



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Dinámica y mecánica de mitocondrias: interacción con el citoesqueleto y transporte activo

Tesis presentada para optar por el título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

Lic. Agustina Belén Fernández Casafuz

Directora de Tesis: Dra. Luciana Bruno
Co-directora de Tesis: Dra. María Cecilia De Rossi
Consejera de Estudios: Dra. Diana Skigin
Lugar de Trabajo: Instituto de Cálculo, UBA-CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2025

Dinámica y mecánica de mitocondrias: interacción con el citoesqueleto y transporte activo

Resumen

Las mitocondrias son capaces de experimentar diversos procesos que pueden modificar su morfología, tamaño y distribución, en respuesta a distintos estímulos, ya sean de naturaleza química o física. Estudios recientes han demostrado que la interacción entre las mitocondrias y el citoesqueleto puede alterar la función mitocondrial; sin embargo, todavía se desconocen en gran medida los mecanismos subyacentes a este fenómeno. El objetivo general de esta Tesis es comprender las propiedades biomecánicas de estas organelas, y para ello nos propusimos caracterizar su organización y explorar en detalle sus cambios morfológicos a nivel celular desde una perspectiva biofísica.

Empleando imágenes adquiridas por microscopía confocal y de super-resolución Airyscan de las mitocondrias presentes en células melanóforas vivas de *Xenopus laevis*, en primer lugar caracterizamos su organización celular y propiedades mecánicas. Por ejemplo, estimamos la longitud de persistencia aparente de estas organelas, cuantificando – por primera vez – su plasticidad en el entorno celular, y también implementamos un método automático para clasificar las formas que adoptan. Además, exploramos cómo la integridad del citoesqueleto afecta la organización, morfología y movilidad de las mitocondrias, afectando selectivamente la red de microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios de vimentina. Con el objetivo de evaluar cómo dichas redes interactúan de manera mecánica con las organelas, desarrollamos una nueva herramienta cuantitativa que detecta impulsos mecánicos localizados actuando sobre las mismas. Nuestros resultados sugieren que las distintas redes del citoesqueleto interactúan con las mitocondrias de forma física, transmitiéndoles o “protegiéndolas” de impulsos mecánicos que moldean su morfología y movilidad.

En una última instancia, estudiamos el transporte bidireccional de mitocondrias conducido por motores moleculares a lo largo de los microtúbulos, tanto a nivel de modelado numérico como experimental. Por un lado, desarrollamos un modelo unidimensional aplicable al transporte de organelas extensas y flexibles como las mitocondrias. Este modelo permite ampliar el conocimiento actual sobre la organización de los motores en su superficie, y podemos utilizarlo para obtener una interpretación preliminar de las deformaciones experimentadas por estas organelas en células vivas. Finalmente, nos propusimos evaluar el rol de las fuerzas ejercidas por los motores moleculares en la dinámica de las mitocondrias mediante la utilización de técnicas optogenéticas que permiten reclutar selectivamente motores a la membrana externa de las organelas.

La interacción entre las mitocondrias y el citoesqueleto es fundamental en la mecano-transducción de señales intracelulares y esta Tesis pretende contribuir a este campo emergente.

Palabras clave: mitocondrias, citoesqueleto, dinámica mitocondrial, transporte intracelular, técnicas optogenéticas

Dynamics and mechanics of mitochondria: interaction with the cytoskeleton and active transport.

Abstract

Mitochondria are capable of undergoing various processes that can modify their morphology, size and distribution in response to different stimuli, whether of chemical or physical origin. Recent studies have shown that the interaction between mitochondria and the cytoskeleton can alter mitochondrial function; however, the mechanisms underlying this phenomenon are still largely unknown. The overall objective of this Thesis is to understand the biomechanical properties of these organelles, and for this purpose, we set out to characterize their organization and explore in detail their morphological changes at the cellular level from a biophysical perspective.

Using images acquired by confocal and super-resolution Airyscan microscopy of mitochondria present in living melanophore cells of *Xenopus laevis*, we first characterized their cellular organization and mechanical properties. For example, we estimated the apparent persistence length of these organelles, quantifying – for the first time – their plasticity in the cellular environment, and also implemented an automatic method to classify the shapes adopted by them. In addition, we explored how the integrity of the cytoskeleton affects the organization, morphology and motility of mitochondria, selectively affecting the microtubule network, actin filaments and vimentin intermediate filaments. In order to assess how these networks interact mechanically with the organelles, we developed a new quantitative tool that detects localized mechanical impulses acting on them. Our results suggest that the different cytoskeletal networks interact with mitochondria in a physical way, transmitting or “protecting” them from mechanical impulses that shape their morphology and motility.

Finally, we studied the bidirectional transport of mitochondria driven by molecular motors along microtubules, both numerically and experimentally. On the one hand, we developed a one-dimensional model applicable to the transport of elongated and flexible organelles such as mitochondria. This model allows us to extend the current knowledge about the organization of motors on their surface, and it can be used to obtain a preliminary interpretation of the deformations experienced by these organelles in living cells. On the other hand, we set out to evaluate the role of the forces exerted by molecular motors in mitochondrial dynamics by using optogenetic techniques that allow us to selectively recruit motors to the outer membrane of the organelles.

The interaction between mitochondria and the cytoskeleton is fundamental in mechanotransduction, and this Thesis aims to contribute to this emerging field.

Keywords: mitochondria, cytoskeleton, mitochondrial dynamics, intracellular transport, optogenetic techniques

Publicaciones asociadas a esta Tesis

Deciphering the intracellular forces shaping mitochondrial motion.

Agustina B. Fernández Casafuz, Azul M. Brigante, María Cecilia De Rossi, Alejandro Monastra & Luciana Bruno. (2024) *Scientific Reports* 14, 23914 . [link](#)

Mitochondrial cellular organization and shape fluctuations are differentially modulated by cytoskeletal networks.

Agustina B. Fernández Casafuz, María Cecilia De Rossi & Luciana Bruno (2023) *Scientific Reports* 13, 4065 . [link](#)

Morphological fluctuations of individual mitochondria in living cells.

Agustina B. Fernández Casafuz, María Cecilia De Rossi, & Luciana Bruno. (2021) *Journal of Physics: Condensed Matter*, 34(9). [link](#)

Intracellular motor-driven transport of rodlike smooth organelles along microtubules.

Agustina B. Fernández Casafuz, María Cecilia De Rossi, & Luciana Bruno. (2020) *Physical Review E* 101(6), 062416. [link](#)

Agradecimientos

Esta Tesis, fruto de un inmenso trabajo y años de dedicación, culmina en *un* título de doctorado, pero es sabido que es un camino que no se recorre en soledad. A lo largo de ese camino, por suerte, estuve muy acompañada y corresponde en este momento ser agradecida y reconocer el aporte y apoyo de todas esas personas. Me disculpo por las palabras trilladas que siguen a continuación y por hacer esto a último momento cuando ya no me quedan neuronas.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, y en particular, al Departamento de Física, por brindarme una excelente formación académica, por iniciarme en la docencia y divulgación, y finalmente por haber sido una segunda casa para mí durante todos estos años.

A CONICET, por financiar estos años tan valiosos de formación a través de una beca y permitirme dedicarme de lleno a la investigación.

Al jurado, por tomarse el tiempo de leer y evaluar esta Tesis.

A Luciana y Cecilia, por guiarme en estos años, por su calidez humana, por su apoyo constante, especialmente en este último tramo de trabajo intenso; por leer esta Tesis de principio a fin, y por sus invaluable correcciones. Y también por ser un ejemplo a seguir de cómo se puede hacer ciencia y, sobretodo, cómo ser mujeres que hacen ciencia. A Luciana, por todo su entusiasmo y energía que contagia, por apuntar siempre alto; a Ceci, por su paciencia infinita para enseñarme y aclarar hasta la duda más boba sobre biología.

Al Instituto de Cálculo, por haberme abierto las puertas, y a sus integrantes y autoridades por hacer de él un lugar de trabajo excelente y ameno.

A Valeria Levi, por abrirme las puertas de QB6 y brindar las herramientas y espacio de trabajo para formarme experimentalmente. A los integrantes de QB6, por la buena onda y predisposición, en especial a Belén.

A Ale Monastra y Azul, por compartir y colaborar en la última parte de esta Tesis.

A Mariano Mayochi, por hacer que la burocracia del doctorado sea un poco más amena, por estar siempre disponible, por su amabilidad constante y calidez.

A los chiques de la Oficina 2200, por hacer que trabajar en la ofi sea mucho mejor que en mi casa, por construir una comunidad desde nuestras diferencias y compartir infinitos almuerzos, charlas y cervezas: Vicu, Iair, Caro, Lu, los Tomis, Aye, Nacho, Cami, las Flores, Momo, Ari, Fer, Naza; con una mención particular a Caro, que fue mi compañera de escritura y catarsis en este último tramo.

A mis amigos de la facu: Luchi, Fede, María, Juan, Muri, Fede, Juli, Flor, Marian, Ale,

entre muchas otras; por encontrar siempre una cara amigable en los pasillos y compartir mil recreos y congresos, haciendo que todo sea mucho más divertido y mejor.

A mi familia y al resto de mis amigos, por apoyarme en todas mis decisiones y estar siempre presentes, aún cuando están lejos.

A Nico, por ser mi compañero desde el primer día en la facu, por bancarme todos estos años y estar siempre a mi lado, en particular este último tiempo. Gracias por compartir conmigo este camino, por todas las risas y el amor incondicional.

A mis gatos: Clementina, Emilio Toulouse, Lula y Maru.

Índice general

1. Introducción	15
1.1. Estructura, morfología y función de las mitocondrias	16
1.2. Dinámica mitocondrial	18
1.2.1. Fusión, fisión y remodelación de crestas mitocondriales	18
1.2.2. Transporte intracelular	21
1.3. Interacción mitocondria-citoesqueleto	24
1.3.1. Microtúbulos	24
1.3.2. Filamentos de actina	25
1.3.3. Filamentos intermedios	26
1.4. Microscopía de fluorescencia	28
1.4.1. Microscopía confocal	29
1.4.2. Microscopía de Super-Resolución Airyscan	30
1.4.3. Microscopía de iluminación estructurada instantánea (iSIM)	30
1.4.4. Técnicas optogenéticas	31
1.5. Modelos biológicos	33
1.5.1. Células melánoforas de <i>Xenopus laevis</i>	33
1.5.2. Células derivadas de osteosarcoma humano (U2OS)	34
1.6. Hipótesis y organización de la Tesis	35
2. Materiales y Métodos	37
2.1. Técnicas de laboratorio	37
2.1.1. Cultivo celular	37
2.1.2. Transfecciones transientes	38
2.1.3. Preparación de muestras para microscopía	38
2.2. Microscopía	39
2.2.1. Microscopía confocal	39
2.2.2. Microscopía de Super-Resolución Airyscan	40
2.2.3. Microscopía de iluminación estructurada instantánea (iSIM)	40
2.2.4. Técnicas optogénéticas	40
2.3. Imágenes de mitocondrias	40
2.3.1. <i>Tracking</i> de mitocondrias	41
2.3.2. Organización intracelular de mitocondrias: <i>Mitochondria Analyzer</i>	43
2.3.3. Cuantificación de la depolimerización parcial de microtúbulos	44
2.3.4. Análisis del movimiento lateral coordinado de mitocondrias-microtúbulos	46
2.4. Descomposición de la forma de una mitocondria en modos de Fourier	47

2.5.	Análisis estadísticos	48
2.5.1.	Procedimiento de <i>bootstrap</i>	49
2.5.2.	Test estadístico para la comparación de medianas	49
2.5.3.	Modelo de Mezcla de Gaussianas (GMM)	49
2.5.4.	Estimación de densidad por núcleo (<i>kernel density estimation</i>)	50
3.	Organización celular y caracterización morfológica de las mitocondrias	51
3.1.	Organización intracelular de las mitocondrias	51
3.1.1.	Características de la red mitocondrial	51
3.1.2.	Orientación local de las mitocondrias	53
3.2.	Análisis morfológico de mitocondrias individuales	54
3.2.1.	Coordenadas cartesianas e intrínsecas de las formas de las mitocondrias	54
3.2.2.	Longitud y ancho de las mitocondrias	55
3.2.3.	Determinación de la longitud de persistencia aparente	56
3.2.4.	Clasificación de las formas de las mitocondrias	58
3.3.	Análisis temporal de mitocondrias individuales	61
3.3.1.	Fluctuaciones de forma de las mitocondrias	61
3.3.2.	Movimiento y cambio de forma	63
4.	Regulación de la morfodinámica mitocondrial por el citoesqueleto	67
4.1.	Tratamientos que afectan las distintas redes del citoesqueleto	67
4.2.	Rol del citoesqueleto en la organización intracelular de la red mitocondrial .	69
4.2.1.	Características morfológicas de la red mitocondrial	69
4.2.2.	Orientación local de las mitocondrias frente a perturbaciones del cito- esqueleto	70
4.3.	Influencia del citoesqueleto en la forma de las mitocondrias	71
4.3.1.	Longitud de las mitocondrias	71
4.3.2.	Longitud de persistencia aparente y formas	73
4.4.	Efecto del citoesqueleto en el movimiento de mitocondrias	75
4.4.1.	Fluctuaciones de curvatura	75
4.4.2.	Movilidad	77
5.	Regímenes de movimiento y análisis de fuerzas activas	81
5.1.	Modelo semiflexible de una mitocondria	81
5.1.1.	Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD)	82
5.1.2.	Desplazamiento Cuadrático Acumulado (CSD)	84
5.1.3.	Simulaciones numéricas	84
5.2.	MSD y diferentes regímenes de movimiento de las mitocondrias	86
5.3.	CSD y la detección de eventos de fuerzas activas	90
6.	Transporte activo de mitocondrias	95
6.1.	Transporte activo de mitocondrias en melanocitos de <i>X. laevis</i>	96
6.2.	Descripción del modelo numérico	97
6.3.	Simulaciones numéricas del modelo de transporte de mitocondrias	99

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	13
6.4. Técnicas optogénéticas: reclutamiento dirigido de motores moleculares a las mitocondrias	104
7. Conclusiones generales y perspectivas	109
A. Anexo Capítulo 4: Interacción con el citoesqueleto	113
B. Apéndice: Modelo 1D para el transporte activo	115
B.1. Simulaciones numéricas	116

Capítulo 1

Introducción

Las mitocondrias son organelas esenciales que desempeñan importantes funciones garantizando el correcto funcionamiento y la supervivencia de las células eucariotas [1]. En un principio, estas organelas fueron consideradas principalmente como la “fábrica de producción de energía” de la célula (*i.e.* ATP, nucleótido adenosina); sin embargo, participan y regulan numerosos procesos biológicos. Las mitocondrias sintetizan lípidos, aminoácidos y componentes de grupos de hierro y azufre, median en el equilibrio de los iones celulares y sirven de plataforma para muchas cascadas de señalización, en particular la muerte celular (apoptosis, ferroptosis y necroptosis), el Ca^{2+} , el estrés oxidativo y la respuesta inmunitaria innata [2,3]. La relevancia de la función mitocondrial y el impacto de su disfunción en el inicio y la progresión de diferentes patologías [2,4–6] han convertido a esta organela en una de las más estudiadas en la última década.

En las células, las mitocondrias exhiben un comportamiento dinámico y son estructuralmente flexibles. En este sentido, pueden redistribuirse en el citoplasma y adoptar diferentes morfologías en respuesta a señales químicas o físicas [7,8], y dependiendo del tipo celular (ilustrado en la Figura 1.1a). En los últimos años, se han logrado avances significativos en la comprensión de la correlación entre la estructura, dinámica y función de las mitocondrias. La Figura 1.1b resume esquemáticamente la complejidad del estudio y el amplio abanico de procesos involucrados. Sin embargo, aún quedan muchos interrogantes por responder, por ejemplo, cómo las fuerzas mecánicas influyen en las fluctuaciones morfológicas y la dinámica de estas organelas. En este contexto, el citoesqueleto surge como uno de los principales agentes reguladores de estas propiedades de las mitocondrias [9–11]. Dado su anclaje a elementos del citoesqueleto (es decir, microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios), estas organelas están expuestas de forma constante a tensiones dentro del citoplasma [12,13]. En esta Tesis nos proponemos explorar la interacción entre las mitocondrias y el citoesqueleto desde un punto de vista biofísico, enfocándonos en los efectos mecánicos de esta interacción sobre las formas, organización y movilidad de estas organelas.

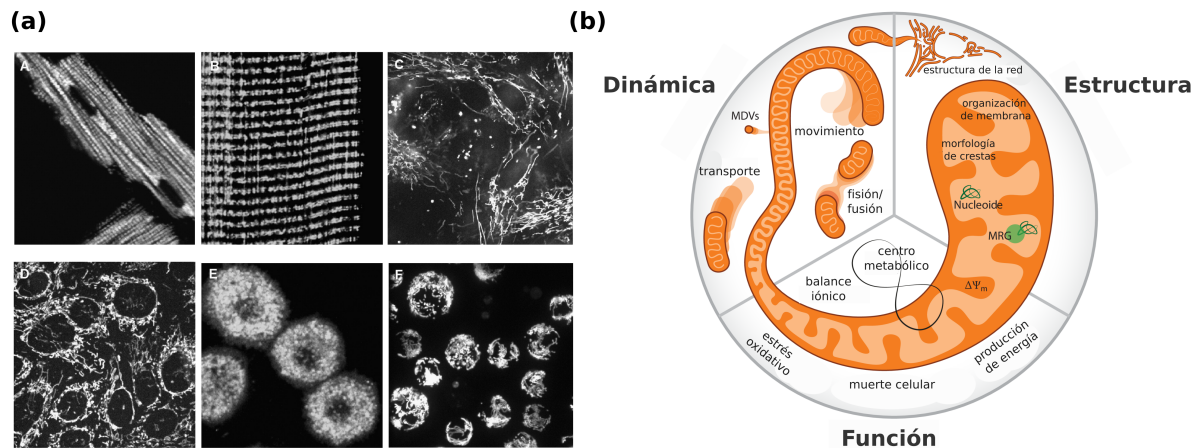


Figura 1.1: **Complejidad de las formas adoptadas por las mitocondrias.** (a) Diferentes tipos celulares exhiben una gran variedad de morfologías mitocondriales. De izquierda a derecha: cardiomiocitos de rata, músculos esqueléticos, células de páncreas humano, HL-1, hepatocitos de ratón y células promieloides. Tomada de [14]. (b) Visión general de las diferentes áreas de la biología y biofísica mitocondrial, agrupadas en tres aspectos: estructura, dinámica y función. Abreviaturas: MDV, vesículas derivadas de mitocondrias; MRG, gránulo de ARN mitocondrial. Figura adaptada de [3]

1.1. Estructura, morfología y función de las mitocondrias

Las mitocondrias están rodeadas por dos membranas, probablemente debido a su origen bacteriano [15]: una membrana externa (OMM, por sus siglas en inglés) y una membrana interna (IMM) [16]. Mientras que la IMM, con sus intrincadas invaginaciones llamadas crestas, separa la matriz del espacio intermembrana y proporciona una plataforma para la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP, la OMM actúa como barrera entre el espacio intermembrana y el citoplasma, permitiendo el paso de algunos metabolitos y pequeños péptidos [3]. La Figura 1.2a muestra un esquema de la estructura de una mitocondria.

La OMM está constituida por proteínas translocasas, canales de metabolitos e iones, enzimas metabólicas y otras proteínas reguladoras, funcionando como plataforma para varias rutas bioquímicas y de señalización [17]. A través de la OMM, las mitocondrias interactúan con casi todos los demás componentes celulares, pudiendo establecer incluso puntos de contacto [18, 19].

Por su parte, la IMM se organiza en invaginaciones características bajo la acción de múltiples actores. Una de las principales causas de la generación de estas crestas son las fuerzas espontáneas generadas por la curvatura de la membrana impulsada por los lípidos y proteínas que la componen [18]. Esta estructura altamente plegada le confiere una gran relación superficie/volumen que permite una mayor actividad enzimática, ya que son estas crestas las que albergan los complejos de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) de la cadena respiratoria para la síntesis de ATP [3]. Durante la OXPHOS, se genera un gradiente electroquímico de protones a través de la IMM que confiere una carga negativa neta a la matriz mitocondrial. La energía potencial asociada a este potencial de membrana (*i.e.* fuerza motriz de protones) se utiliza para la generación de ATP a través de la quimiosmosis.

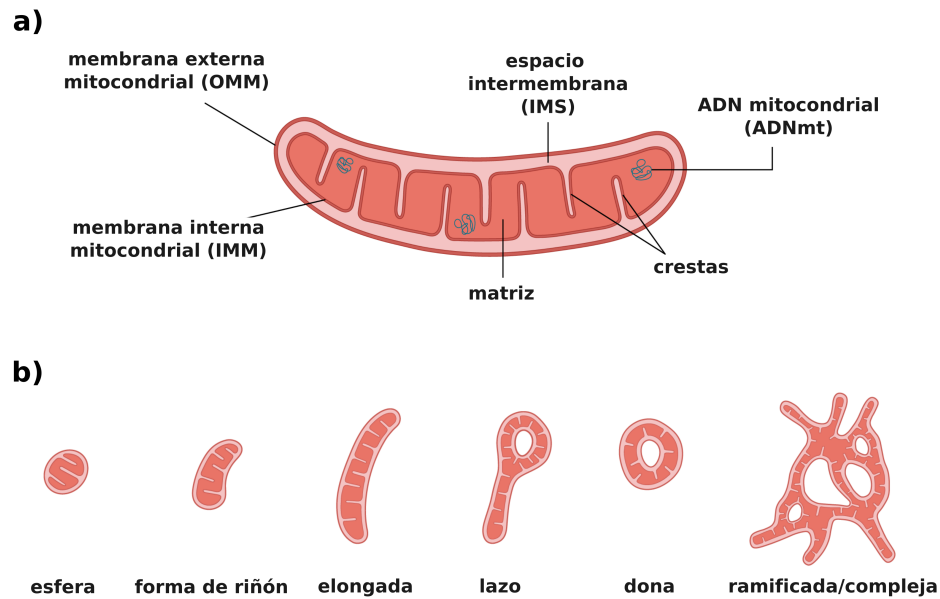


Figura 1.2: **Estructura y morfología de una mitocondria:** Esquema de la estructura interna (a) y las diferentes formas que puede adoptar la organela (b) Figura adaptada de [24].

Dentro de la matriz mitocondrial se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt) – las mitocondrias son las únicas organelas de las células animales que poseen su propio genoma. Las moléculas de ADNmt suelen estar presentes en muchas copias dentro de cada célula y en varias copias por mitocondria [20]. El ADNmt se condensa en complejos denominados nucleoides [21], que están físicamente asociados con la IMM, y se distribuyen de forma semi-regular a lo largo de las organelas. El ADNmt se transcribe como grandes moléculas de ARN en MRGs [22], típicamente cerca de los nucleoides. A diferencia de los nucleoides, los MRGs están espaciados aleatoriamente a lo largo de la red mitocondrial y forman condensados líquidos que pueden intercambiar componentes y fusionarse dinámicamente [23].

La actividad metabólica de las células está estrechamente relacionada con los cambios en la morfología mitocondrial inducidos, por ejemplo, por su exposición a señales mecánicas [25]: las mitocondrias responden a las señales remodelando su estructura [26], dando lugar a una variedad de formas y remodelando su estructura interna (*i.e.* crestas), ilustradas en la Figura 1.2b.

Dependiendo el tipo celular, las mitocondrias suelen adoptar preferentemente formas elongadas o “de riñón”, o en todo caso tomar formas más complejas que devienen en redes interconectadas (ver Figura 1.1). Aunque también suelen observarse organelas esféricas, estas formas suelen estar asociadas a mitocondrias dañadas o estresadas, ya que se ha propuesto que estas organelas se fragmentan y se vuelven pequeñas y esféricas antes de la mitofagia [27, 28] (degradación de una mitocondria por autofagia). También se ha reportado que la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial provoca cambios estructurales drásticos en las mitocondrias, que pasan de tener forma tubular a globular, lo que se conoce como fragmentación mitocondrial; las mitocondrias globulares resultantes pueden quedar hinchadas o en forma

de dona [29]. Otras morfologías únicas incluyen donas y “lazos”. Estas formas poco convencionales se observan sobre todo durante estrés oxidativo o la exposición a temperaturas frías, pero también se dan con frecuencia en células sanas no sometidas a estrés [30, 31].

Las diversas morfologías que presentan las mitocondrias reflejan su adaptabilidad funcional y su capacidad de respuesta a las demandas celulares. Las alteraciones de la forma y la dinámica de estas organelas se han observado en situaciones de estrés y patológicas, como el cáncer, trastornos neurodegenerativos y enfermedades metabólicas [32–35]; en [36] se detalla una lista de diferentes enfermedades y las alteraciones morfológicas asociadas a las mitocondrias. Por lo tanto, desentrañar los mecanismos que regulan los cambios morfológicos de estas organelas proporcionan información valiosa para el estudio de la fisiología y la patología celular, abriendo un abanico de posibilidades para nuevos tratamientos e innovación terapéutica [24].

1.2. Dinámica mitocondrial

Los requisitos funcionales de una célula se encuentran íntimamente relacionados con los cambios dinámicos que experimentan las mitocondrias en su morfología, organización y ubicación en el citoplasma. Tal como ya mencionamos, estas organelas pueden encontrarse formando redes tubulares complejas, como las observadas, por ejemplo, en astrocitos durante procesos de neuroinflamación [37], o bien fragmentadas como ocurre en células en división [38]. Por otro lado, las mitocondrias pueden ser transportadas y reclutadas a regiones subcelulares específicas para asegurar la ocurrencia de distintos procesos biológicos, como se observa a nivel del axón en las neuronas [39, 40].

El término “dinámica mitocondrial” describe colectivamente la capacidad de las mitocondrias para:

1. dar forma a su IMM y OMM mediante eventos de fusión y fisión y remodelación de crestas
2. ser transportadas a lo largo del citoesqueleto por motores moleculares
3. interactuar con otras estructuras celulares

En esta sección me enfocaré en los dos primeros procesos, dejando la interacción con otras estructuras para la próxima sección.

1.2.1. Fusión, fisión y remodelación de crestas mitocondriales

La forma y tamaño de la red mitocondrial resulta de un balance entre los procesos de fisión y fusión, los cuales se encuentran regulados por una familia de proteínas “moldeadoras de mitocondrias”, así como también por la interacción con otras estructuras celulares (Figura 1.3a). La fusión implica la unión de dos organelas para generar una mitocondria de mayor tamaño. Por el contrario, la fisión involucra la división de una organela en dos más pequeñas. Estos procesos son necesarios tanto para la biogénesis mitocondrial, como para la mitofagia, y regulan casi todas las facetas de la fisiología mitocondrial. Por ejemplo, se ha reportado que modificaciones en los genes asociados a las proteínas involucradas en la dinámica de

fusión/fisión traen aparejados diversos trastornos y desordenes de la salud [41]. Es por ello que la mayoría de los estudios se han focalizado en comprender y caracterizar desde una mirada bioquímica el rol de la dinámica de fusión-fisión en la homeostasis mitocondrial [42–44]. Sin embargo, más recientemente se ha comenzado a abordar el estudio de estos procesos desde una perspectiva biofísica demostrando la existencia de la regulación biomecánica –ejercida por las fuerzas actuantes sobre las organelas– en la ocurrencia de dichos fenómenos [7, 10, 11].

Durante el proceso de fusión de dos mitocondrias se produce la combinación de ambas membranas, y la mezcla del contenido de su matriz. La fusión de la membrana externa está regulada por las mitofusinas MFN1 y MFN2, mientras que la fusión de la membrana interna por OPA1 (*optic atrophy 1*) [18] (Figura 1.3b). Este último paso permite el intercambio de metabolitos, lípidos y ADNmt, ayudando a mantener una homogeneidad genética y bioquímica en las mitocondrias por la dilución de especies tóxicas, y pudiendo en algunos casos revertir la disfunción mitocondrial causada por mutaciones en el ADNmt [45].

La fusión mitocondrial puede ocurrir en respuesta a diferentes señales intra y extracelulares. Por ejemplo, en ausencia de un ambiente rico en nutrientes, las mitocondrias tienden a fusionarse en redes interconectadas que mejoran la eficiencia energética de la respiración [46]. De la misma forma, en casos donde aumenta la demanda de ATP, como en los primeros pasos de la apoptosis, la progresión mitótica o senescencia celular, la tasa de fusión aumenta dando lugar a organelas elongadas e interconectadas. Estudios recientes han mostrado que tanto la actina como el retículo endoplasmático son necesarios en la fusión, aunque todavía no se ha esclarecido cuál sería su mecanismo de acción [47].

Por su parte, la fisión mitocondrial es un proceso indispensable para varios propósitos. Por ejemplo, es crucial para garantizar la herencia de mitocondrias durante la división celular [48], y para seleccionar mitocondrias dañadas (*e.g.* con su membrana depolarizada o mutaciones en el ADNmt) para la mitofagia [41]. También rompe las redes en pequeñas “unidades transportables” para su precisa localización en las células [9].

La fisión mitocondrial requiere la coordinación de varios actores simultáneamente y consiste en tres pasos clave [45]:

1. marcación del sitio de fisión
2. ensamblaje de anillos de DRP1 (*dynamamin-related protein 1*) alrededor del sitio de fisión
3. constricción del anillo de DRP1 mediante la hidrólisis de GTP

En el primer paso del proceso, el retículo endoplasmático envuelve y comprime a la mitocondria, marcando el sitio de fisión. Esta preconstricción se logra por la fuerza mecánica ejercida por la polimerización de actina, a través de la cooperación entre INF2 (*ER-localized formin 2*) del retículo, y Spire 1C, la proteína nucleadora de actina en la membrana mitocondrial. Esto genera cortos filamentos de actina que estrechan los contactos entre el retículo y estas organelas, tensando los túbulos que envuelven a las mitocondrias, probablemente con ayuda de miosina [10]. De esta forma, el diámetro de las organelas disminuye de 300-500 nm a aproximadamente un tercio de su tamaño, donde pueden ensamblarse los anillos de DRP1 de 120 nm de longitud. Luego de esta preconstricción, DRP1 es reclutada a la membrana externa mitocondrial, donde se une a los receptores MFF (factor de fisión mitocondrial), MID49/51 (proteínas de dinámica mitocondrial de 49 y 51 kDa) y FIS1 (proteína de fisión

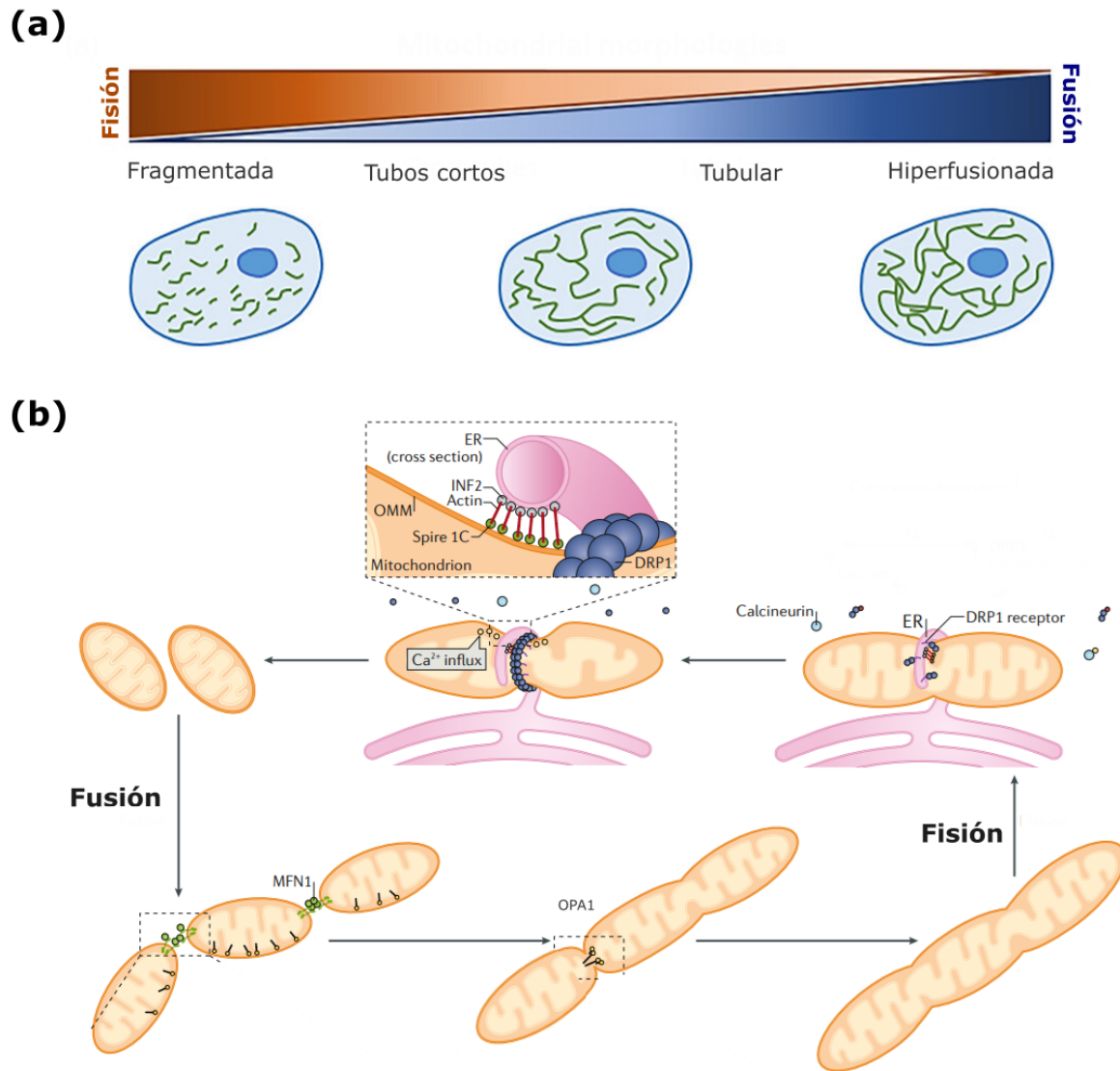


Figura 1.3: **Dinámica de mitocondrias: fusión y fisión.** (a) El balance entre las tasas de fisión y fusión da lugar a diferentes morfologías del condrioma, desde entidades (fragmentadas) pequeñas e individuales a grandes redes interconectadas (hiperfusionada). Figura adaptada de [7]. (b) Esquema de los procesos de fusión y fisión mitocondrial, con sus principales agentes reguladores, adaptada de [18].

mitocondrial 1). Los dímeros de DRP1 se ensamblan en estructuras helicoidales o anillos alrededor de las mitocondrias con la ayuda de actina. Finalmente, mediante la hidrólisis de GTP, estos anillos se estrechan y estrangulan a la organela hasta un diámetro de 16 nm, donde DNM2 (*Dinamin 2*) es responsable de la división final [41] (Figura 1.3b).

Estudios recientes han demostrado que las tensiones mecánicas ejercidas durante la fisión son esenciales para la ocurrencia de dicho proceso. Si bien DRP1 es indispensable, la fisión no ocurre o puede revertirse en ausencia de la polimerización de actina, la cual es requerida para ejercer la tensión sobre las membranas durante la fisión [49]. En esta misma línea, se ha demostrado que distintos estímulos mecánicos pueden ser transmitidos a las mitocondrias e inducir su fisión, como por ejemplo la aplicación de presión externa con un microscopio de fuerza atómica, las fuerzas de arrastre producidas por la colisión de patógenos móviles intracelulares con las mitocondrias o la migración celular sobre una superficie irregular [50].

Así como la estructura global del condrioma cambia dinámicamente de organelas aisladas a redes interconectadas (y viceversa) a través de la fusión/fisión, las mitocondrias también pueden modificar su estructura interna dinámicamente y adaptar su arquitectura en respuesta a factores fisiológicos y patológicos. Las crestas pueden variar en largo, ancho, alineamiento lateral, rigidez y orientación [45].

La remodelación de las crestas es clave en la modulación de la función mitocondrial, ya que se cree que la proliferación de los pliegues de las mismas bajo una gran demanda energética proveería una mayor superficie para los procesos de OXPHOS [7, 45]. Por otro lado, la reducción del ancho de las crestas decrece la liberación de moléculas apoptóticas al citosol tras el estímulo de muerte celular, mientras que la disrupción de las uniones de las crestas y sus membranas resulta en una liberación eficiente de estas moléculas.

Un regulador clave de la arquitectura de las crestas es OPA1, que es importante para la formación y el mantenimiento de las uniones de las mismas y también, como ya vimos, regula de forma independiente la fusión mitocondrial. La ablación o alteración de OPA1 conduce a la desorganización de las crestas y al ensanchamiento de sus uniones, que inducen un espectro de condiciones neurodegenerativas, como la Atrofia Óptica Dominante [18].

Otro de los complejos claves en la regulación de la biogénesis de las crestas es MICOS (*Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System*), que cumple diferentes funciones en la formación de la IMM, el mantenimiento del ADNmt y la morfología de los nucleoides, el mantenimiento del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), el transporte de lípidos, la estabilidad del complejo de la cadena respiratoria y la mitofagia [51]. Las células deficientes de algunas de sus subunidades registran defectos en la OXPHOS, distribución anormal de nucleoides y alteraciones en la traducción [18].

A su vez, el complejo MICOS se asocia también con MIRO, una proteína de la OMM encargada de regular el transporte mitocondrial, facilitando así el movimiento conjunto de ambas estructuras y la redistribución regular de las crestas en las mitocondrias a través de la interacción con el sistema de transporte [52]. En la siguiente sección abordaremos en detalle el transporte intracelular de mitocondrias.

1.2.2. Transporte intracelular

La distribución y organización de las mitocondrias en el citoplasma no ocurre de forma aleatoria. Por ejemplo, las células pueden exhibir una distribución preferencial de estas orga-

nelas en sitios específicos dependiendo de la demanda energética o la presencia de metabolitos. Estos fenómenos han sido reportados en células polarizadas como las neuronas [53, 54], células cancerosas en migración [55, 56], y linfocitos que forman una sinapsis inmunitaria [3, 57]. Asimismo, disfunciones en dicha distribución están relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica [39, 58].

Si bien las células están compuestas en su mayoría por agua, la concentración de macromoléculas es extremadamente alta, y la viscosidad efectiva del citosol puede llegar a ser 2 o 3 órdenes de magnitud mayor que la del agua. Esta “aglomeración molecular” (*molecular crowding*) tiene como consecuencia la reducción en la movilidad de los diferentes componentes celulares. Aunque las moléculas pequeñas presentan el comportamiento esperado para un fluido viscoso, partículas de mayor tamaño exhiben un comportamiento difusivo de tipo anómalo [59–62]. En este contexto, la difusión no es un mecanismo eficiente para lograr el preciso y correcto posicionamiento de todos los componentes celulares: los tiempos requeridos para difundir en un entorno tan complejo como el citoplasma se incrementarían substancialmente, siendo incompatibles con diversos procesos biológicos [63]. Es por ello que las células cuentan con un sistema de transporte activo para movilizar los diferentes cargos (*i.e.* macromoléculas, organelas y vesículas), entre ellas las mitocondrias.

El sistema de transporte intracelular está constituido por motores moleculares que son proteínas especializadas en transportar los diferentes cargos a lo largo de filamentos del citoesqueleto (*i.e.* microtúbulos y filamentos de actina) hasta su destino final en el citoplasma [64, 65].

Los motores moleculares se unen a los diferentes cargos a través de uno de sus extremos, interactuando directamente con la membrana o con proteínas adaptadoras presentes en la misma. En el extremo opuesto, se produce la unión del motor al filamento por medio de dos dominios globulares que presentan actividad catalítica (cadena pesada, llamados dominios motores o cabezas). Esto quiere decir que estos dominios son capaces de unir e hidrolizar ATP y, por consiguiente, son los responsables de generar la energía necesaria para inducir el movimiento a lo largo del filamento [66]. Un esquema de esta estructura genérica se ilustra en la Figura 1.4a.

Existen 3 grandes familias de motores moleculares: kinesinas y dineínas, que son las encargadas del transporte a lo largo de microtúbulos, y miosinas, que median el transporte a lo largo de los filamentos de actina [68, 69]. Los motores moleculares convierten la energía química de la hidrólisis de ATP en energía mecánica, ejerciendo fuerzas del orden de los picoNewtons sobre los cargos y los filamentos sobre los que se desplazan [67, 70].

En esta Tesis nos enfocaremos exclusivamente en el transporte conducido a lo largo de los microtúbulos. Los microtúbulos son filamentos polimerizados que, en algunos sistemas celulares (como *Xenopus laevis*), se organizan de manera radial, formando una red desde el centro de la célula hacia la periferia, como se ilustra en la Figura 1.4b. Estos filamentos se describirán en más detalle en la próxima sección, pero es importante destacar que se encuentran polarizados, ubicándose el llamado extremo positivo (+) en la periferia y el negativo (-) en la zona perinuclear, asociado al centro organizador de microtúbulos (MTOC).

Kinesina transporta las organelas hacia el extremo positivo del microtúbulo (transporte anterógrado) y dineína hacia el extremo negativo del mismo (transporte retrógrado). Ambos tipos de motores pueden actuar simultáneamente sobre el cargo y, como consecuencia, éste

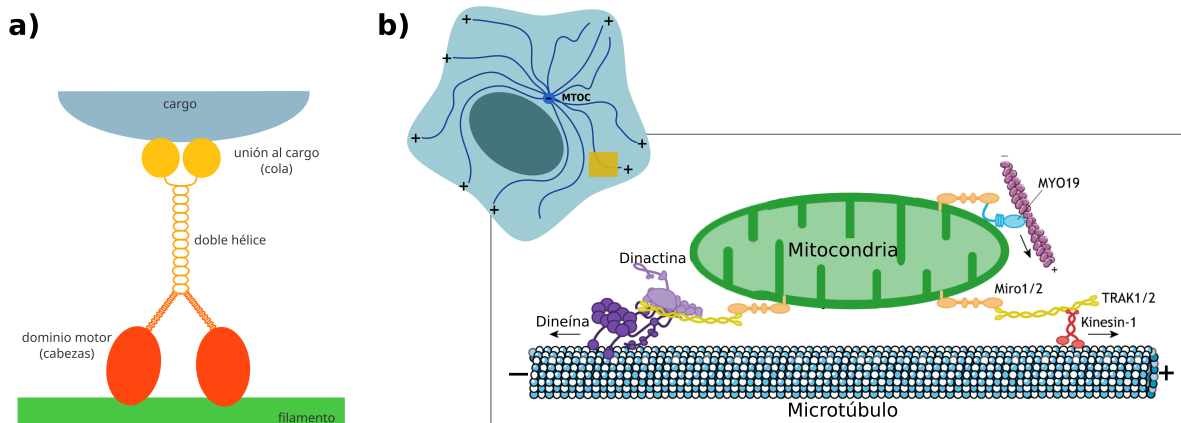


Figura 1.4: **Transporte intracelular de mitocondrias.** (a) Esquema de la estructura de un motor molecular. (b) Resumen esquemático de los motores y proteínas adaptadoras que intervienen en el transporte bidireccional de mitocondrias a lo largo de microtúbulos. Adaptada de [67].

revierte frecuentemente su dirección de movimiento [71–73]. Si bien este mecanismo parecería ser ineficiente para el traslado de un cargo hacia un destino final determinado, el transporte bidireccional es extremadamente efectivo para maniobrar en el citoplasma celular [74].

Existen dos modelos que explican los fenómenos de transporte bidireccional de organelas: el modelo de coordinación y el modelo estocástico de cinchada (*tug-of-war*). El modelo de coordinación postula que ambos tipos de motores se encuentran unidos al cargo, pero que no están simultáneamente activos. Según este modelo, su actividad está coordinada o regulada por cofactores o proteínas accesorias, por lo cual la dirección del transporte en un dado momento estará dada por el motor que se encuentre activo [72]. Por el contrario, el modelo de *tug-of-war* postula que los equipos de motores de polaridad opuesta pueden ejercer simultáneamente fuerza sobre el cargo, y en consecuencia, la dirección del transporte quedaría determinada por el equipo que ejerce mayor fuerza. Debido a que este modelo basa sus fundamentos en la competencia de los equipos de motores, la dinámica del movimiento dependerá tanto del número de motores que constituyen los equipos como también de sus propiedades biofísicas [75, 76].

Además de los motores moleculares mencionados, en el transporte de mitocondrias interviene un complejo adaptador formado por MIRO1 o MIRO2 (denominados colectivamente MIRO1/2) y la proteína de tráfico de kinesina 1 o 2 (TRAK1/2). Las proteínas MIRO están ancladas a la OMM a través de un dominio transmembrana C-terminal. Esta proteína puede asociarse con el complejo MICOS, como se mencionó anteriormente, desempeñando un papel en el mantenimiento de la morfología mitocondrial y la arquitectura de la IMM [52]. En general, este complejo MIRO-TRAK une principalmente kinesinas y dineínas a las mitocondrias, pero MIRO1/2 sin TRAK1/2 también puede reclutar miosina de clase XIX (MYO19) a las mismas [67]. La Figura 1.4b ilustra estos motores y las proteínas adaptadoras.

Por otro lado, además del transporte mitocondrial, kinesina-1, junto con TRAK1/2, también impulsa la tubulación de las mitocondrias en la periferia celular [77]. De hecho, la sobreexpresión de TRAK1/2 produce grandes cambios en la morfología de la red mitocondrial, induciendo la formación de túbulos mitocondriales extendidos y altamente dinámicos

dependientes de microtúbulos [78]. Estos túbulos mitocondriales también se han observado tras el reclutamiento selectivo de motores a la membrana externa mediante técnicas optogénicas [79, 80] (ver detalles en la Sección 1.4.4). Estos estudios demuestran que los impulsos mecánicos generados por los motores moleculares inducen deformaciones en las mitocondrias, que son capaces incluso de inducir su fisión [81].

1.3. Interacción mitocondria-citoesqueleto

En los últimos años, ha crecido el interés por comprender cómo influyen las fuerzas mecánicas en las fluctuaciones morfológicas y la dinámica de las mitocondrias. En este sentido, las interacciones de estas organelas con otros componentes celulares han sido señaladas como factores que influyen en su dinámica [82–84]. En particular, el citoesqueleto se ha identificado como uno de los principales agentes mecano-reguladores de estas organelas debido a su estrecha interacción con ellas [7].

El citoesqueleto está compuesto por microtúbulos (MT), filamentos de actina (F-actina) y filamentos intermedios (FI) que forman una red interconectada con propiedades biofísicas características y distribución específica para cada tipo celular [85, 86]. Esta compleja red es capaz de ejercer y transmitir fuerzas mecánicas a otros componentes celulares como son las mitocondrias, modificando su morfología y función. Dado su interacción con estos filamentos, estas organelas están constantemente expuestas a tensiones tanto de compresión como de tracción dentro del citoplasma [12]. Así, su dinámica y función se ven afectadas por los impulsos mecánicos que se les transmiten [8, 50, 87, 88].

1.3.1. Microtúbulos

Los microtúbulos son filamentos que se forman por el autoensamblado de monómeros de α y β tubulina, dispuestos cabeza con cola formando protofilamentos polares. Estos protofilamentos (entre 9 y 17) se unen entre sí en rotación y se alinean lateralmente, resultando así en un arreglo helicoidal con estructura similar a un tubo hueco de 25 nm de diámetro externo y 18 nm de diámetro interno [63], como se ilustra en la Figura 1.5.

El extremo terminado con β -tubulina se denomina extremo positivo, y el que termina con α -tubulina, extremo negativo. En muchos tipos celulares, estos filamentos se organizan en forma radial: los extremos negativos se concentran en una estructura llamada centrosoma o centro organizador de microtúbulos (MTOC) en el interior de la célula, mientras que los extremos positivos se extienden hacia la membrana plasmática en la periferia celular [64], como se muestra en la Figura 1.5.

