gawrisch, 1996; Garcia-Manyes *et al.*, 2010), la rigidez efectiva a la flexión de la bicapa lipídica disminuye en su presencia (Bashkirov *et al.*, 2011; Shi and Baumgart, 2015). Esta disminución se relacionó anteriormente con la acumulación de DOPE en la monocapa interna del nanotubo lipídico y la disminución proporcional de DOPE en la monocapa externa (Bashkirov *et al.*, 2011). Así, la redistribución de DOPE facilita la constricción de los nanotubos, resultando en una disminución sustancial de la rigidez efectiva a la flexión de la membrana del nanotubo (Roux *et al.*, 2010; Bashkirov *et al.*, 2011).

Si bien en trabajos anteriores se analizaron puntos discretos de concentración de DOPE (20 mol% DOPE, en (Bashkirov *et al.*, 2011) y 30 mol% en (Shi and Baumgart, 2015), aquí, en colaboración con los grupos de los Drs Bashkirov e Ibarra, hemos podido estudiar sistemáticamente el efecto del DOPE sobre una amplia gama de composiciones de membrana (ver Tabla 4.3, Figura 4.5 y Figura 4.6). De este modo hemos podido comprobar que la dependencia de K_{eff} de la concentración de DOPE es consistente con la distribución lineal de curvatura (Bashkirov *et al.*, 2011; Kurczy *et al.*, 2014).

Efecto del DOPE sobre la unión a la membrana de Dyn1 y Dyn2

La adsorción de proteínas es generalmente sensible al empaquetamiento lipídico, ya que se ve afectada por defectos (por ejemplo, debido a lípidos poli-insaturados), colesterol y otros agentes que causan ordenamiento y condensación (Campelo, McMahon and Kozlov, 2008; Koller and Lohner, 2014). Estos efectos está generalmente relacionado con las proteínas que se insertan de alguna manera dentro de la bicapa lipídica. El grado de acunamiento de la membrana por las dinaminas clásicas sigue siendo un punto de discusión controvertido (Antonny *et al.*, 2016). Aquí mostramos claramente que el DOPE, un componente abundante de la membrana plasmática donde la Dyn1 y Dyn2

residen de forma preferencial, promueve fuertemente la adsorción de estas proteínas. Esto corrobora de forma rotunda las mediciones anteriores de la inserción de membrana del dominio PH de Dyn1 (Burger *et al.*, 2000). Además, ello implica que los dominios de PH de ambas isoformas de la dinamina crean una curvatura local sustancial, de modo que la dinamina unida a la membrana se puede considerar como cuasi-partícula con una curvatura intrínseca alta, capaz de detectar y crear una curvatura de membrana global.

Efectos del DOPE en la generación de curvatura por Dyn1 y Dyn2

Nuestro trabajo revela que la Dyn1 y la Dyn2 producen efectos diferentes sobre membranas con diferentes concentraciones de DOPE en sus composiciones lipídicas. La actividad de la Dyn1 (tanto la actividad creadora de curvatura como la actividad constrictora) casi no varía con la rigidez a la flexión de la membrana. La Dyn1 no tiene problemas para tubular membranas que contienen DOPE, de acuerdo con la polimerización efectiva de la proteína sobre la membrana. El PE tiene muy poco efecto en la curvatura final de los tubos constreñidos por la Dyn1, produciendo radios similares para todas las composiciones de membrana alrededor de los 10 nm (ver Figura 4.10-a), resultado clásico de la constricción de membrana por Dyn1 (Sweitzer and Hinshaw, 1998; Chen *et al.*, 2004; Danino, Moon and Hinshaw, 2004; Roux *et al.*, 2010), confirmando el correcto funcionamiento del método aquí usado.

En cambio, la Dyn2 genera curvatura de forma robusta únicamente a partir de membranas blandas que contienen altas cantidades de DOPE. En acuerdo con trabajos anteriores del grupo de la Dr. Schmid (Liu *et al.*, 2011), la Dyn2 no pudo tubular membranas con cantidades bajas de DOPE. Además, la Dyn2 no logra producir la misma constricción de membrana para todas las rigideces de membrana y tensiones superficiales, siendo dependiente de la rigidez a la flexión de la membrana madre. Relacionamos este comportamiento con la acumulación desordenada de la Dyn2 en el nanotubo, impulsada por las preferencias de curvatura del dímero de la proteína. Hay que tener presente que la constricción de membrana irregular observada con la Dyn2 en nanotubos con alto contenido de DOPE, se observó previamente para la Dyn1 con una mutación en el dominio PH (Ramachandran *et al.*, 2009). Los dominios PH se han implicado tanto en la inserción de membranas como en la polimerización de dinaminas. En solución, el dominio PH se encuentra en una configuración cerrada que protege el

interfaz de polimerización, lo que inhibe la oligomerización de la dinamina en la solución (Ramachandran *et al.*, 2007; Reubold *et al.*, 2015). Mientras se encuentra en la membrana, el dominio se libera de la interfaz de polimerización (lo que aumenta la polimerización) y se une a las especies de lípidos cargadas (Klein *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 1998). El grupo Ramachandran propuso que el dominio PH adopta diferentes orientaciones mientras está en la membrana, regulando así recíprocamente la oligomerización y la inserción de la proteína en la membrana. Podemos especular que el estado desordenado de Dyn2 en el nanotubo detectado aquí (ver Figura 4.11) refleja un estado de inserción profunda del dominio PH en la membrana, que también bloquea la polimerización de largo alcance (Mattila *et al.*, 2015). Dicha orientación del dominio PH se asoció con el estado de transición de la hidrólisis de GTP (Mattila *et al.*, 2015). Aquí encontramos que Dyn2 podría aproximarse a este estado en la configuración *apo*, sin el nucleótido, de acuerdo con la pronunciada dependencia de DOPE de su actividad GTPasa. Estos hallazgos ilustran que la mecánica de membrana está íntimamente acoplada al ciclo GTPasa de las dinaminas, siendo este acoplamiento especialmente pronunciado para la isoforma Dyn2.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. Los BGSs permiten la producción de membranas modelo a partir de cualquier composición lipídica de forma rápida y eficaz.
2. La inmovilización proporcionada por el soporte de las microesferas de sílice facilita la observación de procesos de remodelación de la membrana con objetivos de microscopía óptica de alto poder de resolución.
3. La rigidez a la flexión de los BGSs se define por la composición de la mezcla lipídica originaria. Por ello, los BGSs son un modelo adecuado para el análisis cuantitativo de la remodelación de la membrana.
4. La relación molecular DOPE/DOPC controla el parámetro de rigidez a la flexión efectivo de la bicapa lipídica.
5. El DOPE promueve la unión a la membrana de las dinaminas clásicas.
6. La relación molecular DOPE/DOPC afecta tanto la actividad de creación de curvatura como la actividad GTPasa de la isoforma 2 de la dinamina clásica, algo que no sucede con la isoforma 1 de dicha proteína.
7. Distinguimos dos modos de creación de curvatura: andamiaje clásico y un nuevo modo entrópico basados en la redistribución conjunta del dominio PH y DOPC.

