

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR
(IBGM)**

**Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y
FISIOLOGÍA**

**Estudio del papel de las proteínas desacoplantes
UCP2 y UCP3 en la captación mitocondrial de
calcio**

Memoria del Trabajo Fin de Máster presentada por

INÉS ÁLVAREZ MIGUEL

Directores: Dra. M^a Carmen Domínguez Lobatón
Dr. Alfredo Moreno Díaz-Calderón
Dr. Javier Álvarez Martín

Valladolid, 2012

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN	1
1. HOMEOSTASIS DEL CALCIO CELULAR.....	1
2. PRINCIPALES SISTEMAS DE TRANSPORTE DE CALCIO	1
2.1. Transporte a través de la membrana plasmática	1
2.1.1. Canales de Ca^{2+} voltaje dependientes	1
2.1.2. Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (PMCA)	2
2.1.3. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)	2
2.1.4. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ (NCKX)	2
2.1.5. Entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE).....	2
2.2. Transporte a través del retículo endoplásmico	3
2.2.1. Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA)	3
2.2.2. Receptores de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R).....	3
2.2.3. Receptores de Ryanodina (RyR)	3
2.3. Transporte de calcio mitocondrial.....	4
2.3.1. Mecanismos de transporte de calcio mitocondrial	5
2.3.1.1. Uniportador de calcio mitocondrial (MCU).....	6
2.3.1.2. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX).....	7
2.3.1.3. Intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (Letm1).....	7
3. PROTEINAS DESACOPLANTES UCP2 Y UCP3.....	8
3.1. Contribución de UCP2 y UCP3 a la captación de calcio mitocondrial.....	8
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
1. LINEAS CELULARES Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS.....	11
2. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIÓN DE LOS CULTIVOS	11
2.1. Constructos y vectores de expresión.....	11
2.2. Amplificación del DNA plasmídico	13
2.3. Métodos de transfección.....	13
3. MEDIDA DE CALCIO MITOCONDRIAL MEDIANTE BIOLUMINISCENCIA	14
3.1. Aequorina	14
3.2. Equipo de bioluminiscencia	16
3.2.1. Calibración	18
3.3. Determinación experimental de $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial	18
3.3.1. Composición de las soluciones utilizadas	19
RESULTADOS	20
1. EFICACIA DE LOS PROCESOS DE TRANSFECCIÓN	20
2. ESTUDIO EN CÉLULAS INTACTAS.....	20
3. ESTUDIO EN CÉLULAS PERMEABILIZADAS.....	23
3.1. Efecto de IP_3 en células permeabilizadas.....	23
3.2. Efecto de diferentes tampones de calcio en células permeabilizadas	25
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	I-IV

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. HOMEOSTASIS DEL CALCIO CELULAR

El ión calcio (Ca^{2+}) es un mensajero intracelular enormemente versátil capaz de modular un amplio espectro de funciones en todos los tipos celulares, entre las que se encuentran la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la fecundación, la proliferación, el desarrollo, el aprendizaje, la memoria o la apoptosis (Berridge et al., 2000). La especificidad de las señales celulares de Ca^{2+} se consigue gracias a un control muy preciso de su concentración a nivel subcelular mediante un sofisticado sistema formado por numerosos canales iónicos, bombas e intercambiadores, capaces de controlar los flujos de iones calcio a través de la membrana plasmática y de las membranas de los distintos orgánulos celulares.

En situación de reposo la concentración de Ca^{2+} en el citosol se mantiene baja, del orden de 10^{-4} mM, mientras que en el medio extracelular se encuentra en el rango de 1 mM. Sumado a este gradiente químico existe un gradiente eléctrico, ya que la membrana celular está polarizada con potencial negativo dentro.