Los microtúbulos se ensamblan y desensamblan constantemente mediante ciclos de hidrólisis de GTP. El consumo estocástico o controlado de GTP provoca rondas de crecimiento y catástrofe de los microtúbulos en el extremo positivo, un fenómeno conocido como inestabilidad dinámica. La estabilidad y la función de los microtúbulos pueden modularse mediante modificaciones postraduccionales de las subunidades de tubulina, o mediante la acción de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés), como las proteínas MAP1, MAP2 y Tau [63]. Algunas de estas proteínas también tienen como función entrelazar filamentos en sí (*cross-linkers*), generando manojos de filamentos (*bundles*), y pueden

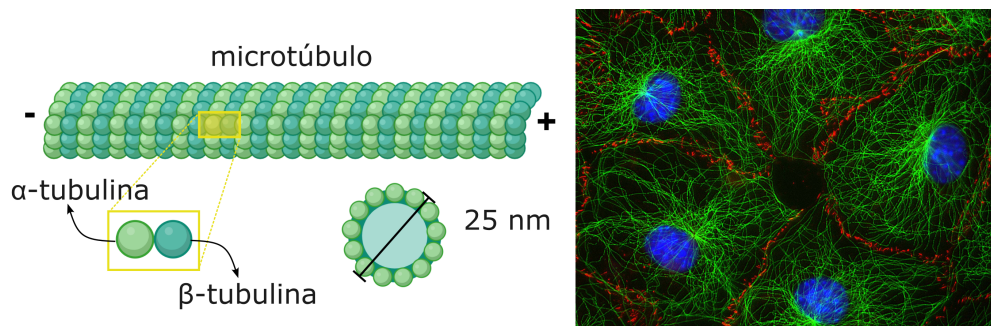


Figura 1.5: **Microtúbulos.** Esquema de un microtúbulo: están compuestos por monómeros de α - y β -tubulina formando protofilamentos que se unen formando tubos huecos de 25 nm de diámetro (panel izquierdo, creado con BioRender [89]). Distribución de los microtúbulos en un fibroblasto de ratón NIH 3T3 (panel derecho, imagen tomada de [90])

alterar la dinámica y propiedades mecánicas del citoesqueleto, fijando segmentos o generando curvaturas locales [91, 92]. Los microtúbulos son los filamentos más rígidos del citoesqueleto, con una longitud de persistencia de 6 mm *in vitro* [93] y unos 20 μm en el citoplasma celular [94, 95].

Los microtúbulos son la principal vía de transporte de las mitocondrias. Los motores dineína y kinesina se unen a las mitocondrias a través de proteínas adaptadoras (como se ha explicado en la sección anterior) e impulsan estas organelas hacia los extremos negativo y positivo de los microtúbulos, respectivamente [96–99]. Además, tanto los microtúbulos como los motores moleculares pueden también ejercer fuerzas mecánicas sobre estas organelas, favoreciendo variaciones morfológicas y de tamaño. Por ejemplo, se ha demostrado que las mitocondrias modifican su tamaño mientras son transportadas o incluso pueden ser inducidas a deformarse mediante el reclutamiento selectivo de motores en su membrana externa [79, 100, 101]. Además, el papel de los microtúbulos y sus proteínas asociadas también es importante para mantener el equilibrio entre la fisión y la fusión, así como para mediar en el anclaje (*tethering*) de las mitocondrias [67].

1.3.2. Filamentos de actina

Los filamentos de actina (F-actina) consisten en una doble hélice formada por los monómeros globulares de actina [63], esquematizada en la Figura 1.6. Son estructuras flexibles con un diámetro entre 6 y 8 nm que se organizan en dos tipos de estructuras: manojos (*bundles*) lineales (como en las fibras de estrés [102, 103]), y redes parcialmente desorganizadas (actina cortical [102, 104]). Aunque los filamentos de actina están dispersos por toda la célula (ver Figura 1.6), su mayor concentración se encuentra en la corteza, justo debajo de la membrana plasmática, proporcionando fuerza y forma a la bicapa lipídica, donde forman muchos tipos de proyecciones en la superficie celular, como los filopodios que las células utilizan para explorar territorio y desplazarse [64].

Al igual que los microtúbulos, F-actina también son filamentos polares debido a la naturaleza asimétrica de sus subunidades, definiendo dos extremos (+ y -) con propiedades cinéticas diferentes. La dinámica de polimerización/depolymerización de estos filamentos depende de la unión e hidrólisis de ATP y se encuentra íntimamente influenciada por la concentración

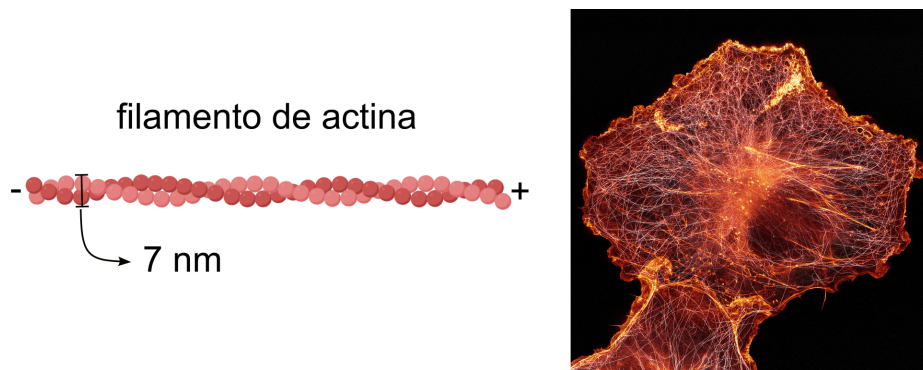


Figura 1.6: **Filamentos de actina** Esquema de un filamento de actina: está formado por una doble hélice de 7 nm de diámetro (panel izquierdo, creado con BioRender [89]). Distribución de filamentos de actina en una célula Vero (panel derecho, imagen tomada de [105]).

de los monómeros de actina y de la interacción de los mismos con proteínas específicas (*Actin Binding Proteins*, ABPs). Estas proteínas cumplen diversas funciones: pueden mediar la interacción entre filamentos, anclarlos a la membrana celular, o evitar su polimerización uniéndose al extremo positivo, favoreciendo la depolimerización y fragmentación de los mismos [106]. A diferencia de los microtúbulos que son muy rígidos, los filamentos de actina no son capaces de resistir esfuerzos de compresión debido a su flexibilidad [93].

Los filamentos de actina desempeñan un papel clave en la fisión de las mitocondrias [48, 107]. Este complejo proceso, explicado en la Sección 1.2, requiere la acción conjunta de elementos del citoesqueleto (por ejemplo, F-actina y septina), otras organelas (por ejemplo, retículo endoplásmico) y proteínas específicas (por ejemplo, miosina, DRP1) [45, 108–111]. Además, F-actina también tiene funciones importantes en otros procesos como la mitofagia, morfogénesis y herencia de las mitocondrias. Por ejemplo, en presencia de daño mitocondrial, se produce una rápida polimerización de los filamentos de actina alrededor de las mitocondrias, impidiendo los cambios de forma mitocondrial que tienen lugar tras su despolarización [112]. También se ha propuesto que Miosina 19 –motor asociado a F-actina– esculpe la arquitectura de las crestas mitocondriales actuando como un vínculo mecánico (*tether*) que estimula la morfogénesis mitocondrial [113]. Por otro lado, se ha descubierto que diferentes ensamblajes de actina tienen papeles complementarios en la organización y partición de las mitocondrias en la división celular: mientras que una red de “cables de actina” organiza el posicionamiento mitocondrial en todo el citoplasma, una onda dinámica de estos filamentos se polimeriza alrededor de las mitocondrias y forma colas de cometa alargadas que empujan las organelas al azar dentro de la célula progenitora mezclando mitocondrias sanas y dañadas entre las hijas, equitativamente [114].

1.3.3. Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios (FI) son complejos filamentos apolares que miden 10 nm de sección transversal, entre los diámetros de los filamentos de actina y los microtúbulos (de allí el nombre). A diferencia de F-actina y los microtúbulos, las proteínas de los filamentos intermedios están compuestas por una amplia variedad de proteínas estructuralmente rela-

cionadas, aunque diferentes. Hasta ahora se han descrito seis tipos diferentes de filamentos intermedios, los cuales se clasifican en grupos en función de su estructura primaria, propiedades de ensamble y expresión génica [115]. Entre los más conocidos se encuentran keratina (en células epiteliales), vimentina (en células ectodérmicas o fibroblastos), desmina y laminas (filamentos intermedios nucleares) [116].

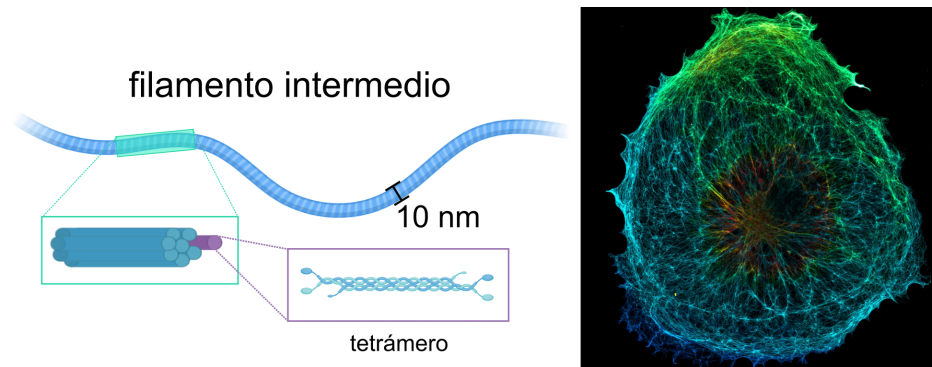


Figura 1.7: **Filamentos intermedios.** Esquema de un filamento intermedio: tienen un ancho de 10 nm y están formados por 8 tetrámeros (panel izquierdo, creado con BioRender [89]). Distribución de filamentos de vimentina en una célula Vero (panel derecho, imagen tomada de [117])

En la presente Tesis, nos focalizaremos en la red de vimentina observada en células melanóforas de *Xenopus laevis* (ver Sección 1.5.1). En esta y otras líneas celulares, como por ejemplo astrocitos y fibroblastos, se ha propuesto que dichos filamentos se distribuyen formando extensas e intrincadas redes que se expanden radialmente en todas las direcciones formando estructuras similares a “jaulas” [116, 118]. Esta red penetra en todas las áreas del citoplasma y las conecta mecánicamente, confiriéndoles la capacidad de coordinar las actividades del citoesqueleto y la transmisión de señales entre la periferia celular y los compartimientos internos [116]. La Figura 1.7 muestra la distribución de filamentos de vimentina en una célula Vero.

Los filamentos intermedios influyen en la función, la localización subcelular y la forma de las mitocondrias (véase [119] y sus referencias). Se ha observado que los FI de vimentina y desmina regulan la bioenergética mitocondrial en células musculares cardíacas y esqueléticas [120]. En particular, se ha demostrado que los FI de vimentina se unen directa o indirectamente a las mitocondrias a través de plectina [121], afectando su movilidad y anclaje en el citoplasma [122, 123]. Además, se ha reportado que la ausencia de vimentina induce la fragmentación de mitocondrias en células COS7 y se ha sugerido que estos filamentos podrían participar en la asociación mitocondrial con microtúbulos [124].

Todas estas pruebas apuntan a una compleja interacción de las mitocondrias y el citoesqueleto que todavía no se comprende del todo. Las evidencias planteadas nos permiten inferir que existe una interacción dinámica entre las mitocondrias y el citoesqueleto que aún no ha sido descrita en profundidad.

1.4. Microscopía de fluorescencia

La microscopía óptica es una de las principales herramientas empleadas para el estudio de los sistemas biológicos vivos, principalmente por el carácter no invasivo de la luz visible. Además, el advenimiento de los fluoróforos que permiten marcar específicamente componentes celulares convirtió a la microscopía de fluorescencia en una de las técnicas más ampliamente utilizadas para visualizar distintas estructuras celulares, como las mitocondrias o el citoesqueleto [125, 126].

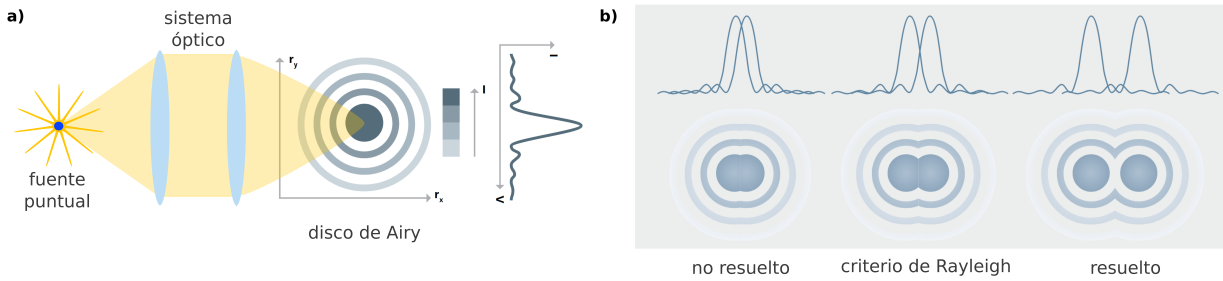


Figura 1.8: **Resolución de un sistema óptico.** (a) La difracción de la luz por un sistema óptico (*i.e.* microscopio) genera un disco de Airy como imagen de una fuente puntual. (b) Según el criterio de Rayleigh, dos fuentes cercanas pueden resolverse cuando el centro del disco de Airy de una cae justo en el borde de la otra. Imagen adaptada de [127]

La resolución de un microscopio convencional está limitada por difracción debido a la naturaleza ondulatoria de la luz [128]. Como consecuencia, la imagen de una fuente puntual no será un punto, sino que tendrá una función de dispersión o PSF, conocida como disco de Airy, en el plano de la imagen, tal como se ilustra en la Figura 1.8a. La distribución de la intensidad de la PSF puede describirse mediante una función de Bessel. En la figura se muestra el perfil de intensidad en un dado plano, y se puede ver que la mayor parte de la intensidad se concentra en el máximo principal ($\sim 84\%I_0$), aunque también hay máximos secundarios subsiguientes. El primer mínimo de la función (*i.e.* el radio del disco) está dado por la siguiente ecuación:

$$r_{DA} = \frac{1.22\lambda}{2NA} \quad (1.1)$$

, siendo λ la longitud de onda y NA la apertura numérica del objetivo.

Entonces, si tenemos dos fuentes puntuales muy cercanas –por ejemplo, dos fluoróforos– no podremos distinguirlas como fuentes separadas en la imagen. Sólo podremos distinguirlos una vez que la distancia entre ellas sea tal que sus discos de Airy se separen (Figura 1.8b). La distancia mínima a la cual podemos distinguir los dos emisores se denomina resolución, y según el criterio de Rayleigh se determina cuando el máximo (centro del disco de Airy) de la segunda fuente coincide con el primer mínimo de la primera.

A continuación, describiremos tres tipos de microscopías que se emplearon en esta Tesis para el estudio a nivel celular de las mitocondrias.

1.4.1. Microscopía confocal

Los microscopios de campo amplio se caracterizan por iluminar una amplia región de la muestra. Esto produce que se exciten muchas moléculas en el volumen iluminado, y se colecte la fluorescencia emitida por todas ellas. En consecuencia, la imagen será generada por rayos provenientes tanto del plano focal como de planos secundarios, disminuyendo así el contraste y la nitidez de la misma.

Los microscopios confocales rechazan la luz que proviene de planos fuera de foco para aumentar el contraste. Para lograr esto, se coloca una apertura confocal (llamada *pinhole*) en el camino óptico previo a la colección de la fluorescencia emitida [129, 130]. Un esquema de este proceso se muestra en la Figura 1.9a-b.

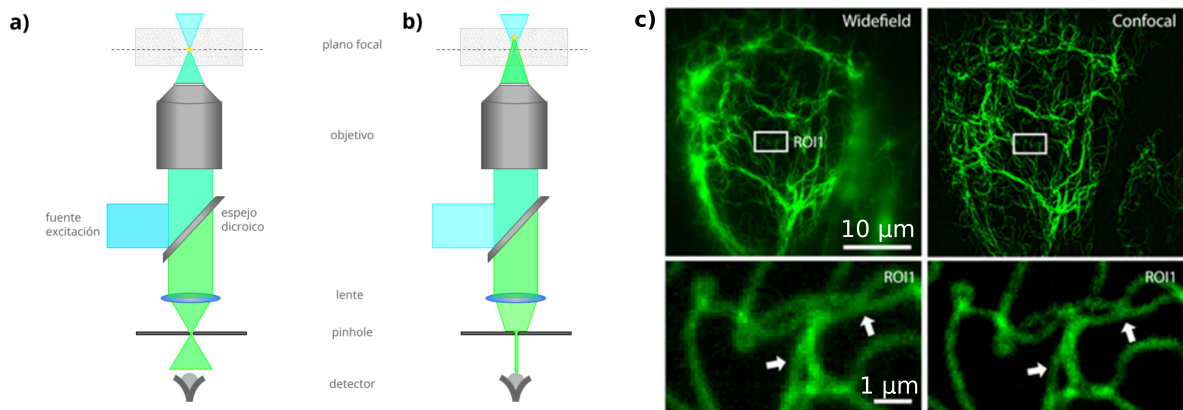


Figura 1.9: **Microscopía confocal.** (a-b) Esquema del funcionamiento de un microscopio de fluorescencia confocal: la emisión de fluorescencia detectada de un punto del plano focal enfocada a través del *pinhole* será máxima (a), mientras que si la fluorescencia emitida proviene de un punto fuera del plano focal, no es enfocada a través del *pinhole* y por lo tanto muy pocos fotones alcanzarán el detector (b). (c) Imagen de una célula U2OS expresando rsEGFP2-vimentin (filamentos de vimentina); comparación entre una imagen adquirida por microscopía de campo amplio (izquierda) y confocal (derecha). Tomada de [131]

Cuanto menor sea el tamaño del *pinhole*, mayor será la resolución del microscopio, ya que la luz que llegará al detector será de una región del espacio más pequeña. Además, teniendo en cuenta el patrón de difracción de cada punto, sabemos que la contribución de fuentes que no estén alineadas con el sistema será menor, ya que la intensidad es menor al alejarse del centro del disco de Airy. Sin embargo, lo que se gana en resolución al cerrar el *pinhole*, se pierde en la eficacia de detección, ya que menos fotones llegan al detector.

En términos prácticos, el tamaño óptimo del *pinhole* que se utiliza equivale a una unidad de Airy. En estas condiciones, la mejora de la resolución es aproximadamente un factor de 1.4 en comparación con un sistema de campo amplio [129]. Esta mejora se muestra en la figura 1.9c.

1.4.2. Microscopía de Super-Resolución Airyscan

El *Airyscanning* es una técnica basada en la microscopía confocal de barrido láser, donde se introduce un detector que mejora drásticamente la señal al utilizar la luz que de otro modo es rechazada por el *pinhole* confocal.

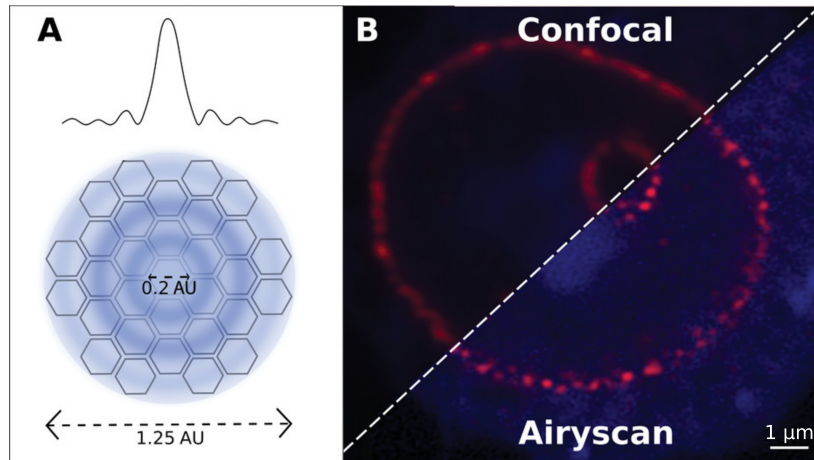


Figura 1.10: **Microscopía Airyscan.** (a) El detector de Airyscan está compuesto por 32 detectores individuales, que capturan la información de la PSF. (b) Imágenes de macrófago murino con su núcleo (azul) y la nucleoporina NUP98 (rojo), marcados con DAPI y Alexa647, respectivamente; Comparación entre una imagen tomada por microscopía confocal y con detector Airyscan. Tomada de [132]

Airyscan utiliza una matriz de 32 detectores puntuales como elemento detector. Esto tiene la ventaja de un tiempo de lectura rápido y un ruido oscuro muy bajo. El detector central se sitúa en el eje óptico y, por tanto, crea una imagen confocal clásica por sí solo. Los demás detectores están desplazados con respecto al eje óptico (ver Figura 1.10). Cada elemento detector, si su dimensión es lo suficientemente pequeña, puede tratarse como un *pinhole*. En el caso de un emisor puntual, cada elemento detector representa una fase diferente de la imagen. Por otra parte, las intensidades de imagen serán menores en comparación con el detector central. Dado que se conoce la cantidad de desplazamiento de cada elemento del detector, se podrían reasignar las PSF de detección medidas a la posición correcta mediante un desplazamiento adecuado, sumando todo y realizando una deconvolución, para obtener una imagen de mayor relación señal/ruido (SNR) y resolución en el plano lateral. La ganancia en SNR contribuye en mayor medida al aumento de la resolución.

1.4.3. Microscopía de iluminación estructurada instantánea (iSIM)

La microscopía de iluminación estructurada (SIM) se basa en la excitación de la muestra con un patrón de luz espacialmente estructurado conocido y se fundamenta en la generación de patrones de interferencia conocidos como efecto Moiré [133]. Se adquieren diferentes imágenes y, mediante la deconvolución matemática de la señal de interferencia, se obtiene una imagen de superresolución (~ 2 veces la resolución de campo amplio). A diferencia de la microscopía

confocal, la mejora de la resolución se consigue sin necesidad de descartar nada de la luz de emisión. [134]

Sin embargo, para extraer la información de alta frecuencia espacial, se deben tomar varias imágenes de la muestra utilizando diferentes orientaciones del patrón de iluminación, y la imagen final sólo se obtiene una vez que estas imágenes han sido procesadas [135]. A diferencia de otros microscopios de iluminación estructurada, en un microscopio de iluminación estructurada instantánea ('instant SIM' o iSIM) la resolución se mejora mediante *hardware* en una sola adquisición de la imagen por cuadro, en lugar de procesar computacionalmente múltiples imágenes, lo que lo convierte en un microscopio de iluminación estructurada «instantáneo» [136].

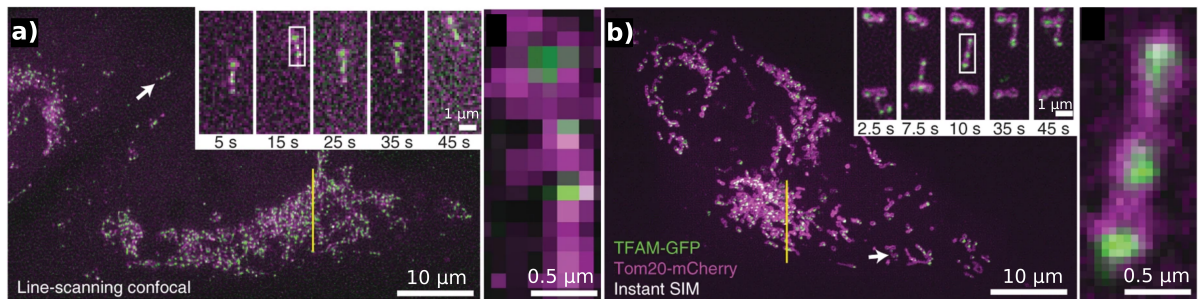


Figura 1.11: **Microscopía de iluminación estructurada instantánea (iSIM)**. Imagen de fibroblasto de pulmón humano con factor de transcripción mitocondrial TFAM-GFP (verde, nucleoides) y la proteína de OMM TOM20-mCherry (magenta, membrana externa de mitocondrias), comparación entre la imagen adquirida por microscopía confocal (a) y por iSIM (b). Imagen adaptada de [136].

1.4.4. Técnicas optogenéticas

Estudiar la mecanobiología de las mitocondrias en su entorno fisiológico es un desafío [7]. Parte del reto reside en la dificultad de controlar o aplicar fuerzas mecánicas dentro de las células vivas. Una estrategia muy prometedora es el uso de un enfoque optogenético para controlar el transporte y la distribución de las mitocondrias utilizando luz [80, 81, 137].

La optogenética combina luz y genética para permitir un control preciso de células, tejidos y organismos vivos con funciones a medida. Entre las ventajas que ofrece se destacan que es una técnica no invasiva, reversible y tiene una alta resolución espacio-temporal [138]. El término «optogenética» describe la expresión de proteínas fotosensibles codificadas genéticamente, que pueden activarse o inhibirse selectivamente con luz, esquematizado en la Figura 1.12a. Las herramientas optogenéticas ofrecen un potente enfoque para investigar la fisiología subcelular, proporcionando una visión detallada de diferentes procesos intracelulares. Se han empleado numerosas combinaciones de sensores fluorescentes y proteínas específicas para marcar con gran precisión estructuras de interés. Entre sus posibles aplicaciones se destacan la localización de organelas, el control del potencial y/o composición de membranas, secreción y/o degradación de proteínas, etc., ilustrados en la Figura 1.12b [139].

Existen numerosos módulos fotosensoriales que, al asociarse con las proteínas de interés, permiten controlar su actividad de diferentes maneras. Los distintos mecanismos de

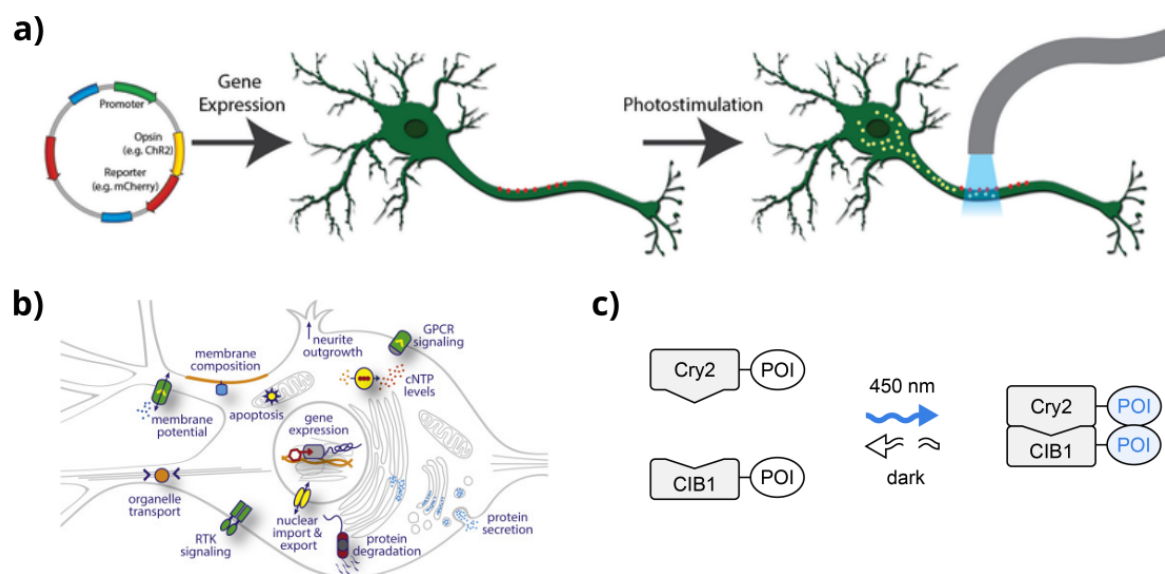


Figura 1.12: **Técnicas optogenéticas.** (a) Esquema del funcionamiento: se expresa un gen con la proteína de interés unida a proteínas fotosensibles, luego ésta se “activa” con la exposición a la luz. Tomada de Addgene (b) Esquema de las numerosas combinaciones de módulos fotosensibles que existen para regular diferentes actividades en la célula, *e.g.* composición de membrana, transporte de organelas, cascadas de señalización, etc. Tomada de [139]. (c) Esquema de la interacción entre CRY2 y CIB1: cada uno de estos compuestos está unido a una proteína de interés (POI). Tras la exposición a la luz azul (~ 450 nm) se dimerizan, y las diferentes POI pueden interactuar. Imagen tomada de optobase

funcionamiento incluyen la disociación, auto-oligomerización, regulación alostérica, heterodimerización y homodimerización, entre otros [138].

Uno de los módulos más populares para controlar las interacciones proteína-proteína es el par criptocromo 2 (CRY2) de *Arabidopsis thaliana* y su socio, CIB1 (*cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1*). Tras la exposición a la luz azul (λ entre 390 nm y 500 nm [140]), CRY2 y CIB1 dimerizan en escalas de subsegundos. El acoplamiento entre CRY2 y CIB1 es reversible y se disocian en ausencia de iluminación [141]. Este proceso se esquematiza en la Figura 1.12c.

Este módulo se ha utilizado para reclutar motores moleculares a las mitocondrias de forma controlada. Mediante esta técnica se ha demostrado que se puede modificar la distribución intracelular de las organelas: al reclutar kinesinas, las mitocondrias se dirigen preferencialmente hacia la periferia celular, mientras que al reclutar dineínas, lo hacen hacia la zona perinuclear [80]. Además, estudios recientes han probado que estos motores activados optogenéticamente pueden generar impulsos mecánicos capaces de deformar las membranas de las mitocondrias e inducir su fisión [81].

1.5. Modelos biológicos

A continuación describiremos los dos modelos celulares que utilizaremos para el estudio de las mitocondrias en esta Tesis. Estas líneas celulares han sido utilizadas en el grupo para el estudio del transporte de organelas [142, 143] y del citoesqueleto [95, 131, 144].

1.5.1. Células melánoforas de *Xenopus laevis*

Este es un modelo celular muy estudiado y caracterizado [145–147], evidenciado por el gran número de trabajos publicados en distintas áreas de las biociencias (~ 10000 desde el año 2008 hasta el momento, según PubMed). Esto se debe a que muchos de los procesos esenciales a nivel celular y molecular se encuentran conservados a través de los vertebrados. Además, la secuenciación de su genoma reveló un alto grado de similitud con el de los humanos, con un 90 % de genes homólogos de enfermedades humanas [148].

La utilización de estas células se debe a varias razones. La principal razón es que estas células son adherentes (se adhieren al sustrato donde crecen) y muy grandes. En promedio pueden llegar a medir $\sim 50 \mu\text{m}$ de diámetro y $\sim 3 \mu\text{m}$ de alto en la periferia celular [142]. Esto nos proporciona un sistema cuasi bidimensional, especialmente en la periferia celular, para estudiar la dinámica de mitocondrias a través de imágenes de microscopía confocal (2D) sin casi pérdida de información. Además, en este sistema celular las mitocondrias adoptan formas simples y filamentosas, lo que permite estudiar la dinámica a nivel de organela única.

En particular, en esta Tesis se empleará una línea estable inmortalizada de células melánoforas: EGFP-XTP. Esta línea celular expresa de forma estable EGFP-XTP, un homólogo de *Xenopus* de la proteína tau (*Xenopus tau-like protein* – XTP) fusionada a la proteína verde fluorescente (*Enhanced Green Fluorescent Protein* – EGFP) [73, 149]. Esta proteína similar a tau se asocia a los microtúbulos, resultando en una célula en la que estos filamentos son observables por microscopía de fluorescencia.

En estas células, la red de microtúbulos se distribuye en forma radial, como se observa en

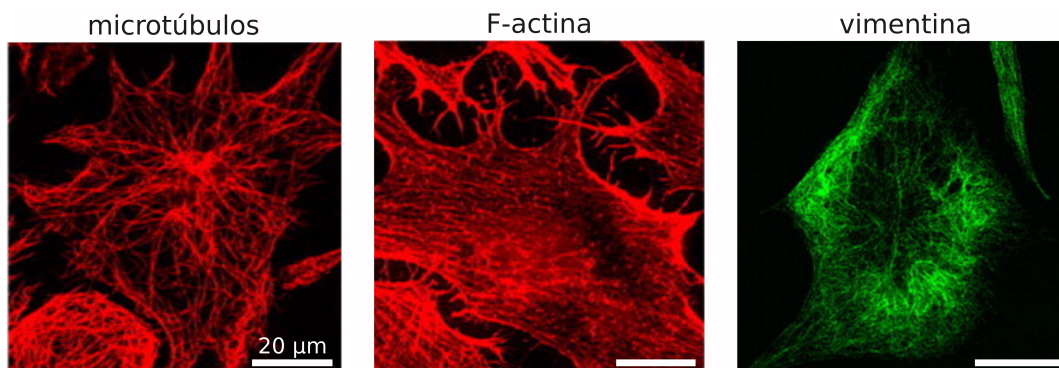


Figura 1.13: **Citoesqueleto en células melanóforas de *Xenopus laevis*** Se muestran en pseudo-color imágenes representativas de las distintas redes de filamentos del citoesqueleto en esta línea celular. Adaptada de [118].

la Figura 1.13. Por otro lado, la red de actina ocupa todo el citoplasma en forma parcialmente desordenada, mientras que la red de vimentina forma intrincadas redes que se expanden radialmente en todas las direcciones.

1.5.2. Células derivadas de osteosarcoma humano (U2OS)

La línea celular U2OS es una de las más utilizadas en diversas áreas de la investigación biomédica. Estas células se caracterizan por ser de menor tamaño ($\sim 20 \mu\text{m}$) que las células melanóforas previamente descritas, con menor área citoplasmática y núcleo prominente.

En este sistema, las mitocondrias forman largas redes, pero también se observan organelas aisladas que muestran una rápida dinámica, como se detalla en el Capítulo 6.

En cuanto al citoesqueleto, se observa que la red de microtúbulos se orienta radialmente, los filamentos de actina forman fibras de estrés mientras que vimentina se dispone formando una red intrincada en el citoplasma, como se observa en la Figura 1.14.

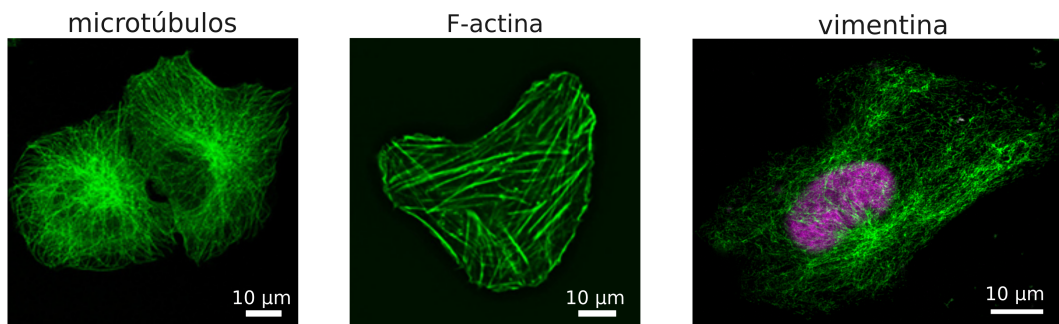


Figura 1.14: **Citoesqueleto de U2OS.** Se muestran en pseudo-color imágenes representativas de las distintas redes de filamentos del citoesqueleto en esta línea celular. Las imágenes de microtúbulos y F-actina tomadas de [150] y la imagen de vimentina de [131]

1.6. Hipótesis y organización de la Tesis

La hipótesis que sostiene nuestro trabajo es que la morfología y dinámica de las mitocondrias, comprendida no en términos de fusión-fisión, sino en un concepto más global de su movilidad y mecánica, está regulada por su interacción con el citoesqueleto. En esta tesis nos propusimos estudiar estos aspectos desde una perspectiva enfocada en las propiedades mecánicas de las mitocondrias.

En el Capítulo 2 describimos las metodologías experimentales y herramientas analíticas empleadas en nuestro estudio.

En el Capítulo 3, nos dedicaremos a describir y caracterizar el condrioma mitocondrial en melanocitos de *X. laevis*, a través del análisis de imágenes de microscopía confocal y Airyscan. Por un lado, exploraremos la distribución y orientación local de las mitocondrias en imágenes de célula entera. Por otro lado, también estudiaremos la dinámica de mitocondrias a nivel de organela individual utilizando una rutina de seguimiento (*tracking*). Esto nos permitirá estimar parámetros mecánicos de estas organelas, como su longitud de persistencia, y analizar sus formas. Para ello, desarrollaremos un algoritmo clasificador de formas.

En el Capítulo 4 nos concentraremos en develar el efecto del citoesqueleto en la dinámica mitocondrial. Realizando diferentes tratamientos, afectaremos selectivamente las distintas redes del citoesqueleto y evaluaremos el impacto sobre la organización mitocondrial, la morfología y las fluctuaciones de forma. El citoesqueleto regula la reología citoplasmática y transmite impulsos mecánicos a las mitocondrias a través de motores moleculares y *cross-linkers* [11, 67, 119]. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que estos tratamientos perjudicarían el confinamiento mitocondrial y la fluctuación mecánica, lo que nos permitiría explorar la interconexión/interacción (*crosstalk*) mecánica entre ellos.

También desarrollaremos una nueva metodología que permite determinar las fuerzas activas y pasivas ejercidas sobre las mitocondrias dentro de células vivas, descrita en el Capítulo 5.

Finalmente, en el Capítulo 6 abordaremos el estudio del transporte de mitocondrias dependiente de microtúbulos.

Nuestro estudio revela propiedades distintas de las interacciones mitocondria-citoesqueleto que podrían ser relevantes para comprender la relación entre la transmisión de señales mecánicas y la función mitocondrial. Utilizando las herramientas cuantitativas propuestas en este trabajo, nuestros resultados arrojan nueva luz sobre cómo las fuerzas ejercidas por el citoesqueleto modulan la dinámica mitocondrial. Creemos que este estudio presenta un nuevo enfoque para ampliar el conocimiento de cómo el impacto de las señales mecánicas se puede cuantificar a nivel de organela única.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Técnicas de laboratorio

2.1.1. Cultivo celular

Células melanóforas de *Xenopus laevis*

Empleamos la línea celular XTP, previamente descrita en la Sección 1.5.1, como modelo biológico para los estudios reportados en los Capítulos 3 a 5. Las células fueron cultivadas a 25°C en medio 70 % L-15 (Sigma-Aldrich) enriquecido con glutamina y suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Internegocios, S.A.) como se describe en [68]. Se agregó PTU (*phenylthiourea*) al medio completo para disminuir el número de melanosomas en las células [104], como se ilustra en la Figura 2.1.

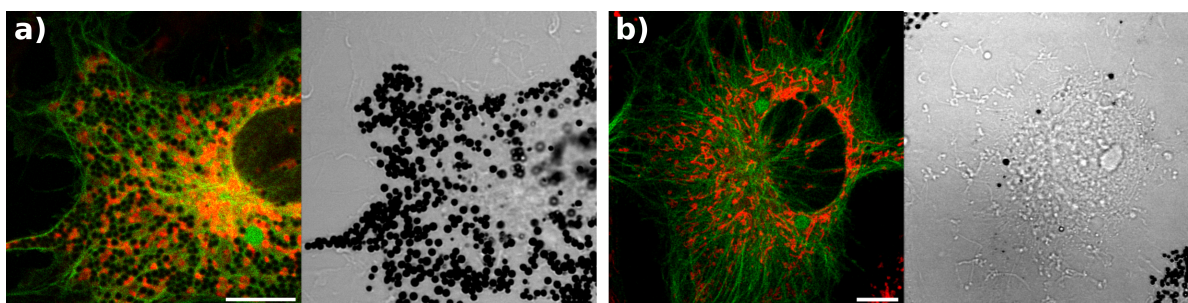


Figura 2.1: Imágenes representativas de melanocitos de *Xenopus laevis* cultivados en medio sin PTU (a) y con PTU (b). Los paneles de la izquierda corresponden a imágenes de microscopía confocal (en verde microtúbulos, en rojo mitocondrias), mientras que la derecha es una imagen de transmisión. Barra de escala = 10 μm . Las imágenes fueron adquiridas por la Dra. M. Cecilia De Rossi.

Células U2OS

Se utilizó la línea celular U2OS, previamente descrita en la Sección 1.5.2, como modelo biológico para los estudios reportados en el Capítulo 6 asociados a técnicas optogenéticas. Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera húmeda controlada con 5 % CO_2 en

medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado con NaHCO_3 , 10% suero fetal bovino inactivado (Internegocios S.A.) y 1% penicilina-estreptomocina (Gibco).

2.1.2. Transfecciones transientes

Las células fueron crecidas por 1 ó 2 días en cubreobjetos ($\text{N}^{\circ}1$) de 25 mm de diámetro, dispuestos en placas de cultivo de 35 mm, conteniendo 1 ml de medio completo. La transfección transiente de los plásmidos de interés se realizó empleando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras fueron observadas 24 hs después del protocolo de transfección.

A continuación se describen los plásmidos empleados para cada línea celular:

Para estudiar la dinámica de las mitocondrias en ausencia de los filamentos intermedios de vimentina, las células XTP fueron transfectadas con un plásmido que impide el autoensamblado de vimentina para formar el filamento [151]. Se empleó una construcción dominante negativa que contiene el dominio no helicoidal (residuos 1-102) y los primeros 36 aminoácidos del dominio altamente conservado α -hélice 1A de vimentina fusionado a la proteína roja fluorescente mCherry [mCherry-vim(1-138)]. Este plásmido fue generado a partir de GFP-vim(1-138) [118, 152], que fue generosamente proporcionado por el Dr. Vladimir I Gelfand (Northwestern University, Chicago, IL). Nos referiremos a esta condición como **VIM⁻** a lo largo de la Tesis.

Las células U2OS fueron co-transfectadas con CRY2-mCherry-Miro1TM (Addgene plásmido #102247) y Kif5-GFP-CIBN (Addgene plásmido #102252) o BICDN-GFP-CIBN (Addgene plásmido #102254). El plásmido CRY2-mCherry-Miro1TM expresa la fusión de CRY2PHR con mCherry y el dominio transmembrana de Miro1. Por su parte, Kif5-GFP-CIBN expresa la fusión de la cadena pesada de kinesina 5 (1-572) con GFP y CIB1 (1-170), mientras que GFP-BICDN-CIBN expresa la proteína adaptadora de dineína BICDN (1-594) fusionada a GFP y CIB1 (1-170). Bajo la luz azul, CRY2 interactúa con CIBN, dimerizándose, lo que resulta en el reclutamiento de los motores a las mitocondrias, como se explicó en la Sección 1.12 [80]. Estos plásmidos fueron gentilmente proporcionados por la Dra. Suliana Manley (LEB, EPFL, Suiza). Por otro lado, para visualizar la red de microtúbulos, las células U2OS fueron transfectadas con el plásmido EMTB-3xGFP [153], que codifica el dominio ensconsina que se une a microtúbulos, fusionado con 3 copias de GFP (Addgene plásmido #26741).

2.1.3. Preparación de muestras para microscopía

Para realizar las mediciones por microscopía, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro esterilizados, dispuestos en placas de cultivo de 35 mm, conteniendo 2.0 ml de medio completo, dos días previos al experimento. Previo a la observación, los cubreobjetos fueron montados en una cámara especialmente diseñada para el microscopio.

Las células fueron incubadas durante 5 minutos con 100 nM de la sonda fluorescente MitoTracker Deep Red FM (Invitrogen) para marcar las mitocondrias. Esta sonda difunde pasivamente a través de la membrana plasmática de las células y luego se acumula en el espacio intermembrana de las mitocondrias debido a su diferencia de potencial. Debido a que esta sonda contiene una fracción de clorometilo ligeramente reactiva al tiol, la marca no se

pierde aunque la mitocondria pierda su potencial de membrana, lo que permite observar las mitocondrias en diferentes estados celulares. [154]

Para alterar las distintas redes del citoesqueleto, las células fueron incubadas con las drogas que se detallan a continuación, previo a su observación por microscopía:

- Para depolimerizar la red de actina, las células fueron incubadas durante 30 minutos en medio sin suero conteniendo 10 nM latrunculina-B (Sigma-Aldrich). Esta droga secuestra los monómeros de actina impidiendo la polimerización y formación de filamentos [155]. Nos referiremos a esta condición como **LAT**.
- Para depolimerizar parcialmente la red de microtúbulos, las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos en medio de crecimiento conteniendo 16 μM nocodazol (Sigma-Aldrich), ver detalles en la Sección 2.3.3. El nocodazol se une a la β -tubulina e interrumpe la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de los microtúbulos [156]. Nos referiremos a esta condición como **NOC**.
- Para alterar la dinámica de los microtúbulos, las células fueron incubadas durante 30 minutos en medio conteniendo 10 nM sulfato de vinblastina (Sigma-Aldrich). A bajas concentraciones ($< 1 \mu\text{M}$), esta molécula se une a los extremos de los microtúbulos, inhibiendo su inestabilidad dinámica de polimerización y depolimerización, pero sin causar la depolimerización neta de estos filamentos. [157]. Nos referiremos a esta condición como **VINB**.

2.2. Microscopía

2.2.1. Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía confocal registradas para la línea celular XTP fueron adquiridas en un microscopio Olympus FV1000 (Olympus Inc., Japan). Para excitar las proteínas fluorescentes EGFP y mCh se emplearon un láser de argón multilíneas configurado en 488 nm, y un láser de 543 nm, respectivamente. Por otro lado, se utilizó un láser de diodo sólido de 635 nm para MitoTracker Deep Red FM.

La luz de los láseres fue reflejada por un espejo dicróico (DM 405/488/543/635) y enfocada en la muestra por medio de un objetivo de inmersión en aceite Olympus UPlanSApo 60X (NA: 1.35). La fluorescencia fue colectada por el mismo objetivo y separada en 2 canales configurados para detectar en el rango 505-525 nm (EGFP) y 650-750 nm (MitoTracker Deep Red FM), o 620-700 nm (mCherry). La fluorescencia fue detectada por un fotomultiplicador configurado en modo de conteo de fotones (*photon-count*). Las series temporales (*time-lapse*) fueron adquiridas a una velocidad entre 0.1 y 1.96 cuadros por segundo. El tamaño de píxel de las imágenes estuvo entre 0.055 y 0.276 μm .

Las imágenes de microscopía confocal registradas para la línea celular U2OS fueron adquiridas en un microscopio confocal Zeiss LSM980 (Carl Zeiss) equipado con un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63x (NA=1.43) y una cámara incubadora para mantener las células a 37°C y 5% CO₂. EGFP y MitoTracker Deep Red FM se excitaron con láseres de diodo sólido de 488 nm y 639 nm, respectivamente. Las series temporales fueron

adquiridas a una velocidad de 0.52 cuadros por segundo. El tamaño de píxel de las imágenes fue de 0.088 μm .

Las mediciones fueron realizadas empleando los equipos del Centro de Microscopía de Fluorescencia “Gregorio Weber” de esta casa de estudios (FCEyN-UBA).

2.2.2. Microscopía de Super-Resolución Airyscan

Las imágenes de super-resolución se adquirieron en un microscopio confocal Zeiss LSM980 (Carl Zeiss) equipado con el detector AiryScan 2 utilizando un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63x (NA = 1.4). EGFP y MitoTracker Deep Red FM se excitaron con láseres de diodo sólido de 488 nm y 639 nm, respectivamente. Las imágenes se adquirieron con un tamaño de píxel de 43 nm. Los archivos se deconvolucionaron utilizando la rutina de procesamiento estándar del *software* Zen. Las imágenes de las células U2OS fueron adquiridas utilizando los mismos parámetros y una cámara incubadora para mantener las células a 37°C y 5% CO₂.

Estas mediciones también fueron realizadas en el Centro de Microscopía de Fluorescencia “Gregorio Weber”.

2.2.3. Microscopía de iluminación estructurada instantánea (iSIM)

Para el registro de imágenes de células U2OS con iSIM, utilizamos un microscopio *custom-made* cuya descripción se detalla en [49] y [158]. El microscopio estaba equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 60x y NA = 1.49 (APONXOTIRF; Olympus), y láseres de 488 nm y 561 nm para excitar GFP y mCh, respectivamente. Las imágenes fueron registradas con una resolución temporal de 10-30 s para ambos canales. Las muestras fueron mantenidas a 37°C durante la adquisición de las imágenes.

Estas imágenes fueron adquiridas en el laboratorio de la Dra. Suliana Manley (EPFL, Suiza).

2.2.4. Técnicas optogénéticas

Utilizamos microscopía confocal (Zeiss LSM980) e iSIM para observar las mitocondrias en células U2OS transfectadas transientemente. En ambos casos, para inducir la dimerización del complejo CRY2-CIBN utilizamos como fuente de excitación un láser sólido de longitud de onda 488 nm, con un tiempo de exposición mayor a 200 ms y potencia entre 0.3 y 0.5 mW.

2.3. Imágenes de mitocondrias

Estudiamos mitocondrias individuales y elongadas, que pueden ser aproximadas por un filamento (largo \gg ancho). Se excluyeron de los análisis aquellas mitocondrias esféricas o pseudo-esféricas, donas y otras estructuras complejas y grandes que no son aproximables por un filamento.

Utilizamos el *software* ImageJ/Fiji [159] para procesar y analizar las imágenes. ImageJ es un *software* de dominio público para el procesamiento de imágenes científicas, y Fiji es una

distribución de ImageJ, que incluye numerosos complementos (*i.e. plug-ins*) que facilitan el análisis científico de imágenes.