8. La geometría lipídica afecta la bioquímica de las dinaminas cambiando los patrones y la eficiencia del autoensamblaje proteico.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

Aeffner, S., Reusch, T., Weinhausen, B. and Salditt, T. (2012) ‘Energetics of stalk intermediates in membrane fusion are controlled by lipid composition’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), pp. E1609–E1618. doi: 10.1073/pnas.1119442109.

Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H. and Kinosita, K. (1996) ‘Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope.’, *Biophysical journal*, 71(December), pp. 3242–3250. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79517-6.

Alberts, B. (1985) *Molecular Biology of the Cell*. 4th editio, New York: Garland Science, c2002. 4th editio. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054>.

Alwarawrah, M., Dai, J. and Huang, J. (2010) ‘A Molecular View of the Cholesterol Condensing Effect in DOPC Lipid Bilayers’, *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(22), pp. 7516–7523. doi: 10.1021/jp101415g.

Angelova, M. I. and Dimitrov, D. S. (1986) ‘Liposome Electroformation’, *Faraday Discuss. Chem. SO*, 81, pp. 303–311.

Antonny, B. (2011) ‘Mechanisms of membrane curvature sensing.’, *Annual review of biochemistry*, 80, pp. 101–23. doi: 10.1146/annurev-biochem-052809-155121.

Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., Ford, M., Frolov, V. A., Frost, A., Hinshaw, J. E., Kirchhausen, T., Kozlov, M. M., Lenz, M.,

Low, H. H., McMahon, H., Merrifield, C., Pollard, T. D., Robinson, P. J., Roux, A. and Schmid, S. L. (2016) ‘Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know’, *The EMBO Journal*, p. e201694613. doi: 10.15252/emboj.201694613.

Arumugam, S. and Bassereau, P. (2015) ‘Membrane nanodomains: contribution of curvature and interaction with proteins and cytoskeleton.’, *Essays in biochemistry*, 57, pp. 109–19. doi: 10.1042/bse0570109.

Bashkirov, P. V. (2007) ‘Membrane nanotubes in the electric field as a model for measurement of mechanical parameters of the lipid bilayer’, *Biochemistry (Moscow)*, 1(2), pp. 176–184. doi: 10.1134/S1990747807020110.

Bashkirov, P. V., Akimov, S. A., Evseev, A. I., Schmid, S. L., Zimmerberg, J. and Frolov, V. A. (2008) ‘GTPase Cycle of Dynamin Is Coupled to Membrane Squeeze and Release, Leading to Spontaneous Fission’, *Cell*. Elsevier Ltd, 135(7), pp. 1276–1286. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.028.

Bashkirov, P. V., Chekashkina, K. V., Akimov, S. a., Kuzmin, P. I. and Frolov, V. a. (2011) ‘Variation of lipid membrane composition caused by strong bending’, *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 5(2), pp. 205–211. doi: 10.1134/S199074781101003X.

Bassereau, P., Jin, R., Baumgart, T., Deserno, M., Dimova, R., Frolov, V. A., Bashkirov, P. V., Grubmüller, H., Jahn, R., Risselada, H. J., Johannes, L., Kozlov, M. M., Lipowsky, R., Pucadyil, T. J., Zeno, W. F., Stachowiak, J. C., Stamou, D., Breuer, A., Lauritsen, L., Simon, C., Sykes, C., Voth, G. A. and Weikl, T. R. (2018) ‘The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap’, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 51(34), p. 343001. doi: 10.1088/1361-6463/aacb98.

Bassereau, P., Sorre, B. and Lévy, A. (2014) ‘Bending lipid membranes: Experiments after W. Helfrich’s model’, *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V., pp. 47–57. doi: 10.1016/j.cis.2014.02.002.

Benarroch, E. E. (2012) ‘Membrane trafficking and transport: Overview and neurologic implications’, *Neurology*, 79(12), pp. 1288–1295. doi: 10.1212/WNL.0b013e31826aadef.

- van der Blik, A. M. and Meyerowitz, E. M. (1991) 'Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic', *Nature*, 351(6325), pp. 411–414. doi: 10.1038/351411a0.
- Bonifacino, J. S. and Glick, B. S. (2004) 'The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion', *Cell*, 116(2), pp. 153–166. doi: 10.1016/S0092-8674(03)01079-1.
- Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J.-C., Ubelmann, F. and Kirchhausen, T. (2011) 'Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(9), pp. 1124–1131. doi: 10.1038/ncb2307.
- Brüning, B., Prévost, S., Stehle, R., Steitz, R., Falus, P., Farago, B. and Hellweg, T. (2014) 'Bilayer undulation dynamics in unilamellar phospholipid vesicles: Effect of temperature, cholesterol and trehalose', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1838(10), pp. 2412–2419. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.06.006.
- Burger, K. N. J., Demel, R. A., Schmid, S. L. and de Kruijff, B. (2000) 'Dynamin Is Membrane-Active: Lipid Insertion Is Induced by Phosphoinositides and Phosphatidic Acid †', *Biochemistry*, 39(40), pp. 12485–12493. doi: 10.1021/bi000971r.
- Busse, R. A., Scacioc, A., Hernandez, J. M., Krick, R., Stephan, M., Janshoff, A., Thumm, M., Kühnel, K., Hsv, P. and Phosphoinositides, I. (2013) 'Qualitative and quantitative characterization of protein-phosphoinositide interactions with liposome-based methods', *Autophagy*, 9(5), pp. 770–777. doi: 10.4161/auto.23978.
- Callan-Jones, A., Sorre, B. and Bassereau, P. (2011) 'Curvature-Driven Lipid Sorting in Biomembranes', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), pp. a004648–a004648. doi: 10.1101/cshperspect.a004648.
- Campelo, F. and Malhotra, V. (2012) 'Membrane Fission: The Biogenesis of Transport Carriers', *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), pp. 407–427. doi: 10.1146/annurev-biochem-051710-094912.