Los mecanismos de entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular están en antagonismo constante con los mecanismos de bombeo que mantienen los gradientes. Del balance o predominio de uno u otro depende el nivel de $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citosol. Los mecanismos de bombeo predominan en el reposo, manteniendo baja la concentración de calcio citosólico (100 nM) y asegurando que los depósitos intracelulares permanezcan llenos. Por el contrario, numerosos tipos de canales actúan como compuertas: en situación de reposo están cerrados, pero en respuesta a diversos estímulos se abren permitiendo el paso rápido de Ca^{2+} hacia el citosol, disipando así los gradientes creados por las bombas y produciendo elevaciones transitorias de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico que disparan la actividad celular. Tras el estímulo, la actividad de las bombas restaura los gradientes y mantiene baja la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citosol, característica del estado de reposo.

2. PRINCIPALES SISTEMAS DE TRANSPORTE DE CALCIO

2.1. TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA:

Los principales mecanismos implicados en el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática son: canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (PMCA), intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ (NCKX) y entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE).

2.1.1 Canales de Ca^{2+} voltaje dependientes:

Actúan como transductores de la señal eléctrica en células excitables, ya que convierten dicha señal procedente de un potencial de acción de la superficie de la membrana plasmática en un transporte de Ca^{2+} hacia el interior celular. Se han descrito múltiples tipos diferentes de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes que difieren entre sí en el tipo de corriente que transmiten, sensibilidad frente a activadores y/o inhibidores, probabilidad de apertura, etc. Desde el punto de vista molecular se clasifican, actualmente, de acuerdo a la subunidad $\alpha 1$ que posean (CaVx.x), una proteína integral de membrana que contiene la maquinaria estructural y funcional necesaria para conducir iones Ca^{2+} (Catterall W. A., 2011). Desde el punto de vista funcional se clasificaban clásicamente en 5 tipos, los canales de tipo L, los de tipo T, los de tipo N y los de tipo P/Q. El más común de todos ellos es el de tipo L (L-type channel), cuyas propiedades son su baja inactivación dependiente de voltaje, apertura durante períodos largos de tiempo y sensibilidad a dihidropiridinas (DHPs). Los canales tipo T (T-type channel) se abren a potenciales de membrana más negativos, se inactivan rápidamente y no son sensibles a DHPs. Por último, los de tipo N (N-type channel) se activan a potenciales y velocidades intermedios respecto a los anteriores y son sensibles al péptido ω -CTx-GVIA procedente de la concha de caracol (Catterall W. A., 2011).

2.1.2. Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (PMCA):

Son proteínas constituidas por 10 segmentos transmembrana que bombean Ca^{2+} en contra de gradiente, desde el citosol al medio extracelular. Se trata de un transporte activo primario dependiente de ATP (relación $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ de 1:1), de tipo electrogénico (intercambia 1 Ca^{2+} por 1 H^+), de elevada afinidad ($K_m < 1 \mu\text{M}$) pero baja capacidad de transporte (0.5 nmol/mg proteína por segundo) (Carafoli E., 1987; Saris N. E. and Carafoli E., 2005).

2.1.3. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX):

Son proteínas transmembrana que se ocupan de la extrusión de Ca^{2+} citosólico actuando mediante un transporte activo secundario en intercambio por Na^+ y sin consumo de ATP. La reacción es electrogénica (1 Ca^{2+} por 3 Na^+), de baja afinidad y elevada capacidad de transporte (Saris N. E. and Carafoli E., 2005). Además, bajo ciertas condiciones, NCX puede actuar en sentido inverso, es decir, puede captar Ca^{2+} ante una sobrecarga celular de Na^+ (Grinwald P. M., 1982, Saris N. E. and Carafoli E., 2005).

2.1.4. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ (NCKX):

Son proteínas transmembrana expresadas principalmente en la retina que llevan a cabo también un transporte activo secundario para la extrusión de Ca^{2+} citosólico. En este caso, la reacción electrogénica consiste en el intercambio de 1 Ca^{2+} y 1 K^+ por 4 Na^+ , de baja afinidad y elevada capacidad de transporte (Altimimi H. F. y Schnetkamp P. P., 2007).