2.3.1. *Tracking* de mitocondrias

Las imágenes de microscopía confocal de mitocondrias se analizaron mediante el complemento (*plug-in*) JFilament de ImageJ/Fiji [160]. Este *plug-in* permite segmentar y rastrear (*trackear*) filamentos en el tiempo a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia de forma semiautomática.

El método se basa en el estiramiento de contornos activos abiertos [161] que se deforman hasta adaptarse a los elementos lineales brillantes de la imagen. La novedad de este método está en usar curvas abiertas, lo que permite que los filamentos se estiren o achiquen de un cuadro a otro, además de trasladarse o deformarse. Esto es un requerimiento necesario, ya que se ha visto que las mitocondrias pueden cambiar de longitud al trasladarse [100].

Los usuarios pueden deformar, añadir y eliminar segmentos de las curvas de los filamentos segmentados, ya que se pueden visualizar junto con las imágenes. Las formas de las mitocondrias se inicializan manualmente; a continuación, el *plug-in* deforma estas curvas y genera un conjunto de coordenadas bidimensionales digitalizadas para cada cuadro de la película, obteniendo de esta manera una representación de la forma curvilínea de la organela en el tiempo. La Figura 2.2 muestra la interfaz del usuario del JFilament y un ejemplo de cómo se pasa de una forma inicial a la recuperada por el *software*, y algunos ejemplos de formas recuperadas. La distancia promedio entre dos puntos está relacionada con el tamaño de píxel de la imagen.

Cond.	imagen única			secuencia de imágenes		
	Nmito	Ncell	Nexp	Nmito	Ncell	Nexp
CTRL	196	40	4	98	33	3
NOC	154	11	2	49	10	2
LAT	198	35	4	49	18	4
VIM⁻	252	14	2	46	11	2
VINB	194	8	1	50	8	1

Tabla 2.1: Número de mitocondrias, células y experimentos por cada condición.

Segmentamos varias organelas por imagen, cuando fue posible, y tomamos imágenes de diferentes células en diferentes experimentos (excepto para el caso de vinblastina, donde sólo realizamos un experimento). La Tabla 2.1 muestra que hay un número menor de mitocondrias *trackeadas* en el tiempo. Esto se debe a que no todas las organelas seleccionadas para el análisis estático, *i.e.* de único cuadro, pudieron seguirse en el tiempo. Si bien el sistema utilizado es cuasi-bidimensional, algunas partes de las mitocondrias pueden irse de foco durante la película, o salirse del campo de visión de la imagen. Además, algunas organelas/células son más sensibles al fotoblanqueo (*photobleaching*), es decir, a la pérdida de fluorescencia debido

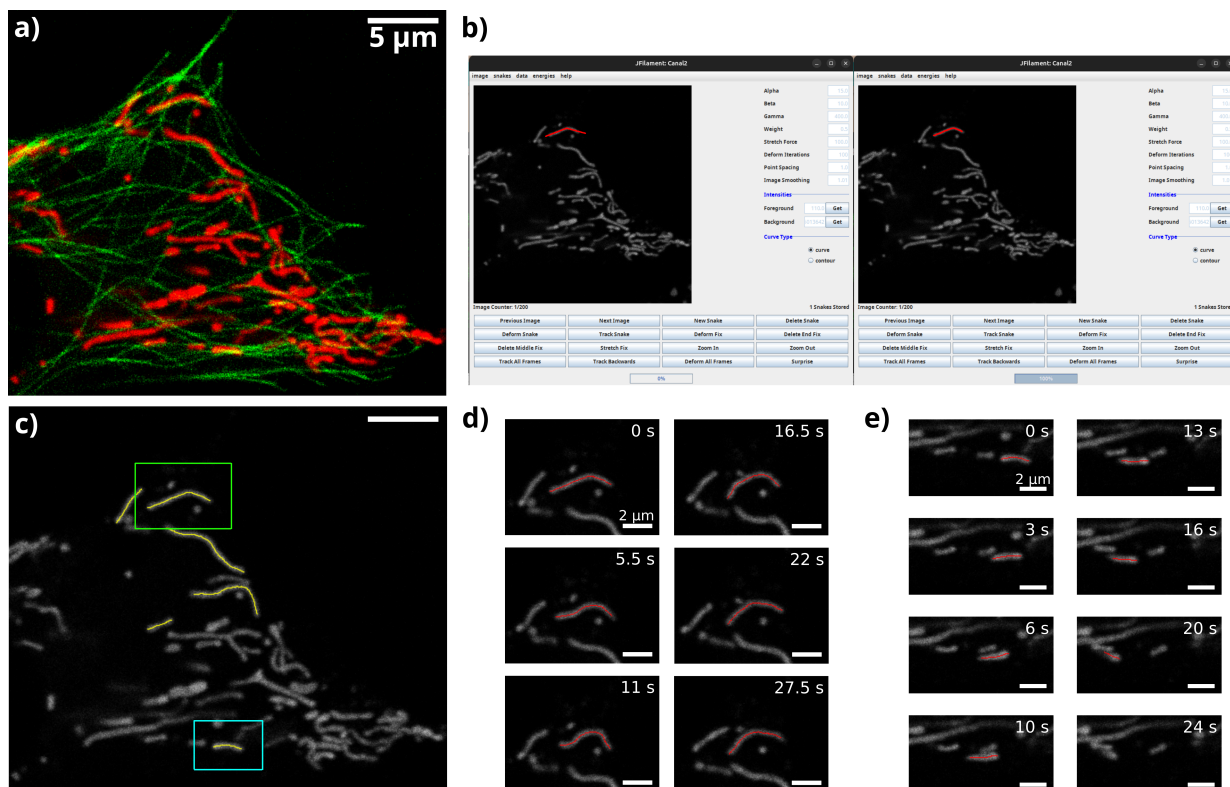


Figura 2.2: *Tracking* de mitocondrias con el *plug-in* JFilament de Fiji. (a) Imagen representativa de mitocondrias (rojo) y microtúbulos (verde) en melanocitos XTP registrada por microscopía confocal. (b) Interfaz de usuario del JFilament. Se puede inicializar el filamento con una forma aproximada (panel izquierda) y el *software* lo deforma hasta recuperar la forma de la organela (panel derecha). (c) Ejemplos de las formas de mitocondrias del panel (a) recuperadas con el JFilament. (d) *Tracking* temporal de una mitocondria deformándose. (e) *Tracking* de una organela moviéndose procesivamente, hasta encontrarse con otra mitocondria. En el último cuadro ya no es posible seguir *trackeando* a la organela, ya que se confunde con su vecina.

a la larga exposición a la excitación; esto hace que la señal se debilite y la mitocondria desaparezca de la imagen. Otro inconveniente es la interacción entre mitocondrias, y tiene una relación directa con las limitaciones del *software* utilizado: al entrar en contacto dos o más organelas, el programa se confunde y el filamento pasa de una a otra organela como si fueran una sola (ver Figura 2.2e). Por estas razones, sólo incluimos en los análisis de movimiento aquellas organelas que pudieran ser correctamente *trackeadas* por más de 50 cuadros seguidos de la película. El número máximo de imágenes de las películas fue de 200 cuadros.

2.3.2. Organización intracelular de mitocondrias: *Mitochondria Analyzer*

Debido a que la adquisición de las imágenes de Airyscan se hace de forma secuencial (primero el canal de mitocondrias y luego el de microtúbulos), no registramos películas con este microscopio, sólo imágenes. Aprovechando la alta resolución, adquirimos imágenes de célula entera para poder cuantificar/caracterizar la organización y distribución global de las mitocondrias.

Las imágenes de microscopía Airyscan se analizaron utilizando el *plug-in* de Fiji *Mitochondria Analyzer* [162]. Este *software* permite el análisis cuantitativo de la morfología mitocondrial mediante la umbralización (*thresholding*) adaptativa de la imagen para la correcta extracción de los “objetos mitocondriales” y el posterior análisis de la red mitocondrial.

Antes del análisis, las imágenes se preprocesaron manualmente. En primer lugar, las mismas se convirtieron a 8 bits y se creó una máscara de la célula para descartar las mitocondrias de las células vecinas. Dado que no contábamos con la imagen del canal de transmisión en estos experimentos, se utilizó el canal de microtúbulos, ya que esta red de filamentos resulta ser una buena plantilla para la estimación los límites de la célula, como se muestra en la Figura 2.3. Utilizando la imagen adquirida para microtúbulos como referencia, se realizó una máscara para delimitar el área celular utilizando el *software* Fiji. Se saturó el brillo del canal de microtúbulos y se hizo una selección a mano alzada de la región de interés (ROI) siguiendo los bordes de la célula. A continuación, se limpió el exterior de la célula en el canal de mitocondrias. También restamos un valor medio de intensidad de fondo a toda la imagen, calculado como el promedio de la intensidad media de fondo medida en cinco ROIs diferentes dentro de la célula.

A continuación, las imágenes de mitocondrias se binarizaron con el *plug-in* utilizando los parámetros predeterminados, excepto las opciones del método de umbralización local. Estos parámetros se determinaron para lograr un umbral óptimo en un conjunto representativo de imágenes de todas las condiciones. Las imágenes umbralizadas se compararon con las originales una a una para asegurar que el condrioma había sido capturado con precisión por la binarización, y aquellas que fallaron esta inspección fueron descartadas.

Aunque las imágenes fueron preprocesadas y los parámetros se eligieron para lograr un umbral óptimo, se observó que el algoritmo producía muchas mitocondrias pequeñas espurias. Por este motivo, se filtraron los objetos menores a $0.3 \mu\text{m}^2$, que corresponde aproximadamente al tamaño máximo de las organelas espurias.

Se analizaron entre 11 y 16 células para cada condición. Para cada imagen, se realizó un análisis *per-mito* y en *bulk*, y se extrajeron descriptores morfológicos individuales y de la red: área de la mitocondria (área mito) y bifurcaciones (*junctions*) por mitocondria (puntos

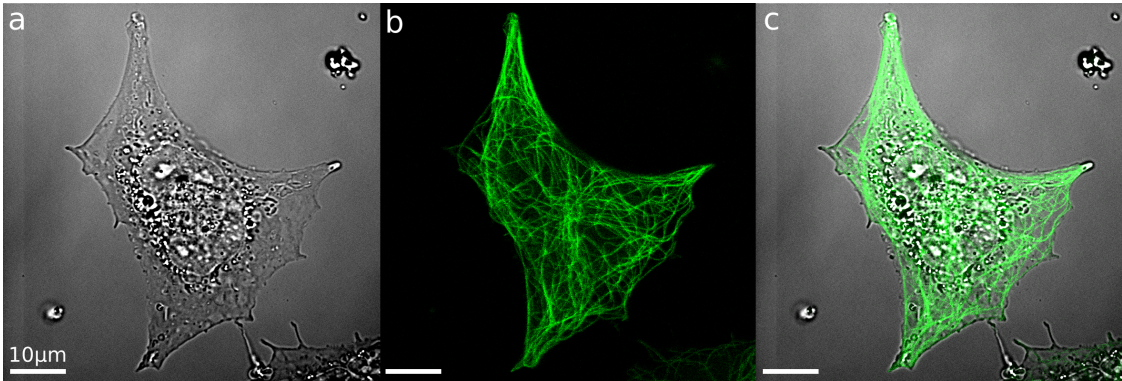


Figura 2.3: **Estimación del área de los melanocitos.** Imágenes representativas de transmisión (a) y confocal (b) de melanocitos de *X. laevis* que expresan EGFP-XTP (verde: microtúbulos). (c) Superposición de las imágenes (a) y (b) que demuestra que el área celular se correlaciona con la distribución de la red de microtúbulos.

donde se unen dos o más ramas de las mitocondrias), número de mitocondrias por célula (N) y ocupación mitocondrial por célula. Para calcular ésta última, primero estimamos el área celular explorada basándonos en la máscara hecha a partir de la red de microtúbulos. El área celular se determinó utilizando **Area Fraction** de la herramienta **Analyze** de Fiji y comparando esta magnitud con el tamaño de la imagen para obtener el área celular en micrómetros cuadrados. La ocupación mitocondrial se calculó dividiendo el área total de mitocondrias obtenida con **Mitochondria Analyzer** por el área celular.

2.3.3. Cuantificación de la depolimerización parcial de microtúbulos

Dado que los microtúbulos son esenciales para la distribución y el transporte de las mitocondrias [111, 163], se buscó afectar mínimamente esta red para capturar variaciones sutiles en la organización y movilidad de estas organelas. Por tanto, nuestro objetivo no fue alterar la red completa de microtúbulos, sino producir pequeñas perturbaciones en esta arquitectura. Para ello, utilizamos el protocolo descrito anteriormente y caracterizamos la red de microtúbulos antes y durante la utilización del nocodazol, registrando imágenes de Airyscan. La Figura 2.4 muestra un ejemplo representativo de la depolimerización parcial de la red de microtúbulos durante el tratamiento.

Para cuantificar el porcentaje de depolimerización de esta red de filamentos utilizamos el *plug-in* de Fiji **Mitochondria Analyzer** [162]. Utilizando el mismo procedimiento explicado en la sección anterior, obtuvimos el área total ocupada por los microtúbulos en la célula. Comparamos este parámetro en diferentes momentos durante la incubación con nocodazol y observamos la disminución del área en el tiempo (Tabla 2.2). Para confirmar que la disminución del área ocupada por los microtúbulos (proporcional a la intensidad total en la imagen binarizada) se debía a una reducción del número de filamentos inducida por el tratamiento y descartar que fuera causada por fenómenos de fotoblanqueo, verificamos que los valores de intensidad no cambiaran significativamente entre las imágenes.

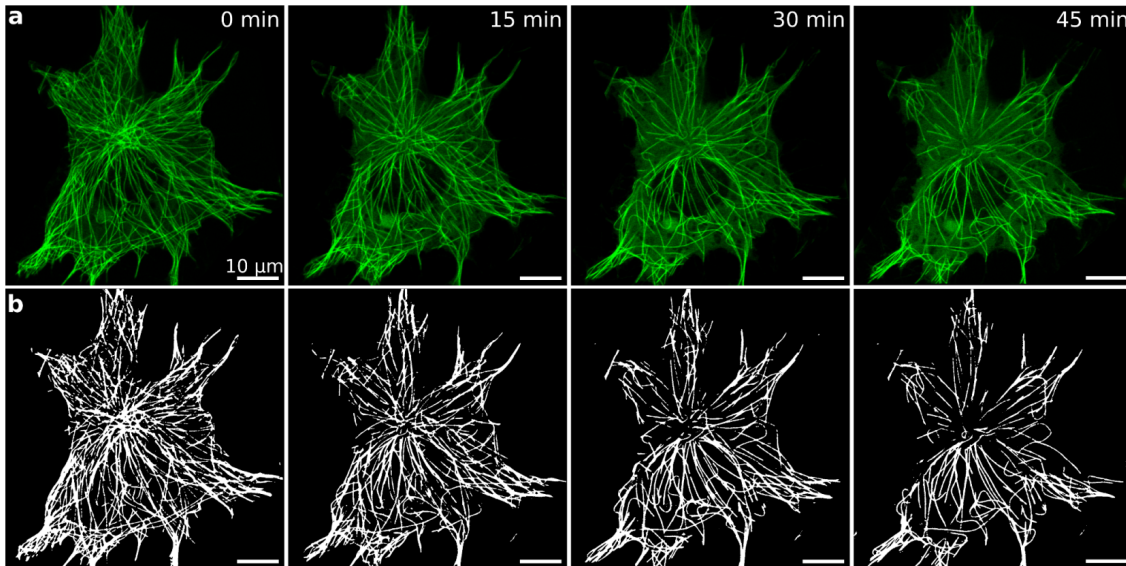


Figura 2.4: Depolimerización parcial de la red de microtúbulos durante el tratamiento con nocodazol. (a) Imagen representativa de un melanocito de *X. laevis* (verde: microtúbulos) adquirida por microscopía de super-resolución Airyscan, antes y durante la incubación con nocodazol. (b) Imágenes binarizadas de la red obtenidas con *Mitochondria Analyzer*.

Tiempo (min)	ocupación de MT del área celular (%)				
	célula 1	célula 2	célula 3	célula 4	célula 5
0	100	100	100	100	100
15	76	-	-	-	-
30	68	-	-	-	-
45	55	79	71	57	88

Tabla 2.2: Cuantificación del área celular ocupada por la red de microtúbulos (MT) durante el tratamiento con nocodazol.

2.3.4. Análisis del movimiento lateral coordinado de mitocondrias-microtúbulos

Para explorar si los movimientos de las mitocondrias y sus microtúbulos vecinos estaban coordinados, *trackeamos* simultáneamente el movimiento transversal de estas estructuras en imágenes confocales (VideoS1-Cap4) de acuerdo con el siguiente procedimiento. En primer lugar, se superpusieron las imágenes de los canales rojo (mitocondrias) y verde (microtúbulos) en Fiji y trazamos una línea transversal en una región que capturaba ambas estructuras (Fig. 2.5a). Utilizando el *plug-in* de Fiji KymographBuilder [164], recuperamos los perfiles de intensidad del curso temporal a lo largo de la línea seleccionada (es decir, el kimograma o *kymograph*, Fig. 2.5b), que luego se dividió en dos imágenes independientes. Cada uno de estos *kymographs* se analizó utilizando una rutina de *tracking custom-made* ([FERNET], [95]) que permitió recuperar las coordenadas centrales de la posición transversal de la mitocondria y los microtúbulos vecinos (puntos verdes en la Fig. 2.5c).

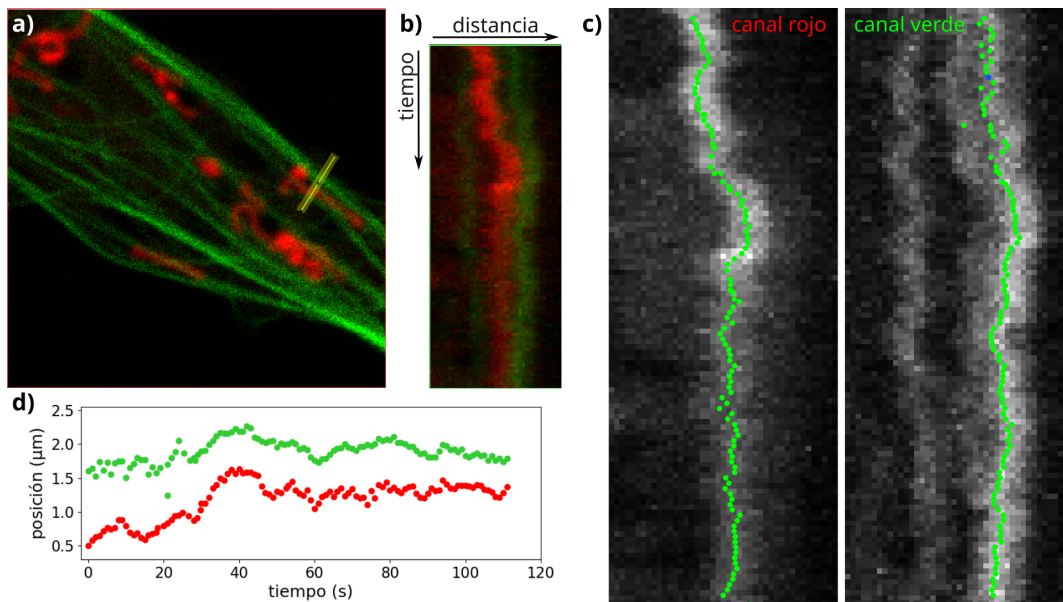


Figura 2.5: **Movimiento lateral coordinado de una mitocondria y un microtúbulo vecino.** (a) Imagen de un melanocito de *X. laevis* que muestra mitocondrias (rojo) y microtúbulos (verde). (b) Kimograma realizado para la línea amarilla marcada en (a) de ambos canales. (c) *Tracking* de cada kimograma por separado. (d) Trayectorias transversales recuperadas de los kimogramas que muestran el movimiento conjunto de ambas estructuras.

Finalmente, se obtuvieron las trayectorias que representaban su desplazamiento lateral y movimiento coordinado de ambas estructuras (Fig. 2.5d). Analizamos aleatoriamente regiones similares en diferentes películas y, en la mayoría de los casos, observamos un comportamiento similar.

2.4. Descomposición de la forma de una mitocondria en modos de Fourier

La forma de un filamento (o mitocondria), determinada por el ángulo tangente $\theta(s)$, se puede expresar mediante la superposición de modos de Fourier:

$$\theta(s) = \sum_{k=1}^N \theta_n(s) = \sqrt{\frac{2}{L}} \sum_{k=1}^N a_n \cos\left(\frac{n\pi}{L}s\right) \quad (2.1)$$

con a_n la amplitud del modo n ésimo, L la longitud del filamento, n el número de modos y N el total de modos utilizados para describir $\theta(s)$. Es importante mencionar que la elección de modos de función coseno es arbitraria y se obtienen resultados equivalentes usando funciones seno o la combinación de ambas.

Dado que la forma de las mitocondrias está descrita por un set discreto de coordenadas, es necesario usar la siguiente aproximación para calcular la amplitud de los modos a_n [93]:

$$a_n = \sqrt{\frac{2}{L}} \int_0^L ds \theta(s) \cos\left(\frac{n\pi}{L}s\right) \sim \sqrt{\frac{2}{L}} \sum_{k=1}^N \theta_k \Delta s_k \cos\left(\frac{n\pi}{L}s_k^{mid}\right) \quad (2.2)$$

con $s_k^{mid} = \sum_{j=1}^{k-1} \Delta s_j + \frac{1}{2} \Delta s_k$.

A modo de ejemplo, la Figura 2.6 muestra cómo se recupera la forma de dos mitocondrias con diferentes formas a través de la superposición de distinta cantidad de modos de Fourier. A medida que aumenta el número de modo (n), aumenta también la frecuencia asociada— o disminuye la longitud de onda. Para recrear formas más complejas, se necesitan frecuencias más altas y mayor cantidad de modos para poder hacerlo. La amplitud a_n nos dice cuánto contribuye ese modo en el desarrollo completo.

Encontramos que 5 modos fueron suficientes para recrear satisfactoriamente la forma de las mitocondrias estudiadas en esta Tesis.

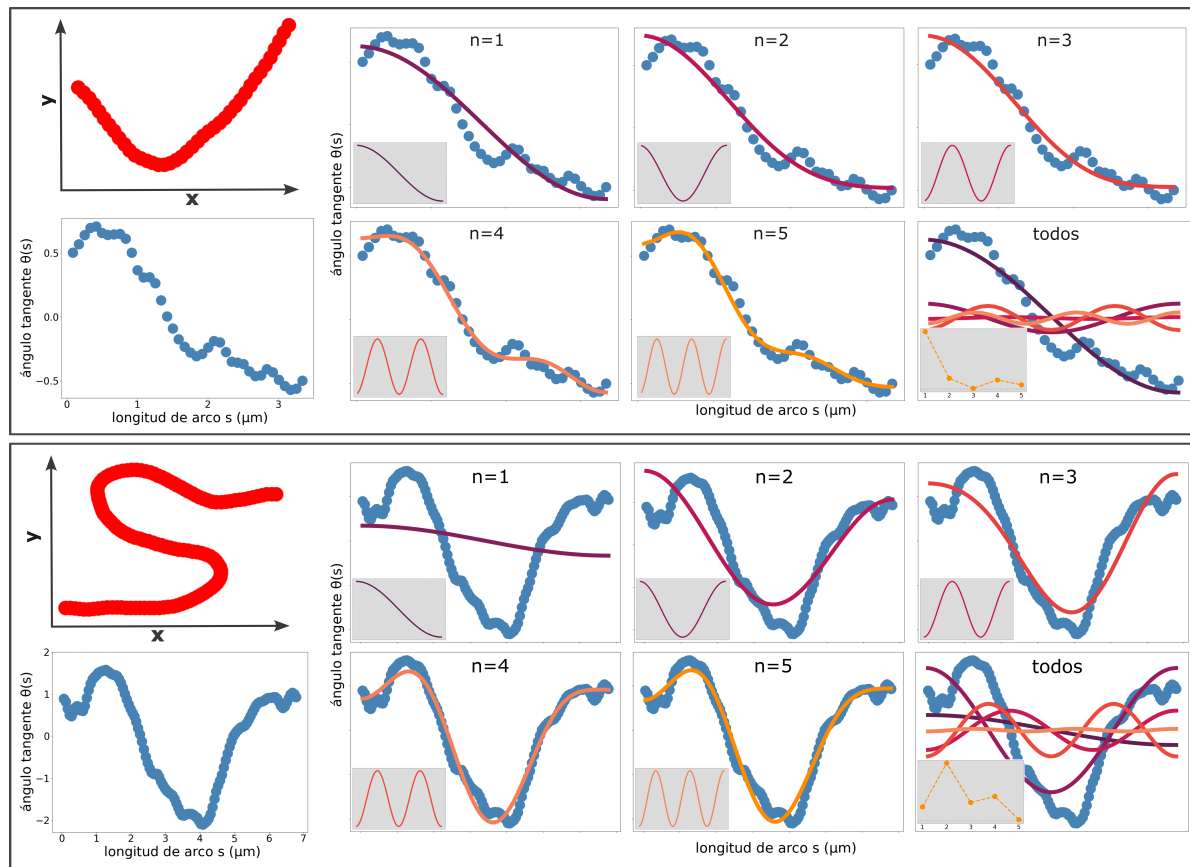


Figura 2.6: **Reconstrucción de la forma de una mitocondria con series de Fourier.** Dos ejemplos de formas de mitocondrias clasificadas como *smile-like* (panel superior) y *snake-like* (panel inferior). Se muestra la forma en sus coordenadas xy (izquierda arriba) y su transformación a coordenadas del filamento (izquierda abajo). A continuación se muestra la reconstrucción de esa curva con diferente número de modos de Fourier ($n=1, \dots, 5$). En cada gráfico hay un recuadro que muestra la forma de cada modo. En el último gráfico se muestran todos los modos de manera independiente, con su respectiva amplitud.

2.5. Análisis estadísticos

Dado que en la mayoría de los casos, los datos no seguían una distribución normal— sino más bien asimétrica con colas pesadas— utilizamos la **mediana** como estimador robusto de la media de la población. Los resultados se expresan como mediana \pm error estándar, cuando no se especifica lo contrario. El error estándar del estimador se calculó mediante el procedimiento *bootstrap* no paramétrico [165].

En los casos donde utilizamos la media para estimar la población, recurrimos a una prueba ANOVA unidireccional (*one-way*) [166] para comparar diferentes grupos.

En todos los casos, los conjuntos de datos se consideraron significativamente diferentes cuando $P < 0.05$. Los asteriscos en las figuras y tablas representan estas diferencias significativas entre los distintos tratamientos y la condición control.

El análisis estadístico, el ajuste de curvas y los gráficos se realizaron principalmente utili-

zando las librerías de Python, excepto que se indique lo contrario. En los ajustes utilizamos un método de cuadrados mínimos no lineales.

2.5.1. Procedimiento de *bootstrap*

El *bootstrap* no paramétrico es un método computacional que aproxima la población mediante un muestreo aleatorio (con sustitución) de los datos observados para obtener nuevas muestras del mismo tamaño.

Para cada “nueva” muestra se calcula el valor del estimador deseado, por ejemplo la mediana, y así se genera una distribución de muestreo *bootstrap* del estimador [165]. Luego se calcula la varianza σ^2 de la distribución para obtener el error estándar. Se usaron 1000 repeticiones de *bootstrap* con reposición en los análisis.

2.5.2. Test estadístico para la comparación de medianas

Para evaluar si las medianas de dos grupos diferentes son significativamente distintas entre sí, utilizamos un test de hipótesis hecho a medida (*custom-made*) [143]. Los P-valores se obtienen de la siguiente manera:

$$P\text{-value} = 2 \left[1 - F \left(\frac{|\text{med}(g_1) - \text{med}(g_2)|}{\sqrt{\sigma^2(g_1) + \sigma^2(g_2)}} \right) \right] \quad (2.3)$$

donde F es la distribución normal estándar y g_1 y g_2 representan los grupos de datos. Los grupos de datos se consideraron significativamente diferentes cuando $P < 0.05$.

2.5.3. Modelo de Mezcla de Gaussianas (GMM)

El modelo de mezcla de gaussianas (o GMM por sus siglas en inglés) [167] considera que los datos provienen de una combinación de muestras obtenidas a partir de K distribuciones normales con media ν_k ($k = 1, \dots, K$). La distribución multimodal $f(\nu)$ se expresa entonces como

$$f_\nu = \sum_{k=1}^K p_k \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\nu - \nu_k}{\sigma} \right)^2} \quad (2.4)$$

donde p_k ($k = 1, \dots, K$) representa el tamaño relativo de la subpoblación k con

$$\sum_{k=1}^K p_k = 1 \quad (2.5)$$

El centro ν_k de cada sub-población, es decir, la moda, es un máximo local de la distribución de densidad. Los estimadores de máxima verosimilitud de los parámetros (ν_k , p_k , σ) se obtuvieron mediante `gmdistribution.fit` en MATLAB (Sección 4.3.1) o `sklearn.mixture` del paquete Scikit learn Mixture en Python [168] (Sección 5.2). El modelo se seleccionó siguiendo el criterio de información de Akaike [169]. Los errores de los parámetros se calcularon mediante un procedimiento *bootstrap*.

2.5.4. Estimación de densidad por núcleo (*kernel density estimation*)

Un gráfico de estimación de densidad por kernel (KDE, por sus siglas en inglés) es un método para visualizar la distribución de las observaciones en un conjunto de datos, análogo a un histograma. La KDE es un estimador no paramétrico de la función densidad de probabilidad de los datos [167]. Esta es una representación continua, mientras que un histograma es en forma discreta. Para ello, se selecciona un *kernel* (o núcleo) y una ventana en la cual se promedian las observaciones, esto quiere decir que, en cada punto, el estimador es la media de los núcleos centrados en los puntos de datos dada una ventana.

Utilizamos la función `kdeplot` de la librería `seaborn` de Python para representar la distribución de longitudes en la Figura 3.4.

Capítulo 3

Organización celular y caracterización morfológica de las mitocondrias

Las mitocondrias son capaces de experimentar diversos procesos que pueden modificar su morfología, tamaño y distribución, en respuesta a distintos estímulos, ya sean de naturaleza química o física.

Con el objetivo de comprender las propiedades biomecánicas de estas organelas, nos propusimos caracterizar su organización y explorar en detalle sus cambios morfológicos a nivel celular. Para ello, registramos imágenes confocales de las mitocondrias presentes en células melanóforas vivas de *Xenopus laevis*, que fueron analizadas desde una perspectiva biofísica. En particular, estimamos la longitud de persistencia aparente de estas organelas, cuantificando – por primera vez – la plasticidad de curvatura de las mitocondrias en su entorno celular. También desarrollamos un método automático para clasificar las formas de estas organelas basado en el análisis de la curvatura de la forma de contorno.

Los resultados obtenidos dieron lugar a una publicación en la revista *Journal of Physics: Condensed Matter*, 34(9), 094005 (2021)

3.1. Organización intracelular de las mitocondrias

Con el objetivo de estudiar la distribución y organización de las mitocondrias en la línea celular XTP, las células fueron incubadas con la sonda comercial MitoTracker DeepRed FM para marcar de forma fluorescente a las organelas (ver detalles en la sección 2.2). Posteriormente, registramos imágenes de las células empleando microscopía de super-resolución Airyscan, que permite obtener imágenes de las organelas con alta resolución espacial y, por ende, caracterizar a nivel estructural la red mitocondrial.

3.1.1. Características de la red mitocondrial

La Figura 3.1a muestra una imagen representativa de una célula melanófora XTP donde pueden verse las características de las mitocondrias en esta línea celular. Las organelas se presentan como entidades individuales distribuidas en el citoplasma, sin formar una red interconectada como ocurre en otros modelos celulares. De todas formas, hablamos de una «red

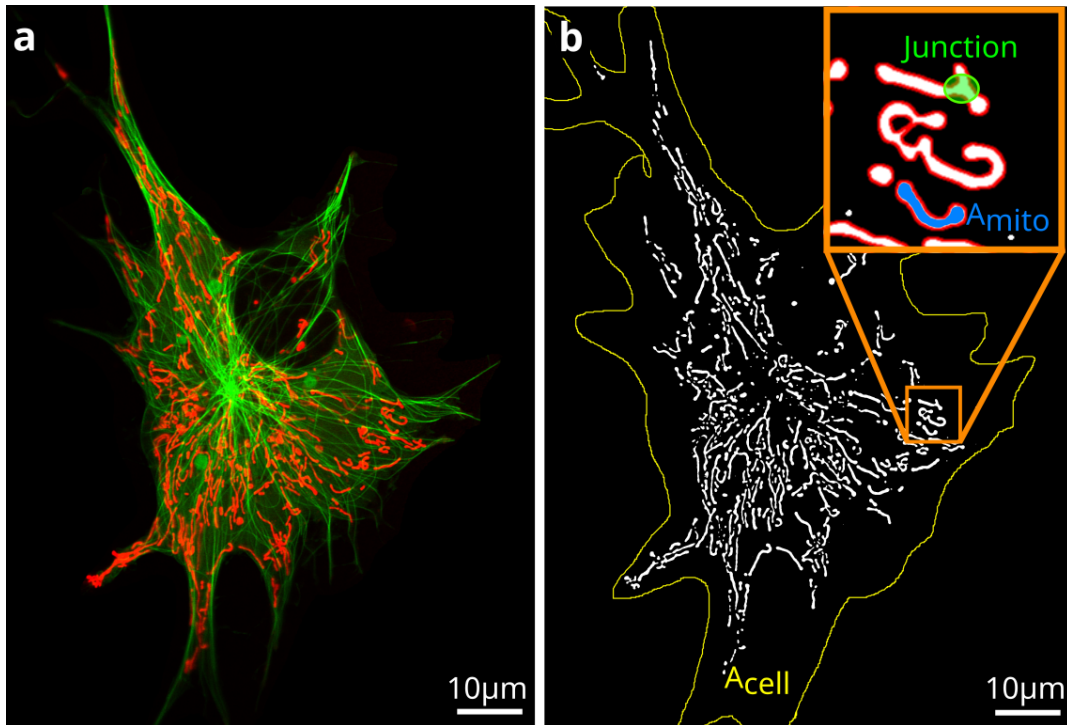


Figura 3.1: **Organización de las mitocondrias en células XTP** (a) Imagen representativa de un melanocito de *X. laevis* que expresa EGFP-XTP (verde: microtúbulos) e incubado con MitoTracker Deep Red FM (rojo: mitocondrias), registrada por microscopía de super-resolución Airyscan. (b) Imagen binarizada de la red de mitocondrias obtenida para la célula mostrada en (a). La línea amarilla indica el contorno celular estimado como se describe en la Sección 2.3.2. El recuadro muestra ejemplos de los parámetros geométricos analizados. Imagen adaptada de [170]

mitocondrial», ya que estas organelas interactúan entre sí y pueden fisionarse o fusionarse dinámicamente, como se detalló en la Sección 1.2.

Como punto de partida en nuestro estudio, decidimos cuantificar parámetros estructurales de la red mitocondrial. Para ello, utilizamos el *plug-in* de Fiji *Mitochondria Analyzer* [162] y determinamos el número, el área (Amito) y las bifurcaciones (*junctions*) de las mitocondrias, así como el porcentaje de ocupación mitocondrial. Estos parámetros se ilustran en la Figura 3.1b. y se describen en más detalle en la Sección 2.3.2.

El número medio de mitocondrias por célula resultó de 170 ± 40 ($N_{cel}=15$), que se encuentra dentro del rango de los valores reportados para otros sistemas celulares [171]. Cada organela ocupa un área de $0.72 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ y, en conjunto, el área total de las mitocondrias ocupa un $8.1 \pm 0.6\%$ del área celular.

También determinamos el número medio de bifurcaciones por organela, que aporta una medida de cuán interconectada está la red mitocondrial. En nuestro caso, este número fue 0.1 ± 0.4 , indicando que 9 de cada 10 mitocondrias adoptan formas “simples” (*i.e.* no ramificadas).

3.1.2. Orientación local de las mitocondrias

Las mitocondrias son principalmente transportadas por motores moleculares dependientes de microtúbulos, como se describió en la Sección 1.2.2. Por este motivo, esta red de filamentos jugaría un rol clave en la distribución y organización de estas organelas en el citoplasma. Para explorar esta hipótesis, calculamos las orientaciones locales de mitocondrias y de microtúbulos en las imágenes de super-resolución Airyscan, y comparamos ambas magnitudes. En otras palabras, queremos estudiar si las mitocondrias y los microtúbulos están coalineados.

El análisis de la orientación mitocondria-microtúbulo se realizó utilizando regiones de interés (ROIs) de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, como las que se muestran en la Figura 3.2a. En primer lugar, se sincronizaron las imágenes de mitocondrias y microtúbulos para la selección de ROIs. Se evitó la exploración en zonas que incluían las proyecciones celulares muy delgadas, ya que presentan una dirección predominante que sesgaría los resultados. Los ángulos de orientación de las mitocondrias y los microtúbulos en la misma ROI se obtuvieron con la herramienta *Directionality* de Fiji [172].

Analizamos entre 3 y 12 ROIs por célula ($N_{cel} = 9$). Las imágenes de mitocondrias y microtúbulos se analizaron independientemente para calcular el ángulo de orientación local (flechas de los recuadros en Figura 3.2a) dentro de la misma región subcelular. Luego, graficamos los ángulos de orientación de los microtúbulos *vs* los de las mitocondrias, y los datos experimentales se compararon con una recta de pendiente igual a 1 e intersección 0 (identidad). El error cuadrático medio raíz (RMSE) se utilizó para cuantificar la dispersión de los datos a partir de la identidad y, por lo tanto, representa una estimación de las diferencias en la orientación local de las organelas y los microtúbulos.

Tal como muestra la Figura 3.2b, encontramos una fuerte correlación entre la direccionalidad de los microtúbulos y las mitocondrias: los datos se alinean a lo largo de la identidad con una baja dispersión (RMSE: 8.95°). Esto indica que la organización de las mitocondrias en las células depende en gran parte de su interacción con los microtúbulos.

Esta interacción también se evidencia al estudiar la dinámica conjunta de ambas estructuras. Cuando analizamos simultáneamente el movimiento transversal de mitocondrias y microtúbulos vecinos, como se describe en Materiales y Métodos (Sección 2.3.4), encontramos una fuerte correlación en su movimiento lateral (ver Figura 2.5), lo que sugiere la presencia de un estrecho contacto mecánico entre ambos.

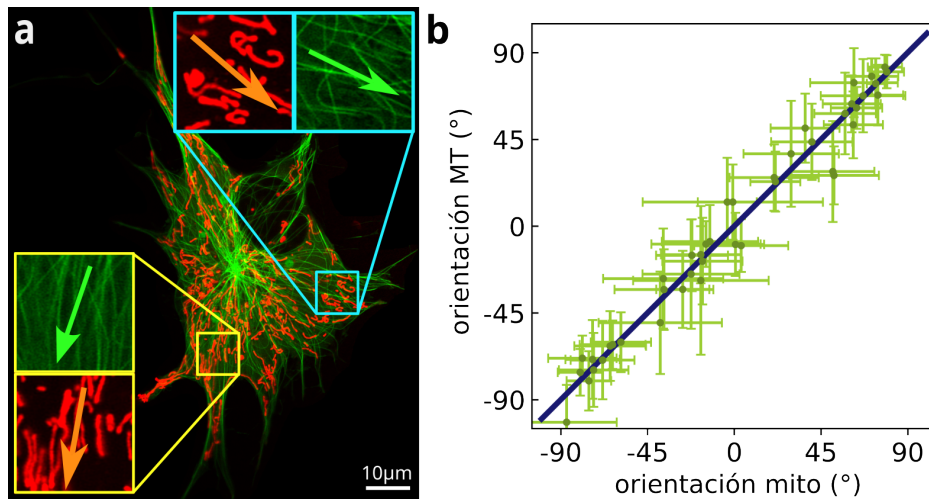


Figura 3.2: **Orientación local de las mitocondrias.** (a) Imagen representativa de un melancito de *X. laevis* que muestra la organización de las mitocondrias (rojo) y los microtúbulos (verde), registrada por microscopía de super-resolución Airyscan. Los recuadros muestran la orientación local de ambas estructuras en diferentes zonas celulares, esquematizada con flechas. (b) Análisis de la orientación de mitocondrias (mito) y microtúbulos (MT). Imagen adaptada de [170].

3.2. Análisis morfológico de mitocondrias individuales

En la sección anterior mostramos que las mitocondrias en este sistema celular son organelas individuales, con formas elongadas y simples –sin ramificaciones–, similares a filamentos. Además, su ancho es mucho menor que su longitud (como se verá en la Sección 3.2.2). Esto nos permite estudiar a las mitocondrias y caracterizarlas bajo la aproximación de filamentos semiflexibles, lo que facilita su descripción física.

Para estudiar estas organelas de forma individual, tomamos imágenes de microscopía confocal y utilizamos el *plug-in* JFilament [160] de Fiji para recuperar el eje central o curva media de las imágenes de las mitocondrias, a la que llamaremos simplemente “forma”, como se explica en la Sección 2.3.1. La Figura 3.3a-b muestra un ejemplo de una imagen confocal donde se ven varias mitocondrias y sus respectivas formas recuperadas.

3.2.1. Coordenadas cartesianas e intrínsecas de las formas de las mitocondrias

El *plug-in* de Fiji devuelve las coordenadas cartesianas de las formas de cada mitocondria analizada. Para facilitar los análisis posteriores, transformamos el conjunto de las coordenadas cartesianas $\{x_k, y_k\}$, a las coordenadas intrínsecas del filamento: s -longitud de arco- y θ -ángulo tangencial- según la ecuación 3.1:

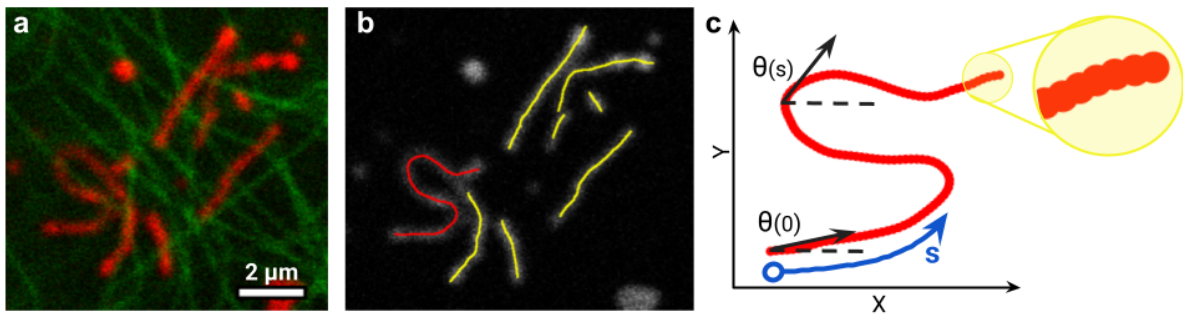


Figura 3.3: **Recuperación de las formas de mitocondrias filamentosas.** **a)** Imagen representativa de un melanocito de *X. laevis* que muestra mitocondrias (rojo) filamentosas, registrada por microscopía confocal. **b)** Formas de las organelas mostradas en (a) recuperadas con JFilament [160]. **c)** Esquema de las coordenadas intrínsecas de la mitocondria marcada en rojo en (b): s es la longitud de arco, y $\theta(s)$, el ángulo tangente a las curvas. La magnificación ilustra que se trata de un conjunto discreto de puntos para el filamento. Imagen adaptada de [173].

$$s_{k+1} = s_k + \Delta s_k, \quad \Delta s_k = \sqrt{(x_{k+1} - x_k)^2 + (y_{k+1} - y_k)^2}$$

$$\theta_k = \tan^{-1} \left(\frac{y_{k+1} - y_k}{x_{k+1} - x_k} \right),$$
(3.1)

con $k = 1..N$, donde N es el número de coordenadas discretas. Δs_k es típicamente del orden del tamaño de píxel. Esta metodología recupera satisfactoriamente la forma de mitocondrias elongadas, como se muestra en la Figura 3.3c y permite realizar los análisis cuantitativos de las formas que se describen en el resto del capítulo.

3.2.2. Longitud y ancho de las mitocondrias

La longitud de la mitocondria, L , puede obtenerse simplemente integrando (sumando) la longitud del arco s (ecuación 3.1):

$$L = \sum_{k=1}^N \Delta s_k$$
(3.2)

En la Figura 3.4 mostramos la distribución de longitudes de 196 mitocondrias analizadas. Observamos una variación entre 0.3 y 12 μm de longitud, con un mayor número de organelas entre 1 y 4 μm . La mediana de la longitud obtenida fue de $2.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$.

También determinamos el ancho de las mitocondrias en imágenes tanto de Airyscan ($N_{mito}=21$), como de microscopía confocal ($N_{mito}=17$). Para ello, ajustamos una función gaussiana al perfil de intensidad transversal de organelas individuales, utilizando la herramienta `Plot Profile` de Fiji. El ancho se calculó como 2σ . Obtuvimos valores medios similares para ambos tipos de imágenes: $328 \pm 52 \text{ nm}$ y $318 \pm 53 \text{ nm}$ para Airyscan o imágenes confocales, respectivamente.

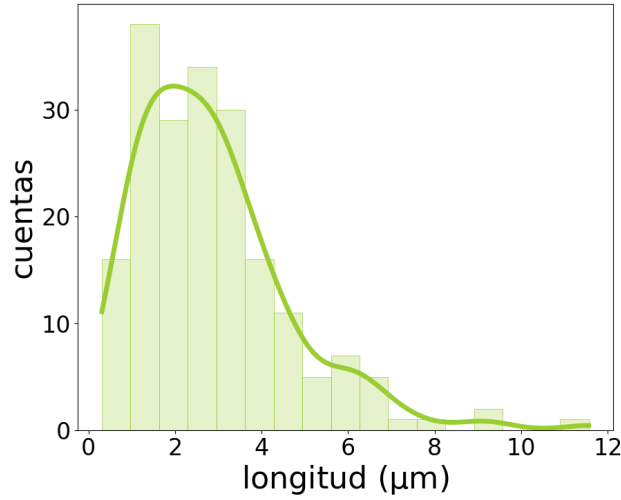


Figura 3.4: **Distribución de la longitud de las mitocondrias.** La línea sobre el histograma representa la estimación de la densidad no paramétrica (*kernel density*) renormalizada.

Este resultado, que muestra que la longitud mediana es unas 8 veces mayor que el ancho, confirma la hipótesis de que la mayoría de las mitocondrias en los melanocitos de *X. laevis* pueden ser modeladas como filamentos y, en particular, nos permitirá aplicar la teoría de filamentos semiflexibles a su estudio.

3.2.3. Determinación de la longitud de persistencia aparente

Uno de los objetivos de esta Tesis es determinar las propiedades mecánicas de las mitocondrias. Dada la compleja estructura interna de estas organelas, mencionada en la Sección 1.1, es difícil obtener mediciones directas, especialmente en el contexto celular.

Un parámetro que se utiliza habitualmente para caracterizar la flexibilidad de un filamento es la longitud de persistencia (L_p). Intuitivamente, esta magnitud se entiende como la longitud en la que la energía térmica, $k_B T$, es suficiente para doblar y torcer el filamento (*i.e.* la energía térmica supera la rigidez del mismo) [174]. Esto puede expresarse como en la ecuación 3.3:

$$L_p = \frac{\kappa}{k_B T} \quad (3.3)$$

donde κ es la rigidez flexural del filamento, k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura del medio.

La rigidez flexural de un filamento remite a la constante de proporcionalidad que hay entre el torque/fuerza aplicado a una barra y su curvatura. Es decir, esta magnitud nos dice qué tan fácil es doblar o curvar un filamento aplicándole una cierta fuerza [63].

La Figura 3.5 ilustra cómo la relación entre la escala de observación (en este caso la longitud del filamento, L) y la longitud de persistencia (L_p) define si el filamento se comporta como una barra rígida, semiflexible o entrópica [174]:

- Si $L_p/L \ll 1$, la energía térmica es suficiente para flexionar al filamento sustancialmente, generando una forma enredada, como una cadena flexible, donde predomina la elasticidad entrópica.

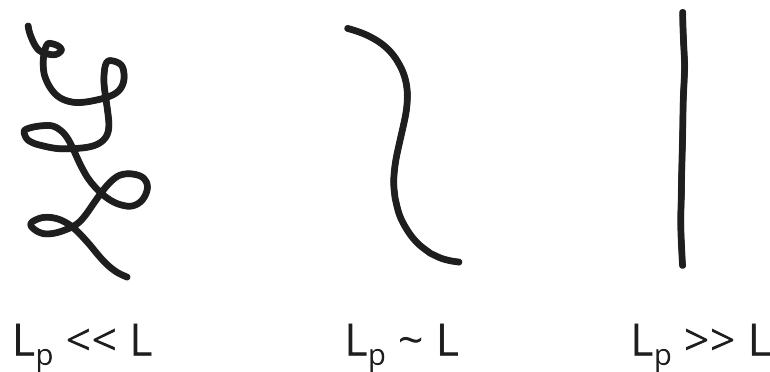


Figura 3.5: **Esquema representativo de la longitud de persistencia.** La forma de un filamento depende de la longitud del filamento (L) y la longitud de persistencia (L_p), o bien entre su rigidez flexural y la energía térmica.