- Campelo, F., McMahon, H. T. and Kozlov, M. M. (2008) ‘The Hydrophobic Insertion Mechanism of Membrane Curvature Generation by Proteins’, *Biophysical Journal*. Elsevier, 95(5), pp. 2325–2339. doi: 10.1529/biophysj.108.133173.
- Canton, I. and Battaglia, G. (2012) ‘Endocytosis at the nanoscale’, *Chemical Society Reviews*, 41(7), p. 2718. doi: 10.1039/c2cs15309b.
- Carravilla, P., Nieva, J. L., Goñi, F. M., Requejo-Isidro, J. and Huarte, N. (2015) ‘Two-Photon Laurdan Studies of the Ternary Lipid Mixture DOPC:SM:Cholesterol Reveal a Single Liquid Phase at Sphingomyelin:Cholesterol Ratios Lower Than 1’, *Langmuir*, 31(9), pp. 2808–2817. doi: 10.1021/la504251u.
- Chabanon, M., Ho, J. C. S., Liedberg, B., Parikh, A. N. and Rangamani, P. (2017) ‘Pulsatile Lipid Vesicles under Osmotic Stress’, *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 112(8), pp. 1682–1691. doi: 10.1016/j.bpj.2017.03.018.
- Chappie, J. S., Mears, J. A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S. L., Milligan, R. A., Hinshaw, J. E. and Dyda, F. (2011) ‘A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke’, *Cell*. Elsevier Inc., 147(1), pp. 209–222. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.003.
- Chen, Y., Zhang, P., Egelman, E. H. and Hinshaw, J. E. (2004) ‘The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes’, *Nature Structural & Molecular Biology*, v11(n6), pp. 574–575. doi: 10.1038/nsmb762.
- Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M. (2003) ‘Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes’, *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), pp. 175–207. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161504.
- Chernomordik, L. V and Kozlov, M. M. (2003) ‘P ROTEIN -L IPID I NTERPLAY IN F USION AND F ISSION OF B IOLOGICAL M EMBRANES *’, pp. 175–207. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161504.
- Cheung, A. Y., de Vries, S. C., Issue, T. F., Updates, T., Staehelin, T. and Rojo, T. (2008) ‘Membrane Trafficking: Intracellular Highways and Country Roads’, *Plant Physiology*, 147(4), pp. 1451–1453. doi: 10.1104/pp.104.900266.

- Chiu, P. L., Kelly, D. F. and Walz, T. (2011) 'The use of trehalose in the preparation of specimens for molecular electron microscopy', *Micron*. Elsevier Ltd, 42(8), pp. 762–772. doi: 10.1016/j.micron.2011.06.005.
- Claessens, M. M. A. E., Van Oort, B. F., Leermakers, F. A. M., Hoekstra, F. A. and Stuart, M. A. C. (2007) 'Bending rigidity of mixed phospholipid bilayers and the equilibrium radius of corresponding vesicles', *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 76(1), pp. 1–6. doi: 10.1103/PhysRevE.76.011903.
- Cocucci, E., Gaudin, R. and Kirchhausen, T. (2014) 'Dynamin recruitment and membrane scission at the neck of a clathrin-coated pit', *Molecular Biology of the Cell*, 25(22), pp. 3595–3609. doi: 10.1091/mbc.E14-07-1240.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Rudolph, A. S., Wistrom, C. A., Spargo, B. J. and Anchordoguy, T. J. (1988) 'Interactions of sugars with membranes', *BBA - Reviews on Biomembranes*, 947(2), pp. 367–384. doi: 10.1016/0304-4157(88)90015-9.
- Dacks, J. B. and Robinson, M. S. (2017) 'Outerwear through the ages: evolutionary cell biology of vesicle coats', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 47(Figure 1), pp. 108–116. doi: 10.1016/j.ceb.2017.04.001.
- Danino, D., Moon, K. H. and Hinshaw, J. E. (2004) 'Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin', *Journal of Structural Biology*, 147(3), pp. 259–267. doi: 10.1016/j.jsb.2004.04.005.
- Dar, S., Kamerkar, S. C. and Pucadyil, T. J. (2015) 'A high-throughput platform for real-time analysis of membrane fission reactions reveals dynamin function', *Nature Cell Biology*, 17(12), pp. 1588–1596. doi: 10.1038/ncb3254.
- Davis, D. M. and Sowinski, S. (2008) 'Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(6), pp. 431–436. doi: 10.1038/nrm2399.
- Derganc, J., Antonny, B. and Čopič, A. (2013) 'Membrane bending: the power of protein imbalance', *Trends in Biochemical Sciences*, 38(11), pp. 576–584. doi: 10.1016/j.tibs.2013.08.006.

- Deserno, M. (2015) ‘Fluid lipid membranes: From differential geometry to curvature stresses’, *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier Ireland Ltd, 185, pp. 11–45. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2014.05.001.
- Dimova, R. (2014) ‘Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes’, *Advances in Colloid and Interface Science*, pp. 225–234. doi: 10.1016/j.cis.2014.03.003.
- Durieux, A.-C., Prudhon, B., Guicheney, P. and Bitoun, M. (2010) ‘Dynamin 2 and human diseases’, *Journal of Molecular Medicine*, 88(4), pp. 339–350. doi: 10.1007/s00109-009-0587-4.
- Dziedzic, J., Bjorkholm, J., Chu, S., Block, S. M., Diego, S., Smith, S. B., Cui, Y. and Bustamante, C. B. T.-M. in E. (2003) ‘[7] Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum’, in *Biophotonics, Part B*. Academic Press, pp. 134–162. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)61009-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)61009-8).
- Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R. and Stuurman, N. (2010) ‘Computer Control of Microscopes Using μ Manager’, in *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–17. doi: 10.1002/0471142727.mb1420s92.
- Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L. and Kirchhausen, T. (2004) ‘Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits’, *Cell*, 118(5), pp. 591–605. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.017.
- Evans, E., Bowman, H., Leung, A., Needham, D. and Tirrell, D. (1996) ‘Biomembrane Templates for Nanoscale Conduits and Networks’, *Science*, 273(August), pp. 1994–1996.
- Evseev, A. and Bashkirov, P. (2008) ‘Fission of membrane nanotube induced by osmotic pressure’, *Biochem Moscow Suppl Ser A*, 2(3), pp. 271–275. doi: 10.1134/S1990747808030112.
- Faelber, K., Gao, S., Held, M., Posor, Y., Haucke, V., Noé, F. and Daumke, O. (2013) ‘Oligomerization of Dynamin Superfamily Proteins in Health and Disease’, in Giraldo, J. and Ciruela, F. B. T.-P. in M. B. and T. S. (eds) *Oligomerization in Health and Disease*. Academic Press, pp. 411–443. doi: 10.1016/B978-0-12-386931-9.00015-5.

- Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., Haucke, V., Noé, F. and Daumke, O. (2011) ‘Crystal structure of nucleotide-free dynamin’, *Nature*, 477(7366), pp. 556–560. doi: 10.1038/nature10369.
- Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B. C. and Hille, B. (2010) ‘Phosphoinositides: Lipid regulators of membrane proteins’, *Journal of Physiology*, 588(17), pp. 3179–3185. doi: 10.1113/jphysiol.2010.192153.
- Ferguson, S. M. and De Camilli, P. (2012) ‘Dynamin, a membrane-remodelling GTPase’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(2), pp. 75–88. doi: 10.1038/nrm3266.
- Ford, M. G. J., Jenni, S. and Nunnari, J. (2011) ‘The crystal structure of dynamin’, *Nature*, 477(7366), pp. 561–566. doi: 10.1038/nature10441.
- Frolov, V. A., Escalada, A., Akimov, S. A. and Shnyrova, A. V. (2015) ‘Geometry of membrane fission’, *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier Ireland Ltd, 185, pp. 129–140. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2014.07.006.
- Frolov, V. A., Shnyrova, A. V. and Zimmerberg, J. (2011) ‘Lipid Polymorphisms and Membrane Shape’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), pp. a004747–a004747. doi: 10.1101/cshperspect.a004747.
- Frolov, V. A. and Zimmerberg, J. (2009) ‘Membranes: Shaping biological matter.’, *Nature materials*, 8(3), pp. 173–4. doi: 10.1038/nmat2390.
- Frolov, V. A. and Zimmerberg, J. (2010) ‘Cooperative elastic stresses, the hydrophobic effect, and lipid tilt in membrane remodeling’, *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 584(9), pp. 1824–1829. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.039.
- Fuller, N. and Rand, R. P. (2001) ‘The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes’, *Biophysical Journal*, 81(1), pp. 243–254. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75695-0.
- Garcia-Manyes, S., Redondo-Morata, L., Oncins, G. and Sanz, F. (2010) ‘Nanomechanics of Lipid Bilayers: Heads or Tails?’, *Journal of the American Chemical Society*, 132(37), pp. 12874–12886. doi: 10.1021/ja1002185.

- Garten, M., Mosgaard, L. D., Bornschlöggl, T., Dieudonné, S., Bassereau, P. and Toombes, G. E. S. (2017) ‘Whole-GUV patch-clamping’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), pp. 328–333. doi: 10.1073/pnas.1609142114.
- Gozen, I., Dommersnes, P., Orwar, O. and Jesorka, A. (2012) ‘Evidence for membrane flow through pores in stacked phospholipid membranes’, *Soft Matter*, 8(23), pp. 6220–6225. doi: 10.1039/c2sm25629k.
- Grassart, A., Cheng, A. T., Hong, S. H., Zhang, F., Zenzer, N., Feng, Y., Briner, D. M., Davis, G. D., Malkov, D. and Drubin, D. G. (2014) ‘Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis’, *The Journal of Cell Biology*, 205(5), pp. 721–735. doi: 10.1083/jcb.201403041.
- Guan, X. L., Cestra, G., Shui, G., Kuhrs, A., Schittenhelm, R. B., Hafen, E., van der Goot, F. G., Robinett, C. C., Gatti, M., Gonzalez-Gaitan, M. and Wenk, M. R. (2013) ‘Biochemical Membrane Lipidomics during Drosophila Development’, *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 24(1), pp. 98–111. doi: 10.1016/j.devcel.2012.11.012.
- Guha, A., Sriram, V., Krishnan, K. S. and Mayor, S. (2003) ‘shibire mutations reveal distinct dynamin-independent and -dependent endocytic pathways in primary cultures of Drosophila hemocytes’, *Journal of Cell Science*, 116(16), pp. 3373–3386. doi: 10.1242/jcs.00637.
- Harris, F. M., Best, K. B. and Bell, J. D. (2002) ‘Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1565(1), pp. 123–128. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00514-X.
- Heinrich, M., Tian, A., Esposito, C. and Baumgart, T. (2010) ‘Dynamic sorting of lipids and proteins in membrane tubes with a moving phase boundary.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), pp. 7208–7213. doi: 10.1073/pnas.0913997107.
- Hinshaw, J. E. (2000) ‘Dynamin and Its Role in Membrane Fission’, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), pp. 483–519. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.483.

- Hinshaw, J. E. and Schmid, S. L. (1995) ‘Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding’, *Nature*, 374(6518), pp. 190–192. doi: 10.1038/374190a0.
- Janmey, P. A. and Kinnunen, P. K. J. (2006) ‘Biophysical properties of lipids and dynamic membranes’, *Trends in Cell Biology*, 16(10), pp. 538–546. doi: 10.1016/j.tcb.2006.08.009.
- Jarsch, I. K., Daste, F. and Gallop, J. L. (2016) ‘Membrane curvature in cell biology: An integration of molecular mechanisms’, *The Journal of Cell Biology*, 214(4), pp. 375–387. doi: 10.1083/jcb.201604003.
- Kaiser, H.-J., Lingwood, D., Levental, I., Sampaio, J. L., Kalvodova, L., Rajendran, L. and Simons, K. (2009) ‘Order of lipid phases in model and plasma membranes’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39), pp. 16645–16650. doi: 10.1073/pnas.0908987106.
- Karamdad, K., Law, R. V, Seddon, J. M., Brooks, N. J. and Ces, O. (2015) ‘Preparation and mechanical characterisation of giant unilamellar vesicles by a microfluidic method’, *Lab on a chip*. Royal Society of Chemistry, 15(2), pp. 557–62. doi: 10.1039/c4lc01277a.
- Karlsson, M., Sott, K., Cans, A.-S., Karlsson, A., Karlsson, R. and Orwar, O. (2001) ‘Micropipet-Assisted Formation of Microscopic Networks of Unilamellar Lipid Bilayer Nanotubes and Containers’, *Langmuir*, 17(22), pp. 6754–6758. doi: 10.1021/la0108611.
- Kegulian, N. C., Sankhagowit, S., Apostolidou, M., Jayasinghe, S. A., Malmstadt, N., Butler, P. C. and Langen, R. (2015) ‘Membrane Curvature-sensing and Curvature-inducing Activity of Islet Amyloid Polypeptide and Its Implications for Membrane Disruption’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), pp. 25782–25793. doi: 10.1074/jbc.M115.659797.
- Klein, D. E., Lee, A., Frank, D. W., Marks, M. S. and Lemmon, M. A. (1998) ‘The Pleckstrin Homology Domains of Dynamin Isoforms Require Oligomerization for High Affinity Phosphoinositide Binding’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), pp. 27725–27733. doi: 10.1074/jbc.273.42.27725.