2.1.5. Entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE):

Este tipo de flujo de entrada de Ca^{2+} consiste en que cuando se produce el vaciamiento de los depósitos intracelulares, principalmente del retículo endoplásmico (RE), se produce una cascada de señalización cuyo fin último es promover la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular para rellenar de nuevo los depósitos. En esta cascada intervienen las proteínas STIM, que presentan un dominio de unión al Ca^{2+} orientado hacia el lumen del RE. Cuando STIM detecta la depleción del RE, oligomeriza y se transloca hacia la membrana plasmática formando agregados llamados "puncta", donde se organiza con las proteínas formadoras de canales Orai y los canales TRPC (transient receptor potential cation) formando clusters, permitiendo así la entrada de Ca^{2+} por dichos canales. Una vez que los depósitos han sido rellenados, STIM vuelve a migrar a su ubicación inicial (Cahalan M. D., 2009; Liou J. et al, 2005).

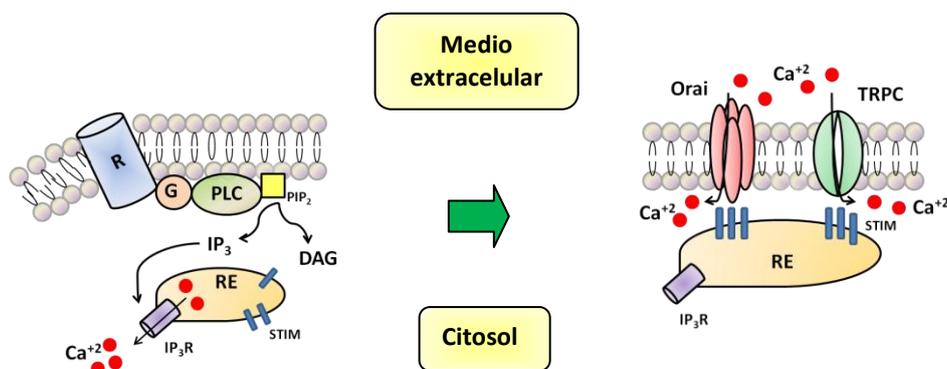


Figura 1: Entrada capacitativa de Ca^{2+} . R: receptor acoplado a proteína G; G: proteína G; PLC: fosfolipasa C; RE: retículo endoplásmico.

2.2. TRANSPORTE A TRAVÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO:

El retículo endoplásmico RE (sarcoplásmico RS, en células musculares) es el principal reservorio de Ca^{2+} celular, siendo la $[\text{Ca}^{2+}]$ en condiciones basales de aproximadamente $500 \mu\text{M}$ (0.5 mM). Sin embargo, bajo estimulación celular, el Ca^{2+} es liberado al citosol para ejercer diversas funciones celulares y, posteriormente, se vuelven a rellenar los depósitos (Álvarez J. et al, 1999; Saris N. E. and Carafoli E., 2005). Por tanto, la dinámica del Ca^{2+} del RS y RE requiere de mecanismos que faciliten tanto la liberación del catión como el relleno posterior. Entre estos mecanismos destacan: Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA), receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R) y receptores de ryanodina (RyR):

2.2.1. Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA):

Son bombas de clase-P constituidas por 10 segmentos transmembrana que bombean Ca^{2+} al lumen del RS/RE en contra de gradiente. Se trata de un transporte activo primario que consume energía, bombea 2 Ca^{2+} por cada ATP consumido, y además es electrogénico, ya que intercambia 2 Ca^{2+} por 2 H^+ (Toyoshima C. et al, 2000). SERCA es codificada por una familia de tres genes, SERCA_1 , SERCA_2 y SERCA_3 , que darán lugar a las diferentes isoformas de la bomba por splicing alternativo. Además, SERCA es modulada por la fosforilación de las moléculas endógenas fosfolamban (PLB) y sarcolipina (SLN) a través de kinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina y/o AMPc (Gasser J. et al, 1988; Saris N. E. and Carafoli E., 2005; Periasamy M. et al, 2007).