- Para $L_p/L \sim 1$ se define el régimen de semi-flexibilidad. En este caso, la energía térmica es suficiente para producir deformaciones de baja longitud de onda, es decir que el filamento se mantiene relativamente recto, pero con algunas ondulaciones transversales.
- Si $L_p/L \gg 1$, las fuerzas térmicas no son capaces de deformar significativamente al filamento, dejándolo en una conformación de barra rígida.

Esta magnitud se ha utilizado ampliamente para identificar las propiedades mecánicas de biopolímeros como el ADN y los filamentos del citoesqueleto tanto *in vitro* [93, 175] como en células vivas [94, 95, 176, 177]. Recientemente, Perkins *et al.* [178] han ampliado este enfoque para determinar la longitud de persistencia de los túbulos del retículo endoplásmico con el fin de obtener una medida de la flexibilidad de estas estructuras en su entorno celular.

Formalmente, la longitud de persistencia define la distancia a lo largo del filamento a partir de la cual se pierden las correlaciones angulares en la dirección tangencial [63]. En dos dimensiones, el promedio del coseno de $\theta(s) - \theta(s_0)$ decae exponencialmente a medida que s aumenta. Entonces la L_p también se puede determinar directamente de la forma de los filamentos de la siguiente manera:

$$\langle \cos(\theta(s) - \theta(0)) \rangle = A e^{-\frac{(s-s_0)}{2L_p}} \quad (3.4)$$

donde los corchetes ($\langle \rangle$) representan un promedio de ensamble.

Dado que hipotetizamos que la forma que adopta una organela es una medida indirecta de la interacción mecánica que tiene la misma con otros componentes celulares, llamaremos longitud de persistencia aparente (L_p^*) a la magnitud estimada para las mitocondrias a partir de estos análisis. La ecuación 3.4 proporciona una manera de estimar esta magnitud a partir de su forma curvilínea.

El parámetro s_0 es una distancia de base que tiene en cuenta el grosor de la organela y A representa una corrección de la correlación máxima en $s = s_0$. Para longitudes menores a s_0 – longitud del mismo orden que el ancho –, no es válida la aproximación de la forma de la mitocondria a un filamento. Dado que las mitocondrias tienen un diámetro $\sim 0.3 \mu\text{m}$, en los análisis consideraremos $s_0 = 1 \mu\text{m}$ para asegurarnos de estar más allá del umbral de deformación.

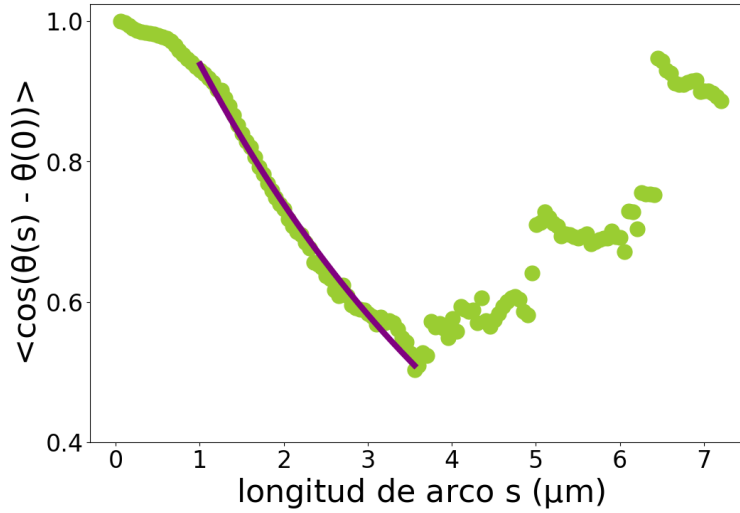


Figura 3.6: **Determinación de la longitud de persistencia aparente de mitocondrias.** Círculos: promedio del ensamble de la correlación del ángulo tangente. Línea continua: Ajuste de los datos experimentales con la ecuación 3.4.

La Figura 3.6 muestra el ajuste de la ecuación 3.4 a un conjunto de 196 mitocondrias. A partir de $s \simeq 4 \mu\text{m}$, el número de mitocondrias empieza a disminuir drásticamente (ver Figura 3.4), y la variabilidad entre organelas tiene un peso mayor en el promedio, *i.e.* el error estándar del promedio aumenta, por lo que se descartaron estos datos para el ajuste.

Mediante un ajuste no lineal por cuadrados mínimos de la ecuación 3.3, con datos entre $1 < s < 3.5 \mu\text{m}$ por lo expuesto anteriormente, obtuvimos una longitud de persistencia aparente $L_p^* = 2.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$. Este valor es comparable a las longitudes típicas de las mitocondrias, por lo que podemos concluir que estas organelas se comportan como filamentos semi-flexibles en el entorno celular.

3.2.4. Clasificación de las formas de las mitocondrias

En nuestro modelo celular, las mitocondrias simples (sin bifurcaciones ni lazos) exhiben gran variedad de formas, siendo posible agruparlas de acuerdo a su grado de deformación. De manera arbitraria, diferenciamos 3 grandes grupos de mitocondrias de acuerdo a sus características morfológicas:

- ***rod-like***: similares a forma de varilla – de curvatura casi nula
- ***smile-like***: similares a forma de sonrisa – con una leve curvatura
- ***snake-like***: similares a forma de serpiente – curvatura mayor y más deformaciones

Estas formas se pueden caracterizar cuantitativamente mediante diferentes métodos. Por ejemplo, para determinar si una mitocondria tiene forma *rod-like*, se puede usar una regresión lineal en sus coordenadas cartesianas, ya que no presentan casi curvatura. Por otro lado, las organelas que pertenecen al segundo grupo (*smile-like*) sí presentan curvatura, similar a una

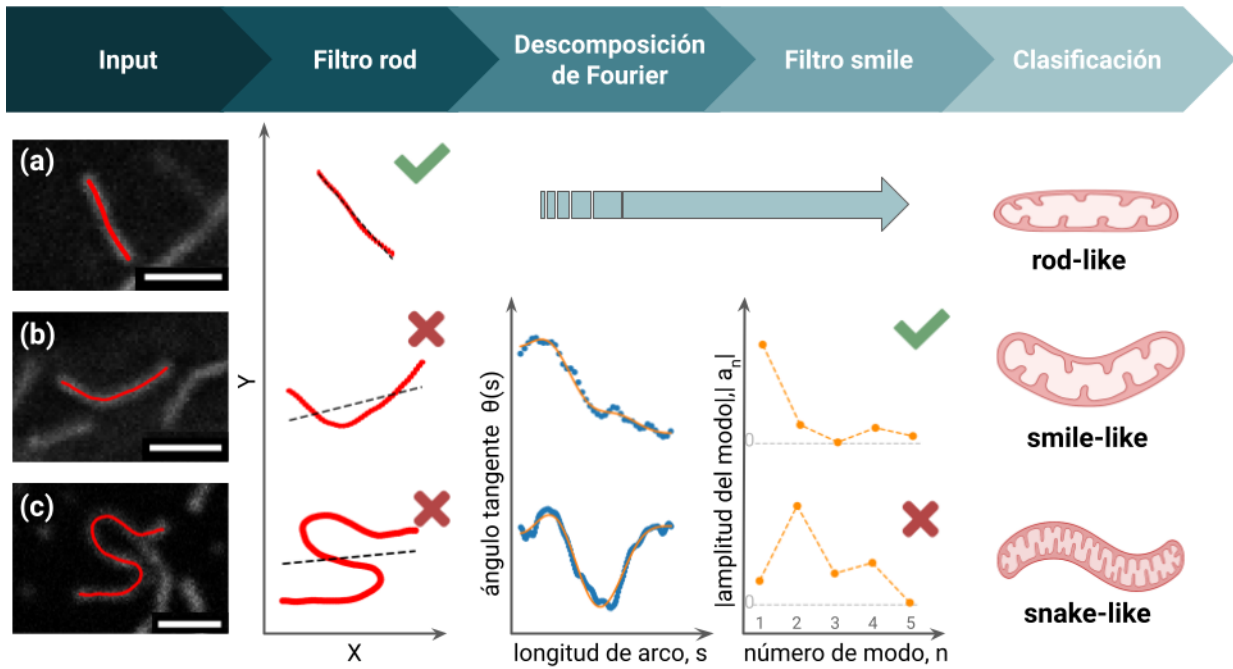


Figura 3.7: **Esquema del proceso de clasificación de formas.** (a), (b) y (c) son ejemplos claros de mitocondrias para cada categoría. (a) Las mitocondrias rectas tendrán un ajuste lineal satisfactorio y se clasificarán como *rod-like*. (b) Si la mitocondria tiene una ligera curvatura, no pasará el filtro rod y se realizará una descomposición de Fourier de $\theta(s)$. En estos casos, el primer modo es dominante sobre el resto y la mitocondria se clasifica como *smile-like*. (c) En caso contrario, se clasifica como *snake-like*. Barra de escala = $2 \mu\text{m}$. Imagen adaptada de [173]

parábola o un semi-coseno. Sin embargo, las mitocondrias pueden tener cualquier orientación, por lo que no siempre es posible ajustarlas por una función. Lo mismo ocurre para el tercer grupo. Una manera de superar estas dificultades es utilizar la descomposición de Fourier de $\theta(s)$ (ver detalles en Sección 2.4). Analizando la contribución de los distintos modos, observamos que la forma *smile-like* se caracteriza por una contribución mayor del primer modo (a_1), mientras que en las formas más tortuosas (*snake-like*) son otros modos de mayor frecuencia los que más contribuyen al desarrollo de Fourier.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, y con el objetivo de agilizar el estudio de estas tres poblaciones de mitocondrias, desarrollamos un algoritmo automático que nos permitió clasificar a las organelas según su forma. La Figura 3.7 muestra ejemplos representativos de cada categoría y una esquematización de las iteraciones del proceso que se detalla a continuación.

El clasificador consta de 4 pasos. En primer lugar, se determina si la mitocondria es (o no) recta como una varilla aplicando una regresión lineal a la forma de la organela en las coordenadas cartesianas. Si la desviación estándar de los residuos es inferior a 0.1, el ajuste se considera exitoso y la mitocondria se clasifica como *rod-like*. Este paso se denomina filtro de varilla (*filtro rod*). Por el contrario, si la forma no es recta, el ajuste será inadecuado y no superará dicho filtro, pasando a la siguiente instancia del clasificador.

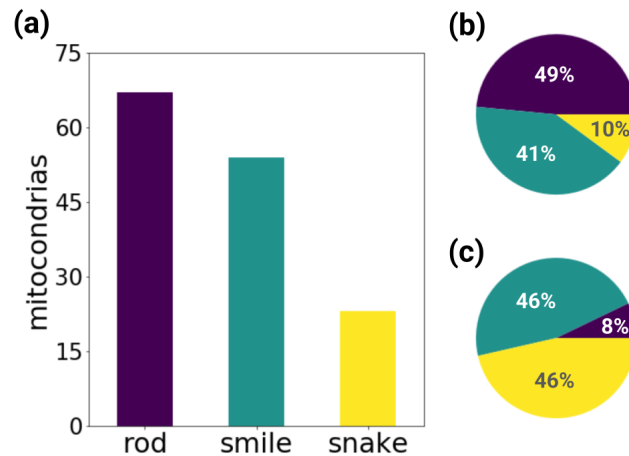


Figura 3.8: **Distribución de las formas de las mitocondrias.** (a) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de población correspondiente a cada categoría. (b-c) Variación de la fracción de poblaciones de forma según la longitud de las mitocondrias, L : (b) $1 \mu\text{m} \leq L \leq 4 \mu\text{m}$; (c) $L \geq 4 \mu\text{m}$. Imagen adaptada de [173]

En este segundo paso, pretendemos discernir si la forma de la mitocondria se aproxima a una sonrisa (*smile-like*). Para ello, se procede a descomponer la forma curvilínea en modos de Fourier y ver cuál de ellos tiene la mayor contribución.

En la Figura 3.7, se observa que la forma de $\theta(s)$ se puede recrear satisfactoriamente con cinco modos ($N=5$) (línea sólida naranja). Entonces, comparamos las amplitudes absolutas de esos cinco primeros modos de Fourier. Si el valor máximo corresponde al primer modo, la mitocondria se clasifica como *smile-like*, ya que esto significa que el primer modo – correspondiente a la forma de un coseno simple o parábola – es el que tiene mayor relevancia. Esto se denomina filtro de sonrisa (*filtro smile*). En cualquier otro caso, la organela se clasifica como *snake-like*.

Este algoritmo resultó ser robusto para diferenciar estos tres tipos de formas de mitocondrias según lo evaluado por inspección visual. Además, la programación de las rutinas es sencilla y el proceso de clasificación es muy rápido; el código está en el siguiente repositorio.

Mediante este algoritmo analizamos y clasificamos la forma de 196 mitocondrias (Figura 3.8). La mayoría de las mitocondrias adoptan formas de, o bien *rod-like* (45%), o *smile-like* (37%), mientras que unas pocas adoptaron formas más intrincadas y se clasificaron como *snake-like* (18%).

Dada la dispersión en las longitudes de las mitocondrias (Figura 3.6b), nos preguntamos si esta proporción tan alta de *rod-like* no podría provenir de las mitocondrias más cortas, de longitud menor o similar a la L_p^* . Para ello, dividimos los datos en 3 grupos según el tamaño de la organela. En primer lugar, las mitocondrias de longitudes menores a $1 \mu\text{m}$ (9% del total) fueron todas *rod-like*, presumiblemente porque su grosor no es despreciable frente a la longitud de la organela y, en consecuencia, no pueden curvarse. En segundo lugar, las mitocondrias con longitudes en el rango $1 \mu\text{m} \leq L \leq 4 \mu\text{m}$ (71%) mostraron una distribución más uniforme de formas *rod-* y *smile-like* (Figura 3.8b). Por último, las fracciones de *rod-* y *snake-like* se invirtieron para las mitocondrias más largas (20%). La disminución de la población *rod-like*

para mitocondrias de más de 4 μm podría estar asociada a las curvaturas naturales de los microtúbulos observadas en las células [144], ya que vimos que las mitocondrias tienden a alinearse con dichos filamentos. Por otro lado, el aumento de la población *snake-like* para estas mitocondrias largas podría estar relacionado con la interacción de estas organelas con diferentes filamentos del citoesqueleto y otras estructuras que confinan espacialmente a las mitocondrias. Volveremos sobre este punto en el Capítulo siguiente.

3.3. Análisis temporal de mitocondrias individuales

Las mitocondrias no son estáticas, sino que se mueven a causa del ruido térmico del citoplasma y como resultado del transporte intracelular mediado por motores moleculares. En esta primera etapa, nos dedicamos a estudiar particularmente los cambios dinámicos en las formas que adoptan estas organelas en el citoplasma. Con este fin, realizamos el seguimiento (*tracking*) de organelas individuales durante 25 segundos a 6 minutos (Sección 2.3.1). Aplicamos el proceso de clasificación explicado anteriormente a cada cuadro de la película y así recuperamos la secuencia de formas adoptadas por las mitocondrias durante el experimento.

3.3.1. Fluctuaciones de forma de las mitocondrias

La Figura 3.9a muestra un ejemplo de las fluctuaciones de forma que experimenta una mitocondria en el tiempo, y el panel b muestra la secuencia de la clasificación de formas adoptadas a lo largo de todo el experimento. Aproximadamente la mitad de las 97 mitocondrias analizadas conservaron su forma durante la ventana temporal de los experimentos. En el Video 1 se muestra un ejemplo de estas mitocondrias. Para las organelas que mostraron al menos un cambio de forma a lo largo del experimento (como se ilustra en los Videos 2 y 3), nos propusimos cuantificar el tiempo de permanencia de cada forma.

Para ello, calculamos la autocorrelación de las secuencias de formas (Figura 3.9b-*inset*). La autocorrelación de la forma decae exponencialmente con un tiempo característico relacionado con la tasa de fluctuaciones de la forma. Realizando un ajuste exponencial, podemos obtener una estimación del tiempo característico (τ) que persiste una forma antes de cambiar a otra, que en promedio fue de 5.1 ± 1.3 s (Figura 3.9c).

A continuación nos preguntamos si las formas de curvatura cero (*rod-like*) eran más estables que las formas más sinuosas. Nuestra hipótesis es que las curvaturas grandes requieren mayor energía de flexión, por lo que las mitocondrias en forma de varilla (*rod-like*) representarían una configuración más favorable en términos de flexión. Para probar esta hipótesis, medimos el “tiempo de vida” de cada una de las tres clases de forma a partir de las secuencias de forma. Dado que las curvaturas de alta flexión están restringidas por el grosor de la organela, las mitocondrias muy cortas no podrán doblarse, por lo que las mitocondrias de longitud menor a 1.5 μm se descartaron del análisis. Nuestros resultados muestran que las formas similares a sonrisas (*smile-like*), pero no a varillas (*rod-like*), son las más prevalentes (Figura 3.9c).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, nos preguntamos si el cambio de una forma sinuosa a una recta era más probable que a la inversa. Comprobamos que los cambios de *rod-like* a *smile-* o *snake-like* y de *smile-* a *snake-like* representan el 49 % del total de cambios

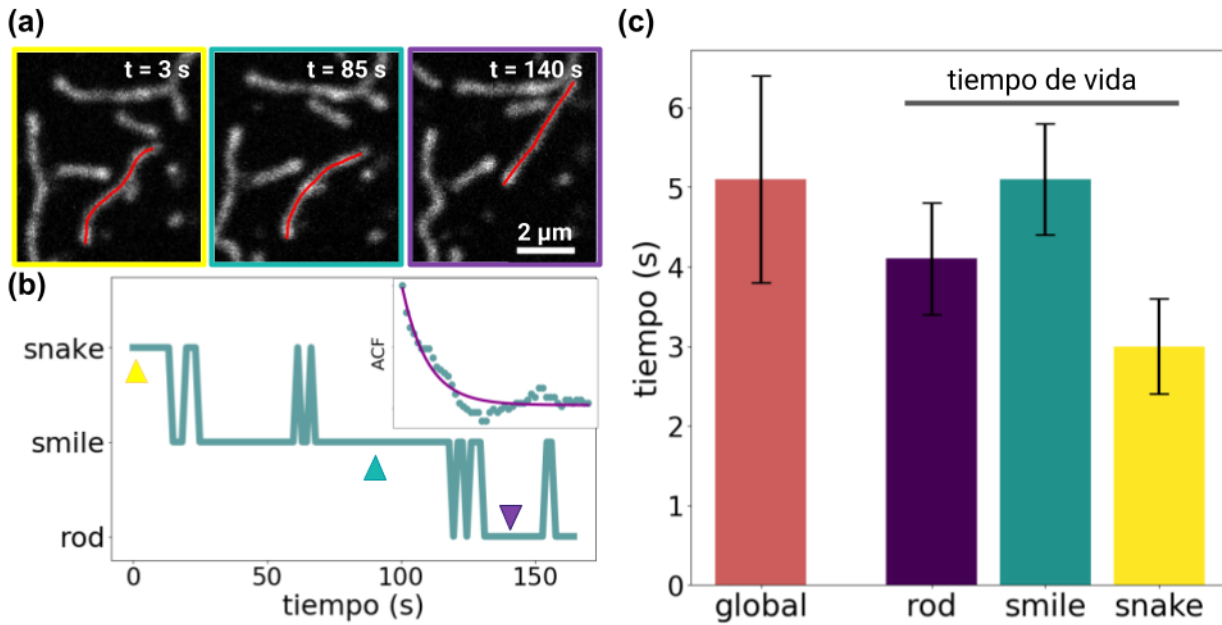


Figura 3.9: **Análisis de la transición de formas.** (a) Imágenes confocales de una mitocondria y su forma recuperada (rojo) para diferentes tiempos. (b) Evolución de la clasificación de formas para toda la película. Las flechas de color indican la forma asociada a las imágenes en (a). Recuadro: Decaimiento de función de autocorrelación de la forma (ACF) con ajuste en línea continua. Para los datos mostrados, $\tau = 11$ s. (c) Tiempo característico obtenido del análisis de autocorrelación de forma (rojo, $N_{\text{datos}}=47$). Tiempo de vida de las formas – *rod*, *smile* y *snake*– obtenido a partir del mismo conjunto de datos ($N_{\text{datos}}=124$, 164 y 108, respectivamente). Imagen adaptada de [173]

de forma analizados (366/748), lo cual es similar a la fracción de cambios de *snake-like* a *rod/smile-like* o de *smile-like* a *rod-like* (382/748).

Con el fin de explorar las posibles causas de estas fluctuaciones dinámicas de forma y con la ventaja de que la línea celular expresa de forma estable microtúbulos fluorescentes, analizamos en detalle la fluctuación de forma de varias mitocondrias simultáneamente con microtúbulos cercanos. Observamos que muchos cambios de forma de las organelas estaban directamente relacionados con eventos asociados a microtúbulos, como también se informó recientemente en [82]. Por ejemplo, la Figura 3.10a muestra cómo un microtúbulo polimerizándose deforma transitoriamente a una mitocondria, aumentando su curvatura (ver Video 4). Por otro lado, la Figura 3.10b muestra una mitocondria en forma *rod-like* siendo transportada a lo largo de un microtúbulo que, al llegar a una intersección de estos filamentos, cambia de filamento y se curva, adoptando una forma similar a una sonrisa (*smile-like*) (véase Video 5).

Aunque no podemos descartar otros mecanismos relacionados con las fluctuaciones de forma de las mitocondrias, los resultados descritos sugieren que las fuerzas activas ejercidas por los motores moleculares que las transportan, así como la polimerización y organización de los microtúbulos, desempeñan un papel importante en este proceso.

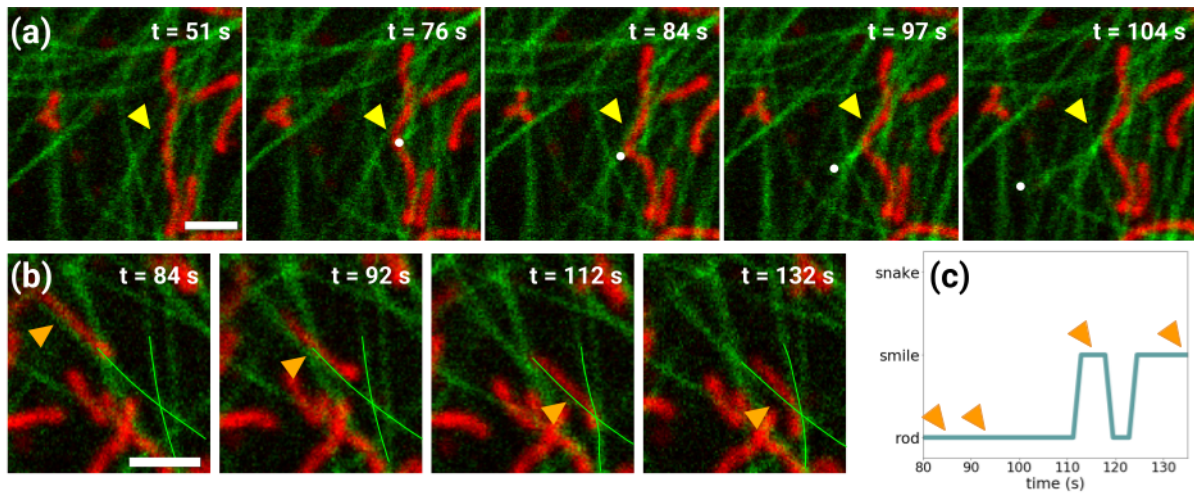


Figura 3.10: **Asociación entre microtúbulos y mitocondrias.** (a) Un microtúbulo en polimerización (punta indicada con círculo blanco) deforma transitoriamente una mitocondria que lo intercepta (punta de flecha amarilla). (b) una mitocondria (punta de flecha naranja) que se desplaza a lo largo de un microtúbulo se curva al cambiar de filamento en la intersección de dos microtúbulos (líneas verdes cerca de la región de intersección). (c) Secuencia de formas adoptadas por la mitocondria registrada en (b). Barras de escala= 2 μm . Imagen adaptada de [173].

3.3.2. Movimiento y cambio de forma

Por último, nos preguntamos si existe alguna relación entre la forma de la mitocondria y el movimiento general de la organela. Distintos autores [9, 100] han informado que las mitocondrias suelen adquirir una forma *rod-like* para poder ser transportadas a lo largo de los microtúbulos. Para dilucidar si las mitocondrias en una configuración altamente curvada también podrían moverse procesivamente, clasificamos simultáneamente la forma y calculamos la posición del centro de masa de la organela a partir del *tracking*.

La Figura 3.11a muestra las trayectorias del centro de masa (CM) de 81 mitocondrias con el código de colores indicando su forma “instantánea”. Los datos mostrados en esta Figura corresponden a organelas con $L > 1.5 \mu\text{m}$. Las trayectorias mostraron un comportamiento muy heterogéneo: algunas organelas presentan un movimiento confinado, mientras que otras se mueven de forma dirigida. Curiosamente, descubrimos que sólo las organelas *rod-like* y las de muy baja curvatura *smile-like* mostraron un movimiento procesivo (Figura 3.11b), probablemente debido a la acción coordinada de motores moleculares. En algunos casos, pudimos distinguir transiciones de movimiento confinado a movimiento dirigido, asociadas con el cambio de forma de *snake-* a *rod-like* (Figura 3.11c y Video 3), en concordancia con los resultados reportados por otros autores y mencionados más arriba [9, 100].

En conjunto, estos resultados muestran que la morfología de las mitocondrias se remodela constantemente y sugieren que las fuerzas activas desempeñan un papel clave en esta dinámica, probablemente debido a la interacción de estas organelas con el citoesqueleto, mediado por motores moleculares u otras proteínas de unión, así como con otras organelas.

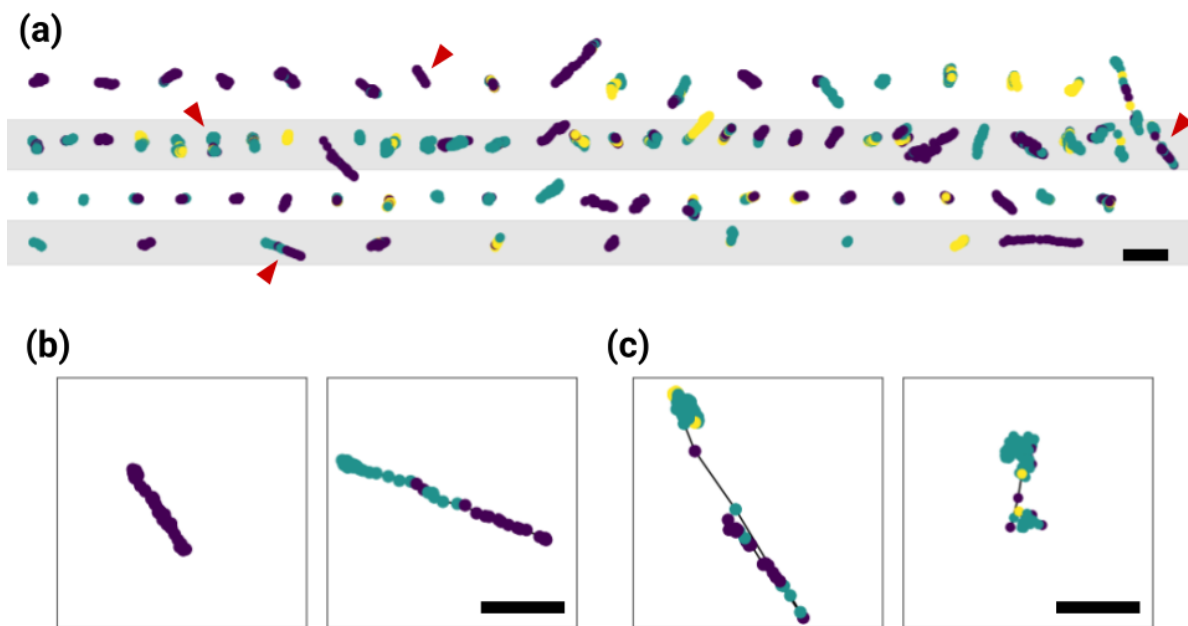


Figura 3.11: **Traectorias del CM de las mitocondrias y sus formas instantáneas.** (a) Cada conjunto de círculos representa la trayectoria del centro de masa de una mitocondria, y el color de cada círculo corresponde a la forma adoptada por la organela en ese momento: *rod-like* (violeta), *smile-like* (turquesa) y *snake-like* (amarillo). De abajo hacia arriba, las trayectorias se ordenan en bandas según la duración del experimento: 0-50 s, 50-100 s, 100-150 s, 150-300 s. Barra de escala = 3 μm . (b-c) Ampliación de las 4 trayectorias indicadas con flechas rojas en (a), las cuales presentan movimiento procesivo (b), o muestran una transición de movimiento confinado a procesivo (c). Barras de escala = 2 μm . Imagen adaptada de [173].

Conclusiones

En este capítulo caracterizamos la red mitocondrial de melanocitos de *Xenopus laevis*, por medio del análisis de imágenes adquiridas mediante microscopía de super-resolución Airyscan y microscopía confocal. Observamos que estas organelas se presentan como entidades individuales distribuidas en el citoplasma celular, y encontramos que su organización depende fuertemente de su asociación con la red de microtúbulos, mostrando una orientación preferencial co-alineada con estos filamentos. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que las mitocondrias son transportadas principalmente a través de los microtúbulos por acción de los motores moleculares dineína y kinesina, quienes posicionan a dichas organelas en el citoplasma.

Con respecto al análisis morfológico de las mitocondrias, caracterizamos por primera vez las diferentes formas y tamaños de estas organelas en este modelo celular. Si bien pudimos observar mitocondrias redondeadas o con formas más complejas, la mayor parte de estas organelas presenta formas elongadas simples (*i.e* filamentosas). Para caracterizarlas, calculamos en primer lugar la distribución de longitudes, con un rango entre 0.3 y 12 μm , siendo la mediana $L = 2.6 \mu\text{m}$. A su vez, obtuvimos un ancho de 0.3 μm , verificando que la mayoría de las organelas pueden ser consideradas como “filamentos” y ser estudiadas bajo esta aproximación. Calculamos una longitud de persistencia aparente $L_p^* = 2.1 \mu\text{m}$, aportando una estimación de la flexibilidad de las mitocondrias en el citoplasma. Comparando este valor con las longitudes típicas de las organelas, podemos afirmar que las mismas se comportan como filamentos semi-flexibles en su entorno celular.

Por otro lado, presentamos un método novedoso para clasificar las formas de mitocondrias individuales a partir de imágenes confocales basado en el análisis de su curvatura. Esta rutina automática permitió el estudio de las deformaciones y los cambios de forma de estas organelas en células vivas y determinar las escalas temporales de las fluctuaciones morfológicas no asociadas a la dinámica de fisión y fusión. Descubrimos que la forma de las organelas varía en el orden de segundos. En algunos casos, observamos transiciones de un comportamiento confinado a un movimiento dirigido, con su consiguiente cambio de forma, de mitocondrias flexionadas a mitocondrias alargadas, evidenciando el efecto de las fuerzas activas generadas por motores moleculares sobre las mitocondrias.

Además, la inspección de las películas que registran simultáneamente mitocondrias y microtúbulos fluorescentes sugiere que la arquitectura y la dinámica de esta red del citoesqueleto desempeñan un papel importante en la remodelación y las fluctuaciones de la forma de las mitocondrias. Evidencia reciente subraya el papel clave de las fuerzas mecánicas en los cambios morfológicos y la dinámica de dichas organelas [12, 49, 50, 111]. Desde una perspectiva biofísica, sería relevante analizar las fluctuaciones de las formas de estas organelas modificando los factores capaces de ejercer fuerzas sobre ellas. En particular, el citoesqueleto juega un papel clave como agente regulador de las mitocondrias [11, 82, 114, 119, 179]. Abordaremos este tema en el siguiente capítulo.

Capítulo 4

Regulación de la morfodinámica mitocondrial por el citoesqueleto

Estudios recientes han demostrado que la interacción entre las mitocondrias y el citoesqueleto puede alterar la función mitocondrial [10, 11, 87]; sin embargo, todavía se desconocen en gran medida los mecanismos subyacentes a este fenómeno. Por este motivo, en este capítulo exploraremos cómo la integridad del citoesqueleto afecta la organización, la morfología y la movilidad de las mitocondrias en melanocitos de *Xenopus laevis*. Para ello, realizaremos diferentes tratamientos que afectan selectivamente las diferentes redes del citoesqueleto: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios de vimentina. Evaluaremos cómo dichas redes interactúan de manera mecánica con las mitocondrias moldeando su dinámica.

Los resultados descriptos en este capítulo dieron lugar a una publicación en la revista *Scientific Reports* 13, 4065 (2023).

4.1. Tratamientos que afectan las distintas redes del citoesqueleto

Para explorar las funciones que desempeña el citoesqueleto en la organización intracelular de las mitocondrias, afectamos selectivamente tres de las distintas redes que lo componen (microtúbulos, F-actina y vimentina). El procedimiento experimental se encuentra descrito en detalle en la Sección 2.1.3. Para referirnos a cada tratamiento a lo largo de la Tesis usaremos las siguientes “etiquetas”:

NOC: depolimerizamos parcialmente los **microtúbulos** incubando a las células con nocodazol. Quisimos preservar parte de esta red de filamentos para explorar aspectos más sutiles de la dinámica y movilidad mitocondrial que dependen de los mismos.

LAT: depolimerizamos la red de filamentos de actina (**F-actina**) incubando a las células con latrunculina-B.

VIM⁻: transfectamos de forma transiente los melanocitos con una mutante dominante negativa de vimentina (vim 1-138) que impide el ensamblado la red de filamentos intermedios de **vimentina**.

VINB: analizamos los efectos de la vinblastina, un fármaco que estabiliza la dinámica de los **microtúbulos** [157]. La concentración de vinblastina utilizada en los experimentos tiene el efecto de aumentar las curvaturas de los microtúbulos, lo que sugiere un aumento de las tensiones de esta red [176].

CTRL: células control, no sometidas a ningún tratamiento. Todas las otras condiciones serán comparadas/contrastadas con esta condición.

La Figura 4.1 muestra imágenes representativas de células para las distintas condiciones experimentales. Los tratamientos realizados no afectaron significativamente la adhesión ni el tamaño celular. No obstante, observamos un cambio en la organización global y morfología de la red de microtúbulos cuando afectamos F-actina (LAT) o vimentina (VIM⁻). Por ejemplo, notamos la presencia de manojos o *bundles* de microtúbulos en esos casos. Investigaciones recientes apuntan a una visión integral del citoesqueleto, y no como una simple superposición de microtúbulos, F-actina y filamentos intermedios, por lo que los cambios observados en la red de microtúbulos pueden estar asociados al desacople de las redes frente a los tratamientos realizados. Observamos también la reducción del número de microtúbulos en la condición NOC o cómo estos filamentos presentan mayores curvaturas en la condición VINB.

A primera vista, parecería que la organización y distribución de las mitocondrias no varía abruptamente entre los tratamientos y la condición control. Sin embargo, se sabe que el citoesqueleto influye directamente en la dinámica mitocondrial de diferentes maneras [10, 11, 87].

Para obtener una descripción cuantitativa de cómo afecta la integridad del citoesqueleto a las mitocondrias, en las siguientes secciones repetimos en estas células los análisis descritos en el Capítulo 3 cuando estudiamos la organización, morfología y movilidad de las mitocondrias en la condición CTRL (Sección 3.1.1).

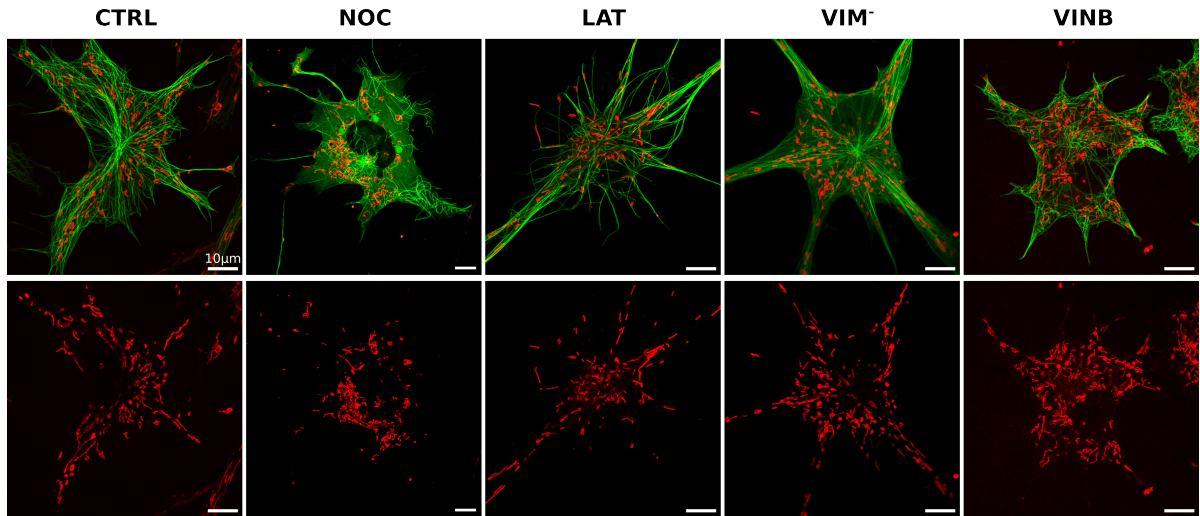


Figura 4.1: **Distribución y morfología de las mitocondrias frente a la perturbación del citoesqueleto.** Imágenes representativas de melanocitos de *X. laevis* registrada por microscopía Airyscan (verde: microtúbulos; rojo: mitocondrias –panel superior). Para facilitar la visualización de las mitocondrias, el canal rojo se muestra también de forma independiente en el panel inferior.

4.2. Rol del citoesqueleto en la organización intracelular de la red mitocondrial

4.2.1. Características morfológicas de la red mitocondrial

Utilizamos el *plug-in* de Fiji *Mitochondria Analyzer* [162] para cuantificar las características estructurales de la red mitocondrial a nivel global (Sección 3.1.1) luego de aplicar los distintos tratamientos indicados previamente. Los resultados se muestran en la Figura 4.2.

Comprobamos que tanto el número de mitocondrias por célula –alrededor de 150–, como el área por mitocondria –alrededor de $0.7 \mu\text{m}^2$ –, fueron similares a la condición control (CTRL) (Figura 4.2a y b; Tabla A.1,). Sin embargo, observamos una ligera reducción del número y tamaño de las mitocondrias en las células tratadas con nocodazol. El tratamiento con vinblastina también dio lugar a organelas más pequeñas. Esto último podría explicarse considerando que la mayor tensión que acumulan los microtúbulos, debido a la alteración de su dinámica, se transmite a las mitocondrias aumentando su tasa de fisión [12].

Al analizar la ocupación mitocondrial (relación entre el área de todas las mitocondrias dentro de una célula y el área celular total – Sección 2.3.2), encontramos que tanto las células tratadas con latrunculina-B como con nocodazol mostraron una reducción en comparación al control (Figura 4.2d). Esto es notable, ya que no hay diferencias significativas en el área celular entre las distintas condiciones (Tabla A.1). Dicho resultado indicaría que las mitocondrias cambian su distribución cuando se interrumpen las redes de F-actina o microtúbulos, evidenciando el papel crucial que desempeñan estos dos filamentos del citoesqueleto en la homeostasis mitocondrial.

Por último, analizamos las bifurcaciones por mitocondria, que cuantifican las ramificacio-

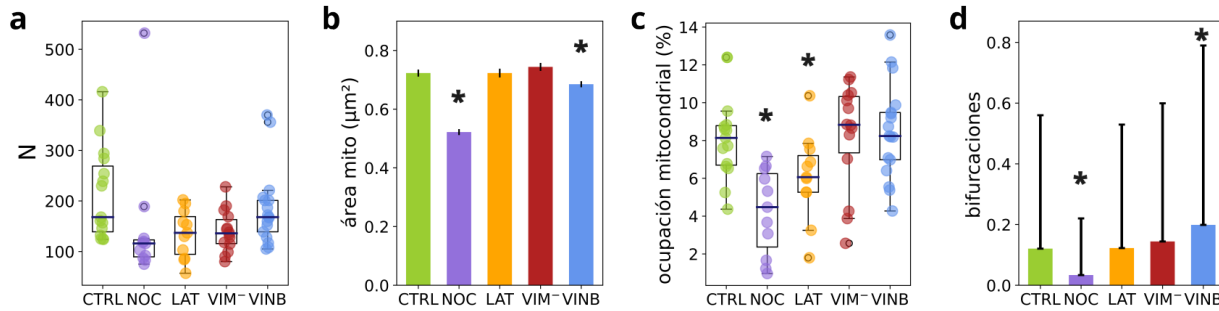


Figura 4.2: **Efecto del citoesqueleto sobre la organización mitocondrial.** (a) Número medio de mitocondrias por célula; (b) Área media por mitocondria; (c) Cuantificación de la ocupación mitocondrial; (d) Número medio de bifurcaciones por organela. Cada círculo representa una única célula. Los números de células y mitocondrias analizadas se encuentran en la Tabla 2.1. Figura adaptada de [170]

nes observadas en estas organelas y encontramos que alrededor del 10% de las mitocondrias presentan bifurcaciones (Tabla A.1). Curiosamente, mientras que la fracción de mitocondrias bifurcadas se redujo en las células incubadas con nocodazol, el tratamiento con vinblastina aumentó esta fracción, lo que subraya que la organización de los microtúbulos y las tensiones mecánicas influyen en la forma de las mitocondrias. Una posibilidad es que el origen de esas ramificaciones sea por la acción de fuerzas locales debido a motores moleculares que “tiran” de la organela mientras se desplazan a lo largo de microtúbulos, generando tracciones locales en las mitocondrias [79]. Por un lado, al reducir el número de microtúbulos con nocodazol, disminuirían los contactos con estos filamentos, reduciendo la probabilidad de observar bifurcaciones. Por otro lado, el tratamiento con vinblastina aumenta la tensión de los microtúbulos, lo que podría producir un aumento de las tensiones locales sobre las mitocondrias que se sumaría a la acción de los motores, incrementando la probabilidad de generar bifurcaciones en estas organelas.

4.2.2. Orientación local de las mitocondrias frente a perturbaciones del citoesqueleto

En el capítulo anterior vimos que existe una fuerte correlación entre la direccionalidad de los microtúbulos y las mitocondrias en la condición control (RMSE: $8,95^\circ$, Figura 4.3). Es por ello que nos propusimos, en primer lugar, evaluar el impacto que tendría sobre dicha correlación la perturbación de la red de microtúbulos con nocodazol y vinblastina. El análisis de la orientación mitocondria-microtúbulo se realizó siguiendo los pasos explicados en el capítulo anterior (ver Sección 3.1.2).

En el caso de la depolimerización parcial de dichos filamentos, la correlación de orientaciones se pierde (RMSE: $54,7^\circ$, Figura 4.3), revelando que la red de microtúbulos forma un andamiaje para las mitocondrias en esta línea celular. Notablemente, al afectar la estabilidad de los microtúbulos con vinblastina, la co-orientación de mitocondrias y microtúbulos también fue más débil (RMSE: $23,3^\circ$, Figura 4.3). Esto indica que la dinámica de los microtúbulos desempeña un papel importante en el acoplamiento mitocondrial y que la tensión

4.3. INFLUENCIA DEL CITOESQUELETO EN LA FORMA DE LAS MITOCONDRIAS 71

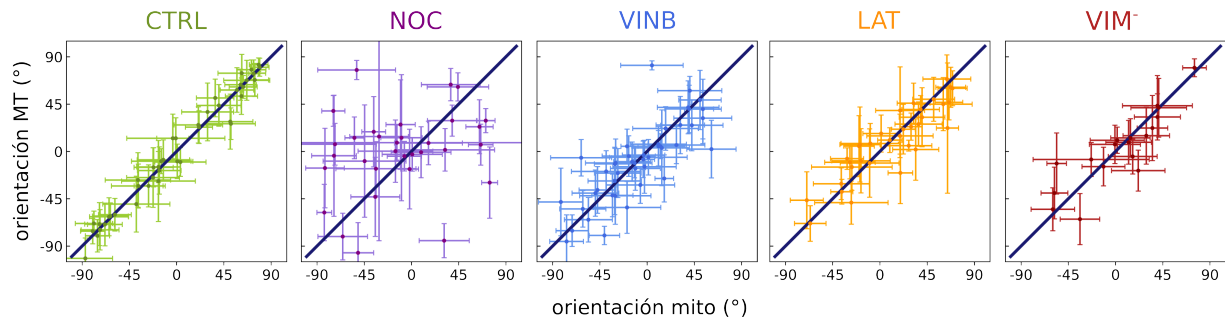


Figura 4.3: **Orientación de las mitocondrias respecto a los microtúbulos en las distintas condiciones experimentales.** Cada punto representa la orientación media de los microtúbulos y las mitocondrias en una ROI. La recta representa la identidad. Se analizaron entre 3 y 12 ROIs de entre 8 y 40 células para cada condición (ver Tabla 2.1). Figura adaptada de [170]

acumulada en estos filamentos afecta la interacción entre ambas estructuras.

A continuación nos preguntamos si las otras redes del citoesqueleto desempeñan algún papel en la organización mitocondrial dependiente de microtúbulos. Observamos que la co-orientación de mitocondrias y microtúbulos, tanto en células tratadas con latrunculina-B como en células que expresan vimentina mutada, era más débil que en la condición CTRL, como indica la mayor dispersión de los datos alrededor de la identidad (RMSE: $18,1^\circ$ y $18,5^\circ$, Figura 4.3).

Estos resultados muestran que todas las redes del citoesqueleto afectan la organización intracelular de las mitocondrias, aunque de manera diferente.

4.3. Influencia del citoesqueleto en la forma de las mitocondrias

Siguiendo la misma metodología descrita en el capítulo anterior (Sección 3.2), recuperamos las coordenadas curvilíneas de mitocondrias elongadas a partir de imágenes de microscopía confocal y estudiamos las propiedades morfológicas de organelas individuales para los tratamientos que alteran las distintas redes del citoesqueleto.

4.3.1. Longitud de las mitocondrias

La longitud de las mitocondrias está íntimamente relacionada con el balance de la dinámica de fusión-fisión. Se sabe, por ejemplo, que los filamentos de actina tienen efecto sobre esta tasa: la polimerización de actina alrededor de las mitocondrias aumenta su tasa de fisión e inhibe la fusión mitocondrial, mientras que en ausencia de estos filamentos la tasa de fusión supera a la de fisión [48]. La longitud es entonces una magnitud relevante y fácil de medir, que brinda información sobre el efecto del citoesqueleto en la dinámica mitocondrial.

Nuestros análisis muestran una gran dispersión de los valores de longitud, que van desde 0.3 a $12 \mu\text{m}$ en el caso CTRL, y hasta $25 \mu\text{m}$ para LAT (Figura 4.4). Si consideramos la

mediana de la longitud L para cada condición experimental y la comparamos con la obtenida para CTRL, observamos que L es menor para los tratamientos VIM⁻ y VINB, mientras que NOC y LAT parecen no tener efecto en la longitud (Tabla 4.1). Para explorar más en profundidad las distribuciones de longitud, analizamos los datos utilizando un modelo de mezcla de gaussianas [167], que considera que los datos pueden provenir de una combinación de muestras o poblaciones, como se explica en la Sección 2.5.3. Este enfoque nos permitirá tener en cuenta el efecto de valores *outliers* en la distribución. La Figura 4.4 muestra el ajuste del modelo en cada condición.

Cond.	N	L (μm)
CTRL	196	2.60 ± 0.12
NOC	154	2.33 ± 0.12
LAT	198	2.60 ± 0.19
VIM ⁻	252	$2.24 \pm 0.09^*$
VINB	194	$1.63 \pm 0.07^*$

Tabla 4.1: **Longitud de las mitocondrias en las diferentes condiciones experimentales.** L es la mediana de la longitud.

Encontramos que en todas las condiciones, excepto LAT, la distribución de longitudes se ajustó a un modelo bimodal. En ausencia de F-actina, se necesitaron 3 gaussianas para ajustar los datos.

Para las condiciones CTRL, NOC y VIM⁻ alrededor del 90 % de las mitocondrias pertenece a una subpoblación con longitudes centradas en 2.3 μm , mientras que el 10 % restante corresponde a longitudes en torno a 6-7 μm (Tabla 4.2).