Koenig, J. H. and Ikeda, K. (1989) 'Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 9(11), pp. 3844–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2573698>.

Koller, D. and Lohner, K. (2014) 'The role of spontaneous lipid curvature in the interaction of interfacially active peptides with membranes', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1838(9), pp. 2250–2259. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.05.013.

Kollmitzer, B., Heftberger, P., Rappolt, M. and Pabst, G. (2013) 'Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids', *Soft Matter*, 9(45), pp. 10877–10884. doi: 10.1039/c3sm51829a.

Kozlov, M. M., Campelo, F., Liska, N., Chernomordik, L. V., Marrink, S. J. and McMahon, H. T. (2014) 'Mechanisms shaping cell membranes', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 29(1), pp. 53–60. doi: 10.1016/j.ceb.2014.03.006.

Kozlov, M. M., McMahon, H. T. and Chernomordik, L. V. (2010) 'Protein-driven membrane stresses in fusion and fission', *Trends in Biochemical Sciences*, 35(12), pp. 699–706. doi: 10.1016/j.tibs.2010.06.003.

Kozlovsky, Y. and Kozlov, M. M. (2003) 'Membrane fission: Model for intermediate structures', *Biophysical Journal*. Elsevier, 85(1), pp. 85–96. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74457-9.

Kunding, A. H., Mortensen, M. W., Christensen, S. M. and Stamou, D. (2008) 'A Fluorescence-Based Technique to Construct Size Distributions from Single-Object Measurements: Application to the Extrusion of Lipid Vesicles', *Biophysical Journal*, 95(3), pp. 1176–1188. doi: 10.1529/biophysj.108.128819.

Kurczyk, M. E., Mellander, L. J., Najafinobar, N. and Cans, A.-S. (2014) 'Composition Based Strategies for Controlling Radii in Lipid Nanotubes', *PLoS ONE*. Edited by H. W. van Veen, 9(1), p. e81293. doi: 10.1371/journal.pone.0081293.

Kuzmin, P. I., Zimmerberg, J., Chizmadzhev, Y. A. and Cohen, F. S. (2001) 'A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates', *Proceedings*

of the National Academy of Sciences, 98(13), pp. 7235–7240. doi: 10.1073/pnas.121191898.

Lenz, M., Morlot, S. and Roux, A. (2009) ‘Mechanical requirements for membrane fission: Common facts from various examples’, *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 583(23), pp. 3839–3846. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.012.

Leonard, M., Doo Song, B., Ramachandran, R. and Schmid, S. L. (2006) ‘Robust colorimetric assays for dynamin’s basal and stimulated GTPase activities’, *Methods in Enzymology*, 404(1991), pp. 490–503. doi: 10.1016/S0076-6879(05)04005-X.

Lindahl, E. and Edholm, O. (2000) ‘Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations’, *Biophysical Journal*. Elsevier, 79(1), pp. 426–433. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76304-1.

Lira, R. B., Steinkühler, J., Knorr, R. L., Dimova, R. and Riske, K. A. (2016) ‘Posing for a picture: Vesicle immobilization in agarose gel’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(April), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep25254.

Liu, Y.-W., Lukiyanchuk, V. and Schmid, S. L. (2011) ‘Common Membrane Trafficking Defects of Disease-Associated Dynamin 2 Mutations’, *Traffic*, 12(11), pp. 1620–1633. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01250.x.

Liu, Y.-W., Neumann, S., Ramachandran, R., Ferguson, S. M., Pucadyil, T. J. and Schmid, S. L. (2011) ‘Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), pp. E234–E242. doi: 10.1073/pnas.1102710108.

Liu, Y. W., Mattila, J. P. and Schmid, S. L. (2013) ‘Dynamin-Catalyzed Membrane Fission Requires Coordinated GTP Hydrolysis’, *PLoS ONE*, 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0055691.

Luzardo, M. del C., Amalfa, F., Nuñez, A. M., Díaz, S., Biondi de Lopez, A. C. and Disalvo, E. A. (2000) ‘Effect of Trehalose and Sucrose on the Hydration and Dipole Potential of Lipid Bilayers’, *Biophysical Journal*, 78(5), pp. 2452–2458. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76789-0.

- Manni, M. M., Tiberti, M. L., Pagnotta, S., Barelli, H., Gautier, R. and Antony, B. (2018) 'Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage', *eLife*, 7, p. e34394. doi: 10.7554/eLife.34394.
- De Marothy, M. T. and Elofsson, A. (2015) 'Marginally hydrophobic transmembrane α -helices shaping membrane protein folding', *Protein Science*, 24(7), pp. 1057–1074. doi: 10.1002/pro.2698.
- Mattila, J.-P., Shnyrova, A. V., Sundborger, A. C., Hortelano, E. R., Fuhrmans, M., Neumann, S., Müller, M., Hinshaw, J. E., Schmid, S. L. and Frolov, V. a. (2015) 'A hemi-fission intermediate links two mechanistically distinct stages of membrane fission', *Nature*, 524(7563), pp. 109–113. doi: 10.1038/nature14509.
- McMahon, H. T. and Boucrot, E. (2015) 'Membrane curvature at a glance', *Journal of Cell Science*, 128(6), pp. 1065–1070. doi: 10.1242/jcs.114454.
- Mehrotra, N., Nichols, J. and Ramachandran, R. (2014) 'Alternate pleckstrin homology domain orientations regulate dynamin-catalyzed membrane fission', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by D. G. Drubin, 25(6), pp. 879–890. doi: 10.1091/mbc.e13-09-0548.
- Méléard, P., Gerbeaud, C., Bardusco, P., Jeandaine, N., Mitov, M. D. and Fernandez-Puente, L. (1998) 'Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles', *Biochimie*, 80(5–6), pp. 401–413. doi: 10.1016/S0300-9084(00)80008-5.
- Menon, M. and Schafer, D. A. (2013) *Dynamin. Expanding Its Scope to the Cytoskeleton.*, *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-407699-0.00003-0.
- Merrifield, C. J., Feldman, M. E., Wan, L. and Almers, W. (2002) 'Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits', *Nature Cell Biology*, 4(9), pp. 691–698. doi: 10.1038/ncb837.
- Morlot, S., Galli, V., Klein, M., Chiaruttini, N., Manzi, J., Humbert, F., Dinis, L., Lenz, M., Cappello, G. and Roux, A. (2012) 'Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction', *Cell*, 151(3), pp. 619–629. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.017.