2.2.2. Receptores de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R):

Son proteínas de la membrana del RE encargadas de la liberación de Ca^{2+} desde el lumen al citosol tras la unión del ligando al receptor. Existen tres isoformas del receptor (IP_3R_1 , IP_3R_2 e IP_3R_3), con expresión específica según el tipo celular, cuya estructura consiste en 6 segmentos transmembrana formadores de un canal de Ca^{2+} próximo al extremo C-terminal y separado del extremo N-terminal, dominio de unión al ligando, por una extensa región que actúa como reguladora. El ligando activador del receptor es el IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato), segundo mensajero procedente de la cascada de señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que actúan a través de fosfolipasa C. Sin embargo, en presencia de IP_3 , la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica también actúa como modulador alostérico del receptor siguiendo una cinética bifásica con forma de campana: a $[\text{Ca}^{2+}]$ de $0.25 \mu\text{M}$ se obtiene la máxima actividad del receptor, disminuyendo la actividad hacia ambos lados del punto máximo. De esta forma, la activación alostérica dependiente de Ca^{2+} proporciona una amplificación de la señal inicial dando lugar a ondas de Ca^{2+} ("waves") y patrones oscilatorios de suma importancia para llevar a cabo las funciones celulares, así como un feedback negativo cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica es demasiado elevada (Bezprozvanny I. et al, 1991; Kaftan E. J. et al, 1997; Moraru II. et al, 1999; Várnai P. et al, 2005).

2.2.3. Receptores de Ryanodina (RyR):

Estos receptores sensibles a ryanodina constituyen una familia de proteínas de la membrana del RE/RS que actúan en el acoplamiento de la señal excitación-contracción del músculo esquelético y cardíaco liberando Ca^{2+} al citosol. Existen tres isoformas del receptor (RyR_1 , RyR_2 y RyR_3), expresadas en diferentes tejidos, cuya estructura consiste en un homotetrámero y dos dominios funcionales: el dominio C-terminal contiene 4-6 segmentos transmembrana formadores del canal de liberación de Ca^{2+} y el dominio N-terminal actúa como sitio de unión de diferentes ligandos endógenos. La señal de acoplamiento excitación-contracción difiere según el tejido y la isoforma del receptor: en músculo esquelético, RyR_1 se encuentra en estrecha unión con los canales de Ca^{2+} tipo L de la membrana plasmática, los cuáles, se organizan en tétradas; en cambio, en músculo cardíaco, RyR_2 es activado mediante el mecanismo CICR (Calcium induced-calcium

release), que consiste en la liberación de Ca^{2+} a través del receptor activada por el Ca^{2+} que entra a través de la membrana plasmática por canales dependientes de voltaje (Ma J. et al, 2004; Serysheva II., 2004).

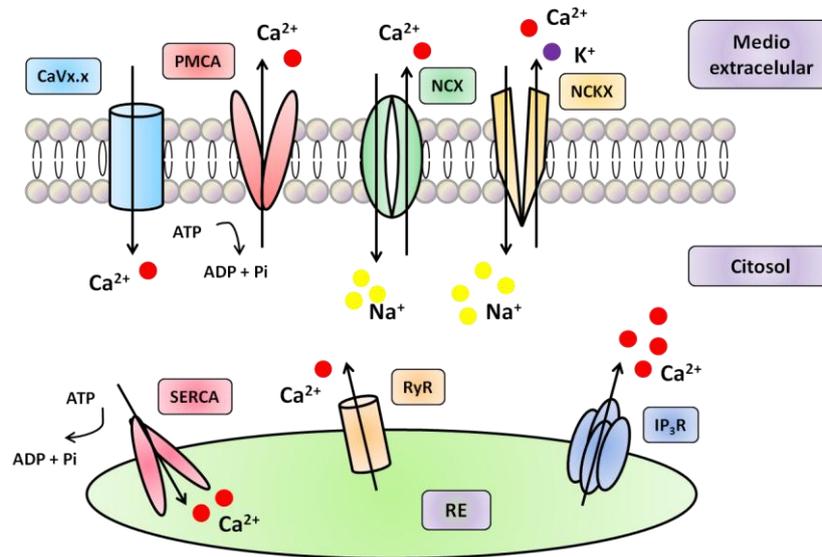


Figura 2: Principales sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico.