Por otro lado, en LAT alrededor del 20 % de las mitocondrias fueron significativamente más largas que CTRL, con longitudes hasta 10 veces mayores. Este resultado puede explicarse considerando reportes previos que indican que la depolimerización de F-actina resulta en una disminución de la tasa de fisión mitocondrial, resultando en un aumento de la longitud de las mitocondrias [180], tal como se comentó más arriba.

Por último, el tratamiento con vinblastina produjo mitocondrias más cortas: su distribución bimodal se centra en 1.6 y 3.6 μm . Especulamos que, dado que se ha descrito que la vinblastina aumenta la tensión mecánica de los microtúbulos [157, 176], esta tensión podría transmitirse a las mitocondrias aumentando la tasa de fisión [49] dando lugar a una reducción de su longitud.

Estos resultados muestran que las diferentes redes del citoesqueleto tienen un efecto diferencial sobre la longitud de las mitocondrias. En particular, los filamentos de actina cumplen un rol en la regulación de la fisión mitocondrial, ocasionando en su ausencia un aumento en la longitud. Notablemente, afectar la dinámica de microtúbulos con vinblastina tuvo el mayor efecto sobre estas organelas, reduciendo su longitud en un 40 % aproximadamente.

4.3. INFLUENCIA DEL CITOESQUELETO EN LA FORMA DE LAS MITOCONDRIAS 73

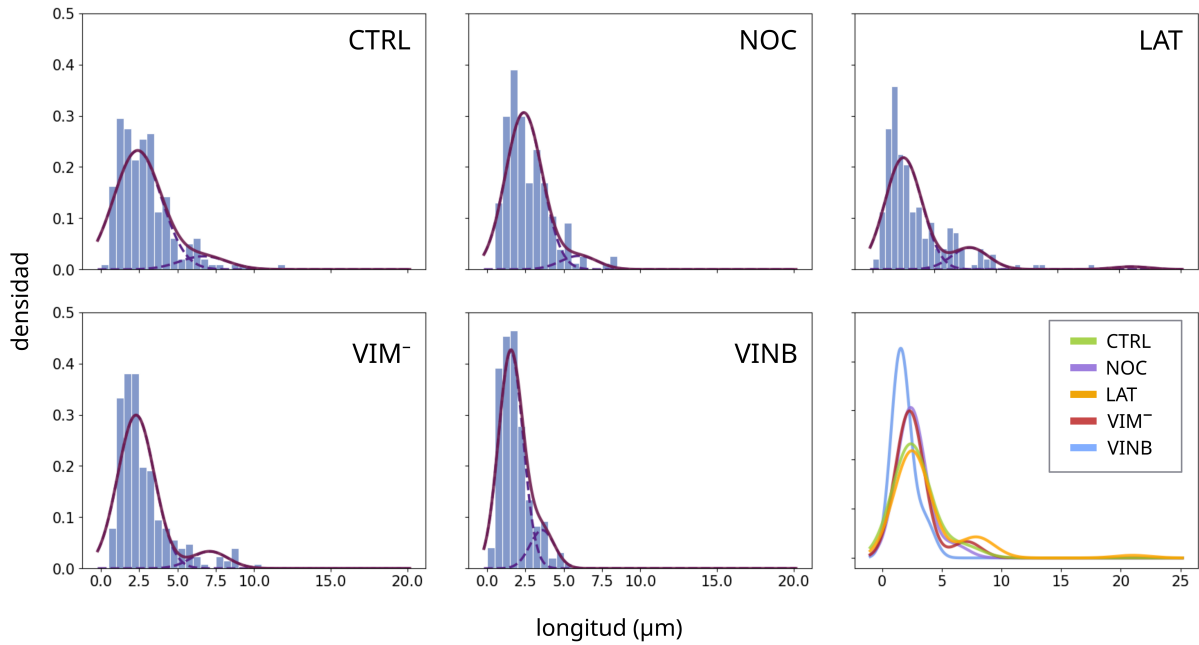


Figura 4.4: **Distribuciones de la longitud de las mitocondrias.** Las longitudes obtenidas para cada condición experimental (histogramas celestes) se analizaron cuantitativamente considerando una mezcla de funciones gaussianas (línea violeta) con dos o tres modos (líneas punteadas). El último panel muestra las funciones de densidad de probabilidad (*pdf*) de la mezcla gaussiana para todas las condiciones.

Cond.	l_1 (μm)	l_2 (μm)	l_3 (μm)	f_1	f_2	f_3	σ
CTRL	2.4 ± 0.2	6.7 ± 1.8	-	0.90	0.10	-	1.55
NOC	2.4 ± 0.2	6.0 ± 0.9	-	0.92	0.08	-	1.2
LAT	2.5 ± 0.1	7.9 ± 2.2	$21.0 \pm 1.1^*$	0.82	0.16	0.02	1.5
VIM⁻	2.3 ± 0.7	7.1 ± 0.1	-	0.90	0.10	-	1.2
VINB	$1.55 \pm 0.05^*$	$3.6 \pm 0.2^*$	-	0.85	0.15	-	0.8

Tabla 4.2: **Parámetros del modelo de mezcla gaussiana para la longitud de mitocondrias.** l_i y σ están en unidades μm y corresponden a la longitud media y la desviación estándar de la gaussiana i , respectivamente. f_i es la fracción de población de la gaussiana i a la distribución global.

4.3.2. Longitud de persistencia aparente y formas

A continuación, nos preguntamos qué efecto tiene el citoesqueleto sobre la longitud de persistencia aparente (L_p^*) (Sección 3.2.3).

La Figura 4.5a muestra la correlación del coseno de θ_s para los diferentes tratamientos y los ajustes de los datos con la ecuación 3.4. En este caso, decidimos calcular esta magnitud sólo para las mitocondrias de longitud mayor a una longitud de corte (L_c), y así evitar

considerar el aumento en el error estadístico debido a la disminución del número de datos a medida que s aumenta. El valor de L_c influye directamente sobre el ajuste, y por ende, sobre la estimación de L_p^* . Utilizamos 3 valores de corte, basados en la mediana de las longitudes de las organelas en cada condición (Tabla 4.1): $2 \mu\text{m}$, L y $3 \mu\text{m}$. El gráfico de la Figura 4.5a muestra los datos utilizando L_c igual a la mediana de cada condición.

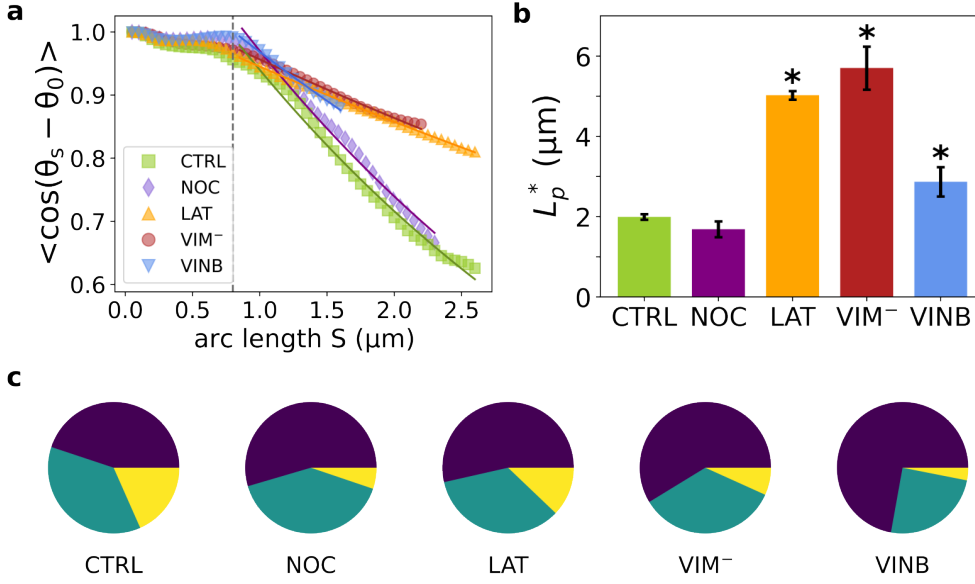


Figura 4.5: **Caracterización de la rigidez aparente y la distribución de la forma de las mitocondrias.** (a) Determinación de la longitud de persistencia aparente de las mitocondrias (L_p^*) a partir de la descorrelación del $\cos(\theta_s)$. La línea punteada corresponde a $s_0 = 0.8 \mu\text{m}$. (b) Valores de L_p^* obtenidos de los ajustes mostrados en (a). (c) Distribución de las formas de las mitocondrias: *rod-like* (violeta), *smile-like* (turquesa) y *snake-like* (amarillo). Figura adaptada de [170]

Realizamos el ajuste del decaimiento exponencial en cada caso utilizando, además del L_c , un límite inferior $s_0 = 0.8 \mu\text{m}$ que contempla el ancho de las mitocondrias (ver Sección 3.2.3). Promediamos los valores obtenidos de L_p^* para los 3 L_c utilizados y consideramos el error como el intervalo máximo dado por ellos. Estos resultados se ilustran en la Figura 4.5b y se detallan en la Tabla A.2.

La longitud de persistencia aparente de las mitocondrias en las células CTRL fue de $2 \mu\text{m}$ (Figura 4.5c y Tabla A.2), en consistencia con el valor obtenido en el capítulo anterior. Observamos que la depolimerización parcial de los microtúbulos con nocodazol no afectó significativamente el valor de L_p^* . Esto indicaría que las mitocondrias largas, que son las consideradas para este análisis, probablemente estén asociadas a la red de microtúbulos remanente.

Por otro lado, los tratamientos de LAT y VIM⁻ aumentaron significativamente la L_p^* de las mitocondrias. Este aumento de “rigidez aparente” de las mitocondrias en ausencia de filamentos de actina o vimentina está relacionado con organelas menos curvadas y más rectas (por esta razón el coseno de $\theta(s)$ decae más lentamente). Nuestra hipótesis es que ambos tipos

de filamentos (F-actina y vimentina) añaden puntos de contacto físicos con las organelas, que aumentan el confinamiento de las mitocondrias y resultan en formas más curvadas (*i.e.* una L_p^* menor).

Un resultado similar se obtuvo para las células tratadas con vinblastina: las mitocondrias mostraron un incremento en su longitud de persistencia aparente en comparación con el control, revelando que la estabilidad de los microtúbulos también contribuye a las formas que adoptan las mitocondrias. Si bien los microtúbulos presentan mayores curvaturas bajo el tratamiento de vinblastina, también acumulan una mayor tensión, que podría perjudicar el acople entre las mitocondrias y estos filamentos, obteniendo así organelas menos curvadas.

Para profundizar en el estudio morfológico, y corroborar nuestra hipótesis sobre el efecto del citoesqueleto sobre las formas mitocondriales, exploramos a continuación cómo se distribuye el ensamble de formas de estas organelas según la clasificación propuesta en el capítulo anterior (3.2.4). Las categorías posibles para cada mitocondria son: *rod-like*, *smile-like* y *snake-like*, en ese orden según aumenta la curvatura y complejidad de su forma. La Figura 4.5c muestra cómo se compone la población mitocondrial de cada condición estudiada en un gráfico de torta. Encontramos que todos los tratamientos aumentaron la población de mitocondrias *rod-like* en detrimento de las más curvadas –*snake-like*– (Tabla A.2). Esto muestra que efectivamente, al “eliminar” diferentes filamentos del citoesqueleto, las organelas adoptan formas más rectas o menos curvadas, reforzando la idea de que existe una interacción mecánica entre las mitocondrias y los distintos tipos de filamentos que moldea su forma.

4.4. Efecto del citoesqueleto en el movimiento de mitocondrias

4.4.1. Fluctuaciones de curvatura

Como mencionamos previamente, el citoesqueleto tiene un impacto directo sobre las formas que adoptan las mitocondrias, relacionado con la curvatura de esas formas. Entonces, en primer lugar, nos propusimos estudiar qué efecto tienen los diferentes filamentos sobre el comportamiento temporal de la curvatura de estas organelas. Nuestra hipótesis es que las mitocondrias inmersas en el citoplasma presentan fluctuaciones morfológicas debido al ruido térmico y a fuerzas activas, y los filamentos del citoesqueleto son en menor o mayor medida responsables de estas fluctuaciones.

Con el objetivo de cuantificar la dinámica de los cambios de forma de las mitocondrias, definimos la tasa de fluctuaciones de curvatura, que llamamos ν (frecuencia). Para cada mitocondria en una secuencia de imágenes, calculamos la curvatura local en cada imagen i de la misma (Figura 4.6a) según la ecuación:

$$C_i = \frac{d\theta}{ds}, \quad (4.1)$$

donde θ es el ángulo tangente a la forma de la organela en la posición s , utilizando la función `gradient` de la librería `numpy`. A continuación, promediamos la curvatura de la mitocondria en cada imagen de la secuencia (Figura 4.6b –curvatura media \bar{C}). Independientemente de cuál sea la forma de la mitocondria, esperamos que la curvatura media varíe muy poco entre

cuadros sucesivos de la película si la organela conserva su forma, mientras que este observable cambiará rápidamente para mitocondrias que se estén deformando.

Para obtener el tiempo característico de las variaciones de forma de las mitocondrias, calculamos la función de autocorrelación (ACF) de \bar{C} en el tiempo, utilizando la función `autocorr` de la biblioteca `Pandas` y ajustamos los datos de ACF con una función de decaimiento exponencial. Este proceso se ilustra en la Figura 4.6c. Definimos ν , la tasa de fluctuaciones de curvatura, como la inversa del tiempo característico (Figura 4.6d y Tabla A.3).

Nuestros resultados muestran que cuando la red de microtúbulos es afectada por nocodazol, las fluctuaciones de forma se ralentizan en un $\sim 70\%$, sugiriendo que los microtúbulos son los principales responsables de los cambios rápidos en las formas de las mitocondrias, mientras que los otros filamentos del citoesqueleto no tienen un efecto significativo sobre esta magnitud.

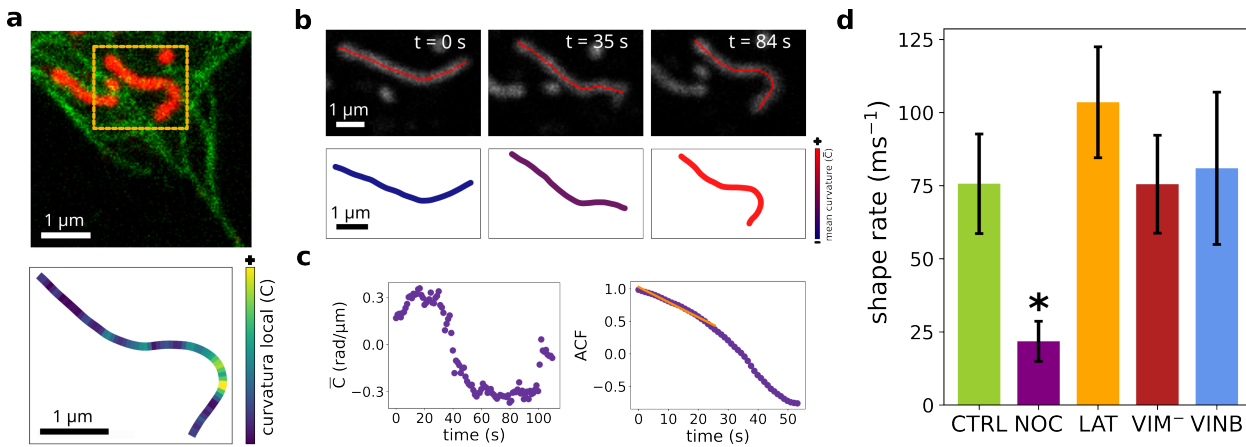


Figura 4.6: **Fluctuaciones de curvatura de las mitocondrias.** (a) Ejemplo de forma de una mitocondria y su curvatura local (C). (b) Para cada imagen de la secuencia temporal se determina la curvatura media (\bar{C}). (c) La $\bar{C}(t)$ (panel izquierdo) se utiliza para calcular la ACF (panel derecho) como se describe en el texto. (d) Tasa de fluctuación de curvatura para cada condición experimental (ν). Figura adaptada de [170]

De este modo, planteamos la hipótesis de que los microtúbulos transmitirían su *jittering* a las mitocondrias mediante las estrechas asociaciones entre estos dos componentes celulares. Esta hipótesis se sustenta en datos previos, que muestran que los tiempos característicos de los movimientos laterales de los microtúbulos en esta línea celular están entre 10-100 s [144] – similares a la ventana temporal considerada aquí. Además, siendo que éstos son los filamentos más rígidos del citoesqueleto ($L_p^* \sim 20 \mu\text{m}$ [95]) – y en particular son más rígidos que las mitocondrias – es razonable plantear que pueden transmitirles rápidos impulsos mecánicos, mientras que los otros filamentos, al ser mucho más flexibles no son capaces de hacer lo mismo.

4.4.2. Movilidad

A continuación nos propusimos explorar si las fluctuaciones de forma de las mitocondrias individuales se reflejan en el movimiento neto de estas organelas. Una forma de abordar esta observación de forma cuantitativa es analizando el movimiento del centro de masa de la forma de cada organela (CM). La Figura 4.7 muestra trayectorias representativas de mitocondrias en las diferentes condiciones experimentales (Videos S4-8). Podemos observar que algunas trayectorias están muy confinadas, como en el caso de NOC, y otras son muy procesivas, como en LAT y VIM^- . Sin embargo, en la mayoría de los casos –especialmente los no procesivos– se observa que estas trayectorias presentan sucesivos cambios de dirección. En el próximo capítulo volveremos sobre estas trayectorias cuando analicemos el desplazamiento cuadrático medio.

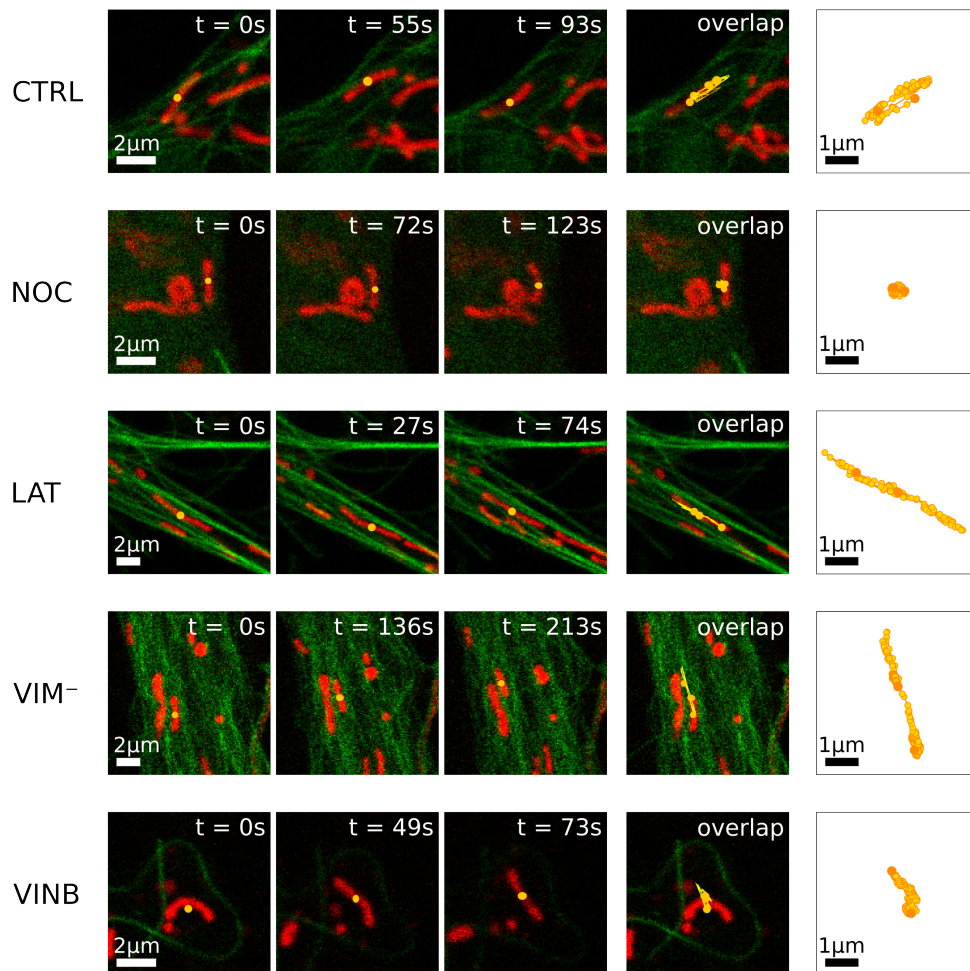


Figura 4.7: Ejemplos del movimiento del CM de mitocondrias en las diferentes condiciones experimentales. Imágenes de microscopía confocal de las mitocondrias (rojo) con su CM (círculos naranjas) (Videos S4-S8). Las trayectorias del CM recuperadas se representan en los dos paneles de la derecha. Figura adaptada de [170]

Aquí, realizamos un primer análisis cualitativo de estas trayectorias con el fin de explorar sus comportamientos. Definimos la distancia neta explorada (D) que corresponde a la mayor

distancia recorrida por el CM durante la duración de la película, esquematizado en la Figura 4.8a. Este valor se puede calcular según la expresión:

$$D = \sqrt{\Delta X_{CM}^2 + \Delta Y_{CM}^2} \quad (4.2)$$

con $\Delta X_{CM} = X_{Max} - X_{Min}$ y $\Delta Y_{CM} = Y_{Max} - Y_{Min}$, siendo X e Y las localizaciones del CM a lo largo del experimento. La movilidad de las mitocondrias se obtuvo dividiendo D por la duración de la trayectoria, y los resultados se muestran en la Figura 4.8b y se detallan en la Tabla A.3.

Encontramos que las mitocondrias en las células tratadas con nocodazol exhibieron trayectorias más confinadas que las células control, caracterizadas por un desplazamiento neto menor. Tal como ya mencionamos, los microtúbulos son vías fundamentales para el transporte mitocondrial [11] y, por tanto, se espera que el transporte activo se vea perjudicado con dicho tratamiento (reducción de la movilidad).

Por otro lado, la movilidad de las mitocondrias aumentó en las células tratadas con latrunculina-B, siguiendo la tendencia observada para las fluctuaciones de forma. Estudios recientes han demostrado que F-actina envuelve a las mitocondrias durante sus ciclos de polimerización en células HeLa en metafase [48], probablemente restringiendo el movimiento de las mitocondrias. Además, se ha informado que la depolimerización de F-actina por latrunculina-B resulta en un aumento de la movilidad mitocondrial, mientras que el aumento de la polimerización de dichos filamentos bloquea los movimientos rápidos de las mitocondrias en células CV-1 [181]. Basándonos en estas evidencias, especulamos que F-actina atenuaría la movilidad de las mitocondrias en las células control. Nuestra hipótesis es que esta atenuación podría explicarse por un mayor confinamiento espacial producido por dicha red de filamentos, el cual se reduce al depolimerizarlos con latrunculina-B.

Por último, no se observaron diferencias significativas en la movilidad mitocondrial entre las células control y las células con vimentina mutada o las células tratadas con vinblastina (Tabla A.3). En particular, el rol que desempeñan los filamentos de vimentina en el transporte intracelular continúa siendo controversial. Mientras algunos autores sugieren que esta red de filamentos sirve de anclaje, reduciendo el transporte intracelular de organelas [122], otros estudios indican lo contrario [118, 142].

Nuestros resultados revelan distintos papeles desempeñados por los diferentes filamentos en el movimiento y acoplamiento mitocondrial a los microtúbulos. Si bien este análisis aporta una primera aproximación sobre cómo el citoesqueleto afecta la movilidad de las organelas, es un poco limitado, ya que se basa sólo en el estudio de la distancia neta recorrida. Como vimos, las trayectorias del CM y las fluctuaciones de formas de las mitocondrias son heterogéneas, y pueden presentar momentos de pausas y comportamientos procesivos. Para profundizar en estos temas, se utilizan técnicas estadísticas más robustas que abordaremos en el siguiente capítulo.

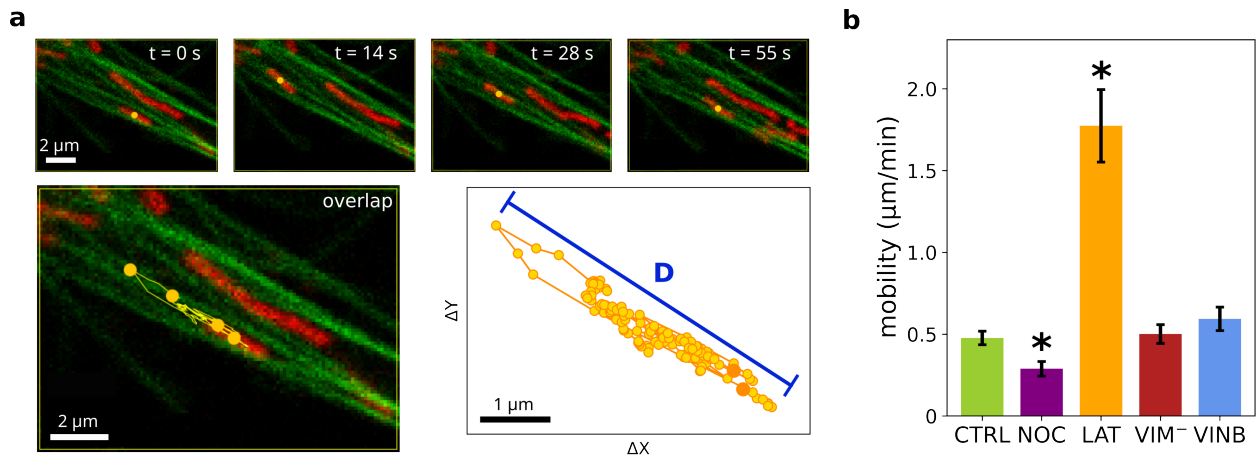


Figura 4.8: **Análisis de la movilidad de las mitocondrias.** (a) Imágenes representativas de una mitocondria en movimiento (panel superior), con su centro de masa (círculos amarillos). El punto inicial y final de la trayectoria se muestran en naranja oscuro. La distancia neta explorada por la organela (D) se esquematiza como un segmento azul. (panel inferior) (b) Cuantificación de la movilidad de las mitocondrias. Figura adaptada de [170]

Conclusiones

En este capítulo, exploramos la interacción entre las mitocondrias y el citoesqueleto en células vivas, afectando selectivamente tres de los diferentes filamentos del citoesqueleto (microtúbulos, F-actina y vimentina). Hallamos que la perturbación del citoesqueleto tiene un impacto diferencial en la longitud de las mitocondrias, la longitud de persistencia aparente, la movilidad y la organización celular en melanocitos de *X. laevis*.

Como se informó anteriormente en otras líneas celulares [163], se observaron cambios sustanciales en la distribución y movilidad de las mitocondrias al depolimerizar parcialmente los microtúbulos. Esta red de filamentos sirve de andamiaje para la organización mitocondrial en las células, como demuestra la pérdida de co-alineación entre estas estructuras en las células tratadas con nocodazol. Además, la distribución celular de las mitocondrias se reduce bajo dicho tratamiento, probablemente debido al impedimento de fenómenos de transporte. A nivel de organela individual, la movilidad y las fluctuaciones de forma de las mitocondrias se reducen significativamente, sugiriendo la presencia de asociaciones locales transitorias entre ellas y los microtúbulos.

Por otro lado, los filamentos de actina y vimentina ayudarían a mantener a las mitocondrias confinadas a la red de microtúbulos, ya que en su ausencia se reduce la co-orientación entre estos dos últimos. Al mismo tiempo, el aumento de la longitud de persistencia aparente de las mitocondrias en células sin F-actina o vimentina también indica que estos dos filamentos del citoesqueleto se comunican mecánicamente con las organelas, tal como se describe en la literatura [10, 119]. Estos puntos de contacto modularían las formas de las mitocondrias, dando lugar a organelas más curvadas.

Además, observamos que las mitocondrias exhiben no sólo mayor longitud en ausencia de F-actina - probablemente debido a una disminución en su tasa de fisión [48]- sino que también incrementan significativamente su movilidad, lo cual es compatible con estudios previos [181].

Por ejemplo, en neuronas de *Drosophila* se ha demostrado que en ausencia de miosina V, un motor asociado a F-actina, se produce un aumento de la longitud y una reducción del movimiento de las mitocondrias [182]. Aunque no hay evidencias de que miosina V se una a mitocondrias en células melanóforas, es sabido que miosina V se expresa en *X. laevis* y se une a melanosomas. Se podría especular que dado que miosina V se une a los filamentos de actina, la interrupción de esta red con latrunculina-B podría tener efectos similares en la línea celular estudiada aquí.

Es interesante observar que los tratamientos con nocodazol y latrunculina-B tienen efectos opuestos sobre las curvaturas y la movilidad de las mitocondrias, lo que pone de manifiesto las funciones complementarias que desempeñan estos filamentos en el comportamiento espacio-temporal de estas organelas. Mientras que los microtúbulos constituyen una malla dinámica para la organización de las mitocondrias, transmitiéndoles impulsos mecánicos, los filamentos de actina y, en menor medida, los de vimentina, restringen su movimiento y, al mismo tiempo, las mantienen en estrecha asociación con la red de microtúbulos.

Como complemento a estas observaciones, encontramos mitocondrias más cortas en las células tratadas con vinblastina en comparación con la condición control. En vista de los reportes de que vinblastina aumenta las curvaturas de los microtúbulos [157, 176], planteamos la hipótesis de que la carga mecánica adicional, debida a la tensión acumulada en los microtúbulos, se transmitiría a las mitocondrias. Como consecuencia, esta tensión mecánica aumentaría la tasa de fisión de las mitocondrias, como se ha informado recientemente [49].

Capítulo 5

Regímenes de movimiento y análisis de fuerzas activas

En los capítulos anteriores hemos detallado la compleja dinámica que exhiben las mitocondrias, las cuales son capaces de cambiar su forma, agitarse térmicamente y trasladarse procesivamente en el citoplasma. Por otro lado, en el Capítulo 4 hemos demostrado que el citoesqueleto juega un rol importante en la regulación de estos procesos. En este capítulo, nos propusimos estudiar los regímenes de movimiento de las mitocondrias (*i.e.* movimiento activo, difusivo y/o confinado) y determinar si las distintas redes del citoesqueleto influyen en los mismos. Por un lado, determinamos las trayectorias de las organelas realizando un análisis global de las mismas mediante el cálculo del Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD) que brinda información sobre el mecanismo asociado al movimiento. Por otro lado, completamos la caracterización desarrollando una nueva herramienta cuantitativa que detecta impulsos mecánicos localizados sobre las organelas, y que denominamos Desplazamiento Cuadrático Acumulado (CSD). Este novedoso método es útil para explorar las fuerzas activas que afectan a las mitocondrias dentro de las células vivas de una forma casi no invasiva.

El trabajo descrito en este capítulo se realizó en colaboración con el Dr. Alejandro Monastera de la Universidad Nacional de General Sarmiento y con la licenciada Azul Brigante, como parte de su trabajo de tesis de licenciatura en el Departamento de Física de esta casa de estudios (FCEyN-UBA) [183]. Los resultados obtenidos dieron lugar a una publicación en la revista *Scientific Reports* 14, 23914 (2024)

5.1. Modelo semiflexible de una mitocondria

En los capítulos anteriores hemos estudiado la dinámica mitocondrial focalizándonos en comprender y caracterizar los cambios morfológicos, las fluctuaciones de curvatura y, por último, su movilidad. Estos son algunos de los distintos procesos que estas organelas experimentan simultáneamente, dando lugar a un comportamiento sumamente complejo. Por este motivo, nos propusimos desarrollar herramientas cuantitativas que nos permitan describir en detalle el movimiento de la organela. Basándonos en las caracterizaciones realizadas en los capítulos anteriores, utilizamos un modelo de filamento semi-flexible para estudiar el comportamiento de las mitocondrias en melanocitos de *X. laevis*.

La teoría de los filamentos flexibles y semiflexibles ha proporcionado herramientas analíticas útiles para describir la dinámica de polímeros y otras estructuras filamentosas en entornos viscosos y viscoelásticos, que incluyen: movimiento del centro de masa, amplitud de los modos de flexión, curvatura, longitud de extremo a extremo y correlaciones espacio-temporales [184–186]. Todas estas cantidades estadísticas dependen en gran medida de las propiedades mecánicas del filamento y del medio, así como de la presencia de fuerzas externas activas (por ejemplo, motores moleculares) o pasivas (por ejemplo, agitación térmica o restricciones). Estos modelos se han probado en muchos sistemas experimentales, como los cilios y los microtúbulos en células vivas [144, 187–190].

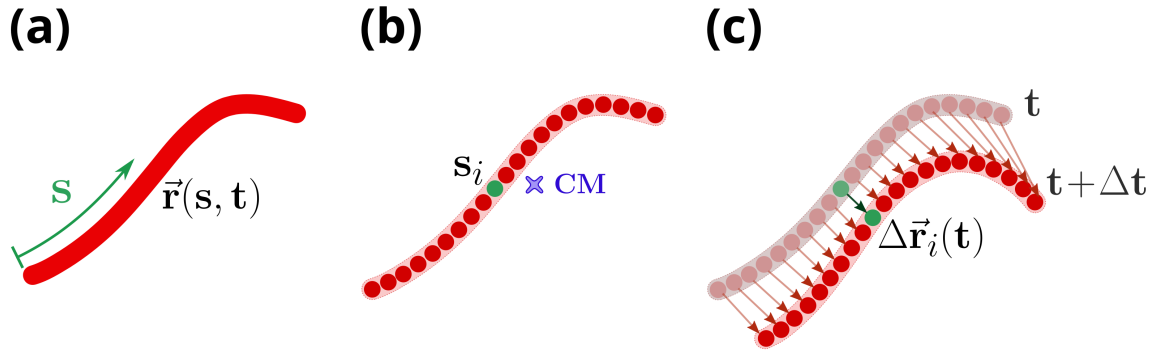


Figura 5.1: **Modelo semiflexible de una mitocondria.** (a) Esquema representativo de una mitocondria filamentosas caracterizada por su forma curvilínea. El perfil de la organela se describe mediante la posición (\vec{r}) de un punto material (s) registrado en un momento determinado (t). (b,c) Cada punto material (*bead*) que constituye el filamento (s_i , verde) se *trackeo* para determinar la trayectoria del centro de masa (CM) y su desplazamiento durante cierto intervalo de tiempo Δt .

La Figura 5.1 esquematiza las variables utilizadas en la descripción de una mitocondria en la aproximación de filamento semiflexible. La forma de la organela está dada por la posición $\vec{r}(s, t)$ de un punto material, que llamamos s , en el tiempo t , con $0 \leq s \leq L$, donde L es la longitud natural del filamento. Idealmente, s y t son continuos, pero en los experimentos (o simulaciones numéricas) la forma se aproxima mediante un conjunto de N_b puntos materiales discretos s_i , llamados cuentas o *beads* (Figura 5.1b). Asimismo, el tiempo se discretiza en función del tiempo de muestreo Δt (*sampling time*) utilizado en los experimentos, pudiéndose expresar los tiempos como $t = j \Delta t$, con j un número natural.

5.1.1. Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD)

Para caracterizar la mecánica y el movimiento de distintas estructuras, una de las herramientas más utilizadas es el cálculo del Desplazamiento Cuadrático Medio, o MSD (*Mean Square Displacement*). El MSD indica la distancia cuadrática media recorrida por una partícula luego de un determinado tiempo τ y, por lo tanto, su dependencia con τ está relacionada con las propiedades del movimiento de la misma [191].

En el caso de un filamento, la trayectoria del centro de masa (CM) contiene información importante sobre el movimiento global del filamento y su interacción con el entorno, dada

por la siguiente ecuación:

$$\vec{\mathbf{r}}_{\text{CM}}(t) = \frac{1}{L} \int_0^L \vec{\mathbf{r}}(s, t) ds \approx \frac{1}{N_b} \sum_{i=1}^{N_b} \vec{\mathbf{r}}(s_i, t) \quad (5.1)$$

Entonces, para un filamento moviéndose en dos dimensiones, podemos calcular el MSD del CM según:

$$\text{MSD}(\tau) = \langle (\vec{\mathbf{r}}_{\text{CM}}(t + \tau) - \vec{\mathbf{r}}_{\text{CM}}(t))^2 \rangle \quad (5.2)$$

donde τ es el desfase temporal y los corchetes indican un promedio temporal en t .

Normalmente, el MSD se ajusta mediante una ley de potencias [192] en función del desfase temporal:

$$\text{MSD}(\tau) = D^* \tau^\alpha. \quad (5.3)$$

donde D^* y α son el coeficiente de difusión generalizado y el exponente de difusión anómala, respectivamente.

Mientras que D^* representa una tasa de movilidad, el exponente α constituye un parámetro global clave que indica la direccionalidad general de una trayectoria. Además, está relacionado con el equilibrio entre las fuerzas activas y pasivas que actúan sobre la organela. En ausencia de procesos activos, como en las células sin ATP [193] o en entornos superpoblados [194–196], este exponente tomará valores inferiores a 1, característico de fenómenos subdifusivos. Por el contrario, las organelas impulsadas por fuerzas activas exhiben valores de α que oscilan entre 1.2-1.5 [142, 197–199] correspondientes a fenómenos superdifusivos. Por último, para un filamento libre en un medio viscoso, se espera un movimiento difusivo ($\alpha = 1$). En este caso, el coeficiente de difusión D^* depende inversamente de la viscosidad del medio y de la longitud del filamento [184]. Estos regímenes de movimiento se ilustran en la Figura 5.2.

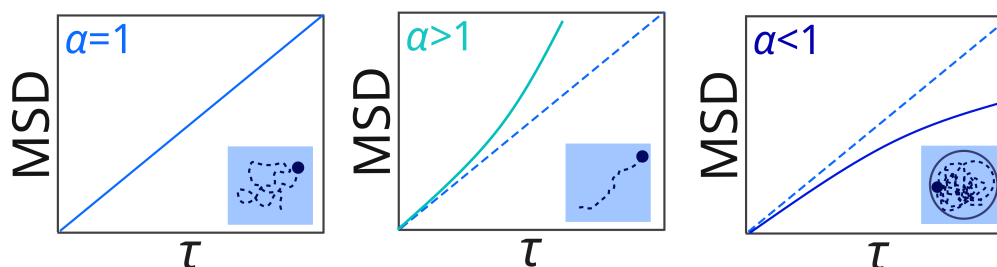


Figura 5.2: **Esquema del desplazamiento cuadrático medio (MSD) para diferentes regímenes de movimiento.** Dependencia del MSD con el desfase temporal (τ) para una partícula que presenta movimiento difusivo (a), superdifusivo (b), o subdifusivo (c). Los recuadros en cada panel ilustran el movimiento del centro de masa de la partícula.

En este sentido, analizar las curvas del MSD de las mitocondrias nos permitirá determinar los distintos regímenes de movimiento a los que están sujetas y evaluar el rol del citoesqueleto como potenciador o atenuante de las fuerzas actuantes sobre ellas.

5.1.2. Desplazamiento Cuadrático Acumulado (CSD)

Si bien la trayectoria del centro de masa nos puede brindar información muy precisa sobre el movimiento de una partícula esférica, un filamento podría deformarse de tal manera que su centro de masa permaneciera inmóvil, pero su forma fuera completamente diferente después de un cierto tiempo. Por lo tanto, en estos casos resulta más informativo analizar el desplazamiento de los puntos materiales individuales del filamento después de un lapso de tiempo Δt (ver Figura 5.1c):

$$\Delta \vec{r}(s_i, t, \Delta t) = \vec{r}(s_i, t + \Delta t) - \vec{r}(s_i, t) \quad (5.4)$$

Ésta es una magnitud muy fluctuante, por lo que es conveniente realizar diferentes promedios para extraer información relevante. En particular, consideramos la media del cuadrado de los desplazamientos a lo largo del filamento en función del tiempo:

$$K(t) = \frac{1}{L} \int_0^L [\Delta \vec{r}(s, t, \Delta t)]^2 ds = \frac{1}{N_b} \sum_{i=1}^{N_b} [\Delta \vec{r}_i(t)]^2 \quad (5.5)$$

Esta cantidad está relacionada con el área media barrida por cada punto material del filamento en un intervalo de tiempo Δt . Cuanto mayor sea la fluctuación de la forma del filamento debido a las fuerzas estocásticas térmicas (y no térmicas), mayor será el valor de K , independientemente del movimiento del centro de masa. En la ecuación 5.5, mantenemos implícita la dependencia de K y $\Delta \mathbf{r}$ con Δt , ya que éste suele ser el tiempo de muestreo del experimento.

Por razones que se aclararán más adelante, es útil definir también el Desplazamiento Cuadrático Acumulado – o CSD (*Cumulative Square Displacement*)– como:

$$\text{CSD}(t) = \int_0^t K(t) dt = \sum_{j=1}^{t/\Delta t} K(j\Delta t) \quad (5.6)$$

Como el CSD es la suma de cantidades positivas, crece monótonamente con el tiempo.

Como se describirá a continuación, estudiar la evolución del CSD en el tiempo nos permitirá obtener información de los impulsos mecánicos actuantes sobre las mitocondrias.

5.1.3. Simulaciones numéricas

Para explorar cómo estas dos magnitudes, el MSD y el CSD, pueden revelar aspectos de la dinámica subyacente al movimiento de las mitocondrias filamentosas, realizamos simulaciones numéricas de un sistema modelo simple. El objetivo de estas simulaciones no es reproducir el sistema real, sino validar las herramientas cuantitativas de análisis en un contexto controlado.

Adaptamos un modelo muy conocido en la literatura de filamentos semiflexibles que se denomina (*Worm-Like Chain Model*) [190, 200] para describir la evolución temporal del filamento, utilizando como parámetros la caracterización que hemos hecho de las mitocondrias en los capítulos anteriores, por ejemplo su L_p^* . Brevemente, consideramos un filamento compuesto por N_b *beads* acoplados, inmersos en un medio viscoso homogéneo, y sometido a ruido térmico (ver [183] y [201] para más detalles). La Figura 5.3 muestra un esquema de este

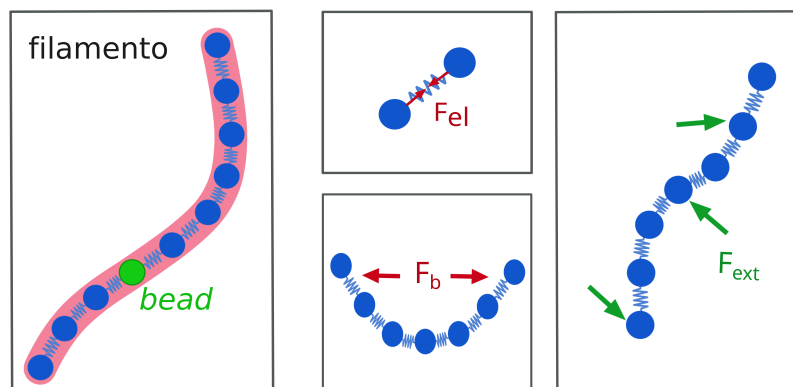


Figura 5.3: **Esquema del Worm-like Chain Model** La organela se conforma por un conjunto discreto de *beads* acoplados elásticamente (F_{el}), sujetos a fuerzas restitutivas F_b y fuerzas externas (F_{ext}).

modelo con las fuerzas intervinientes. Se pueden incluir fuerzas activas externas, modeladas como impulsos puntuales que actúan sobre *beads* individuales siguiendo una dinámica temporal estocástica.

La Figura 5.4a muestra dos configuraciones representativas de filamentos obtenidas a partir de simulaciones en ausencia o presencia de fuerzas activas (panel superior e inferior, respectivamente). En primer lugar, recuperamos las trayectorias del centro de masa a partir de las formas simuladas y calculamos el MSD (Figura 5.4b). Los resultados muestran un comportamiento difusivo en ausencia de fuerzas activas, y un régimen superdifusivo en presencia de las mismas, tal y como predicen estudios previos [184].

Además, calculamos K y CSD a partir de las coordenadas de los filamentos, que se muestran en la Figura 5.4c. Curiosamente, el comportamiento de K para ambas simulaciones es similar (*i.e.* sus medianas no son significativamente diferentes), excepto por la presencia de unos pocos puntos de datos atípicos en las simulaciones con fuerzas activas. El efecto de estos valores extremos es más evidente en el CSD, donde se observan saltos sobre el comportamiento lineal obtenido en ausencia de fuerzas activas. Aún más relevante, la aparición de estos eventos se correlaciona con los períodos en los que estas fuerzas se activan, proporcionando así una herramienta potencialmente útil para descubrir el patrón temporal de las fuerzas activas que actúan sobre el filamento.

Estos resultados ilustran que ambas magnitudes, MSD y CSD, describen aspectos diferentes pero complementarios del movimiento de un filamento semiflexible en presencia de fuerzas activas. En las próximas secciones, evaluaremos su comportamiento con datos experimentales obtenidos a partir del *tracking* de mitocondrias en células vivas XTP.

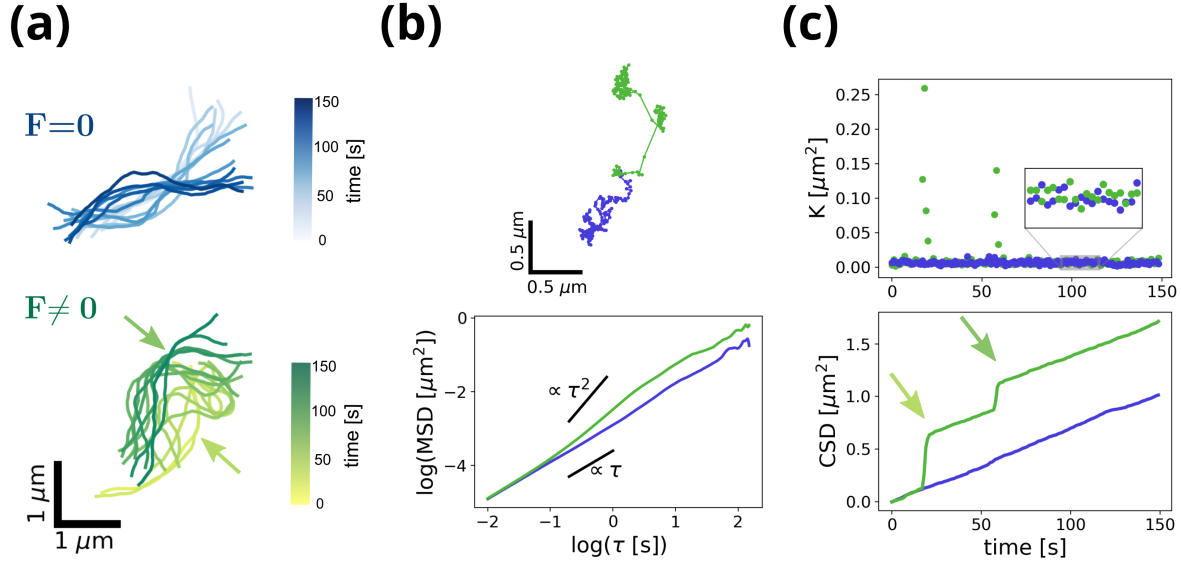


Figura 5.4: **Simulaciones numéricas del comportamiento de un filamento en ausencia/presencia de fuerzas activas** (a) Evolución temporal de filamentos semiflexibles simulados en ausencia ($F=0$, azul; panel superior) o presencia ($F \neq 0$, verde; panel inferior) de fuerzas activas. Las flechas indican los puntos de aplicación de la fuerza en distintos momentos. (b) Trayectorias del CM correspondientes a los filamentos mostrados en (a) y dependencia del MSD con τ para cada uno de ellos (panel superior e inferior, respectivamente). (c) Evolución temporal de los valores de K y del CSD obtenidos para los filamentos indicados en (a). En presencia de fuerzas activas (conjunto de datos verde), las fluctuaciones de K a lo largo del tiempo presentan valores atípicos que se corresponden con los saltos (flechas) mostrados en el gráfico CSD, coincidiendo con el momento de aplicación de la fuerza. Figura adaptada de [201]

5.2. MSD y diferentes regímenes de movimiento de las mitocondrias

En esta sección analizamos las curvas de MSD de mitocondrias en células vivas. La Figura 5.5a muestra un ejemplo del movimiento de una mitocondria y su forma recuperada con JFilament (ver VideoS1). Utilizamos los *trackings* de organelas individuales (Sección 2.3.1) para obtener las trayectorias de los CM (ecuación 5.1).

Calculamos el MSD a partir de las coordenadas del CM de las trayectorias según la ecuación 5.2. En este caso, tanto t como τ son múltiplos del tiempo de muestreo Δt .