- Morlot, S. and Roux, A. (2013) ‘Mechanics of Dynamin-Mediated Membrane Fission’, *Annual Review of Biophysics*, 42(1), pp. 629–649. doi: 10.1146/annurev-biophys-050511-102247.
- Neumann, S., Pucadyil, T. J. and Schmid, S. L. (2013) ‘Analyzing membrane remodeling and fission using supported bilayers with excess membrane reservoir’, *Nature Protocols*, 8(1), pp. 213–222. doi: 10.1038/nprot.2012.152.
- Neumann, S. and Schmid, S. L. (2013) ‘Dual Role of BAR Domain-containing Proteins in Regulating Vesicle Release Catalyzed by the GTPase, Dynamin-2’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(35), pp. 25119–25128. doi: 10.1074/jbc.M113.490474.
- Ogłęcka, K., Sanborn, J., Parikh, A. N. and Kraut, R. S. (2012) ‘Osmotic Gradients Induce Bio-Reminiscent Morphological Transformations in Giant Unilamellar Vesicles’, *Frontiers in Physiology*, 3(May), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphys.2012.00120.
- Onoue, Y., Suzuki, T., Davidson, M., Karlsson, M., Orwar, O., Yoshida, M. and Kinoshita, K. (2009) ‘A giant liposome for single-molecule observation of conformational changes in membrane proteins’, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1788(6), pp. 1332–1340. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.01.015.
- Parasassi, T., Krasnowska, E. K., Bagatolli, L. and Gratton, E. (1998) ‘Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes’, *Journal of Fluorescence*, 8(4), pp. 365–373. doi: 10.1023/A:1020528716621.
- Parasassi, T., De Stasio, G., d’Ubaldo, A. and Gratton, E. (1990) ‘Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence’, *Biophysical Journal*, 57(6), pp. 1179–1186. doi: 10.1016/S0006-3495(90)82637-0.
- Pereira, C. S. and Hünenberger, P. H. (2008) ‘Effect of trehalose on a phospholipid membrane under mechanical stress’, *Biophysical Journal*, 95(8), pp. 3525–3534. doi: 10.1529/biophysj.108.131656.
- Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L. A., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antony, B. and Barelli, H. (2014) ‘Polyunsaturated phospholipids

- facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins’, *Science*, 345(6197), pp. 693–697. doi: 10.1126/science.1255288.
- Praefcke, G. J. K. and McMahon, H. T. (2004) ‘The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?’, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(2), pp. 133–47. doi: 10.1038/nrm1313.
- Prévost, C., Tsai, F.-C., Bassereau, P. and Simunovic, M. (2017) ‘Pulling Membrane Nanotubes from Giant Unilamellar Vesicles’, *Journal of Visualized Experiments*, (130), p. e56086. doi: 10.3791/56086.
- Pucadyil, T. J. and Schmid, S. L. (2008) ‘Real-Time Visualization of Dynamin-Catalyzed Membrane Fission and Vesicle Release’, *Cell*. Elsevier Ltd, 135(7), pp. 1263–1275. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.020.
- Pucadyil, T. J. and Schmid, S. L. (2010) ‘Supported Bilayers with Excess Membrane Reservoir: A Template for Reconstituting Membrane Budding and Fission’, *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 99(2), pp. 517–525. doi: 10.1016/j.bpj.2010.04.036.
- Raimondi, A., Ferguson, S. M., Lou, X., Armbruster, M., Paradise, S., Giovedi, S., Messa, M., Kono, N., Takasaki, J., Cappello, V., O’Toole, E., Ryan, T. A. and De Camilli, P. (2011) ‘Overlapping Role of Dynamin Isoforms in Synaptic Vesicle Endocytosis’, *Neuron*, 70(6), pp. 1100–1114. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.031.
- Ramachandran, R., Pucadyil, T. J., Liu, Y.-W., Acharya, S., Leonard, M., Lukiyanchuk, V. and Schmid, S. L. (2009) ‘Membrane Insertion of the Pleckstrin Homology Domain Variable Loop 1 Is Critical for Dynamin-catalyzed Vesicle Scission’, *Molecular Biology of the Cell*, 20(22), pp. 4630–4639. doi: 10.1091/mbc.E09-08-0683.
- Ramachandran, R. and Schmid, S. L. (2008) ‘Real-time detection reveals that effectors couple dynamin’s GTP-dependent conformational changes to the membrane’, *The EMBO Journal*, 27(1), pp. 27–37. doi: 10.1038/sj.emboj.7601961.
- Ramachandran, R. and Schmid, S. L. (2018) ‘The dynamin superfamily’, *Current Biology*, 28(8), pp. R411–R416. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.013.
- Ramachandran, R., Surka, M., Chappie, J. S., Fowler, D. M., Foss, T. R., Song, B. D. and Schmid, S. L. (2007) ‘The dynamin middle domain is critical for tetramerization