2.3. TRANSPORTE DE CALCIO MITOCONDRIAL:

Está bien establecido el papel central jugado por el retículo endoplásmico en los procesos modulados por las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), no obstante, las evidencias acumuladas en los últimos años indican que otros orgánulos celulares cumplen también papeles específicos y muy relevantes en la señalización por Ca^{2+} y uno de ellos es la mitocondria. A partir de los estudios realizados en los años 50 y 60 sobre la captación de elevadas cantidades de Ca^{2+} llevados a cabo en mitocondrias aisladas, se ha considerado a este orgánulo celular como algo más que un simple sistema de almacenamiento intracelular de Ca^{2+} (Deluca H. F. and Engstrom G. W., 1961; Carafoli E., 2003). La mitocondria está delimitada por dos membranas: la membrana mitocondrial externa (OMM) es permeable a iones y proteínas de pequeño peso molecular (<10 kDa); sin embargo, la membrana mitocondrial interna (IMM), de mayor longitud que la externa debido a las invaginaciones o crestas que presenta hacia la matriz mitocondrial (Frey T. G. et al, 2002), se comporta como una barrera impermeable a los iones. La actividad respiratoria mitocondrial llevada a cabo por los componentes de la cadena de transporte de electrones de la IMM da lugar a un transporte de H^+ al espacio intermembrana, lo que genera un gradiente electroquímico con un componente químico (ΔpH) y un componente eléctrico ($\Delta\psi$). En la mitocondria, la mayor parte del gradiente electroquímico de protones establecido por la cadena respiratoria está en la forma de gradiente eléctrico de -180 mV (negativo dentro de la matriz). Este gradiente tan negativo será la fuerza que impulse la entrada y acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (Carafoli E., 2003; Rimessi A. et al, 2008; Pan S. et al, 2011).

Por tanto, la mitocondria se comporta como un sistema modulador en la señalización intracelular de Ca^{2+} con importantes funciones fisiopatológicas:

- Metabolismo mitocondrial. Incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ activan el metabolismo oxidativo mitocondrial, modulando la actividad de tres enzimas importantes: piruvato dehidrogenasa, isocitrato dehidrogenasa y α -cetoglutarato dehidrogenasa. De esta manera, se aumenta la actividad respiratoria y la producción de energía en la mitocondria (Malli R. and Graier W. F., 2010; Raffaello A. et al, 2012).
- Buffer intracelular de Ca^{2+} . La captación de Ca^{2+} por la mitocondria modula la amplitud de los patrones espacio-temporales de la señal de Ca^{2+} citosólica, de manera que es capaz de modular la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ durante la estimulación celular (Jean-Quartier C. et al, 2012). Los estudios llevados a cabo en las proximidades entre el RE y la mitocondria establecen la existencia de uniones entre ambos orgánulos a través de diversos complejos proteicos (MCU, VDAC, RyR e IP_3R) (Csordás G. et al, 2010; Giacomello M. et al, 2010). Estas zonas de unión se comportan como microdominios de alto Ca^{2+} tras la estimulación celular y liberación de Ca^{2+} del RE, facilitando la entrada del catión a la mitocondria, así como el proceso de rellenado del RE durante y después de la estimulación celular (Malli R. and Graier W. F., 2010; Shin D. M. and Muallem S., 2010).
- Muerte celular. La sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} tiene efectos tóxicos sobre la misma llegando incluso a causar la muerte celular por necrosis y/o apoptosis. Este proceso conlleva la rotura de la OMM y la liberación de diversos factores mitocondriales al citosol que activarán los procesos de muerte celular (Rimessi A. et al, 2008). Es importante destacar la función ejercida por el complejo formador del poro de transición de permeabilidad (PTP). PTP es un canal no selectivo que provoca la liberación de diversos componentes mitocondriales, entre ellos el citocromo c, ante procesos que incluyan una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial entre otros factores. La composición del complejo PTP aún no está clara, aunque se ha propuesto la participación de un complejo de varias proteínas, entre ellas el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), la enzima adenin-nucleótido transferasa (ANT) y la ciclofilina D (Cy-D). La apertura del PTP está favorecida, además de por Ca^{2+} , por radicales libres (ROS), formación de enlaces S-S, disminución del potencial de membrana y pH alcalino, mientras que quelantes de Ca^{2+} , pH ácido, atrapadores de radicales libres ("scavengers"), ciclosporina A (CsA) y otros factores actúan como inhibidores de su apertura (Saris E. L. and Carafoli E., 2005; Rimessi A. et al, 2008). Una vez activado el mecanismo de apertura de PTP, se produce la muerte celular por apoptosis en la que intervienen maquinarias complejas formadas por diversas proteínas, tales como citocromo c, smac/DIABLO, AIF, proteasas y caspasas (Raffaello A. et al, 2012). Además, existen sustancias que modulan negativamente la actividad de PTP, como es el caso de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (Rimessi A. et al, 2008; Raffaello A. et al, 2012). Por tanto, la captación de Ca^{2+} por la mitocondria tiene que ser un proceso altamente regulado.