Luego, los datos del MSD se ajustaron con un modelo de difusión anómala similar al propuesto en trabajos anteriores [184, 186]:

$$\text{MSD}(\tau) = \text{MSD}_0 + D^* \tau^\alpha \quad (5.7)$$

donde MSD_0 es el MSD residual dado por el error de *tracking*, que fue inferior a 60 nm. Para evitar imprecisiones causadas por la dispersión estadística al calcular el MSD, sólo se utilizaron para el ajuste los datos con valores de τ inferiores al 15% del tiempo total de la

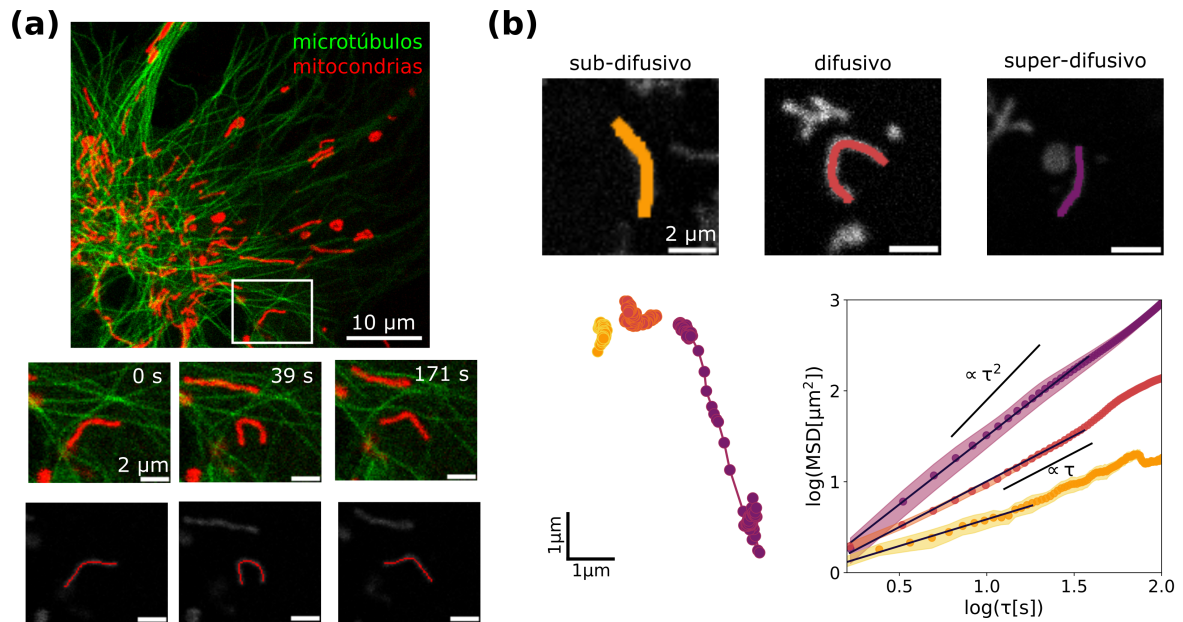


Figura 5.5: **Diferentes regímenes de movimiento mitocondrial** (a) Imagen confocal representativa de mitocondria en una célula, ilustrando su movimiento (paneles inferiores) - VideoS1 (b) Ejemplo de tres mitocondrias que experimentan un comportamiento subdifusivo (naranja, $\alpha < 1$, VideoS2), difusivo (rojo oscuro, $\alpha \sim 1$, VideoS3) y superdifusivo (púrpura, $\alpha > 1$, VideoS4) (panel superior). Las trayectorias del CM correspondientes a estas organelas y la dependencia del MSD con τ para cada una de ellas se muestran en el panel inferior. Figura adaptada de [201].

trayectoria [202].

La Figura 5.5b muestra tres ejemplos representativos de mitocondrias que ilustran comportamientos superdifusivos ($\alpha > 1$), difusivos ($\alpha = 1$) y subdifusivos ($\alpha < 1$), con sus respectivas trayectorias del CM (ver VideoS2-S4). El régimen superdifusivo indica la presencia de fuerzas activas [184], mientras que la subdifusión podría deberse al confinamiento de las organelas en el citoplasma [186].

Teniendo en cuenta que las distintas redes del citoesqueleto tienen un efecto directo sobre la movilidad y fluctuaciones de la forma y curvatura de las mitocondrias (Capítulo 5), nos propusimos estudiar si las mismas influyen en los regímenes de movimiento observados.

La Figura 5.6 muestra las curvas del MSD recuperadas en células control y los valores de α y D^* obtenidos para cada tratamiento realizado. Observamos una amplia dispersión de los diferentes regímenes de movimiento en las trayectorias, capturada por la amplia distribución de los parámetros obtenidos.

En todas las condiciones experimentales evaluadas, la distribución de α obtenida muestra una dispersión entre 0 y 2, con una mayor densidad de puntos en torno a 1. En particular, se observa que la distribución obtenida en la condición control resulta más simétrica en comparación, por ejemplo, con el caso LAT. Para analizar estas diferencias de forma cuantitativa, utilizamos un modelo de mezcla gaussiana (ver detalles en la Sección 2.5.3). Probamos modelos con 1 y 2 modos (M). La Figura 5.6d muestra la distribución de α y los modelos con

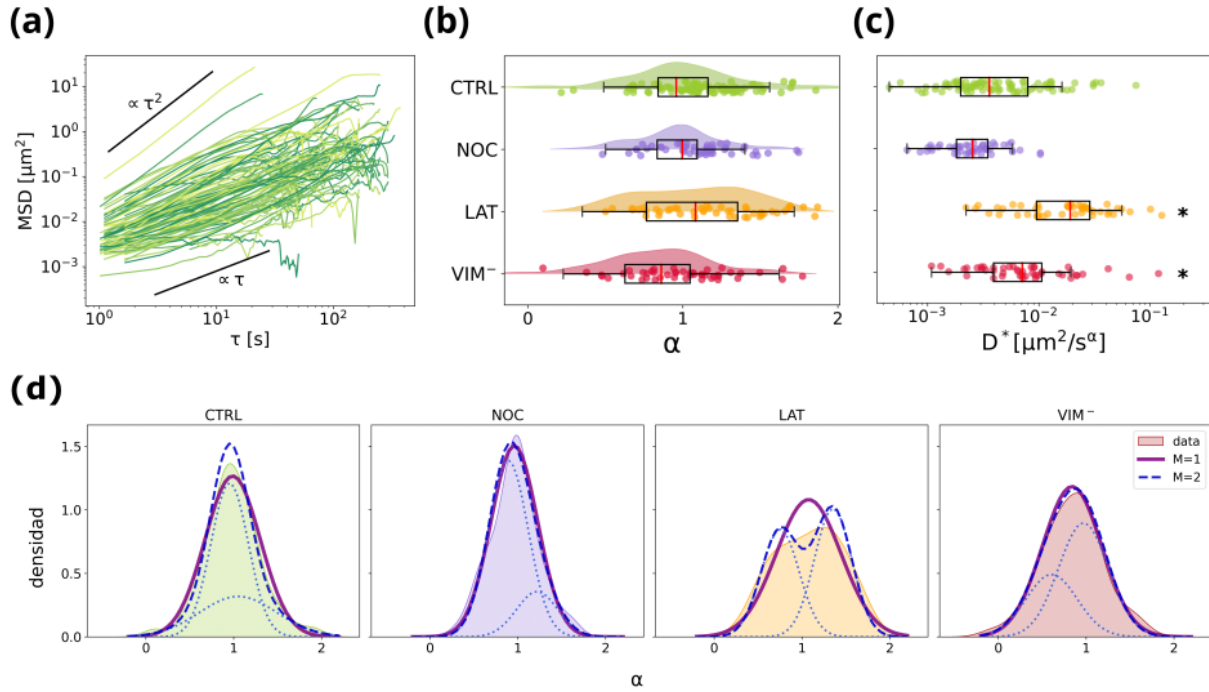


Figura 5.6: **Análisis del MSD para mitocondrias.** (a) Curvas MSD obtenidas para mitocondrias dentro de melanocitos en condición control. (b) Distribución de los valores α registrados para las mitocondrias en células CTRL (verde, N=89), NOC (violeta, N=49), LAT (naranja, N=48) y VIM⁻ (rojo, N=46). (c) Distribución del coeficiente de difusión generalizado (D^*) obtenido para cada condición experimental. (d) Análisis del exponente de difusión anómala (α) considerando una mezcla de funciones gaussianas con uno ($M=1$) o dos modos ($M=2$, líneas punteadas).

$M = 1$ y 2 que mejor se ajustan a los datos. Para seleccionar qué modelo describía mejor cada distribución experimental, pedimos que cada fracción poblacional (para el caso $M = 2$) fuera superior a 0.1 y que los intervalos de confianza de los valores medios de los modos no se solaparan.

Comprobamos que todas las condiciones, excepto el tratamiento con latrunculina-B, podían ajustarse satisfactoriamente a una única distribución normal ($M = 1$) con un valor medio en torno a $\alpha = 1$. El tratamiento con NOC no tuvo un efecto marcado en la distribución de los exponentes de difusión anómala, mientras que en ausencia de vimentina resultó en valores de α inferiores a los observados en las células control (ver Tabla 5.1), es decir, un comportamiento mayormente subdifusivo. Esta reducción de la direccionalidad de las trayectorias en ausencia de la red de vimentina podría interpretarse considerando que estos filamentos pueden actuar como una malla física que confina a las organelas cerca de los microtúbulos. Esta proximidad aumentaría el tiempo de permanencia de las mitocondrias cerca de los microtúbulos, favoreciendo así la unión de los motores que transportan la organela a lo largo de estos filamentos y potenciando el transporte activo [58, 142, 203] en las células control.

Por otro lado, para las células tratadas con latrunculina-B, encontramos que los datos presentaban una distribución bimodal ($M = 2$), indicando la presencia de dos poblaciones diferentes, en particular una significativamente superdifusiva ($\alpha \sim 1.3$, Tabla 5.1). Hipoteti-

zamos que este aumento de la población superdifusiva podría atribuirse a un aumento de la frecuencia y/o intensidad de las fuerzas activas ejercidas sobre las mitocondrias en ausencia de F-actina, como por ejemplo los impulsos mecánicos transmitidos por los microtúbulos o el aumento del transporte a lo largo de estos filamentos [181].

Cond.	α_1	σ	f_1	α_2	σ	f_2
CTRL	1.00 ± 0.03	0.3 ± 0.02	1	-	-	-
NOC	0.96 ± 0.04	0.3 ± 0.02	1	-	-	-
LAT	$0.76 \pm 0.05^*$	0.4 ± 0.01	0.46 ± 0.07	$1.36 \pm 0.06^*$	0.4 ± 0.01	0.54 ± 0.07
VIM ⁻	$0.84 \pm 0.04^*$	0.3 ± 0.02	1	-	-	-

Tabla 5.1: **Parámetros del modelo de mezcla gaussiana para el exponente de difusión anómala.** α_i y σ corresponden a la posición media y la desviación estándar de la gaussiana i , respectivamente. f_i es la fracción que representa la contribución de la gaussiana i a la distribución global.

En cuanto a los coeficientes de difusión generalizados (D^*), obtuvimos distribuciones asimétricas y colas pesadas tendientes a valores altos (Figura 5.6c). La condición NOC presentó una menor variabilidad que CTRL, mientras que LAT exhibió una mayor dispersión.

Por último, nos propusimos explorar en detalle los mecanismos subyacentes a las diferencias en el movimiento de las mitocondrias. Para ello, analizamos aquellos datos que mostraron regímenes difusivos ($\alpha \simeq 1$) y comparamos los valores del coeficiente de difusión aparente (D_{ap}) en las diferentes condiciones experimentales. Curiosamente, aunque se observaron diferencias no significativas en las distribuciones de α y D^* entre las células tratadas con NOC y las células control (Figura 5.6b y c), los valores de D_{ap} de las mitocondrias fueron significativamente inferiores en esa condición (Tabla 5.2). Por el contrario, LAT mostró un aumento de 5 veces en los coeficientes de difusión aparente.

Los resultados obtenidos refuerzan nuestras conclusiones previas (Sección 4.4) que señalaban que los microtúbulos y F-actina tienen efectos contrarios sobre la movilidad de las mitocondrias. La menor movilidad observada cuando los microtúbulos están parcialmente depolimerizados sugiere una disminución de las fuerzas activas que actúan sobre las mitocondrias, lo que apoya resultados anteriores que muestran que los impulsos mecánicos se transmiten principalmente a estas organelas por la red de microtúbulos [10, 11, 87]. Por el contrario, las células tratadas con latrunculina-B mostraron mayores valores del coeficiente de difusión, lo que puede asociarse a un aumento de las fuerzas activas, sugiriendo que F-actina confinaría a las mitocondrias y amortiguaría los estímulos mecánicos.

Cond.	D_{ap} ($10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$)	N
CTRL	43 ± 8	27
NOC	$18 \pm 3^*$	18
LAT	$250 \pm 50^*$	9
VIM ⁻	40 ± 10	12

Tabla 5.2: **Coefficiente de difusión aparente**(D_{ap}). N es el número de datos considerados para cada condición, los cuales cumplen que $0.9 \leq \alpha \leq 1.1$.

5.3. CSD y la detección de eventos de fuerzas activas

Aunque el análisis del MSD proporciona información valiosa sobre los regímenes de movimiento global de las mitocondrias, estos resultados no permiten inferir en detalle las fuerzas actuantes sobre estas organelas. Es por ello que proponemos implementar el CSD como herramienta complementaria al MSD.

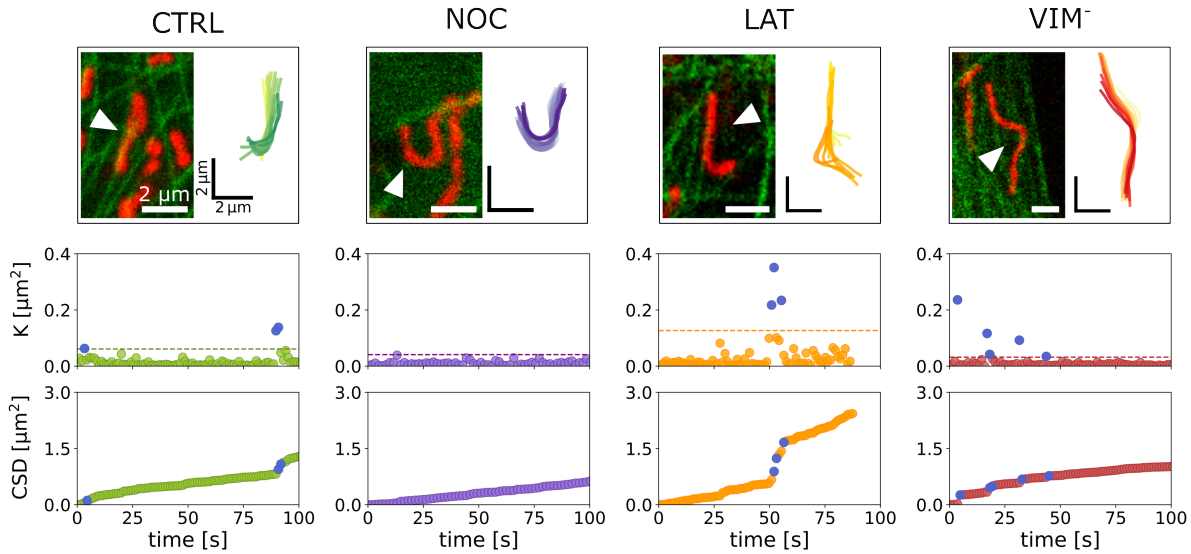


Figura 5.7: **Evolución temporal de los desplazamientos cuadrados K y el CSD para mitocondrias en células XTP** Para cada condición experimental, se muestra un ejemplo de mitocondria y la evolución de su forma (paneles superiores, VideoS5-S8), los valores K y la dependencia del CSD con el tiempo (paneles inferiores). Los valores atípicos de K y los saltos correspondientes en los gráficos CSD se muestran en azul.

La Figura 5.7a muestra el curso temporal de los desplazamientos cuadrados K y el CSD de mitocondrias representativas correspondientes a las cuatro condiciones experimentales exploradas (véanse VideoS5-S8). De forma similar a lo observado en las simulaciones numéricas, los valores de K fluctúan alrededor de un valor medio, excepto por unos pocos valores atípicos. Estos valores extremos se observan como saltos en las curvas del CSD. En consonancia con

los resultados encontrados en los ejemplos numéricos, proponemos que estos desplazamientos se originan por grandes impulsos mecánicos, *i.e.* “patadas”, que actúan sobre las organelas.

Para explorar esta posibilidad, y aprovechando que la línea celular utilizada expresa microtúbulos fluorescentes – EGFP-XTP [73, 149] –, examinamos las películas de mitocondrias e intentamos identificar momentos en los que una organela se deforma considerablemente o es transportada a lo largo de estos filamentos. En la mayoría de los casos, estos cambios se correlacionan con saltos en las curvas CSD. Un ejemplo se muestra en la Figura 5.8a y VideoS4. Se observa que para tiempos $t < 100$ s, la mitocondria fluctúa ligeramente, pero entre los tiempos 100 s y 150 s, se producen rápidos desplazamientos sucesivos de su posición, lo que se refleja en un desplazamiento vertical de la curva CSD. Luego, la organela vuelve al régimen de “cámara lenta”. Dado que el video es nuestra única fuente de información, no es posible determinar el origen de la fuerza motriz, pero una clara posibilidad es que sean motores moleculares los que la impulsan. Independientemente del origen de la perturbación, es evidente que existe un cambio de régimen del movimiento estacionario anterior a la traslación de la mitocondria, lo que enfatiza la viabilidad de utilizar estos eventos como detectores de fuerzas activas.

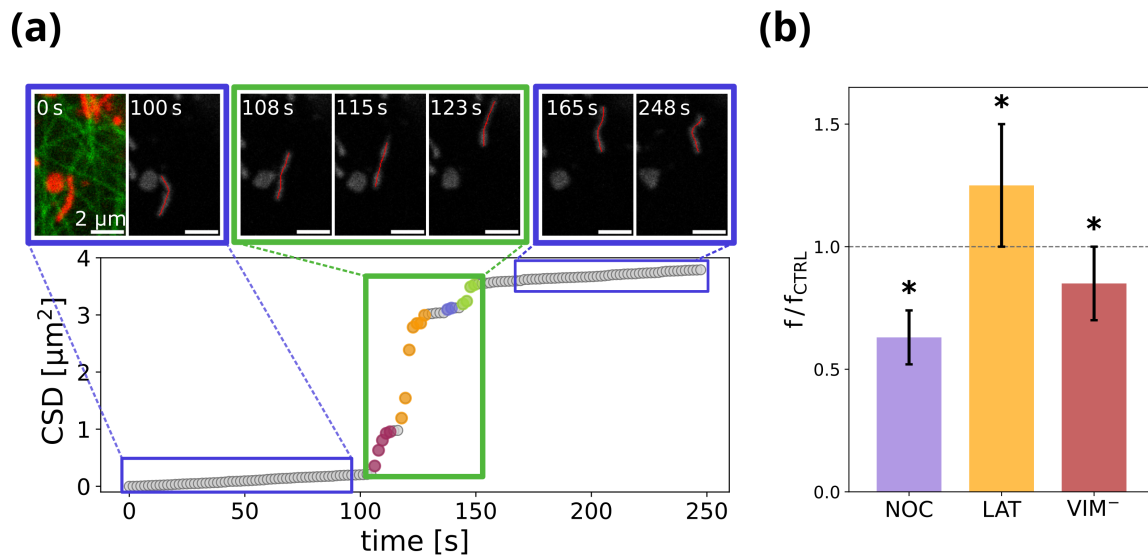


Figura 5.8: **Cuantificación de las fuerzas intracelulares implicadas en la dinámica mitocondrial.** (a) Correlación de los saltos CSD y las fuerzas activas ejercidas sobre las mitocondrias. Imágenes representativas de una mitocondria siendo transportada activamente (panel superior, VideoS4). Cuando la organela experimenta un desplazamiento longitudinal significativo, se registra un salto en el gráfico CSD (panel inferior). El código de colores en el salto indica el número de eventos diferentes detectados por el algoritmo. (b) Frecuencia media de eventos obtenida a partir del análisis CSD para cada condición experimental, f , en relación con CTRL, f_{CTRL} , calculada como se explica en el texto.

Para realizar un estudio sistemático de los datos, desarrollamos un algoritmo para detectar automáticamente valores extremos (K^*) a partir de la distribución de K en cada trayectoria, y definir eventos únicos basados en estos datos. Brevemente, utilizamos un criterio de umbral: cualquier valor K mayor que un valor umbral K_0 se considera un valor atípico, con

$K_0 = Q3 + q \text{ IQR}$. $Q3$ e IQR son el tercer cuartil de la distribución de K y el rango intercuartil, respectivamente, y q es un número positivo. Este umbral K_0 se puede observar en la distribución de K de la Figura 5.7 como una línea punteada. Para determinar la mejor elección de q , utilizamos simulaciones numéricas en las que se conocían los patrones de fuerza y elegimos el que mejor recuperaba los eventos. Sobre la base de estos análisis, se eligió un valor de $q = 4$ para la determinación de K_0 . Los detalles se describen en [183, 201].

Una vez obtenidos los valores atípicos de una trayectoria dada, la determinación de los eventos aislados se realiza agrupando temporalmente los *outliers* que se suponen causados por la acción de una misma fuerza: aquellos separados por un tiempo Δt o $2\Delta t$ se consideran parte de un mismo evento. Luego, el número de eventos por trayectoria puede calcularse directamente. Para reducir los errores estadísticos, calculamos la frecuencia de eventos, f , para cada condición experimental como la suma de todos los eventos de cada trayectoria dividida por la suma de la duración de todas las trayectorias (Tabla 5.3). Se evaluó la significancia estadística de los resultados siguiendo un procedimiento de *bootstrap* con $N = 10^4$ réplicas con reposición [204](ver Sección 2.5). Utilizamos la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar las diferencias entre cada tratamiento y la condición control. El código que calcula el CSD y detecta eventos, junto con un ejemplo de una mitocondria *trackeada*, se puede encontrar en este repositorio público.

Dado que el número de eventos detectados es sensible al tiempo de muestreo de los datos, como se mencionó anteriormente, la Figura 5.8b muestra la frecuencia media de cada condición experimental en relación con la control obtenida utilizando el mismo tiempo de muestreo, f/f_{CTRL} .

Cond.	Δt (s)	Frecuencia (min^{-1})
CTRL ₁	1.66	1.0 ± 0.1
NOC	1.64	$0.62 \pm 0.05^*$
CTRL ₂	1.1	1.3 ± 0.1
LAT	1.1	$1.6 \pm 0.2^*$
VIM ⁻	1.2	$1.1 \pm 0.1^*$

Tabla 5.3: **Frecuencia de eventos para las distintas condiciones experimentales.** CTRL₁ son experimentos control para la condición NOC, mientras que CTRL₂ son experimentos control para las condiciones LAT y VIM⁻.

Curiosamente, las tres redes del citoesqueleto influyen en el número de impulsos activos que sufren las mitocondrias. Encontramos que la frecuencia de eventos era de alrededor de 1 min^{-1} para las células control y que este valor disminuye $\sim 40\%$ bajo tratamiento con nocodazol. Además, la frecuencia también se redujo ligeramente en las células sin vimentina. Por el contrario, la ausencia de F-actina revela un aumento del 25% en la frecuencia de eventos, lo que refuerza nuestras conclusiones anteriores de que estos filamentos protegerían a las mitocondrias de los estímulos mecánicos.

Además, exploramos las fluctuaciones estacionarias de K . Calculamos la mediana de $K(t)$ para cada trayectoria y analizamos su distribución en las diferentes condiciones experimentales (Figura 5.9). Dado que los valores atípicos (K^*) son eventos raros, la mediana representa una estimación robusta del valor estacionario de $K(t)$. También calculamos la media de

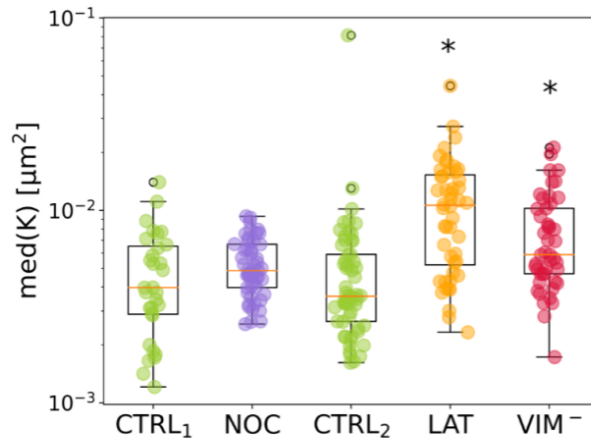


Figura 5.9: **Mediana de valores estacionarios de K .** CTRL₁ son experimentos control para la condición NOC, mientras que CTRL₂ son experimentos control para las condiciones LAT y VIM⁻.

$K_s = K - K^*$, y los resultados fueron consistentes con los obtenidos para la mediana. En particular, encontramos un desplazamiento hacia valores mayores de K para las células tratadas con latrunculina B y para las que expresan la mutante de vimentina. Esto sugiere que el micro-entorno de las mitocondrias en el citoplasma cambia al eliminar las redes de actina o vimentina, es decir que fluctúan más libremente.

En conjunto, estos resultados van en la misma dirección que los obtenidos con el análisis del MSD y apoyan la hipótesis de que los microtúbulos son la principal fuente de estimulación mecánica para las mitocondrias, mientras que F-actina actúa como absorbente/amortiguador de fuerza. Además, la reducción de eventos activos en la ausencia de vimentina refuerza la noción de que estos filamentos intermedios confinan a las mitocondrias a permanecer en estrecha proximidad a los microtúbulos, favoreciendo así su contacto mecánico.

Conclusiones

En este capítulo, empleamos dos herramientas estadísticas para investigar la dinámica de las mitocondrias filamentosas y sus interacciones con el citoesqueleto en células vivas. Además, desarrollamos una metodología novedosa para identificar y cuantificar el patrón de fuerzas activas ejercidas sobre estas organelas.

En primer lugar, se recuperaron las trayectorias del centro de masa mitocondrial y se calcularon los MSD individuales en función del desfase temporal τ . Se ajustó un modelo de difusión generalizado a los datos para explorar los diferentes regímenes de movimiento para las organelas (Figura 5.6). Por un lado, observamos que los exponentes de difusión anómala se distribuyeron ampliamente alrededor de $\alpha = 1$, indicando que, en general, las fuerzas que

actúan sobre las organelas están equilibradas [205]. Sin embargo, también se encontraron poblaciones subdifusivas y superdifusivas en algunas condiciones exploradas, lo que sugiere un desequilibrio entre las fuerzas activas y pasivas en esos casos. Este desequilibrio fue más notable en el caso de las células tratadas con latrunculina-B, donde domina la población superdifusiva, lo que indica la prevalencia de fuerzas activas dirigidas que actúan sobre las mitocondrias en ausencia de filamentos de actina.

Por otro lado, y teniendo en cuenta que las mitocondrias se deforman y agitan bajo la influencia de diferentes fuerzas, no sólo por la acción de los motores moleculares, nos propusimos estudiar la dinámica de todos los puntos materiales de la organela para obtener información sobre otras fuentes de deformación y así comprender mejor sus causas. Entonces, de forma complementaria al análisis del MSD, desarrollamos otra herramienta cuantitativa: el Desplazamiento Cuadrático Acumulado (CSD), que permite detectar cambios instantáneos en el movimiento mitocondrial que destaquen de su comportamiento en estado estacionario. Utilizamos simulaciones numéricas de un filamento semiflexible para poner a punto esta nueva técnica y, con la ayuda de un algoritmo automatizado, identificamos el inicio de los eventos de fuerza activa a partir del análisis del CSD. Encontramos que en las células con microtúbulos parcialmente depolimerizados o en ausencia de filamentos de vimentina, la frecuencia de eventos activos se reduce con respecto a las células control. Por el contrario, la ausencia de F-actina dio lugar a un aumento del número de eventos por trayectoria.

Nuestro estudio demuestra que tanto el MSD como el CSD sirven como valiosas herramientas estadísticas para obtener información cuantitativa sobre la mecanobiología de las mitocondrias y el rol del citoesqueleto como regulador/fuente de fuerzas activas.

Capítulo 6

Transporte activo de mitocondrias

Las células poseen un sistema activo de transporte que les permite movilizar los distintos componentes celulares (*e.g.* organelas, vesículas, macromoléculas) con alta presión espacio-temporal. Este sistema está integrado por filamentos del citoesqueleto (*i.e.* microtúbulos y F-actina) y los motores moleculares asociados (*i.e.* dineína/kinesina y miosina, respectivamente). En este capítulo, nos focalizaremos en caracterizar el transporte bidireccional de mitocondrias conducido a través de microtúbulos. En particular, abordaremos esta temática a nivel de modelado numérico que compararemos con resultados experimentales previos.

Por un lado, nos propusimos desarrollar un modelo unidimensional aplicable al transporte de organelas extensas y flexibles como las mitocondrias. A diferencia de los reportados en la literatura (que refieren a cargos rígidos y esféricos), este modelo permite extender el análisis a cargos complejos, permitiendo explorar la distribución de los motores en su superficie y su efecto en la remodelación de los mismos. Mediante simulaciones computacionales estudiamos la acción de distintas configuraciones de equipos de motores, centrándonos en las propiedades de transporte observables en los experimentos con mitocondrias, como la velocidad media y la variación de longitud. En este sentido, podemos utilizarlo para obtener una interpretación preliminar de las deformaciones de las mitocondrias observadas en células vivas.

Por otro lado, nos propusimos evaluar el rol de las fuerzas ejercidas por los motores moleculares en la dinámica de las mitocondrias. Para ello, realizamos experimentos preliminares empleando técnicas optogenéticas que permiten reclutar motores exógenos (dineína y kinesina) a la membrana externa de las organelas. A partir de las imágenes registradas, pudimos iniciar la puesta a punto, tanto a nivel experimental como metodológica, para abordar esta temática.

El desarrollo numérico de este capítulo comenzó como parte de mi trabajo de tesis de licenciatura en el Departamento de Física de esta casa de estudios (FCEyN-UBA) [206]. Los resultados obtenidos dieron lugar a una publicación en la revista *Physical Review E* 101, 062416 (2020). Los resultados preliminares obtenidos usando técnicas optogenéticas se realizaron en el laboratorio de la Dra. Suliana Manley en la École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) en Suiza, en el marco de una beca de The Company of Biologists para comenzar colaboraciones científicas, en el año 2024.

6.1. Transporte activo de mitocondrias en melanocitos de *X. laevis*

En trabajos previos del grupo, se estudió el transporte bidireccional conducido por los motores moleculares dineína y kinesina a lo largo de los microtúbulos en melanocitos de *X. laevis* [100]. Para ello, se seleccionaron de las películas mitocondrias elongadas y que estuvieran transportándose de manera dirigida a lo largo de dichos filamentos. Utilizando herramientas desarrolladas en el grupo, se determinó, de manera simultánea, la trayectoria del centroide de cada mitocondria y la longitud de la organela.

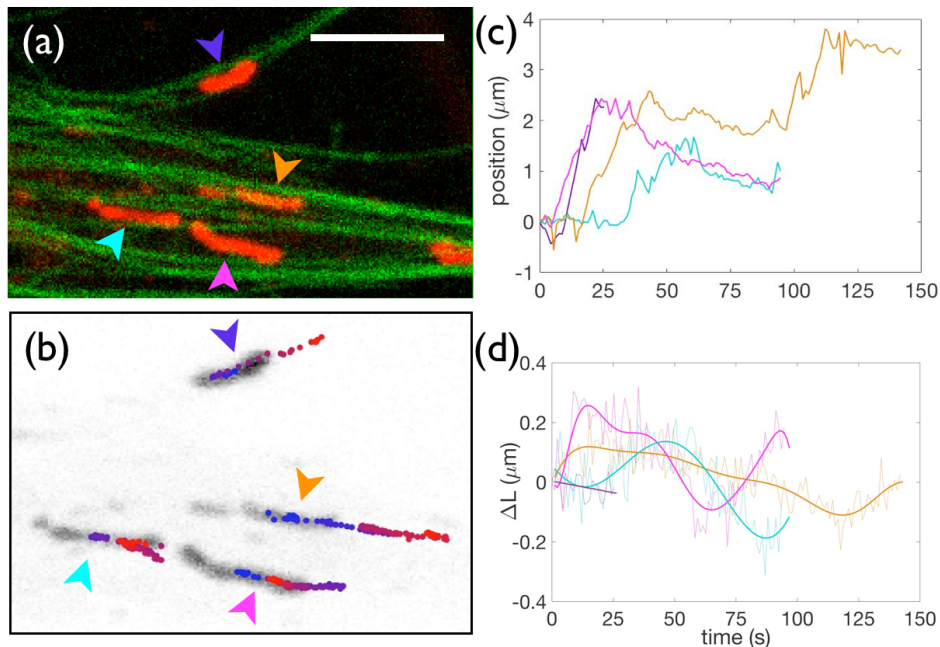


Figura 6.1: **Transporte de mitocondrias dependiente de microtúbulos.** (a) Imagen registrada por microscopía confocal que muestra microtúbulos (verde) y mitocondrias (rojo) en una célula melanófora de *X. laevis*. Barra de escala = 5 μm . (b) Imagen en escala de grises del ejemplo mostrado en (a) superponiendo las trayectorias del dentro de masa (CM) recuperadas de las mitocondrias indicadas con las puntas de flecha. La escala de colores del azul al rojo en las trayectorias indica la evolución temporal. (c) Posición del CM recuperada a lo largo de la dirección longitudinal y (d) variación de longitud (ΔL) para las 4 mitocondrias mostradas en (b). Las líneas sólidas en (d) corresponden a un suavizado de los datos para facilitar la visualización ($\Delta L = L - L_o$). Figura adaptada de [101]

La Figura 6.1a muestra ejemplos de estos análisis. Podemos observar que las trayectorias individuales muestran el típico movimiento bidireccional observado para las mitocondrias y otras organelas y vesículas que se mueven a lo largo de los microtúbulos [76] e incluyen períodos de movimiento procesivo y frecuentes cambios de dirección (Figura 6.1c). La Figura 6.1d muestra que las mitocondrias pueden retraerse, extenderse o conservar su longitud al ser transportadas.

Los principales resultados de ese trabajo [100] pueden resumirse en los siguientes puntos:

- La deformación depende de la dirección de transporte: el 80% de las mitocondrias se retraen al ser transportadas por dineína en dirección al extremo negativo de los microtúbulos (*i.e.* transporte retrogrado) mientras que el 70% no presentan variaciones de longitud cuando son conducidas por kinesina hacia el extremo positivo de dichos filamentos (*i.e.* transporte anterógrado).
- Las velocidades de las mitocondrias que se extienden durante el transporte son menores que las velocidades de aquellas organelas que conservan su tamaño.
- La variación en la longitud de las mitocondrias ronda el 20-30% de su longitud inicial.

Con el fin de interpretar estos resultados, desarrollamos el modelo que se describe a continuación.

6.2. Descripción del modelo numérico

El modelo se basa en aquellos previamente descritos en la literatura sobre el transporte intracelular [207, 208] en los que el cargo (*i.e.* vesícula u organela) es impulsado por motores que se unen simultáneamente a microtúbulos y a la organela. Para valores típicos de viscosidad del citoplasma y tamaño de las organelas, pueden despreciarse los efectos de la inercia [209, 210].

La novedad de nuestro modelo consiste en considerar un cargo extenso y deformable que representa organelas tales como las mitocondrias. Para ello, asumimos que el cargo está compuesto por dos nodos, conectados por un resorte sobreamortiguado. Los motores pueden acoplarse a cualquiera de estos nodos y al microtúbulo, y realizar pasos discretos a lo largo de él, ejerciendo fuerzas locales sobre el cargo.

La Figura 6.2 muestra un esquema del modelo con sus principales parámetros. Hemos incluido el comportamiento elástico de las mitocondrias, relacionado con la deformabilidad y tensión de su membrana [211], representado por el parámetro κ , así como también su viscosidad, que se ha demostrado es muy importante para la fisiología mitocondrial [212–214], mediante el coeficiente de arrastre γ_m .

Para describir el comportamiento del sistema, utilizamos como variables la posición del centro de masa (X_{cm}) y la variación de longitud –o deformación– (X_{def}) del cargo. El transporte del cargo y su deformación dinámica se describen mediante las siguientes ecuaciones de Langevin acopladas:

$$\gamma_c \frac{dX_{cm}}{dt} = \sum_{i=1}^N f_i^1(t) + \sum_{i=1}^N f_i^2(t) + \zeta_c(t) \quad (6.1)$$

$$\gamma_m \frac{dX_{def}}{dt} = -\kappa X_{def} + \sum_{i=1}^N f_i^2(t) - \sum_{i=1}^N f_i^1(t) + \zeta_m(t) \quad (6.2)$$

donde N es el número de motores, y $\sum f_i^1$ y $\sum f_i^2$ representan la fuerza total ejercida por los motores sobre los nodos 1 y 2, respectivamente. Aunque no se considera aquí, la adición de una fuerza externa a las ecuaciones es directa.

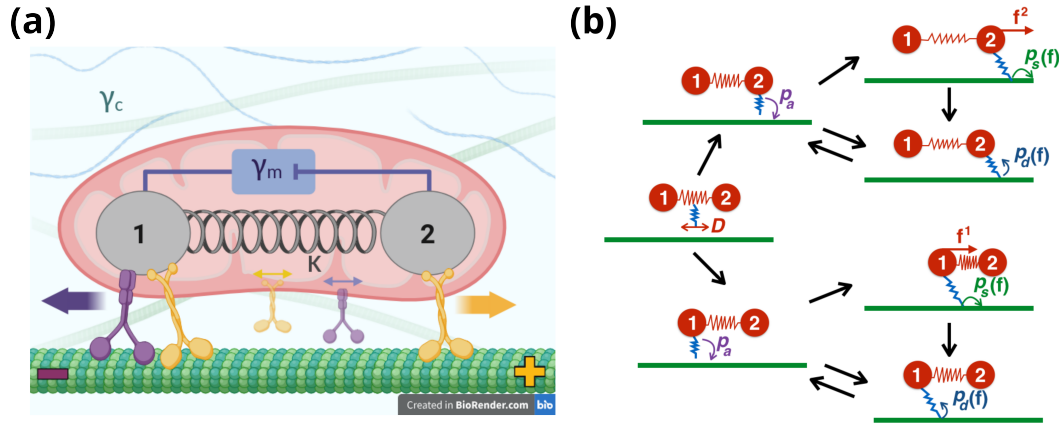


Figura 6.2: **Esquema del modelo numérico.** (a) El cargo está compuesto por dos nodos, acoplados elásticamente, y está inmerso en un medio viscoso. Figura creada con BioRender [89] (b) Estados posibles de los motores. Los motores difunden mientras están desacoplados del microtúbulo. Las flechas negras representan las posibles transiciones entre estados. Pueden unirse al nodo 1 (o nodo 2) y acoplarlo al filamento, con probabilidad p_a . Los motores acoplados pueden despegarse de él (p_d), o realizar pasos discretos a lo largo de él (p_s). Los motores pueden ejercer fuerzas (f) sobre el nodo al que están acoplados sólo cuando se estiran por encima de su longitud natural.

Consideramos el ruido térmico, de acuerdo con el teorema de fluctuación-disipación [215, 216], mediante una fuerza aleatoria $\zeta(t)$ centrada en cero con función de correlación:

$$\langle \zeta(t)\zeta(t') \rangle = 2\gamma k_B T \delta(t - t') \quad (6.3)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, $\delta(t)$ es la función δ de Dirac, y γ es un coeficiente de arrastre relacionado con la fuerza viscosa de Stokes. Llamamos ζ_c y ζ_m al ruido térmico en las Ecs. (6.1) y (6.2), para dar cuenta explícitamente de las diferencias entre el coeficiente de arrastre en el citosol y en la membrana, respectivamente.

Estas ecuaciones acopladas pueden interpretarse de la siguiente manera: por un lado, la ecuación (6.1) considera el movimiento de una organela rígida equivalente, descrito por el centro de masa del cargo en un fluido viscoso –el citoplasma– con un coeficiente de arrastre γ_c , e impulsado por la fuerza neta ejercida por los motores. Por otro lado, la ecuación (6.2) describe la dinámica de extensión y retracción de la longitud del cargo causada por las fuerzas motoras opuestas. En otras palabras, el desequilibrio de las fuerzas aplicadas a los nodos 1 y 2 es responsable tanto del movimiento neto del cargo (ecuación 6.1), como de la variación de su longitud (ecuación 6.2).

Los motores individuales son considerados independientes, pero pueden interactuar mecánicamente con otros motores a través de la tensión inducida en los nodos, de aquí en adelante llamada *load*. Cada motor sigue una dinámica independiente con una rutina de simulación de Monte Carlo. En la Fig. 6.2b representamos un esquema de los estados del motor y las posibles transiciones entre ellos. Brevemente, cada motor “libre” difunde a lo largo del cargo con un coeficiente de difusión D . Los motores en difusión se redistribuyen a lo largo del cargo, pero no pueden ejercer fuerzas sobre él. Estos motores pueden anclarse a un nodo (1 ó 2) y

acoplarlo al microtúbulo con una tasa constante p_a . Cuando un motor se ancla a un nodo, ya no puede difundir desde ese lugar de la membrana.

Una vez acoplado al microtúbulo, el motor puede desprenderse de él con una probabilidad por tiempo p_d , que depende de la *load*, o puede dar pasos discretos hacia el extremo positivo (kinesinas) o negativo (dineínas) con una probabilidad p_s , que también depende de la *load*. Si el motor se estira por sobre su longitud natural, puede ejercer una fuerza sobre el nodo al que se encuentra anclado.

Consideramos las dos familias de motores moleculares: kinesina y dineína, que transportan el cargo hacia el extremo positivo y negativo del microtúbulo, respectivamente. Estas dos familias de motores difieren no sólo en su dirección de movimiento, sino también en otras propiedades biofísicas importantes, como velocidad y cinética de unión y separación del microtúbulo, como ya se ha comentado en la Sección 1.2.2, que determinan los parámetros utilizados en las simulaciones. Cuando la fuerza ejercida por un motor es superior a $10^{-5}pN$, se considera que es un “motor activo”. Cabe mencionar que no todos los motores están activos simultáneamente: la fracción de motores activos es de alrededor de 30 % para los equipos de kinesinas y de 50 % para las dineínas.

Los detalles del modelo y de las simulaciones numéricas se pueden encontrar en [101, 206] y en el Apéndice B, incluyendo los parámetros utilizados en la Tabla B.1.

6.3. Simulaciones numéricas del modelo de transporte de mitocondrias

Realizamos simulaciones de 200 s de duración con un intervalo de tiempo de 1 ms. Estas magnitudes se remuestrearon a 1 s –el tiempo de muestreo experimental– y se analizaron siguiendo los mismos procedimientos utilizados para las obtenidas experimentalmente.

Exploramos dos escenarios distintos con diferentes niveles de competitividad: transporte mediado por un único equipo de motores idénticos, y transporte mediado por dos equipos de motores de polaridad opuesta que compiten entre sí, como los motores kinesina y dineína, escenario que se conoce como *tug-of-war* (TOW) o cinchada. Cada equipo está compuesto por N copias de motores idénticos actuando sobre el cargo ($N = 1, \dots, 10$).

La Figura 6.3a muestra resultados representativos de simulaciones del modelo para dos equipos de kinesinas formados por 2 y 10 copias de motor, respectivamente. Como puede observarse, en ambos casos la organela se mueve procesivamente con una velocidad media en torno a 100-350 nm/s, que es mayor para el equipo más numeroso. Además, la longitud del cargo fluctúa, mostrando períodos de estiramiento y contracción, con un predominio de la contracción que es menos pronunciado cuando se reduce el número de copias de motores en el equipo (panel inferior en Fig. 6.3a).

También calculamos la velocidad media y su variación de longitud relativa del cargo para diferentes valores de su rigidez. Como es de esperar, al disminuir la rigidez, se observa un aumento en su deformación. En el mismo sentido, la velocidad también depende del número de copias del motor y, aunque no se muestra en las figuras, de las propiedades biofísicas de los mismos.

Por otro lado, la Figura 6.3b muestra dos trayectorias que representan los casos de TOW con competencia alta (10 kinesinas y 9 dineínas) y baja (10 kinesinas y 5 dineínas), respecti-

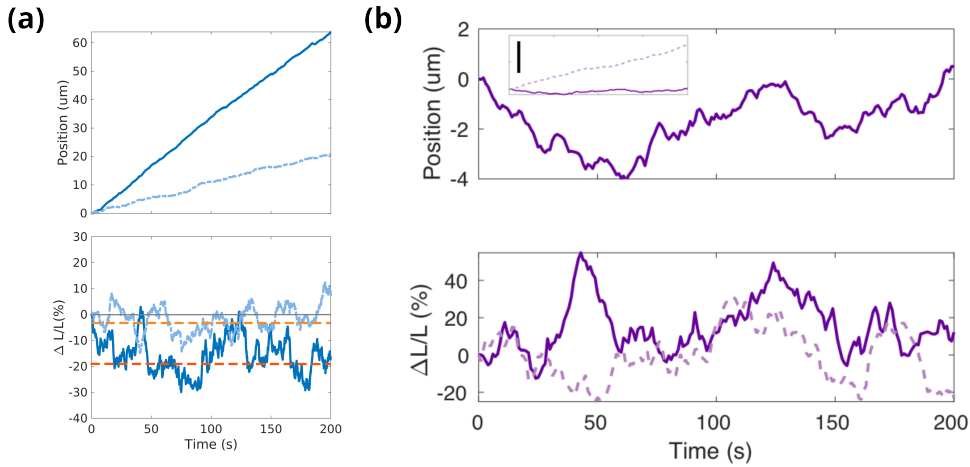


Figura 6.3: **Simulación para distintos equipos de motores.** (a) Equipos de motores idénticos: Trayectorias del cargo (panel superior) y variación de longitud relativa (panel inferior) para 2 (línea discontinua) y 10 (línea punteada) copias de kinesinas actuando sobre el cargo. En línea punteada naranja se muestra la deformación promedio. (b) Equipos de motores de polaridad opuesta: Trayectorias representativas (panel superior) y la correspondiente variación de longitud (panel inferior) del cargo para dos escenarios de TOW: 10 kinesinas *vs.* 9 (línea rellena) y *vs.* 5 (línea discontinua) dineínas. Barra de escala en el panel superior: 20 μm .

vamente. Puede observarse que el cargo cambia frecuentemente su dirección de movimiento como consecuencia del “tira y afloja” entre los equipos de polaridad opuesta para el caso de competencia alta, mientras que para competencia baja muestra una trayectoria mayormente procesiva. En este caso, también observamos que los estiramientos de la organela son más frecuentes y más amplios que en el caso de un solo equipo, en el que el cargo tiende a retraerse. El análisis de estos datos mediante el procedimiento descrito anteriormente para los experimentos mostró que las velocidades y deformaciones del cargo son similares a las obtenidas para mitocondrias en células vivas. Es más, las organelas simuladas también tienden a ralentizarse cuando se estiran, tal y como se observó en los experimentos.

A continuación nos preguntamos el origen de los distintos comportamientos para escenarios cooperativos y competitivos. Basándonos en los resultados experimentales de nuestro grupo [100], que muestran que en mitocondrias que se retraen el extremo posterior tiene una velocidad mayor que el extremo anterior, hipotetizamos que la localización de los motores no es homogénea en el cargo.

Para analizar cómo se distribuyen los motores en el modelo simulado, determinamos su localización relativa a lo largo de la organela. Dado que el cargo cambia su longitud de forma estocástica mientras se desplaza, definimos la posición relativa adimensional de cada motor en el tiempo t como:

$$\tilde{x}_i(t) = \frac{x_i(t) - X_1(t) + r}{L(t_s)}$$

donde $x_i(t)$ y $X_1(t)$ son las coordenadas del motor i -ésimo y del nodo 1 en el tiempo t , respectivamente; r es el radio del nodo y $L(t)$ es la longitud del cargo, calculada como

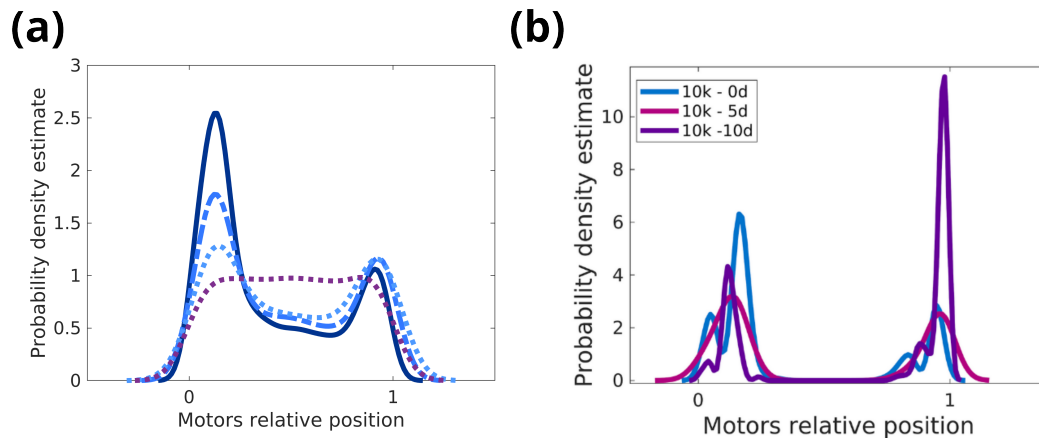


Figura 6.4: **Distribución de motores a lo largo de la organela** (a) Equipos de igual polaridad: estimación de la densidad de probabilidad de la localización de motores para equipos de kinesinas con 10 (línea sólida), 3 (línea discontinua) y 2 (línea punteada) copias de motor. La línea punteada violeta corresponde a la distribución de un equipo de 10 kinesinas en el que los motores no pueden adherirse al microtúbulo, por lo que sólo difunden a lo largo del cargo. (b) Equipos de polaridad opuesta con distinto grado de competencia: Distribución de un equipo de 10 kinesinas cuando se enfrenta a 0 (azul), 5 (fucsia) y 10 (violeta) dineínas, respectivamente.