- and higher-order self-assembly’, *The EMBO Journal*, 26(2), pp. 559–566. doi: 10.1038/sj.emboj.7601491.
- Raucher, D. and Sheetz, M. P. (1999) ‘Characteristics of a Membrane Reservoir Buffering Membrane Tension’, *Biophysical Journal*, 77(4), pp. 1992–2002. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77040-2.
- Reeves, J. P. and Dowben, R. M. (1969) ‘Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles’, *Journal of Cellular Physiology*, 73(1), pp. 49–60. doi: 10.1002/jcp.1040730108.
- Renard, H. F., Johannes, L. and Morsomme, P. (2018) ‘Increasing Diversity of Biological Membrane Fission Mechanisms’, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, xx, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.tcb.2017.12.001.
- Reubold, T. F., Faelber, K., Plattner, N., Posor, Y., Ketel, K., Curth, U., Schlegel, J., Anand, R., Manstein, D. J., Noé, F., Haucke, V., Daumke, O. and Eschenburg, S. (2015) ‘Crystal structure of the dynamin tetramer.’, *Nature*, 525(7569), pp. 404–8. doi: 10.1038/nature14880.
- Rodriguez, N., Pincet, F. and Cribier, S. (2005) ‘Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42(2), pp. 125–130. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.01.010.
- Roux, A. (2013) ‘The physics of membrane tubes: soft templates for studying cellular membranes’, *Soft Matter*, 9(29), p. 6726. doi: 10.1039/c3sm50514f.
- Roux, A., Koster, G., Lenz, M., Sorre, B., Manneville, J.-B., Nassoy, P. and Bassereau, P. (2010) ‘Membrane curvature controls dynamin polymerization’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), pp. 4141–4146. doi: 10.1073/pnas.0913734107.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. and De Camilli, P. (2006) ‘GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission’, *Nature*, 441(7092), pp. 528–531. doi: 10.1038/nature04718.
- Roy, A., Dutta, R., Kundu, N., Banik, D. and Sarkar, N. (2016) ‘A Comparative Study of the Influence of Sugars Sucrose, Trehalose, and Maltose on the Hydration and

Diffusion of DMPC Lipid Bilayer at Complete Hydration: Investigation of Structural and Spectroscopic Aspect of Lipid-Sugar Interaction', *Langmuir*, 32(20), pp. 5124–5134. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b01115.

Saarikangas, J., Zhao, H., Pykäläinen, A., Laurinmäki, P., Mattila, P. K., Kinnunen, P. K. J., Butcher, S. J. and Lappalainen, P. (2009) 'Molecular Mechanisms of Membrane Deformation by I-BAR Domain Proteins', *Current Biology*, 19(2), pp. 95–107. doi: 10.1016/j.cub.2008.12.029.

Saleem, M., Morlot, S., Hohendahl, A., Manzi, J., Lenz, M. and Roux, A. (2015) 'A balance between membrane elasticity and polymerization energy sets the shape of spherical clathrin coats', *Nature Communications*, 6(1), p. 6249. doi: 10.1038/ncomms7249.

Sanchez, S. A., Tricerri, M. A., Gunther, G. and Gratton, E. (2007) 'Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope', *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 2, pp. 1007–1014.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012) 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis', *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.

Schmid, E. M., Richmond, D. L. and Fletcher, D. A. (2015) *Reconstitution of proteins on electroformed giant unilamellar vesicles*, *Methods in Cell Biology*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/bs.mcb.2015.02.004.

Schmid, S. L. and Frolov, V. a. (2011) 'Dynamin: Functional Design of a Membrane Fission Catalyst', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), pp. 79–105. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104016.

Schultz, S. G. and Solomon, A. K. (1961) 'Determination of the Effective Hydrodynamic Radii of Small Molecules by Viscometry', *The Journal of General Physiology*, 44(6), pp. 1189–1199. doi: 10.1085/jgp.44.6.1189.

- Separovic, F. and Gawrisch, K. (1996) 'Effect of unsaturation on the chain order of phosphatidylcholines in a dioleoylphosphatidylethanolamine matrix', *Biophysical Journal*. Elsevier, 71(1), pp. 274–282. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79223-8.
- Seu, K. J., Cambrea, L. R., Everly, R. M. and Hovis, J. S. (2006) 'Influence of Lipid Chemistry on Membrane Fluidity: Tail and Headgroup Interactions', *Biophysical Journal*. Elsevier, 91(10), pp. 3727–3735. doi: 10.1529/biophysj.106.084590.
- Shi, Z. and Baumgart, T. (2015) 'Membrane tension and peripheral protein density mediate membrane shape transitions', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(May 2014), pp. 1–8. doi: 10.1038/ncomms6974.
- Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M. M. and Rapoport, T. A. (2009) 'Mechanisms Shaping the Membranes of Cellular Organelles', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), pp. 329–354. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113324.
- Shnyrova, A. V., Ayllon, J., Mikhalyov, I. I., Villar, E., Zimmerberg, J. and Frolov, V. A. (2007) 'Vesicle formation by self-assembly of membrane-bound matrix proteins into a fluidlike budding domain', *The Journal of Cell Biology*, 179(4), pp. 627–633. doi: 10.1083/jcb.200705062.
- Shnyrova, A. V., Bashkurov, P. V., Akimov, S. A., Pucadyil, T. J., Zimmerberg, J., Schmid, S. L. and Frolov, V. A. (2013) 'Geometric Catalysis of Membrane Fission Driven by Flexible Dynamin Rings', *Science*, 339(6126), pp. 1433–1436. doi: 10.1126/science.1233920.
- Shnyrova, A. and Zimmerberg, J. (2009) 'Reconstitution of membrane budding with unilamellar vesicles', *Methods in enzymology*, 6879(09). doi: 10.1016/S0076-6879(09)64004-0.Reconstitution.
- Shohda, K., Takahashi, K. and Suyama, A. (2015) 'A method of gentle hydration to prepare oil-free giant unilamellar vesicles that can confine enzymatic reactions', *Biochemistry and Biophysics Reports*. Elsevier, 3, pp. 76–82. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.07.005.