2.3.1. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE CALCIO MITOCONDRIAL

El transporte de Ca^{2+} en la mitocondria tiene lugar a través de diferentes mecanismos cuya función se conoce desde los estudios realizados en los años 70, pero que se han resistido durante muchos años a todos los intentos realizados para caracterizarlos molecularmente. Sin embargo en los dos últimos años han surgido importantes novedades, en concreto se han descrito y clonado varias proteínas que parecen ser esenciales para los flujos de entrada y salida de calcio de la mitocondria. El principal mecanismo conocido responsable de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria es el uniportador de calcio mitocondrial (MCU), descrito funcionalmente en el año 1961. Por otro lado, el Ca^{2+} sale de la mitocondria a través de otros mecanismos que actúan como intercambiadores dependientes o no del ion Na^+ y que son, principalmente, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX) y el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial. Además, cabe

destacar la importancia de la apertura de PTP, anteriormente descrita, en la salida de Ca^{2+} ante una sobrecarga mitocondrial. Así mismo, se han descrito varias proteínas que podrían constituir nuevos mecanismos de transporte de Ca^{2+} mitocondrial o bien actuar como moduladores de los hasta ahora bien conocidos, tal es el caso de las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3. A continuación, se describen las principales características y funciones de cada uno de los mecanismos de transporte mencionados.

2.3.1.1. Uniportador de calcio mitocondrial (MCU)

Como hemos comentado, el principal mecanismo conocido responsable de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria es el uniportador de calcio mitocondrial (MCU). Estudios electrofisiológicos mediante técnicas de patch-clamp han mostrado que es un canal selectivo para Ca^{2+} que funciona conduciendo corriente hacia el interior de la matriz mitocondrial a favor del gradiente eléctrico mantenido a través de la membrana mitocondrial interna por las bombas de protones de la cadena respiratoria (Kirichok et al 2004). Una de sus características más destacadas es su baja afinidad por Ca^{2+} , con una K_d de alrededor de 10 μM . Estudios posteriores han revelado que la mitocondria es perfectamente capaz de captar grandes cantidades de calcio durante las elevaciones fisiológicas de Ca^{2+} citosólico subsiguientes a la activación celular, a pesar de que estas elevaciones se sitúan de forma general en el rango micromolar bajo. Esta paradoja se resolvió al descubrirse que la mitocondria posee una localización privilegiada dentro de la célula que le permite detectar los microdominios de alto calcio generados bien en el entorno de los canales de Ca^{2+} situados en la membrana plasmática o bien cerca de los sitios de liberación de Ca^{2+} situados en el retículo endoplásmico.