$L(t) = L_o + X(t)$. Estas nuevas coordenadas toman valores entre 0 y 1, donde 0 representa el extremo posterior de la organela y 1 su parte delantera, durante el transporte por kinesinas, mientras que en el caso de las dineínas 0 y 1 representan el extremo delantero y trasero, respectivamente.

A continuación, calculamos la densidad de probabilidad estimada de la posición adimensional de los motores utilizando la función `ksdensity` de Matlab. La Fig. 6.4(a) muestra la distribución de los motores para el caso cooperativo (sólo kinesinas). Podemos observar que ésta no es homogénea, sino que muestra un aumento de la densidad en los extremos de la organela. Para descartar que estos picos no constituyan un artefacto de la condición de extremo del cargo, consideramos un equipo de diez motores difundiendo a lo largo del mismo, incapaces de unirse al microtúbulo ($p_a = 0$). En este caso, los picos se desvanecieron y obtuvimos una distribución homogénea, apoyando la conclusión de que la mayor concentración de motores en los extremos del cargo se debe a los motores acoplados al microtúbulo, como se ilustra en el esquema del modelo (Fig. 6.2).

Sin embargo, observamos una asimetría en la ubicación relativa de los motores, que se debe a la prevalencia de motores activos en la parte trasera de la organela, como se muestra en la Fig. 6.4 (a). Este efecto es más prominente para equipos con mayor número de motores, lo que explica el incremento en la contracción de la organela para equipos numerosos.

Cuantificamos esta asimetría en la distribución de los motores, evaluando la relación entre los motores situados en el extremo anterior –motores que tiran, $\tilde{x}_i \sim 1-$, y los motores situados en el extremo posterior –motores que empujan, $\tilde{x}_i \sim 0-$ como el cociente entre los dos máximos locales de la densidad. Usando como analogía el transporte de vehículos, un valor de *ratio* inferior a 1 describiría una tracción trasera, mientras que el caso contrario representaría

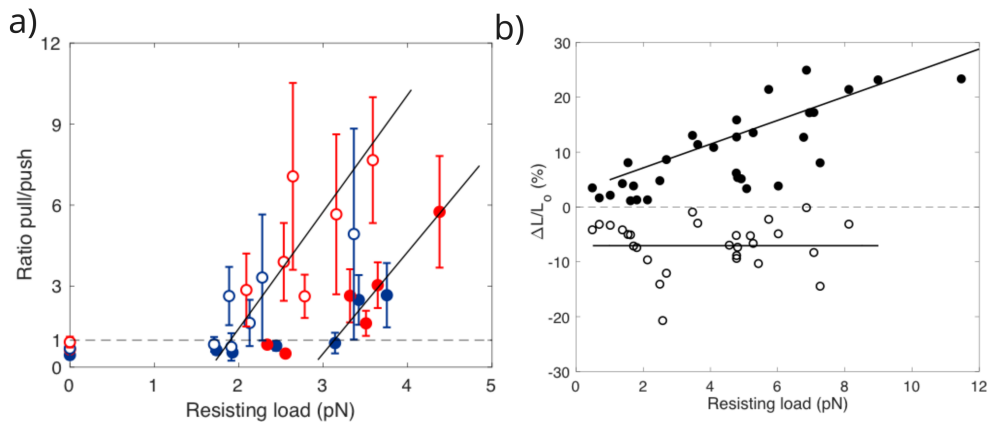


Figura 6.5: **Dependencia de las configuraciones con la fuerza opuesta.** (a) Relación entre las poblaciones de motores que empujan y tiran del cargo en función de la fuerza opuesta para equipos de 5 (símbolos vacíos) y 10 (símbolos rellenos) motores. Los círculos azules y rojos representan a kinesina y dineína, respectivamente. Las líneas sólidas son guías para la visualización. (b) Variación de la longitud relativa del cargo en función de la fuerza opuesta para diferentes escenarios de *tug-of-war*. Los datos se dividen en eventos de extensión (círculos rellenos) y retracción (círculos vacíos). Las líneas son regresiones lineales de los datos, con pendientes de 2.2 ± 0.6 y 0 ± 0.03 %/pN.

una tracción delantera. Nuestros resultados muestran que para equipos de motores idénticos, tanto las kinesinas como las dineínas, asumen un comportamiento colectivo de tracción trasera para equipos con más de 2 motores.

Ahora bien, cuando analizamos la distribución de motores en el caso de competencia de equipos (mostrada en la Figura 6.4b), observamos que esta tendencia se revierte, es decir, los motores pasan a un esquema de tracción delantera. Nuestra hipótesis es que, en un escenario de *tug-of-war*, cada equipo se enfrenta a una fuerza de resistencia (*resisting load*) ejercida por el equipo de polaridad opuesta, que aumenta con el número de motores activos en el equipo contrario. Para evaluar esta hipótesis, consideramos uno de los equipos –por ejemplo, el equipo de kinesinas– y calculamos la fuerza producida por el equipo contrario –las dineínas. Ésta se calculó promediando la fuerza neta producida por las dineínas activas sobre el cargo a lo largo de toda la trayectoria. La Figura 6.5 muestra cómo cambios en la fuerza opuesta producen modificaciones en la distribución de motores. Encontramos que para valores bajos de la fuerza opuesta (por ejemplo, 10 kin *vs* 5 din), los motores empujan el cargo –*ratio* menor a 1, pero a medida que la *load* aumenta, (por ejemplo, 10 kin *vs* 10 din), los motores invierten su distribución relativa y la población que tira del cargo supera a la que empuja –*ratio* mayor a 1. Además, observamos que el aumento de la *resisting load* está relacionado con un aumento del estiramiento del cargo. Por el contrario, la magnitud de retracción no muestra una dependencia explícita con la *load* (panel b de la fig. 6.5). Teniendo en cuenta que las organelas que se extienden también se mueven más lentamente, concluimos que las configuraciones de estiramiento están asociadas con un alto grado de competitividad.

Podemos contrastar los resultados de este modelo con los del transporte activo de mitocondrias en células XTP. En los experimentos, se observó una correlación negativa entre la velocidad de las mitocondrias y su elongación, y también se encontró una fuerte correlación

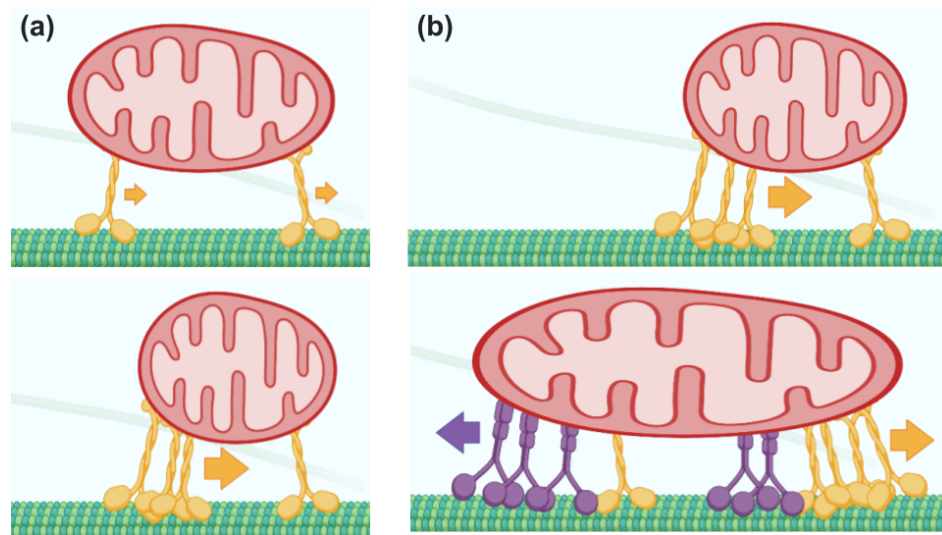


Figura 6.6: **Esquemmatización de la distribución de motores en la organela según el modelo.** (a) Cuando el cargo es transportados por 2 motores (por ejemplo kinesinas, en amarillo), éstos se distribuyen uniformemente sin afectar longitud del mismo (panel superior). Al aumentar el número de motores, éstos tienden a ubicarse en la parte posterior del cargo, resultando es una disminución de su longitud. (b) Cuando la fuerza opuesta es pequeña, los motores “empujan” el cargo (panel inferior). A medida que se suman motores de polaridad opuesta (dineínas, violeta), la fuerza opuesta crece y se invierte la distribución preferencial de los motores: ahora las kinesinas se ubican en el extremo delantero y “tiran” de la organela, elongándola (panel inferior). Sólo se muestran los motores activos. Esquema realizado con BioRender [89].

entre el transporte retrógrado y la retracción de las mitocondrias, mientras que la mayoría de las mitocondrias anterógradas conservaron su tamaño durante el transporte [100]. Estos comportamientos complejos pueden interpretarse en términos de nuestro modelo: el transporte retrógrado sería llevado a cabo principalmente por un equipo de varias dineínas, en ausencia de *tug-of-war*, mientras que el movimiento anterógrado estaría sujeto a un mayor grado de TOW o consistiría en un menor número de copias de kinesina. Esto concuerda con los resultados que muestran que el cargo tiende a contraerse en el caso de equipos numerosos de motores idénticos, mientras que se alarga en el caso de TOW o de equipos menos numerosos.

6.4. Técnicas optogénéticas: reclutamiento dirigido de motores moleculares a las mitocondrias

Los resultados numéricos descriptos en la sección anterior sugieren que los motores moleculares no adoptan una distribución uniforme a lo largo de las mitocondrias, y generan estímulos mecánicos localizados que eventualmente podrían provocar cambios morfológicos en estas organelas. Utilizando herramientas optogénéticas para reclutar kinesinas o dineínas a las mitocondrias [80], pretendemos provocar estímulos mecánicos adicionales a las mismas para analizar tanto las fluctuaciones morfológicas como su dinámica. El objetivo principal es estudiar cómo influyen la distribución y la dinámica de los motores en la deformación espacio-temporal de las mitocondrias y cómo se propaga la fuerza producida por los mismos a lo largo de la organela. Además, evaluaremos los efectos sobre los fenómenos de transporte bidireccional.

Para realizar este proyecto, y capacitarme en estas nuevas técnicas, establecimos una colaboración con la Dra. Suliana Manley, profesora del EPFL en Suiza. La Dra. Manley es una experta en dinámica de mitocondrias y en desarrollo de microscopios *custom-made* de super-resolución [49,158,217]. A través de una beca de *The Company of Biologists* pude viajar al laboratorio de la Dra. Manley, quien nos proveyó las herramientas y facilitó los equipos utilizados. Allí optimicé el protocolo experimental y obtuve algunos resultados preliminares que presento a continuación.

El estudio se llevó a cabo empleando la línea celular U2OS, previamente descrita en la Sección 1.5.2 y con la que trabajamos habitualmente en nuestro grupo, pudiendo continuar los experimentos en Argentina. En esta línea celular, las mitocondrias exhiben formas más complejas y una dinámica más rápida en comparación con nuestro otro modelo biológico. En este sentido, podemos distinguir fenómenos de fusión, fisión, transporte dirigido y fluctuaciones abruptas de forma (Figura 6.7).

Para inducir el reclutamiento de los motores exógenos a la membrana externa de las mitocondrias, se empleó el sistema CRY2-CIB1 (Sección 1.4.4). En primer lugar, se prepararon muestras de células co-transfectadas con los plásmidos que codifican CRY2-mCherry-Miro1TM y Kif5A-GFP-CIBN o GFP-BIDN-CIBN (detalles en Sección 2.1.2). Empleando un microscopio iSIM, se expusieron las muestras a luz azul ($t > 200$ ms) para inducir la dimerización del complejo CRY2-CIB1 y direccionar los motores a las organelas (Figura 6.8a) [80]. Posteriormente, se registraron secuencias temporales de imágenes para observar el comportamiento de las mitocondrias.

La Figura 6.8b muestra una célula que expresa los plásmidos CRY2-mCherry-Miro1TM

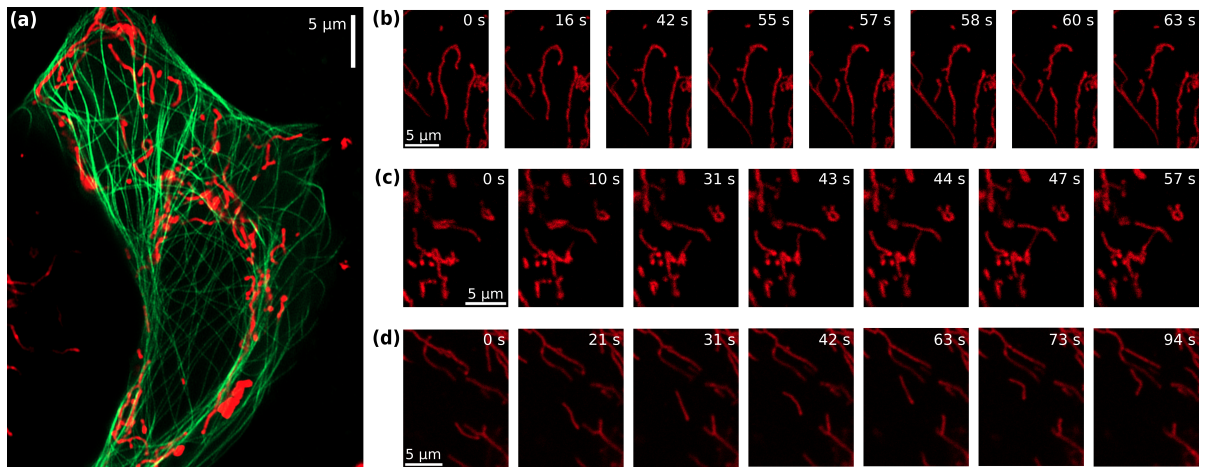


Figura 6.7: **Dinámica de las mitocondrias en el modelo celular U2OS.** (a) Imagen representativa de una célula U2OS mostrando la organización de las mitocondrias (rojo) y los microtúbulos (verde), tomada por microscopía de super-resolución Airyscan. Barra de escala = 10 μm . (b-d) Ejemplos de la rápida dinámica mitocondrial en esta línea celular. Se observan eventos de fisión (a), fusión (b) y transporte activo (c).

y GFP-BIDN-CIBN . Observamos que a $t = 0$ s (antes de la fotoestimulación) se distinguen ambas señales, mientras que para tiempos mayores ($t = 30$ s) se observa además un enriquecimiento de las mitocondrias con los motores exógenos (panel c). Esta colocación de las señales muestra que los mismos son efectivamente reclutados hacia las organelas.

Los resultados preliminares muestran que las mitocondrias están sometidas a fuerzas agudas ejercidas por los motores reclutados. Esto se evidencia por el aumento de la movilidad de las organelas más pequeñas y una mayor deformación mitocondrial. En particular, tras la fotoestimulación, observamos la formación de estructuras tubulares que se extienden en dirección anterógrada o retrógrada, dependiendo del tipo de motor reclutado, como se ilustra en la Figura 6.8d, y como también informaron Liu et al. [81]. Esto sugiere que el reclutamiento selectivo de motores de kinesina o dineína a las mitocondrias altera el equilibrio de las fuerzas actuantes sobre ellas.

Por otro lado, en algunos casos también observamos la formación de *clusters* de MIRO1TM a lo largo de las mitocondrias (focos de alta intensidad tanto de mCherry como de GFP, Figura 6.9). Esto probablemente conlleva a la distribución no homogénea de los motores sobre la organela. El movimiento de estos *clusters* parece correlacionarse con la deformación mitocondrial localizada, pero es necesaria una investigación más profunda.

Si bien los resultados mencionados forman parte del proyecto colaborativo establecido con la Dra. Manley –encontrándose aún en curso– consideramos que la incorporación de herramientas optogenéticas será ventajosa para abordar muchos de los interrogantes que planteamos a lo largo de la presente Tesis.

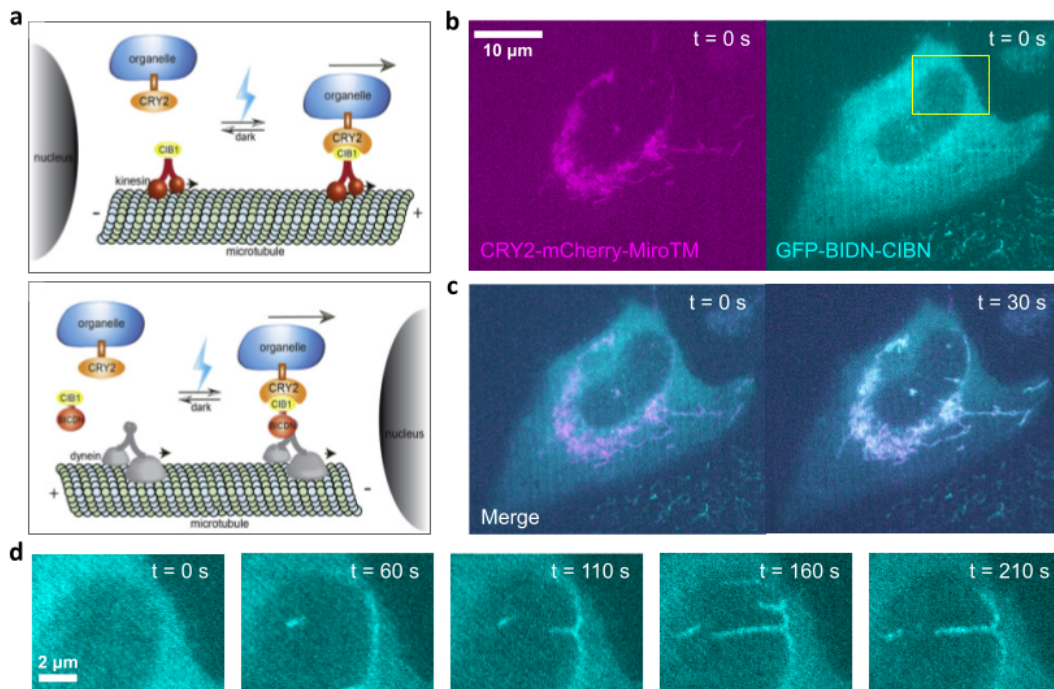


Figura 6.8: **Reclutamiento de motores a las mitocondrias con técnicas optogenéticas.** (a) Esquema del reclutamiento de motores a mitocondrias controlado por luz (Imagen adaptada de [80]). (b) Imagen de una célula U2OS que expresa el complejo CRY2-mCherry-MiroTM (magenta) y GFP-BIDN-CIBN (cian) para reclutar dineínas a la membrana externa, registrada por microscopía iSIM. (c) Superposición de ambos canales antes ($t = 0$ s) y después ($t = 30$ s) de la exposición a la luz azul, mostrando la colocación del motor a las mitocondrias. (d) Formación de túbulos mitocondriales tras una excitación prolongada con luz azul.

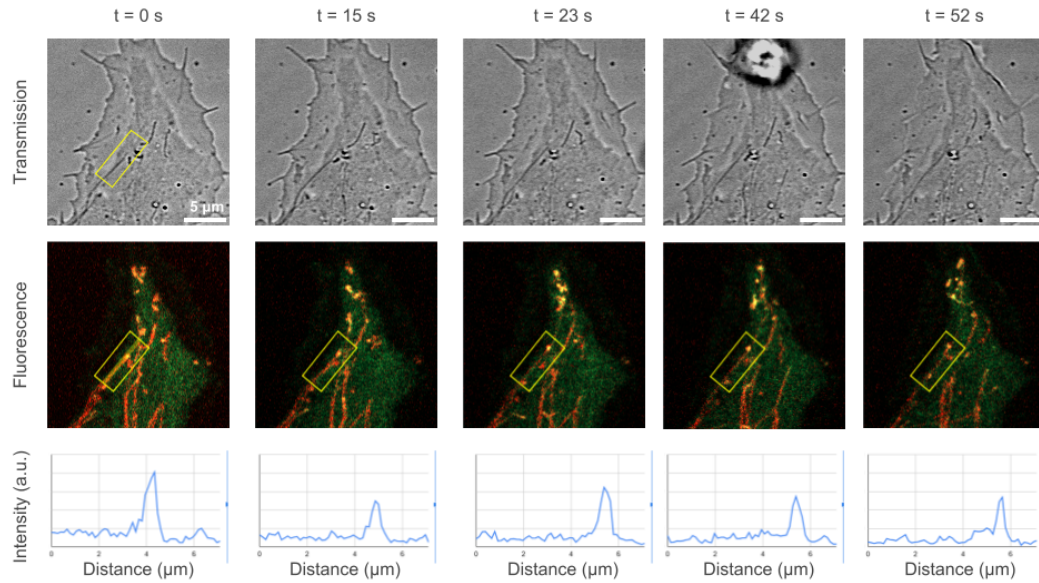


Figura 6.9: **Dinámica de *clusters***. Imágenes de una célula MEF que expresa CRY2-mCherry-MiroTM (rojo) y Kif5A-GFP-CIBN (verde), registradas por microscopía confocal. Se muestran los canales de transmisión (panel superior) y fluorescencia (panel inferior). El recuadro amarillo resalta una mitocondria en proceso de elongación. En particular, las intensidades más altas en los canales verde (GFP) y rojo (mCherry) se concentran en la punta (panel inferior). Imágenes registradas por la Dra. M. Cecilia De Rossi.

Conclusiones

En este capítulo desarrollamos un modelo numérico unidimensional para describir el transporte de organelas elongadas y flexibles impulsado por los motores moleculares dependientes de microtúbulos. Exploramos en detalle la distribución de los motores en la organela y las fuerzas producidas durante el transporte. Encontramos que los motores utilizan dos configuraciones diferentes para transportar cargas extensas en función de la fuerza opuesta (*load*). Cuando la resistencia es poca –escenarios de poca competitividad–, los motores se ubican en la región posterior y empujan a la organela, provocando la retracción de su longitud. A medida que la fuerza opuesta se incrementa –escenarios más competitivos–, se ubican en la parte anterior de la mitocondria y tiran de ella, ocasionando la elongación de la organela. Nuestro modelo ofrece una interpretación de las deformaciones experimentadas por las mitocondrias transportadas en melanocitos de *X. laevis* reportadas en [100].

Por otro lado, pudimos iniciar el estudio del impacto de las fuerzas mecánicas ejercidas por los motores sobre las mitocondrias empleando técnicas optogenéticas. Si bien este proyecto se encuentra en curso, los resultados preliminares nos permiten inferir que el reclutamiento de los motores exógenos altera el equilibrio de las fuerzas actuantes sobre las organelas y, consecuentemente, su dinámica.

Capítulo 7

Conclusiones generales y perspectivas

Las mitocondrias son organelas fundamentales para la supervivencia celular y desempeñan un papel mediador crucial en diversos procesos celulares, incluyendo la producción de energía, la señalización celular y la respuesta al estrés. Son organelas muy dinámicas que pueden fusionarse/fisionarse y ser transportadas en el citoplasma, respondiendo a diferentes estímulos intra o extra-celulares. Estudios recientes han hecho foco en la relación existente entre la morfodinámica y la función de estas organelas [7, 12, 49, 50, 111]. En este sentido, el citoesqueleto ha surgido como uno de los principales agentes en la regulación de la dinámica mitocondrial. Sin embargo, aún faltan estudios que caractericen esta interacción desde una mirada biofísica, centrándose en las propiedades mecánicas de estas organelas y sus fluctuaciones morfológicas.

En esta Tesis nos propusimos abordar esta temática y caracterizar los cambios de forma de las mitocondrias en respuesta a señales y fuerzas mecánicas en su entorno celular. Nuestra hipótesis central es que la mecánica de estas organelas y las fuerzas aplicadas (su magnitud y localización) sobre ellas son factores determinantes para entender estos fenómenos.

Para explorar estos aspectos, estudiamos la red mitocondrial en melanocitos de *Xenopus laevis*, por medio del análisis de imágenes de microscopía de super-resolución Airyscan y microscopía confocal. Observamos que estas organelas se presentan como entidades individuales y filamentosas, exhibiendo una distribución celular con una orientación preferencial co-alineada con los microtúbulos, posiblemente debido al transporte intracelular conducido a lo largo de los mismos. Caracterizamos, por primera vez, las diferentes formas y tamaños de las mitocondrias en este sistema celular. Observamos que las longitudes de estas organelas varían en el rango entre 0.5 y 12 μm , con mediana $L = 2.6 \mu\text{m}$. A su vez, obtuvimos un ancho de 0.3 μm , verificando que estas organelas son filamentosas en este sistema. Además, determinamos una longitud de persistencia aparente (L_p^*) de 2.1 μm , brindando una estimación de la flexibilidad de estas organelas. Comparando este valor con las longitudes típicas de las organelas, podemos afirmar que las mismas se comportan como filamentos semi-flexibles en su entorno celular.

Uno de los aportes de esta Tesis fue el desarrollo de un método novedoso para estandarizar la clasificación de las formas de mitocondrias individuales a partir de imágenes confocales basado en el análisis de su curvatura. Esta rutina automática permitió el estudio bidimensional del movimiento global y las fluctuaciones de forma de estas organelas en células vivas. Descubrimos que los cambios en la forma de las mitocondrias varían en el orden de segundos,

lo que revela que las mismas están sometidas a tensiones asimétricas constantemente. En algunos casos, observamos transiciones de un comportamiento confinado a un movimiento dirigido, asociado a un cambio de forma hacia mitocondrias elongadas.

Al mismo tiempo, la inspección de las películas que registran simultáneamente mitocondrias y microtúbulos fluorescentes sugiere que la arquitectura y la dinámica de esta red del citoesqueleto desempeñan un papel importante en la remodelación y las fluctuaciones de la forma de estas organelas, al igual que se ha reportado en estudios recientes [11, 82, 114, 119, 179]. En este sentido, nos propusimos explorar la interacción entre las mitocondrias y el citoesqueleto afectando selectivamente la red de microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios de vimentina. Hallamos que la perturbación del citoesqueleto tiene un impacto diferencial en estas organelas, afectando su longitud, L_p^* , movilidad y organización celular en los melanocitos de *X. laevis*.

Como se informó anteriormente en otras líneas celulares [163], el mayor efecto se encontró al depolimerizar parcialmente los microtúbulos con nocodazol, lo cual derivó en cambios sustanciales en la distribución celular y la movilidad de las mitocondrias. La pérdida de co-alineación de estas organelas con los microtúbulos y la reducción de su distribución en esta condición indican que esta red de filamentos funciona como un andamiaje para la organización mitocondrial en las células. A su vez, los filamentos de actina y vimentina contribuirían a mantener a las mitocondrias confinadas a la red de microtúbulos, ya que su ausencia provoca una disminución en la co-orientación entre ambas estructuras. Además, estas condiciones también resultan en el aumento de la L_p^* de las organelas, indicando que estos dos filamentos del citoesqueleto se comunican mecánicamente con ellas, como se ha informado [10, 119]. Estos puntos de contacto modularían la morfología mitocondrial, dando lugar a organelas más curvadas. Asimismo, en las células tratadas con vinblastina se registraron mitocondrias más cortas en comparación con la condición control. En este sentido, y teniendo en cuenta que vinblastina aumenta las curvaturas de los microtúbulos [157, 176], hipotetizamos que la tensión mecánica adicional acumulada en estos filamentos se transmitiría a las mitocondrias y, consecuentemente, aumentaría la tasa de fisión de las mismas, como se ha informado recientemente [49].

Por otra parte, para realizar un estudio cuantitativo de la dinámica mitocondrial utilizamos el Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD) de su centro de masa, recuperando de esta manera los regímenes de movimiento de las mitocondrias. El coeficiente de difusión efectiva obtenido revela que la movilidad de las organelas depende en gran medida de la integridad de las redes del citoesqueleto. Este parámetro muestra que el movimiento y las fluctuaciones mitocondriales están severamente restringidos cuando la red de microtúbulos se depolimeriza parcialmente, lo que sugiere que estos filamentos y los motores asociados son los principales transmisores de los impulsos mecánicos [218]. En la misma dirección, el menor valor del coeficiente de difusión efectivo obtenido para las células sin vimentina sugiere que esta red de filamentos intermedios reforzaría la interacción entre los microtúbulos y las mitocondrias, quizás confinándolas cerca de ellos [119]. Por el contrario, la depolimerización de F-actina aumenta significativamente la movilidad mitocondrial, lo cual nos permite inferir que dichos filamentos podrían amortiguar las fluctuaciones mecánicas de estas organelas.

Estos resultados proporcionan información valiosa sobre los regímenes de movimiento global de las mitocondrias, pero no permiten inferir en detalle las fuerzas actuantes sobre ellas. Por lo tanto, propusimos y desarrollamos una nueva herramienta cuantitativa: el Desplaza-

miento Cuadrático Acumulado (CSD). Esta magnitud considera la distribución (media) de desplazamientos cuadrados de todos los puntos materiales que constituyen la forma de la organela. Aplicando este análisis a datos obtenidos a partir de simulaciones numéricas de filamentos semiflexibles sometidos a fuerzas externas estocásticas, observamos que el CSD presentaba “saltos” (discontinuidades) en los tiempos en los que las fuerzas externas estaban actuando. Motivadas por este resultado y con la ayuda de un algoritmo automatizado, identificamos los eventos de fuerza activa actuando en las mitocondrias y exploramos la probabilidad de su ocurrencia bajo las diferentes condiciones experimentales. Encontramos que esta frecuencia era de alrededor de 1 min^{-1} para las células control y que este valor disminuye $\sim 40\%$ bajo tratamiento con nocodazol. Al mismo tiempo, la frecuencia también se redujo ligeramente en ausencia de vimentina, mientras que al depolimerizar actina aumentó un 25% . Estos resultados refuerzan nuestras conclusiones anteriores de que estos filamentos “protegerían” a las organelas frente a los estímulos mecánicos.

Nuestro estudio demuestra que tanto el MSD como el CSD sirven como valiosas herramientas estadísticas para obtener información cuantitativa sobre la mecanobiología de las mitocondrias. Cabe destacar que el CSD permite la detección de eventos de fuerza individuales y, potencialmente, permitiría la caracterización de su duración e intensidad en relación con el microambiente. Sin embargo, esto requeriría de una calibración con experimentos controlados.

Por último, estudiamos numéricamente la dinámica colectiva de los motores moleculares mientras conducen un cargo flexible y elongado. Nuestra hipótesis es que la distribución no uniforme de los motores a lo largo de las mitocondrias puede generar estímulos mecánicos localizados, provocando cambios morfológicos. Nuestros resultados sugieren que los motores activos adoptan diferentes distribuciones espaciales a lo largo de la organela dependiendo de la fuerza opuesta a la que se encuentran sometidos. Cuando la resistencia es poca –escenarios de poca competitividad–, los motores se ubican en la región posterior y empujan al cargo, provocando la retracción de su longitud. A medida que la fuerza opuesta se incrementa –escenarios más competitivos–, se ubican en el extremo anterior de la organela y tiran de ella, ocasionando la elongación de la misma. Estos resultados brindan herramientas para interpretar los datos del transporte bidireccional de mitocondrias observados en melanocitos de *X. laevis*, reportados en [100]. Este modelo también podría utilizarse potencialmente para abordar el transporte de endosomas tubulares [219] o la extracción de tubos de membrana por motores de kinesina [220].

En particular, este último proceso biofísico es muy similar al efecto observado en mitocondrias luego del reclutamiento de motores moleculares a su membrana mediante técnicas optogenéticas, donde se observa la generación de túbulos mitocondriales [13]. Para extender nuestra comprensión de la relación entre los cambios de forma de las mitocondrias y las fuerzas aplicadas por los motores moleculares, realizamos experimentos preliminares utilizando estas técnicas para reclutar selectivamente kinesinas o dineínas a las organelas. Este es un proyecto en curso, en el que nos encontramos poniendo a punto el sistema experimental, pero prevemos que la activación controlada de los equipos de motores exógenos proporcionará valiosos conocimientos sobre la mecánica de la conformación mitocondrial y la localización de los motores a lo largo de su membrana externa. El objetivo principal es descubrir cómo influyen la distribución y la dinámica de los motores en la deformación espacio-temporal de las mitocondrias y cómo se propagan las fuerzas producidas por estos motores en ella.

Apéndice A

Anexo Capítulo 4: Interacción con el citoesqueleto

Cond.	Ncel.	Nmito	área mito (μm^2)	ocupación mitoc. (%)	bifurcaciones	área cel. (μm^2)
CTRL	15	170 \pm 40	0.72 \pm 0.01	8.1 \pm 0.6	0.1 \pm 0.4	2200 \pm 300
NOC	11	120 \pm 20	0.53 \pm 0.01*	4.5 \pm 0.1*	0.0 \pm 0.2*	2500 \pm 900
LAT	11	140 \pm 20	0.72 \pm 0.02	6.1 \pm 0.7*	0.1 \pm 0.4	2200 \pm 200
VIM⁻	14	140 \pm 10	0.74 \pm 0.01	8.8 \pm 0.8	0.1 \pm 0.5	1700 \pm 200
VINB	17	170 \pm 20	0.69 \pm 0.01*	8.2 \pm 0.7	0.2 \pm 0.6*	1900 \pm 100

Tabla A.1: **Resultados del análisis con *Mitochondria Analyzer***. Los descriptores morfológicos y de red calculados fueron: número de mitocondrias por célula (Nmito), área y bifurcaciones por mitocondria y la ocupación mitocondrial. Los datos de las uniones se expresan como media \pm SD. El resto de los datos se expresan como mediana \pm SE. Relacionada con la figura 4.2.

Cond.	L_p^* (μm)	<i>rod-like</i> (%)	<i>smile-like</i> (%)	<i>snake-like</i> (%)
CTRL	2.0 \pm 0.1	45	37	18
NOC	1.7 \pm 0.2	55	40	5
LAT	5.0 \pm 0.1*	54	34	12
VIM⁻	5.7 \pm 0.5*	59	34	7
VINB	2.9 \pm 0.4*	72	25	3

Tabla A.2: **Longitud de persistencia aparente (L_p^*) y distribución de la forma de las mitocondrias**. Valores relacionados a la figura 4.5.

Cond.	ν (1/s)	movilidad ($\mu\text{m}/\text{min}$)
CTRL	0.08 ± 0.02	0.48 ± 0.04
NOC	$0.022 \pm 0.007^*$	$0.29 \pm 0.04^*$
LAT	0.10 ± 0.02	$1.8 \pm 0.2^*$
VIM⁻	0.08 ± 0.02	0.50 ± 0.06
VINB	0.08 ± 0.03	0.59 ± 0.07

Tabla A.3: **Cuantificación de la tasa de fluctuaciones de curvatura y movilidad de las mitocondrias.** Valores relacionados a las figuras 4.6 y 4.8, respectivamente.

Apéndice B

Apéndice: Modelo 1D para el transporte activo

Introducimos dos variables para describir el movimiento del sistema: la posición del centro de masa del cargo (X_{cm}) y su variación de longitud –o deformación– (X_{def}), que se definen como:

$$X_{cm}(t) = \frac{1}{2}(X_1(t) + X_2(t))$$
$$X_{def}(t) = X_2(t) - X_1(t) - L_x$$

donde $X_1(t)$ y $X_2(t)$ son las coordenadas de los nodos en el tiempo t y L_x es la longitud natural del resorte que acopla los nodos, que se ha fijado igual a 3 μm . Entonces, el transporte del cargo y su deformación dinámica se describen mediante las siguientes ecuaciones de Langevin acopladas:

$$\gamma_c \frac{dX_{cm}}{dt} = \sum_{i=1}^N f_i^1(t) + \sum_{i=1}^N f_i^2(t) + \zeta_c(t) \quad (\text{B.1})$$

$$\gamma_m \frac{dX_{def}}{dt} = -\kappa X_{def} + \sum_{i=1}^N f_i^2(t) - \sum_{i=1}^N f_i^1(t) + \zeta_m(t) \quad (\text{B.2})$$

donde N es el número de motores, y $\sum f_i^1$ y $\sum f_i^2$ representan la fuerza total ejercida por los motores sobre los nodos 1 y 2, respectivamente. Los motores individuales son independientes, pero pueden interactuar mecánicamente con otros motores a través de la tensión inducida en los nodos, de aquí en adelante llamada *load*. Aunque no se considera aquí, la adición de una fuerza externa a las ecuaciones es directa.

La actividad térmica se considera mediante el ruido térmico $\zeta(t)$, de acuerdo con el teorema de fluctuación-disipación [215, 216]. Brevemente, el ruido térmico $\zeta(t)$ es una fuerza aleatoria centrada en cero con función de correlación:

$$\langle \zeta(t)\zeta(t') \rangle = 2\gamma k_B T \delta(t - t') \quad (\text{B.3})$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y $\delta(t)$ es la función δ de Dirac. Por último, γ es un coeficiente de arrastre relacionado con la fuerza viscosa de

Stokes, *i.e.* lados izquierdos en las Ec. (B.1) y (B.2). Llamamos ζ_c y ζ_m al ruido térmico en las Ecs. (B.1) y (B.2), para dar cuenta explícitamente de las diferencias entre el coeficiente de arrastre en el citosol y en la membrana, respectivamente.

Estas ecuaciones acopladas pueden interpretarse de la siguiente manera: por un lado, la Ec. (B.1) considera el movimiento de una organela rígida equivalente, descrito por el centro de masa del cargo en un fluido viscoso –el citosol– con un coeficiente de arrastre γ_c , e impulsado por la fuerza neta ejercida por los motores. Por otro lado, la Ec. (B.2) describe la dinámica de extensión y retracción de la longitud del cargo causada por las fuerzas motoras opuestas. En esta ecuación, γ_m representa el coeficiente de arrastre debido a la membrana viscosa de la vesícula y κ está relacionado con la rigidez de la membrana. En otras palabras, el desequilibrio de las fuerzas aplicadas a los nodos 1 y 2 es responsable tanto del movimiento neto de la carga a lo largo de la vía mediante la Ec. (B.1), como de la variación de la longitud de la carga mediante la Ec. (B.2).

B.1. Simulaciones numéricas

Integrando numéricamente las ecuaciones (B.1) y (B.2) obtuvimos la trayectoria y la variación de la longitud de la organela. Para ello utilizamos el método de Euler de diferencias finitas para la ecuación de Langevin descrito en [221]. Las rutinas desarrolladas en este trabajo fueron escritas en `Matlab`. Consideramos equipos de N ($N = 1, \dots, 10$) motores idénticos actuando sobre el cargo, ya sea solos o combinados en un escenario de cinchada (*tug-of-war*) o “tira y afloja”, donde compiten contra un equipo de polaridad opuesta.

Cada motor sigue una dinámica independiente con una rutina de simulación de Monte Carlo. En la Fig. 6.2b representamos un esquema de los estados del motor y las posibles transiciones entre ellos. Brevemente, cada motor “libre” difunde a lo largo del cargo con un coeficiente de difusión D . Consideramos condiciones de contorno reflectantes para los motores difundidos, es decir, los motores que alcanzan la punta del cargo se reflejan en una barrera. Los motores en difusión se redistribuyen a lo largo del cargo, pero no pueden ejercer fuerzas sobre él. Estos motores pueden anclarse a un nodo (1 ó 2) y al microtúbulo con una tasa constante p_a . Cuando un motor se ancla a un nodo, ya no puede difundir desde ese lugar de la membrana.

Un motor unido/anclado puede desprenderse del microtúbulo con una probabilidad por tiempo dada por [207, 222]:

$$p_d(f) = \epsilon_0 e^{-\frac{f}{F_d}} \quad (\text{B.4})$$

donde ϵ_0 es la tasa de despegado, F_d es la fuerza de desprendimiento del motor y f es el valor absoluto de la *load - carga?fuerza?*. Se han sugerido otros mecanismos para la cinética de desprendimiento distintos de la Ec. (B.4) para la dineína [222]. Sin embargo, no existe un consenso general y se necesitan más experimentos para dilucidar el comportamiento de las dineínas bajo *load*.

Además, un motor unido/anclado realiza pasos discretos de 8 nm hacia el extremo positivo (kinesinas) o negativo (dineínas) del microtúbulo con una probabilidad por unidad de tiempo

igual a [75, 223, 224]:

$$p_s(f) = \begin{cases} v_0[1 - (\frac{f}{F_s})^w] & f < F_s \\ 0 & f \geq F_s \end{cases} \quad (\text{B.5})$$

donde F_s es la fuerza de detención y v_0 es la velocidad de *load* cero.

Cuando un motor acoplado se estira, ya sea porque realiza un paso o porque es arrastrado por la carga en movimiento, ejerce una fuerza f_i^j sobre el correspondiente nodo j ($j = 1, 2$) dada por [208]:

$$f_i^j = \begin{cases} k(d_i^j - l_0) & d_i^j > l_0 \\ 0 & -l_0 \leq d_i^j \leq l_0 \\ k(d_i^j + l_0) & d_i^j < -l_0 \end{cases} \quad (\text{B.6})$$

donde k representa la resistencia del motor a estirarse más allá de su longitud natural l_0 . d_i^j es la distancia entre la posición del motor (a_i) y la posición de nodos correspondiente (X_j): $d_i^j = a_i - X_j$. Cuando la fuerza ejercida por un motor es superior a $10^{-5} pN$, se considera que es un **motor activo**. Cabe mencionar que no todos los motores están activos simultáneamente; la fracción de motores activos es de alrededor de 30 % para los equipos de kinesinas y de 50 % para las dineínas.

Realizamos simulaciones de 200 s de duración con un paso de tiempo de 1 ms. El paso de tiempo numérico de 1 ms se determinó como el más apropiado teniendo en cuenta la optimización entre la duración de los experimentos y el costo computacional –esto se evaluó en simulaciones preliminares utilizando pasos de tiempo en el rango de 1 μ s - 10 ms.

Inicialmente, todos los motores están separados de la pista/microtúbulo (difunden libremente) y se sitúan en X_{cm} . Después de cada paso de simulación, se calculan las posiciones de los motores, la fuerza total que actúa sobre cada nodo y el número de motores activos. Con estos datos, se obtiene la posición del centro de masa del cargo X_{cm} y su variación de longitud X_{def} , resolviendo las Ecs. (B.1) y (B.2). Estas magnitudes se remuestrearon a 1 s, *i.e.* el tiempo de muestreo experimental.

Los parámetros utilizados en las simulaciones se muestran en la Tabla B.1 en el Apéndice B.

Dado que no encontramos estudios experimentales o modelos que consideren valores de rigidez interna de las mitocondrias, decidimos explorar el comportamiento del sistema para κ entre $3 \cdot 10^{-4}$ y $3 \cdot 10^{-2}$ pN/nm. El mayor valor del rango corresponde a la rigidez de un complejo motor-*linker* reportado en [208, 225] y considera el comportamiento elástico de las proteínas adaptadoras que enlazan los motores a la membrana de carga. Por otra parte, el límite inferior está de acuerdo con Jin *et al.* [226]; estos autores estudiaron la difusión confinada de proteínas de membrana y determinaron valores de rigidez de membrana en el rango $10^{-4} - 10^{-3}$ pN/nm.

Tabla B.1: Parámetros utilizados en las simulaciones del modelo de transporte activo.

Magnitud	Símbolo	Kinesina/Dineína
Viscosidad citosol (pN s/nm ²)	η_c	$500\eta_{water}$
Energía térmica (pN nm)	$k_B T$	4
Ancho organela (nm)	W	600
Largo organela (nm)	L_o	3600
Coefficiente arrastre del citosol (pN s/nm)	γ_c	0.0071
Coefficiente arrastre de la membrana (pN s/nm)	γ_m	$2\gamma_c$
Rígidez de la membrana (pN /nm)	κ	$3 (10^{-4} - 10^{-2})$ [225, 226]
Coefficiente de difusión (nm ² /s)	D	$0.5 \cdot 10^6$ [227, 228]
Largo natural del motor (nm)	l_0	100 [223, 229]
Rígidez del motor (pN/nm)	k	0.03 [225]
Largo del paso (nm)	Δx	8 [58]
Velocidad de <i>load</i> cero (nm/s)	v_0	500 [230–232]
Exponente dela relación F-V	w	2 / 0.5 [233]
<i>Stall force</i> (pN)	F_s	5.8 / 1.5 [219, 234, 235]
Tasa de despegado (1/s)	ϵ_0	1.1 / 0.2 [236, 237]
Fuerza de despegado (pN)	F_d	3 / 0.8 [223]
Tasa de unión (1/s)	p_a	2.6 / 5 [236, 238]

Bibliografía

- [1] J. Nunnari and A. Suomalainen, “Mitochondria: in sickness and in health,” *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1145–1159, 2012.
- [2] A. Evans and N. Neuman, “The mighty mitochondria,” *Molecular Cell*, vol. 61, no. 5, p. 641, 2016.
- [3] J. C. Landoni, T. Kleele, J. Winter, W. Stepp, and S. Manley, “Mitochondrial structure, dynamics, and physiology: light microscopy to disentangle the network,” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 40, 2024.
- [4] M. Picard, D. C. Wallace, and Y. Burelle, “The rise of mitochondria in medicine,” *Mitochondrion*, vol. 30, pp. 105–116, 2016.
- [5] J. W. Elrod and Å. B. Gustafsson, “Editorial overview: Mitochondria—master regulators of cellular function,” 2018.
- [6] A. J. Garcia-Saez and H. McBride, “Special issue—cell biology of mitochondria,” 2025.
- [7] É. Su, C. Villard, and J.-B. Manneville, “Mitochondria: at the crossroads between mechanobiology and cell metabolism,” *Biology of the Cell*, 2023.
- [8] S. Phuyal, P. Romani, S. Dupont, and H. Farhan, “Mechanobiology of organelles: illuminating their roles in mechanosensing and mechanotransduction,” *Trends in Cell Biology*, 2023.
- [9] V. Anesti and L. Scorrano, “The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 1757, no. 5-6, pp. 692–699, 2006.
- [10] A. S. Moore and E. L. Holzbaur, “Mitochondrial-cytoskeletal interactions: dynamic associations that facilitate network function and remodeling,” *Current opinion in physiology*, vol. 3, pp. 94–100, 2018.
- [11] M. Shah, L. A. Chacko, J. P. Joseph, and V. Ananthanarayanan, “Mitochondrial dynamics, positioning and function mediated by cytoskeletal interactions,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 78, no. 8, pp. 3969–3986, 2021.
- [12] Q. Feng and B. Kornmann, “Mechanical forces on cellular organelles,” *Journal of Cell Science*, vol. 131, no. 21, p. jcs218479, 2018.