- Shpetner, H. S. and Vallee, R. B. (1989) 'Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules', *Cell*, 59(3), pp. 421–432. doi: 10.1016/0092-8674(89)90027-5.
- Shpetner, H. S. and Vallee, R. B. (1992) 'Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules', *Nature*.
- Simunovic, M., Voth, G. A., Callan-Jones, A. and Bassereau, P. (2015) 'When Physics Takes Over: BAR Proteins and Membrane Curvature', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 25(12), pp. 780–792. doi: 10.1016/j.tcb.2015.09.005.
- Srinivasan, S., Burckhardt, C. J., Bhave, M., Chen, Z., Chen, P.-H. H., Wang, X., Danuser, G. and Schmid, S. L. (2018) 'A non-canonical role for dynamin-1 in regulating early stages of clathrin-mediated endocytosis in non-neuronal cells', *bioRxiv*, 16(4). doi: 10.1371/journal.pbio.2005377.
- Stachowiak, J. C., Hayden, C. C. and Sasaki, D. Y. (2010) 'Steric confinement of proteins on lipid membranes can drive curvature and tubulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), pp. 7781–7786. doi: 10.1073/pnas.0913306107.
- Stein, H., Spindler, S., Bonakdar, N., Wang, C. and Sandoghdar, V. (2017) 'Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations', *Frontiers in Physiology*, 8(FEB), pp. 1–16. doi: 10.3389/fphys.2017.00063.
- Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P. and McMahon, H. T. (1999) 'Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring', *Nature cell biology*, 1(1), pp. 27–32. doi: 10.1038/8997.
- Sundborger, A. C., Fang, S., Heymann, J. A., Ray, P., Chappie, J. S. and Hinshaw, J. E. (2014) 'A dynamin mutant defines a superconstricted pre-fission state', *Cell Reports*, 8(3), pp. 734–742. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.054.
- Sweitzer, S. M. and Hinshaw, J. E. (1998) 'Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation', *Cell*, 93(6), pp. 1021–1029. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81207-6.

- Takei, K., Haucke, V., Slepnev, V., Farsad, K., Salazar, M., Chen, H. and De Camilli, P. (1998) ‘Generation of Coated Intermediates of Clathrin-Mediated Endocytosis on Protein-Free Liposomes’, *Cell*, 94(1), pp. 131–141. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81228-3.
- Tarazona, P., Chacón, E. and Bresme, F. (2013) ‘Thermal fluctuations and bending rigidity of bilayer membranes’, *Journal of Chemical Physics*, 139(9), pp. 1–14. doi: 10.1063/1.4818421.
- Taylor, M. J., Lampe, M. and Merrifield, C. J. (2012) ‘A feedback loop between dynamin and actin recruitment during clathrin-mediated endocytosis’, *PLoS Biology*, 10(4). doi: 10.1371/journal.pbio.1001302.
- Thottacherry, J. J., Kosmalska, A. J., Elosegui-Artola, A., Pradhan, S., Sharma, S., Singh, P. P., Guadamillas, M. C., Chaudhary, N., Vishwakarma, R., Trepát, X., del Pozo, M. A., Parton, R. G., Pullarkat, P., Roca-Cusachs, P. and Mayor, S. (2017) ‘Mechanochemical feedback and control of endocytosis and membrane tension’, *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/201509>.
- Tian, A., Capraro, B. R., Esposito, C. and Baumgart, T. (2009) ‘Bending stiffness depends on curvature of ternary lipid mixture tubular membranes’, *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 97(6), pp. 1636–1646. doi: 10.1016/j.bpj.2009.07.012.
- Tsumoto, K., Matsuo, H., Tomita, M. and Yoshimura, T. (2009) ‘Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), pp. 98–105. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.09.023.
- Vance, J. E. and Tasseva, G. (2013) ‘Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells.’, *Biochimica et biophysica acta*. Elsevier B.V., 1831(3), pp. 543–54. doi: 10.1016/j.bbaliip.2012.08.016.
- Walde, P., Cosentino, K., Engel, H. and Stano, P. (2010) ‘Giant Vesicles: Preparations and Applications’, *ChemBioChem*, 11(7), pp. 848–865. doi: 10.1002/cbic.201000010.
- Wang, Q., Navarro, M. V. A. S., Peng, G., Molinelli, E., Goh, S. L., Judson, B. L., Rajashankar, K. R. and Sondermann, H. (2009) ‘Molecular mechanism of membrane

constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), pp. 12700–5. doi: 10.1073/pnas.0902974106.

Warnock, D. E., Baba, T. and Schmid, S. L. (1997) 'Ubiquitously Expressed Dynamin-II Has a Higher Intrinsic GTPase Activity and a Greater Propensity for Self-assembly Than Neuronal Dynamin-I', *Molecular Biology of the Cell*, 8(12), pp. 2553–2562. doi: 10.1091/mbc.8.12.2553.

Weber, G. and Farris, F. J. (1979) 'Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene', *Biochemistry*, 18(14), pp. 3075–3078. doi: 10.1021/bi00581a025.

Węgrzyn, I., Jeffries, G. D. M., Nagel, B., Katterle, M., Gerrard, S. R., Brown, T., Orwar, O. and Jesorka, A. (2011) 'Membrane protrusion coarsening and nanotubulation within giant unilamellar vesicles', *Journal of the American Chemical Society*, 133(45), pp. 18046–18049. doi: 10.1021/ja207536a.

Wilson-Kubalek, E. M., Brown, R. E., Celia, H. and Milligan, R. a (1998) 'Lipid nanotubes as substrates for helical crystallization of macromolecules.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(July), pp. 8040–8045. doi: 10.1073/pnas.95.14.8040.

Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J. and Hurley, J. H. (2009) 'Membrane scission by the ESCRT-III complex', *Nature*. Nature Publishing Group, 458(7235), pp. 172–177. doi: 10.1038/nature07836.

Xiao, Q., Hu, X., Wei, Z. and Tam, K. Y. (2016) 'Cytoskeleton molecular motors: Structures and their functions in neuron', *International Journal of Biological Sciences*, 12(9), pp. 1083–1092. doi: 10.7150/ijbs.15633.

Zhang, P. and Hinshaw, J. E. (2001) 'Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state.', *Nature cell biology*, 3(10), pp. 922–926. doi: 10.1038/ncb1001-922.

Zhang, X., Tanner, P., Graff, A., Palivan, C. G. and Meier, W. (2012) 'Mimicking the cell membrane with block copolymer membranes', *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, pp. 2293–2318. doi: 10.1002/pola.26000.

Zhao, H. and Lappalainen, P. (2012) ‘A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions’, *Molecular Biology of the Cell*, 23(15), pp. 2823–2830. doi: 10.1091/mbc.E11-07-0645.

Zheng, J., Cahill, S. M., Lemmon, M. A., Fushman, D., Schlessinger, J. and Cowburn, D. (1996) ‘Identification of the Binding Site for Acidic Phospholipids on the PH Domain of Dynamin: Implications for Stimulation of GTPase Activity’, *Journal of Molecular Biology*, 255(1), pp. 14–21. doi: 10.1006/jmbi.1996.0002.

Zimmerberg, J. and Kozlov, M. M. (2006) ‘How proteins produce cellular membrane curvature’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(1), pp. 9–19. doi: 10.1038/nrm1784.