En 2011, investigaciones llevadas a cabo por dos grupos independientes (Mootha V.K. y Rizzuto R.) han logrado aislar una proteína que reúne las principales características para ser considerada como el uniportador de calcio mitocondrial (MCU), resumidas como: transporte selectivo de Ca^{2+} , sensibilidad a rojo de rutenio y baja afinidad por el catión. Ambos grupos han basado sus experimentos de aislamiento y purificación del MCU en estudios de expresión del gen candidato utilizando modelos *in silico* y filogenéticos basados en: expresión ubicua en tejidos de mamífero, altamente conservado en kinetoplastidos pero no así en *Saccharomyces cerevisiae* y existencia de dos o más dominios transmembrana. De esta forma, se han caracterizado dos proteínas diferentes pero relacionadas entre sí: el uniportador de calcio mitocondrial (MCU) (De Stefani D. et al, 2011; Baughman J.M. et al, 2011) y un posible regulador de MCU (MICU1) (Perocchi F. et al, 2010). Ambas proteínas intervienen en el proceso de captación de calcio por la mitocondria.

El uniportador de calcio mitocondrial (MCU) consiste en una proteína de 40 kDa localizada en la membrana mitocondrial interna (IMM) que posee dos hélices transmembrana (TM1 y TM2) unidas entre sí mediante un lazo formado por residuos ácidos, denominado motivo DIME. Existe controversia acerca de la localización de los extremos terminales amino y carboxilo, ya que un estudio afirma que ambos extremos se orientan hacia la matriz mitocondrial (Baughman J.M. et al, 2011), mientras que otro afirma que ambos se sitúan en el lado del espacio intermembrana (De Stefani D. et al, 2011). Por otro lado, ambos estudios concuerdan en la importancia de los residuos ácidos del lazo que une las dos hélices, tanto en el proceso de unión a Ca^{2+} como en la sensibilidad presentada por MCU frente al inhibidor rojo de rutenio.

Los estudios de sobreexpresión de MCU llevados a cabo en diferentes líneas celulares han dado lugar a aumentos en la captación de Ca^{2+} mitocondrial, tanto del liberado de los depósitos intracelulares como del añadido exógenamente. Al contrario, el silenciamiento del gen MCU lleva a una disminución de la captación del catión por la mitocondria (De Stefani D. et al, 2011; Baughman J.M. et al, 2011). Así mismo, para verificar que la variación en la captación de Ca^{2+} observada en presencia o no de MCU no se debía a cambios en la actividad respiratoria de la mitocondria, al potencial de membrana mitocondrial o la morfología del orgánulo, ambos grupos llevaron a cabo experimentos que demostraron la independencia de la actividad de MCU respecto las propiedades mitocondriales mencionadas; sin embargo, el silenciamiento del MCU y la consiguiente disminución de la captación de Ca^{2+} provoca una disminución de

la actividad del ciclo de Krebs, lo que se relaciona con la ausencia de la acción del Ca^{2+} sobre las deshidrogenasas mencionadas anteriormente (Baughman J.M. et al, 2011).

Además de la proteína MCU, un estudio previo llevado a cabo por el grupo de A.V. Mootha había conseguido aislar y purificar otra proteína localizada en la IMM, llamada MICU1. Dicha proteína, de unos 54 kDa, está constituida por un único dominio transmembrana y contiene dos dominios de tipo EF-hand altamente conservados. Dichos dominios EF-hand son esenciales para la captación de Ca^{2+} por la mitocondria, ya que mutaciones en los mismos produjeron una importante reducción de la velocidad de captación. Estudios de silenciamiento del gen MICU1 han mostrado que produce una disminución de la captación de Ca^{2+} mitocondrial que no se debe a variaciones en la actividad respiratoria mitocondrial o en el potencial de membrana (Perocchi F. et al, 2010).

Estos estudios han llevado a la conclusión de que tanto MCU como MICU1, expresados conjuntamente en muchos tejidos, son componentes esenciales en el proceso de captación de Ca^{2+} por la mitocondria; sin embargo, mientras que MCU parece ser la proteína formadora del canal de Ca^{2+} , la función de MICU1 es probablemente la de actuar como subunidad reguladora de MCU (De Stefani D. et al, 2011; Baughman J.M. et al, 2011).