- [13] D. Huang, S. Chen, D. Xiong, H. Wang, L. Zhu, Y. Wei, Y. Li, and S. Zou, “Mitochondrial dynamics: Working with the cytoskeleton and intracellular organelles to mediate mechanotransduction,” *Aging and disease*, vol. 14, no. 5, p. 1511, 2023.
- [14] A. V. Kuznetsov, M. Hermann, V. Saks, P. Hengster, and R. Margreiter, “The cell-type specificity of mitochondrial dynamics,” *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 41, no. 10, pp. 1928–1939, 2009.
- [15] L. Sagan, “On the origin of mitosing cells,” *Journal of theoretical biology*, vol. 14, no. 3, pp. 225–IN6, 1967.
- [16] G. E. Palade, “The fine structure of mitochondria,” *The Anatomical Record*, vol. 114, no. 3, pp. 427–451, 1952.
- [17] T. Wai and T. Langer, “Mitochondrial dynamics and metabolic regulation,” *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 27, no. 2, pp. 105–117, 2016.
- [18] M. Giacomello, A. Pyakurel, C. Glytsou, and L. Scorrano, “The cell biology of mitochondrial membrane dynamics,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 21, no. 4, pp. 204–224, 2020.
- [19] L. Scorrano, M. A. De Matteis, S. Emr, F. Giordano, G. Hajnóczky, B. Kornmann, L. L. Lackner, T. P. Levine, L. Pellegrini, K. Reinisch, *et al.*, “Coming together to define membrane contact sites,” *Nature communications*, vol. 10, no. 1, p. 1287, 2019.
- [20] M. M. Nass and S. Nass, “Intramitochondrial fibers with dna characteristics i. fixation and electron staining reactions,” *Journal of Cell Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 593–611, 1963.
- [21] J. Bereiter-Hahn and M. Vöth, “Distribution and dynamics of mitochondrial nucleoids in animal cells in culture,” *Experimental Biology Online*, vol. 1, pp. 1–17, 1996.
- [22] H. Antonicka, F. Sasarman, T. Nishimura, V. Paupe, and E. A. Shoubbridge, “The mitochondrial rna-binding protein grsfl localizes to rna granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression,” *Cell metabolism*, vol. 17, no. 3, pp. 386–398, 2013.
- [23] T. Rey, S. Zaganelli, E. Cuillery, E. Vartholomaiou, M. Croisier, J.-C. Martinou, and S. Manley, “Mitochondrial rna granules are fluid condensates positioned by membrane dynamics,” *Nature cell biology*, vol. 22, no. 10, pp. 1180–1186, 2020.
- [24] N. Preminger and M. Schuldiner, “Beyond fission and fusion—diving into the mysteries of mitochondrial shape,” *Plos Biology*, vol. 22, no. 7, p. e3002671, 2024.
- [25] K. M. Tharp, R. Higuchi-Sanabria, G. A. Timblin, B. Ford, C. Garzon-Coral, C. Schneider, J. M. Muncie, C. Stashko, J. R. Daniele, A. S. Moore, *et al.*, “Adhesion-mediated mechanosignaling forces mitohormesis,” *Cell metabolism*, vol. 33, no. 7, pp. 1322–1341, 2021.

- [26] M. R. Lewis and M. Lewis, “Mitochondria (and other cytoplasmic,” *The American Journal of Anatomy*, vol. 17, p. 339, 1915.
- [27] L. C. Gomes and L. Scorrano, “High levels of fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 1777, no. 7-8, pp. 860–866, 2008.
- [28] G. Twig, A. Elorza, A. J. Molina, H. Mohamed, J. D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S. E. Haigh, S. Katz, G. Las, *et al.*, “Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy,” *The EMBO journal*, vol. 27, no. 2, pp. 433–446, 2008.
- [29] Y. Miyazono, S. Hirashima, N. Ishihara, J. Kusukawa, K.-i. Nakamura, and K. Ohta, “Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner,” *Scientific reports*, vol. 8, no. 1, p. 350, 2018.
- [30] L. Quiring, B. Walter, N. Lohaus, D. Schwan, A. Rech, A. Dlugos, and U. Rauen, “Characterisation of cold-induced mitochondrial fission in porcine aortic endothelial cells,” *Molecular Medicine*, vol. 28, no. 1, p. 13, 2022.
- [31] C. K. Bleck, Y. Kim, T. B. Willingham, and B. Glancy, “Subcellular connectomic analyses of energy networks in striated muscle,” *Nature communications*, vol. 9, no. 1, p. 5111, 2018.
- [32] L. Chen, M. Zhou, H. Li, D. Liu, P. Liao, Y. Zong, C. Zhang, W. Zou, and J. Gao, “Mitochondrial heterogeneity in diseases,” *Signal transduction and targeted therapy*, vol. 8, no. 1, p. 311, 2023.
- [33] W. Chen, H. Zhao, and Y. Li, “Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets,” *Signal transduction and targeted therapy*, vol. 8, no. 1, p. 333, 2023.
- [34] Y. Ma, L. Wang, and R. Jia, “The role of mitochondrial dynamics in human cancers,” *American journal of cancer research*, vol. 10, no. 5, p. 1278, 2020.
- [35] V. Eisner, M. Picard, and G. Hajnóczky, “Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses,” *Nature cell biology*, vol. 20, no. 7, pp. 755–765, 2018.
- [36] B. C. Jenkins, K. Neikirk, P. Katti, S. M. Claypool, A. Kirabo, M. R. McReynolds, and A. Hinton, “Mitochondria in disease: changes in shapes and dynamics,” *Trends in biochemical sciences*, 2024.
- [37] E. Motori, J. Puyal, N. Toni, A. Ghanem, C. Angeloni, M. Malaguti, G. Cantelli-Forti, B. Berninger, K.-K. Conzelmann, M. Götz, *et al.*, “Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance,” *Cell metabolism*, vol. 18, no. 6, pp. 844–859, 2013.

- [38] K. Mehta, L. A. Chacko, M. K. Chug, S. Jhunjhunwala, and V. Ananthanarayanan, “Association of mitochondria with microtubules inhibits mitochondrial fission by precluding assembly of the fission protein dnm1,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, no. 10, pp. 3385–3396, 2019.
- [39] D. T. Chang, A. S. Honick, and I. J. Reynolds, “Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons,” *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 26, pp. 7035–7045, 2006.
- [40] N. Ohno, G. J. Kidd, D. Mahad, S. Kiryu-Seo, A. Avishai, H. Komuro, and B. D. Trapp, “Myelination and axonal electrical activity modulate the distribution and motility of mitochondria at cns nodes of ranvier,” *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 20, pp. 7249–7258, 2011.
- [41] R. Quintana-Cabrera and L. Scorrano, “Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics,” *Molecular Cell*, vol. 83, no. 6, pp. 857–876, 2023.
- [42] D. C. Chan, “Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development,” *Cell*, vol. 125, no. 7, pp. 1241–1252, 2006.
- [43] S. Campello and L. Scorrano, “Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology,” *EMBO reports*, vol. 11, no. 9, pp. 678–684, 2010.
- [44] I. Amigo, F. M. da Cunha, M. F. Forni, W. Garcia-Neto, P. A. Kakimoto, L. A. Luévano-Martínez, F. Macedo, S. L. Menezes-Filho, J. Peloggia, and A. J. Kowaltowski, “Mitochondrial form, function and signalling in aging,” *Biochemical Journal*, vol. 473, no. 20, pp. 3421–3449, 2016.
- [45] L. Pernas and L. Scorrano, “Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function,” *Annual review of physiology*, vol. 78, pp. 505–531, 2016.
- [46] M. Liesa and O. S. Shirihai, “Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure,” *Cell metabolism*, vol. 17, no. 4, pp. 491–506, 2013.
- [47] P. Gatti, C. Schiavon, J. Cicero, U. Manor, and M. Germain, “Mitochondria-and-er-associated actin are required for mitochondrial fusion,” *Nature Communications*, vol. 16, no. 1, p. 451, 2025.
- [48] A. S. Moore, Y. C. Wong, C. L. Simpson, and E. L. Holzbaur, “Dynamic actin cycling through mitochondrial subpopulations locally regulates the fission–fusion balance within mitochondrial networks,” *Nature communications*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2016.
- [49] D. Mahecic, L. Carlini, T. Kleele, A. Colom, A. Goujon, S. Matile, A. Roux, and S. Manley, “Mitochondrial membrane tension governs fission,” *Cell reports*, vol. 35, no. 2, p. 108947, 2021.
- [50] S. C. J. Helle, Q. Feng, M. J. Aebersold, L. Hirt, R. R. Grüter, A. Vahid, A. Sirianni, S. Mostowy, J. G. Snedeker, A. Šarić, *et al.*, “Mechanical force induces mitochondrial fission,” *Elife*, vol. 6, p. e30292, 2017.

- [51] A. K. Kondadi and A. S. Reichert, “Mitochondrial dynamics at different levels: from cristae dynamics to interorganellar cross talk,” *Annual Review of Biophysics*, vol. 53, 2024.
- [52] S. Modi, G. López-Doménech, E. F. Halff, C. Covill-Cooke, D. Ivankovic, D. Melandri, I. L. Arancibia-Cárcamo, J. J. Burden, A. R. Lowe, and J. T. Kittler, “Miro clusters regulate er-mitochondria contact sites and link cristae organization to the mitochondrial transport machinery,” *Nature communications*, vol. 10, no. 1, p. 4399, 2019.
- [53] Q. Cai, H. M. Zakaria, A. Simone, and Z.-H. Sheng, “Spatial parkin translocation and degradation of damaged mitochondria via mitophagy in live cortical neurons,” *Current Biology*, vol. 22, no. 6, pp. 545–552, 2012.
- [54] T. Misgeld and T. L. Schwarz, “Mitostasis in neurons: maintaining mitochondria in an extended cellular architecture,” *Neuron*, vol. 96, no. 3, pp. 651–666, 2017.
- [55] M. C. Caino, J. H. Seo, Y. Wang, D. B. Rivadeneira, D. I. Gabrilovich, E. T. Kim, A. T. Weeraratna, L. R. Languino, D. C. Altieri, *et al.*, “Syntaphilin controls a mitochondrial rheostat for proliferation-motility decisions in cancer,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 127, no. 10, pp. 3755–3769, 2017.
- [56] D. B. Rivadeneira, M. C. Caino, J. H. Seo, A. Angelin, D. C. Wallace, L. R. Languino, and D. C. Altieri, “Survivin promotes oxidative phosphorylation, subcellular mitochondrial repositioning, and tumor cell invasion,” *Science signaling*, vol. 8, no. 389, pp. ra80–ra80, 2015.
- [57] A. Quintana, C. Schwindling, A. S. Wenning, U. Becherer, J. Rettig, E. C. Schwarz, and M. Hoth, “T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 36, pp. 14418–14423, 2007.
- [58] A. G. Hendricks, E. L. Holzbaur, and Y. E. Goldman, “Force measurements on cargoes in living cells reveal collective dynamics of microtubule motors,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 45, pp. 18447–18452, 2012.
- [59] T. G. Mason and D. Weitz, “Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids,” *Physical review letters*, vol. 74, no. 7, p. 1250, 1995.
- [60] A. Caspi, R. Granek, and M. Elbaum, “Diffusion and directed motion in cellular transport,” *Physical Review E*, vol. 66, no. 1, p. 011916, 2002.
- [61] A. W. Lau, B. D. Hoffman, A. Davies, J. C. Crocker, and T. C. Lubensky, “Microrheology, stress fluctuations, and active behavior of living cells,” *Physical review letters*, vol. 91, no. 19, p. 198101, 2003.
- [62] I. M. Toli ć Nørrelykke, E.-L. Munteanu, G. Thon, L. Oddershede, and K. Berg-Sørensen, “Anomalous diffusion in living yeast cells,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 93, p. 078102, Aug 2004.

- [63] J. Howard *et al.*, *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer associates Sunderland, MA, 2001.
- [64] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 2007.
- [65] R. D. Vale, “The molecular motor toolbox for intracellular transport,” *Cell*, vol. 112, no. 4, pp. 467–480, 2003.
- [66] R. D. Vale and R. A. Milligan, “The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins,” *Science*, vol. 288, no. 5463, pp. 88–95, 2000.
- [67] A. J. Kruppa and F. Buss, “Motor proteins at the mitochondria–cytoskeleton interface,” *Journal of cell science*, vol. 134, no. 7, p. jcs226084, 2021.
- [68] S. L. Rogers, I. S. Tint, P. C. Fanapour, and V. I. Gelfand, “Regulated bidirectional motility of melanophore pigment granules along microtubules in vitro,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 8, pp. 3720–3725, 1997.
- [69] S. L. Rogers and V. I. Gelfand, “Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores,” *Current Biology*, vol. 8, no. 3, pp. 161–164, 1998.
- [70] F. Gittes, E. Meyhöfer, S. Baek, and J. Howard, “Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule,” *Biophysical journal*, vol. 70, no. 1, pp. 418–429, 1996.
- [71] S. P. Gross, M. A. Welte, S. M. Block, and E. F. Wieschaus, “Coordination of opposite-polarity microtubule motors,” *Journal of Cell Biology*, vol. 156, no. 4, pp. 715–724, 2002.
- [72] M. A. Welte, “Bidirectional transport along microtubules,” *Current Biology*, vol. 14, no. 13, pp. R525–R537, 2004.
- [73] V. Levi, A. S. Serpinskaya, E. Gratton, and V. Gelfand, “Organelle transport along microtubules in xenopus melanophores: evidence for cooperation between multiple motors,” *Biophysical journal*, vol. 90, no. 1, pp. 318–327, 2006.
- [74] S. Ally, A. G. Larson, K. Barlan, S. E. Rice, and V. I. Gelfand, “Opposite-polarity motors activate one another to trigger cargo transport in live cells,” *Journal of Cell Biology*, vol. 187, no. 7, pp. 1071–1082, 2009.
- [75] M. J. Müller, S. Klumpp, and R. Lipowsky, “Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 12, pp. 4609–4614, 2008.
- [76] W. O. Hancock, “Bidirectional cargo transport: moving beyond tug of war,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 15, no. 9, p. 615, 2014.

- [77] C. Wang, W. Du, Q. P. Su, M. Zhu, P. Feng, Y. Li, Y. Zhou, N. Mi, Y. Zhu, D. Jiang, *et al.*, “Dynamic tubulation of mitochondria drives mitochondrial network formation,” *Cell research*, vol. 25, no. 10, pp. 1108–1120, 2015.
- [78] O. S. Koutsopoulos, D. Laine, L. Osellame, D. M. Chudakov, R. G. Parton, A. E. Frazier, and M. T. Ryan, “Human mitons associate with mitochondria and induce microtubule-dependent remodeling of mitochondrial networks,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1803, no. 5, pp. 564–574, 2010.
- [79] Y. Song, P. Huang, X. Liu, Z. Zhao, Y. Wang, B. Cui, and L. Duan, “Light-inducible deformation of mitochondria in live cells,” *Cell Chemical Biology*, vol. 29, no. 1, pp. 109–119, 2022.
- [80] L. Duan, D. Che, K. Zhang, Q. Ong, S. Guo, and B. Cui, “Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells,” *Chemistry & biology*, vol. 22, no. 5, pp. 671–682, 2015.
- [81] X. Liu, L. Xu, Y. Song, Z. Zhao, X. Li, C.-Y. Wong, R. Chen, J. Feng, Y. Gou, Y. Qi, *et al.*, “Force-induced tail-autotomy mitochondrial fission and biogenesis of matrix-excluded mitochondrial-derived vesicles for quality control,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 121, no. 14, p. e2217019121, 2024.
- [82] Y. Guo, D. Li, S. Zhang, Y. Yang, J.-J. Liu, X. Wang, C. Liu, D. E. Milkie, R. P. Moore, U. S. Tulu, *et al.*, “Visualizing intracellular organelle and cytoskeletal interactions at nanoscale resolution on millisecond timescales,” *Cell*, vol. 175, no. 5, pp. 1430–1442, 2018.
- [83] Y. C. Wong, S. Kim, W. Peng, and D. Krainc, “Regulation and function of mitochondria–lysosome membrane contact sites in cellular homeostasis,” *Trends in cell biology*, vol. 29, no. 6, pp. 500–513, 2019.
- [84] R. G. Abrisch, S. C. Gumbin, B. T. Wisniewski, L. L. Lackner, and G. K. Voeltz, “Fission and fusion machineries converge at er contact sites to regulate mitochondrial morphology,” *Journal of Cell Biology*, vol. 219, no. 4, 2020.
- [85] D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt, and F. C. MacKintosh, “Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks,” *Science*, vol. 315, no. 5810, pp. 370–373, 2007.
- [86] A. F. Pegoraro, P. Janmey, and D. A. Weitz, “Mechanical properties of the cytoskeleton and cells,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 9, no. 11, p. a022038, 2017.
- [87] E. Bartolák-Suki, J. Imsirovic, Y. Nishibori, R. Krishnan, and B. Suki, “Regulation of mitochondrial structure and dynamics by the cytoskeleton and mechanical factors,” *International journal of molecular sciences*, vol. 18, no. 8, p. 1812, 2017.
- [88] N. U. Fatima and V. Ananthanarayanan, “Mitochondrial movers and shapers: recent insights into regulators of fission, fusion and transport,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 80, p. 102150, 2023.

- [89] <https://BioRender.com>.
- [90] J. Schmoranzer. <https://www.nikonsmallworld.com/galleries/2005-photomicrography-competition/nih-3t3-fibroblasts-mouse-cells>.
- [91] A. Samsonov, J.-Z. Yu, M. Rasenick, and S. V. Popov, “Tau interaction with microtubules in vivo,” *Journal of cell science*, vol. 117, no. 25, pp. 6129–6141, 2004.
- [92] S. Koehler, V. Schaller, and A. R. Bausch, “Collective dynamics of active cytoskeletal networks,” *PLoS one*, vol. 6, no. 8, p. e23798, 2011.
- [93] F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton, and J. Howard, “Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape,” *The Journal of cell biology*, vol. 120, no. 4, pp. 923–934, 1993.
- [94] C. P. Brangwynne, F. MacKintosh, and D. A. Weitz, “Force fluctuations and polymerization dynamics of intracellular microtubules,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 41, pp. 16128–16133, 2007.
- [95] C. Pallavicini, V. Levi, D. E. Wetzler, J. F. Angiolini, L. Benseñor, M. A. Despósito, and L. Bruno, “Lateral motion and bending of microtubules studied with a new single-filament tracking routine in living cells,” *Biophysical journal*, vol. 106, no. 12, pp. 2625–2635, 2014.
- [96] R. L. Frederick and J. M. Shaw, “Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle,” *Traffic*, vol. 8, no. 12, pp. 1668–1675, 2007.
- [97] A. Varadi, L. I. Johnson-Cadwell, V. Cirulli, Y. Yoon, V. J. Allan, and G. A. Rutter, “Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1,” *Journal of cell science*, vol. 117, no. 19, pp. 4389–4400, 2004.
- [98] M. Nangaku, R. Sato-Yoshitake, Y. Okada, Y. Noda, R. Takemura, H. Yamazaki, and N. Hirokawa, “Kif1b, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria,” *Cell*, vol. 79, no. 7, pp. 1209–1220, 1994.
- [99] Y. Tanaka, Y. Kanai, Y. Okada, S. Nonaka, S. Takeda, A. Harada, and N. Hirokawa, “Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain kif5b, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria,” *Cell*, vol. 93, no. 7, pp. 1147–1158, 1998.
- [100] M. C. De Rossi, V. Levi, and L. Bruno, “Retraction of rod-like mitochondria during microtubule-dependent transport,” *Bioscience reports*, vol. 38, no. 3, p. BSR20180208, 2018.
- [101] A. F. Casafuz, M. De Rossi, and L. Bruno, “Intracellular motor-driven transport of rodlike smooth organelles along microtubules,” *Physical Review E*, vol. 101, no. 6, p. 062416, 2020.

- [102] A. K. Lewis and P. C. Bridgman, “Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity.,” *The Journal of cell biology*, vol. 119, no. 5, pp. 1219–1243, 1992.
- [103] R. G. Fehon, A. I. McClatchey, and A. Bretscher, “Organizing the cell cortex: the role of erm proteins,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 11, no. 4, pp. 276–287, 2010.
- [104] S. P. Gross, M. C. Tuma, S. W. Deacon, A. S. Serpinskaya, A. R. Reilein, and V. I. Gelfand, “Interactions and regulation of molecular motors in xenopus melanophores,” *The Journal of cell biology*, vol. 156, no. 5, pp. 855–865, 2002.
- [105] A. Moore. <https://www.hhmi.org/beautifulbiology/media-detail/cytoskeleton-crew>.
- [106] S. H. Lee and R. Dominguez, “Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells,” *Molecules and cells*, vol. 29, no. 4, pp. 311–326, 2010.
- [107] A. L. Hatch, P. S. Gurel, and H. N. Higgs, “Novel roles for actin in mitochondrial fission,” *Journal of cell science*, vol. 127, no. 21, pp. 4549–4560, 2014.
- [108] A. Pagliuso, T. N. Tham, J. K. Stevens, T. Lagache, R. Persson, A. Salles, J.-C. Olivo-Marin, S. Oddos, A. Spang, P. Cossart, *et al.*, “A role for septin 2 in drp1-mediated mitochondrial fission,” *EMBO reports*, vol. 17, no. 6, pp. 858–873, 2016.
- [109] F. Kraus and M. T. Ryan, “The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission,” *Journal of cell science*, vol. 130, no. 18, pp. 2953–2960, 2017.
- [110] D. C. Chan, “Mitochondrial dynamics and its involvement in disease,” *Annual review of pathology: mechanisms of disease*, vol. 15, pp. 235–259, 2020.
- [111] A. R. Fenton, T. A. Jongens, and E. L. Holzbaur, “Mitochondrial dynamics: Shaping and remodeling an organelle network,” *Current opinion in cell biology*, vol. 68, pp. 28–36, 2021.
- [112] T. S. Fung, R. Chakrabarti, J. Kollasser, K. Rottner, T. E. Stradal, F. Kage, and H. N. Higgs, “Parallel kinase pathways stimulate actin polymerization at depolarized mitochondria,” *Current Biology*, vol. 32, no. 7, pp. 1577–1592, 2022.
- [113] P. Shi, X. Ren, J. Meng, C. Kang, Y. Wu, Y. Rong, S. Zhao, Z. Jiang, L. Liang, W. He, *et al.*, “Mechanical instability generated by myosin 19 contributes to mitochondria cristae architecture and oxphos,” *Nature communications*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, 2022.
- [114] A. S. Moore, S. M. Coscia, C. L. Simpson, F. E. Ortega, E. C. Wait, J. M. Heddleston, J. J. Nirschl, C. J. Obara, P. Guedes-Dias, C. A. Boecker, *et al.*, “Actin cables and comet tails organize mitochondrial networks in mitosis,” *Nature*, vol. 591, no. 7851, pp. 659–664, 2021.
- [115] S. V. Strelkov, H. Herrmann, and U. Aebi, “Molecular architecture of intermediate filaments,” *Bioessays*, vol. 25, no. 3, pp. 243–251, 2003.

- [116] L. Chang and R. D. Goldman, “Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 5, no. 8, pp. 601–613, 2004.
- [117] A. Moore. <https://www.nikonsmallworld.com/galleries/2021-photomicrography-competition/vimentin-intermediate-filament-network-in-an-africa>
- [118] L. Chang, K. Barlan, Y.-H. Chou, B. Grin, M. Lakonishok, A. S. Serpinskaya, D. K. Shumaker, H. Herrmann, V. I. Gelfand, and R. D. Goldman, “The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport,” *Journal of cell science*, vol. 122, no. 16, pp. 2914–2923, 2009.
- [119] N. Schwarz and R. E. Leube, “Intermediate filaments as organizers of cellular space: how they affect mitochondrial structure and function,” *Cells*, vol. 5, no. 3, p. 30, 2016.
- [120] A. V. Kuznetsov, S. Javadov, M. Grimm, R. Margreiter, M. J. Ausserlechner, and J. Hagenbuchner, “Crosstalk between mitochondria and cytoskeleton in cardiac cells,” *Cells*, vol. 9, no. 1, p. 222, 2020.
- [121] L. Winter, C. Abrahamsberg, and G. Wiche, “Plectin isoform 1b mediates mitochondrion–intermediate filament network linkage and controls organelle shape,” *The Journal of cell biology*, vol. 181, no. 6, pp. 903–911, 2008.
- [122] O. E. Nekrasova, M. G. Mendez, I. S. Chernoiivanenko, P. A. Tyurin-Kuzmin, E. R. Kuczmarski, V. I. Gelfand, R. D. Goldman, and A. A. Minin, “Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria,” *Molecular biology of the cell*, vol. 22, no. 13, pp. 2282–2289, 2011.
- [123] E. A. Matveeva, L. S. Venkova, I. S. Chernoiivanenko, and A. A. Minin, “Vimentin is involved in regulation of mitochondrial motility and membrane potential by rac1,” *Biology open*, vol. 4, no. 10, pp. 1290–1297, 2015.
- [124] H. L. Tang, H. L. Lung, K. C. Wu, A.-H. P. Le, H. M. Tang, and M. C. Fung, “Vimentin supports mitochondrial morphology and organization,” *Biochemical journal*, vol. 410, no. 1, pp. 141–146, 2008.
- [125] S. W. Hell, E. H. Stelzer, S. Lindek, and C. Cremer, “Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-b 4pi confocal microscopy,” *Optics letters*, vol. 19, no. 3, pp. 222–224, 1994.
- [126] C. Joo, H. Balci, Y. Ishitsuka, C. Buranachai, and T. Ha, “Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 51–76, 2008.
- [127] K. Weisshart, “Microscopy, technical report.” <http://https://pages.zeiss.com/rs/896-XMS-794/images/ZEISS-Microscopy-The-Basic-Principle-of-Airyscanning.pdf>. Accessed: 2025-04-30.
- [128] E. Hecht, *Optics*. Pearson Education India, 2012.

- [129] R. H. Webb, “Confocal optical microscopy,” *Reports on progress in physics*, vol. 59, no. 3, p. 427, 1996.
- [130] J. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, vol. 236. Springer Science & Business Media, 2006.
- [131] M. Smoler, F. Pennacchietti, M. C. De Rossi, L. Bruno, I. Testa, and V. Levi, “Dynamical organization of vimentin intermediate filaments in living cells revealed by monalisa nanoscopy,” *Bioscience reports*, vol. 45, no. 2, p. BSR20241133, 2025.
- [132] J. Valli and J. Sanderson, “Super-resolution fluorescence microscopy methods for assessing mouse biology,” *Current Protocols*, vol. 1, no. 8, p. e224, 2021.
- [133] M. G. Gustafsson, “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy,” *Journal of microscopy*, vol. 198, no. 2, pp. 82–87, 2000.
- [134] N. Feiner-Gracia, S. Pujals, P. Delcanale, and L. Albertazzi, “Advanced optical microscopy techniques for the investigation of cell-nanoparticle interactions,” in *Smart Nanoparticles for Biomedicine*, pp. 219–236, Elsevier, 2018.
- [135] A. Curd, A. Cleasby, K. Makowska, A. York, H. Shroff, and M. Peckham, “Construction of an instant structured illumination microscope,” *Methods*, vol. 88, pp. 37–47, 2015.
- [136] A. G. York, P. Chandris, D. D. Nogare, J. Head, P. Wawrzusin, R. S. Fischer, A. Chitnis, and H. Shroff, “Instant super-resolution imaging in live cells and embryos via analog image processing,” *Nature methods*, vol. 10, no. 11, pp. 1122–1126, 2013.
- [137] W. Nijenhuis, M. M. van Grinsven, and L. C. Kapitein, “An optimized toolbox for the optogenetic control of intracellular transport,” *Journal of Cell Biology*, vol. 219, no. 4, p. e201907149, 2020.
- [138] P. Tan, L. He, Y. Huang, and Y. Zhou, “Optophysiology: Illuminating cell physiology with optogenetics,” *Physiological reviews*, vol. 102, no. 3, pp. 1263–1325, 2022.
- [139] B. R. Rost, F. Schneider-Warme, D. Schmitz, and P. Hegemann, “Optogenetic tools for subcellular applications in neuroscience,” *Neuron*, vol. 96, no. 3, pp. 572–603, 2017.
- [140] M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, and C. L. Tucker, “Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells,” *Nature methods*, vol. 7, no. 12, pp. 973–975, 2010.
- [141] Y. Cui, S. R. Choudhury, and J. Irudayaraj, “Quantitative real-time kinetics of optogenetic proteins cry2 and cib1/n using single-molecule tools,” *Analytical biochemistry*, vol. 458, pp. 58–60, 2014.
- [142] M. C. De Rossi, L. Bruno, A. Wolosiuk, M. A. Despósito, and V. Levi, “When size does matter: organelle size influences the properties of transport mediated by molecular motors,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1830, no. 11, pp. 5095–5103, 2013.

- [143] M. C. De Rossi, M. E. De Rossi, M. Sued, D. Rodríguez, L. Bruno, and V. Levi, “Asymmetries in kinesin-2 and cytoplasmic dynein contributions to melanosome transport,” *FEBS letters*, vol. 589, no. 19PartB, pp. 2763–2768, 2015.
- [144] C. Pallavicini, A. Monastra, N. G. Bardeci, D. Wetzler, V. Levi, and L. Bruno, “Characterization of microtubule buckling in living cells,” *European Biophysics Journal*, vol. 46, no. 6, pp. 581–594, 2017.
- [145] R. Carotenuto, M. M. Pallotta, M. Tussellino, and C. Fogliano, “*Xenopus laevis* (daudin, 1802) as a model organism for bioscience: A historic review and perspective,” *Biology*, vol. 12, no. 6, p. 890, 2023.
- [146] M. Fisher, C. James-Zorn, V. Ponferrada, A. J. Bell, N. Sundararaj, E. Segerdell, P. Chaturvedi, N. Bayyari, S. Chu, T. Pells, *et al.*, “Xenbase: key features and resources of the xenopus model organism knowledgebase,” *Genetics*, vol. 224, no. 1, p. iyad018, 2023.
- [147] J. El Mir, A. Nasrallah, N. Thézé, M. Cario, H. Fayyad-Kazan, P. Thiébaud, and H.-R. Rezvani, “*Xenopus* as a model system for studying pigmentation and pigmentary disorders,” *Pigment Cell & Melanoma Research*, vol. 38, no. 1, p. e13178, 2025.
- [148] M. Blum and T. Ott, “*Xenopus*: an undervalued model organism to study and model human genetic disease,” *Cells Tissues Organs*, vol. 205, no. 5-6, pp. 303–313, 2019.
- [149] O. F. Olesen, H. Kawabata-Fukui, K. Yoshizato, and N. Noro, “Molecular cloning of xtp, a tau-like microtubule-associated protein from *xenopus laevis* tadpoles,” *Gene*, vol. 283, no. 1-2, pp. 299–309, 2002.
- [150] A. Chinchole, K. A. Lone, and S. Tyagi, “Mll regulates the actin cytoskeleton and cell migration by stabilising rho gtpases via the expression of rhogdi1,” *Journal of cell science*, vol. 135, no. 20, p. jcs260042, 2022.
- [151] C. Kural, A. S. Serpinskaya, Y.-H. Chou, R. D. Goldman, V. I. Gelfand, and P. R. Selvin, “Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 13, pp. 5378–5382, 2007.
- [152] C. Pallavicini, *Mecánica y dinámica del citoesqueleto en células vivas*. PhD thesis, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física, 2017.
- [153] K. Faire, C. M. Waterman-Storer, D. Gruber, D. Masson, E. Salmon, and J. Chloë Bulinski, “E-map-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics,” *Journal of cell science*, vol. 112, no. 23, pp. 4243–4255, 1999.
- [154] M. Poot, Y.-Z. Zhang, J. Krämer, K. S. Wells, L. J. Jones, D. K. Hanzel, A. G. Lugaade, V. L. Singer, and R. P. Haugland, “Analysis of mitochondrial morphology and

- function with novel fixable fluorescent stains.” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 44, no. 12, pp. 1363–1372, 1996.
- [155] I. Spector, N. R. Shochet, D. Blasberger, and Y. Kashman, “Latrunculins—novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. comparison with cytochalasin d,” *Cell motility and the cytoskeleton*, vol. 13, no. 3, pp. 127–144, 1989.
- [156] M. De Brabander, R. Van de Velre, F. Aerts, M. Borgers, and P. Janssen, “The effects of methyl [5-(2-thienylcarbonyl)-1 h-benzimidazol-2-yl] carbamate,(r 17934; nsc 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro,” *Cancer research*, vol. 36, no. 3, pp. 905–916, 1976.
- [157] R. Dhamodharan, M. A. Jordan, D. Thrower, L. Wilson, and P. Wadsworth, “Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells.” *Molecular biology of the cell*, vol. 6, no. 9, pp. 1215–1229, 1995.
- [158] T. Kleele, T. Rey, J. Winter, S. Zaganelli, D. Mahecic, H. Perreten Lambert, F. P. Ruberto, M. Nemir, T. Wai, T. Pedrazzini, *et al.*, “Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis,” *Nature*, vol. 593, no. 7859, pp. 435–439, 2021.
- [159] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, *et al.*, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nature methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, 2012.
- [160] M. B. Smith, H. Li, T. Shen, X. Huang, E. Yusuf, and D. Vavylonis, “Segmentation and tracking of cytoskeletal filaments using open active contours,” *Cytoskeleton*, vol. 67, no. 11, pp. 693–705, 2010.
- [161] H. Li, T. Shen, M. B. Smith, I. Fujiwara, D. Vavylonis, and X. Huang, “Automated actin filament segmentation, tracking and tip elongation measurements based on open active contour models,” in *2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, pp. 1302–1305, IEEE, 2009.
- [162] A. Chaudhry, R. Shi, and D. S. Luciani, “A pipeline for multidimensional confocal analysis of mitochondrial morphology, function, and dynamics in pancreatic β -cells,” *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 318, no. 2, pp. E87–E101, 2020.
- [163] L. C. Woods, G. W. Berbusse, and K. Naylor, “Microtubules are essential for mitochondrial dynamics—fission, fusion, and motility—in dictyostelium discoideum,” *Frontiers in cell and developmental biology*, vol. 4, p. 19, 2016.
- [164] H. Mary, C. Rueden, and T. Ferreira, “Kymographbuilder: Release 1.2. 4,” *Zenodo*, 2016.
- [165] A. Kulesa, M. Krzywinski, P. Blainey, and N. Altman, “Sampling distributions and the bootstrap,” *Nat. Methods*, 2015.

- [166] J. H. McDonald, *Handbook of biological statistics*. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. USA, 2014.
- [167] L. Wasserman, *All of statistics: a concise course in statistical inference*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [168] <https://scikit-learn.org/stable/modules/mixture.html>.
- [169] G. Schwarz, “Estimating the dimension of a model,” *The annals of statistics*, pp. 461–464, 1978.
- [170] A. B. Fernández Casafuz, M. C. De Rossi, and L. Bruno, “Mitochondrial cellular organization and shape fluctuations are differentially modulated by cytoskeletal networks,” *Scientific Reports*, vol. 13, no. 1, p. 4065, 2023.
- [171] J. P. Moura, P. J. Oliveira, and A. M. Urbano, “Mitochondria: An overview of their origin, genome, architecture, and dynamics,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, p. 167803, 2025.
- [172] <https://imagej.net/plugins/directionality>.
- [173] A. B. F. Casafuz, M. C. De Rossi, and L. Bruno, “Morphological fluctuations of individual mitochondria in living cells,” *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 34, no. 9, p. 094005, 2021.
- [174] R. H. Pritchard, Y. Y. S. Huang, and E. M. Terentjev, “Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue,” *Soft matter*, vol. 10, no. 12, pp. 1864–1884, 2014.
- [175] J. B. Hays, M. E. Magar, and B. H. Zimm, “Persistence length of dna,” *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, vol. 8, no. 4, pp. 531–536, 1969.
- [176] M. Smoler, G. Coceano, I. Testa, L. Bruno, and V. Levi, “Apparent stiffness of vimentin intermediate filaments in living cells and its relation with other cytoskeletal polymers,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1867, no. 8, p. 118726, 2020.
- [177] P. Wisanpitayakorn, K. J. Mickolajczyk, W. O. Hancock, L. Vidali, and E. Tüzel, “Measurement of the persistence length of cytoskeletal filaments using curvature distributions,” *Biophysical journal*, vol. 121, no. 10, pp. 1813–1822, 2022.
- [178] H. T. Perkins, V. J. Allan, and T. A. Waigh, “Network organisation and the dynamics of tubules in the endoplasmic reticulum,” *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 2021.
- [179] T. S. Fung, W.-K. Ji, H. N. Higgs, and R. Chakrabarti, “Two distinct actin filament populations have effects on mitochondria, with differences in stimuli and assembly factors,” *Journal of cell science*, vol. 132, no. 18, p. jcs234435, 2019.

- [180] F. Korobova, V. Ramabhadran, and H. N. Higgs, “An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the er-associated formin inf2,” *Science*, vol. 339, no. 6118, pp. 464–467, 2013.
- [181] A. Kulik, O. Nekrasova, and A. Minin, “Mitochondria motility is regulated by f-actin,” *Biologicheskie Membrany*, vol. 23, no. 1, 2006.
- [182] D. Pathak, K. J. Sepp, and P. J. Hollenbeck, “Evidence that myosin activity opposes microtubule-based axonal transport of mitochondria,” *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 26, pp. 8984–8992, 2010.
- [183] A. M. Brigante, “Aspectos dinámicos y mecánicos de mitocondrias e interacciones con el citoesqueleto,” Master’s thesis, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física, 2023.
- [184] T. Eisenstecken, G. Gompper, and R. G. Winkler, “Internal dynamics of semiflexible polymers with active noise,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 146, no. 15, 2017.
- [185] A. Ghosh and N. Gov, “Dynamics of active semiflexible polymers,” *Biophysical Journal*, vol. 107, no. 5, pp. 1065–1073, 2014.
- [186] H. Vandebroek and C. Vanderzande, “Dynamics of a polymer in an active and viscoelastic bath,” *Physical Review E*, vol. 92, no. 6, p. 060601, 2015.
- [187] C. Battle, C. P. Broedersz, N. Fakhri, V. F. Geyer, J. Howard, C. F. Schmidt, and F. C. MacKintosh, “Broken detailed balance at mesoscopic scales in active biological systems,” *Science*, vol. 352, no. 6285, pp. 604–607, 2016.
- [188] F. S. Gnesotto, F. Mura, J. Gladrow, and C. P. Broedersz, “Broken detailed balance and non-equilibrium dynamics in living systems: a review,” *Reports on Progress in Physics*, vol. 81, no. 6, p. 066601, 2018.
- [189] J. Gladrow, N. Fakhri, F. C. MacKintosh, C. Schmidt, and C. Broedersz, “Broken detailed balance of filament dynamics in active networks,” *Physical review letters*, vol. 116, no. 24, p. 248301, 2016.
- [190] J. Wenger, A. Brigante, A. B. F. Casafuz, L. Bruno, and A. Monastra, “Inference of the force pattern acting on a semiflexible filament from shape analysis,” *Physical Review E*, vol. 108, no. 6, p. 064402, 2023.
- [191] V. Levi and E. Gratton, “Exploring dynamics in living cells by tracking single particles,” *Cell biochemistry and biophysics*, vol. 48, pp. 1–15, 2007.
- [192] G. Muñoz-Gil, G. Volpe, M. A. Garcia-March, E. Aghion, A. Argun, C. B. Hong, T. Bland, S. Bo, J. A. Conejero, N. Firdas, *et al.*, “Objective comparison of methods to decode anomalous diffusion,” *Nature communications*, vol. 12, no. 1, p. 6253, 2021.
- [193] I. Wohl and E. Sherman, “Atp-dependent diffusion entropy and homogeneity in living cells,” *Entropy*, vol. 21, no. 10, p. 962, 2019.

- [194] M. Weiss, M. Elsner, F. Kartberg, and T. Nilsson, “Anomalous subdiffusion is a measure for cytoplasmic crowding in living cells,” *Biophysical journal*, vol. 87, no. 5, pp. 3518–3524, 2004.
- [195] D. S. Banks and C. Fradin, “Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding,” *Biophysical journal*, vol. 89, no. 5, pp. 2960–2971, 2005.
- [196] I. Golding and E. C. Cox, “Physical nature of bacterial cytoplasm,” *Physical review letters*, vol. 96, no. 9, p. 098102, 2006.
- [197] A. Caspi, R. Granek, and M. Elbaum, “Enhanced diffusion in active intracellular transport,” *Physical review letters*, vol. 85, no. 26, p. 5655, 2000.
- [198] J. F. Reverej, J.-H. Jeon, H. Bao, M. Leippe, R. Metzler, and C. Selhuber-Unkel, “Superdiffusion dominates intracellular particle motion in the supercrowded cytoplasm of pathogenic *acanthamoeba castellanii*,” *Scientific reports*, vol. 5, no. 1, p. 11690, 2015.
- [199] S. Fedotov, N. Korabel, T. A. Waigh, D. Han, and V. J. Allan, “Memory effects and lévy walk dynamics in intracellular transport of cargoes,” *Physical Review E*, vol. 98, no. 4, p. 042136, 2018.
- [200] E. Gauger and H. Stark, “Numerical study of a microscopic artificial swimmer,” *Physical Review E*, vol. 74, no. 2, p. 021907, 2006.
- [201] A. B. Fernández Casafuz, A. M. Brigante, M. C. De Rossi, A. G. Monastra, and L. Bruno, “Deciphering the intracellular forces shaping mitochondrial motion,” *Scientific Reports*, vol. 14, no. 1, p. 23914, 2024.
- [202] M. J. Saxton and K. Jacobson, “Single-particle tracking: applications to membrane dynamics,” *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, vol. 26, no. 1, pp. 373–399, 1997.
- [203] M. Potokar, M. Kreft, L. Li, J. Daniel Andersson, T. Pangršič, H. H. Chowdhury, M. Pekny, and R. Zorec, “Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes,” *Traffic*, vol. 8, no. 1, pp. 12–20, 2007.
- [204] A. Kulesa, M. Krzywinski, P. Blainey, and N. Altman, “Sampling distributions and the bootstrap: the bootstrap can be used to assess uncertainty of sample estimates,” *Nature methods*, vol. 12, no. 6, p. 477, 2015.
- [205] C. P. Brangwynne, G. H. Koenderink, F. C. MacKintosh, and D. A. Weitz, “Intracellular transport by active diffusion,” *Trends in cell biology*, vol. 19, no. 9, pp. 423–427, 2009.
- [206] A. B. Fernández Casafuz, “Transporte intracelular de organelas flexibles,” Master’s thesis, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física, 2019.
- [207] A. Kunwar and A. Mogilner, “Robust transport by multiple motors with nonlinear force–velocity relations and stochastic load sharing,” *Physical biology*, vol. 7, no. 1, p. 016012, 2010.

- [208] S. Bouzat, V. Levi, and L. Bruno, “Transport properties of melanosomes along microtubules interpreted by a tug-of-war model with loose mechanical coupling,” *PloS one*, vol. 7, no. 8, p. e43599, 2012.
- [209] S. Yamada, D. Wirtz, and S. C. Kuo, “Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology,” *Biophysical journal*, vol. 78, no. 4, pp. 1736–1747, 2000.
- [210] L. Bruno, V. Levi, M. Brunstein, and M. A. Desposito, “Transition to superdiffusive behavior in intracellular actin-based transport mediated by molecular motors,” *Physical Review E*, vol. 80, no. 1, p. 011912, 2009.
- [211] S. Wang, C. Jiang, Y. Zhang, J. Chen, B. Wang, Q. Chen, and M. Long, “Membrane deformability and membrane tension of single isolated mitochondria,” *Cellular and Molecular Bioengineering*, vol. 1, pp. 67–74, 2008.
- [212] N. Jiang, J. Fan, S. Zhang, T. Wu, J. Wang, P. Gao, J. Qu, F. Zhou, and X. Peng, “Dual mode monitoring probe for mitochondrial viscosity in single cell,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 190, pp. 685–693, 2014.
- [213] X. Song, N. Li, C. Wang, and Y. Xiao, “Targetable and fixable rotor for quantifying mitochondrial viscosity of living cells by fluorescence lifetime imaging,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, no. 2, pp. 360–368, 2017.
- [214] X. Zhang, Q. Sun, Z. Huang, L. Huang, and Y. Xiao, “Immobilizable fluorescent probes for monitoring the mitochondria microenvironment: a next step from the classic,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 7, no. 17, pp. 2749–2758, 2019.
- [215] R. Zwanzig, *Nonequilibrium statistical mechanics*. Oxford university press, 2001.
- [216] R. PATHRIA and P. D. Beale, “Statistical mechanics,” *Oxford and New York, Pergamon Press(International Series of Monographs in Natural Philosophy.*, vol. 45, 1972.
- [217] K. B. Holt, J. Winter, S. Manley, and E. F. Koslover, “Spatiotemporal modeling of mitochondrial network architecture,” *PRX Life*, vol. 2, no. 4, p. 043002, 2024.
- [218] J. Xie and N. Minc, “Cytoskeleton force exertion in bulk cytoplasm,” *Frontiers in cell and developmental biology*, vol. 8, p. 69, 2020.
- [219] V. Soppina, A. K. Rai, A. J. Ramaiya, P. Barak, and R. Mallik, “Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 46, pp. 19381–19386, 2009.
- [220] O. Campàs, C. Leduc, P. Bassereau, J. Casademunt, J.-F. Joanny, and J. Prost, “Coordination of kinesin motors pulling on fluid membranes,” *Biophysical Journal*, vol. 94, pp. 5009–5017, June 2008.
- [221] M. San Miguel and R. Toral, “Stochastic effects in physical systems,” in *Instabilities and nonequilibrium structures VI*, pp. 7–9, Springer, 2000.

- [222] Y. Ezber, V. Belyy, S. Can, and A. Yildiz, “Dynein harnesses active fluctuations of microtubules for faster movement,” *Nature physics*, vol. 16, no. 3, pp. 312–316, 2020.
- [223] A. Kunwar, M. Vershinin, J. Xu, and S. P. Gross, “Stepping, strain gating, and an unexpected force-velocity curve for multiple-motor-based transport,” *Current biology*, vol. 18, no. 16, pp. 1173–1183, 2008.
- [224] A. Kunwar, S. K. Tripathy, J. Xu, M. K. Mattson, P. Anand, R. Sigua, M. Vershinin, R. J. McKenney, C. Y. Clare, A. Mogilner, *et al.*, “Mechanical stochastic tug-of-war models cannot explain bidirectional lipid-droplet transport,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 47, pp. 18960–18965, 2011.
- [225] L. Bruno, M. Salierno, D. E. Wetzler, M. A. Despósito, and V. Levi, “Mechanical properties of organelles driven by microtubule-dependent molecular motors in living cells,” *PLoS One*, vol. 6, no. 4, p. e18332, 2011.
- [226] S. Jin, P. M. Haggie, and A. S. Verkman, “Single-particle tracking of membrane protein diffusion in a potential: simulation, detection, and application to confined diffusion of cftr cl- channels,” *Biophysical journal*, vol. 93, no. 3, pp. 1079–1088, 2007.
- [227] R. Grover, J. Fischer, F. W. Schwarz, W. J. Walter, P. Schwille, and S. Diez, “Transport efficiency of membrane-anchored kinesin-1 motors depends on motor density and diffusivity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, no. 46, pp. E7185–E7193, 2016.
- [228] S. R. Nelson, K. M. Trybus, and D. M. Warshaw, “Motor coupling through lipid membranes enhances transport velocities for ensembles of myosin va,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 38, pp. E3986–E3995, 2014.
- [229] M. C. De Rossi, N. G. Bardeci, Y. Alvarez, E. Mocskos, J. J. Romero, L. Bruno, D. E. Wetzler, and V. Levi, “Fluorescence correlation spectroscopy reveals the dynamics of kinesins interacting with organelles during microtubule-dependent transport in cells,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1867, no. 1, p. 118572, 2020.
- [230] A. J. Hunt, F. Gittes, and J. Howard, “The force exerted by a single kinesin molecule against a viscous load,” *Biophysical journal*, vol. 67, no. 2, pp. 766–781, 1994.
- [231] W. Nam and B. I. Epureanu, “The effects of viscoelastic fluid on kinesin transport,” *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 24, no. 37, p. 375103, 2012.
- [232] R. A. Longoria and G. T. Shubeita, “Cargo transport by cytoplasmic dynein can center embryonic centrosomes,” *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e67710, 2013.
- [233] A. K. Rai, A. Rai, A. J. Ramaiya, R. Jha, and R. Mallik, “Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells,” *Cell*, vol. 152, no. 1-2, pp. 172–182, 2013.

- [234] M. J. Schnitzer, K. Visscher, and S. M. Block, “Force production by single kinesin motors,” *Nature cell biology*, vol. 2, no. 10, p. 718, 2000.
- [235] V. Belyy, M. A. Schlager, H. Foster, A. E. Reimer, and A. Yildiz, “The mammalian dynein-dynactin complex is a strong opponent to kinesin in a tug-of-war competition,” *Nature Cell Biology*, vol. 18, no. 1, p. 1018, 2016.
- [236] R. Jiang, S. Vandal, S. Park, S. Majd, E. Tüzel, and W. O. Hancock, “Microtubule binding kinetics of membrane-bound kinesin-1 predicts high motor copy numbers on intracellular cargo,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 52, pp. 26564–26570, 2019.
- [237] C. M. Coppin, D. W. Pierce, L. Hsu, and R. D. Vale, “The load dependence of kinesin’s mechanical cycle,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 16, pp. 8539–8544, 1997.
- [238] B. Gutiérrez-Medina, M. B. Padilla, A. J. Gutiérrez-Esparza, and A. R. O. Camacho, “Differential effect of multiple kinesin motors on run length, force and microtubule binding rate,” *Biophysical chemistry*, vol. 242, pp. 28–33, 2018.