Con respecto a la regulación del MCU, nuestro laboratorio descubrió hace algunos años que una serie de compuestos naturales pertenecientes a la gran familia de flavonoides o polifenoles vegetales son capaces de activar potentemente el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. El compuesto más activo fue el kaempferol, uno de los flavonoides más abundantes en la naturaleza, que fue capaz de aumentar la velocidad de captación mitocondrial de Ca^{2+} 20 veces (Montero M. et al, 2004). Algunos agonistas estrogénicos produjeron también efectos similares, aunque por un mecanismo no mediado por receptores clásicos de estrógenos (Lobatón C.D. et al 2005). La modulación inducida por estos compuestos puede tener importantes efectos fisiológicos. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre el sustrato molecular del uniportador ha hecho difícil estudiar más a fondo el significado y el mecanismo fisiológico de esta modulación y si pudiera tener alguna relación con la actividad de MICU1.

2.3.1.2. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX)

Es el principal mecanismo de extrusión de Ca^{2+} de la mitocondria (Montero M. et al, 2001; Malli R. et al, 2010; Pan S. et al, 2011; Raffaello A. et al, 2012; Jean-Quartier C. et al, 2012). Pertenece a la superfamilia de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), sin embargo, presenta diferencias en cuanto a su filogenética y funcionalidad. El mNCX presenta dos isoformas de 50 y 70 kDa que pueden llegar a formar dímeros de hasta 100 kDa y se localiza en la IMM. El mNCX responde frente a cambios drásticos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de manera dependiente de Na^+ y de forma electrogénica, ya que sigue una estequiometría de $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$. No obstante, en condiciones de ausencia de Na^+ , el intercambiador puede llevar a cabo la extrusión de Ca^{2+} a costa de un intercambio por Li^+ (NCLX), proceso que únicamente se da en la mitocondria y difiere del resto de intercambiadores de la familia NCX (Palty R. et al, 2010). El flujo de salida de Ca^{2+} puede ser inhibido por diversas sustancias, tales como los iones Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , compuestos de interés farmacológico como amilorida, diltiazem, verapamilo y el inhibidor específico del mNCX, CGP-37157. A su vez, alcoholes de cadena corta, el glucagón, agonistas β -adrenérgicos y determinadas condiciones de pH mitocondrial estimulan el flujo de salida de Ca^{2+} a través del intercambiador (Li W. et al, 1992; Bernardi P., 1999; Palty R. et al, 2010).

2.3.1.3. Intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (Letm1)

Existen controversias acerca de la existencia de un flujo de salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ y controlado por la entrada de H^+ , ya que resulta complicado medir flujos de H^+ debido a su efecto tamponador de pH. Por ello, muchos estudios han concluido que se trata de un transporte pasivo y no

electrogénico de estequiometria $1\text{Ca}^{2+}:2\text{H}^+$ (Bernardi P. 1999); sin embargo, el hecho de que inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial inhiban a su vez este mecanismo de intercambio $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ sugiere que puede tratarse de un sistema electrogénico que obtiene parte de la energía del transporte de electrones (Gunter K.K., et al, 1991; Gunter T.E. and Sheu S.S., 2009). Se ha visto que este flujo de salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ es inhibido por Sr^{2+} , Mn^{2+} , bajos niveles de desacoplantes como CCCP y FCCP, altos niveles de TPP^+ (tetraphenyl phosphonium) y TPMP (triphenyl methyl phosphonium) y niveles muy elevados de rojo de rutenio (RR) (Gunter T.E. and Sheu S.S., 2009).

En un estudio reciente mediante screening con RNAi de *Drosophila* se ha identificado a Letm1 como la proteína que controla el flujo de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ mitocondrial. Se ha propuesto que Letm1, asociada al síndrome de Wolf Hirschhorn e inicialmente descrita como intercambiador K^+/H^+ , podría llevar a cabo la reacción electrogénica de entrada de 1Ca^{2+} en base a la salida de 1H^+ cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ es baja; sin embargo, cuando ésta concentración es elevada o el pH citosólico muy bajo, Letm1 realizaría el proceso inverso, sacando Ca^{2+} de la mitocondria. La actividad de Letm1 está regulada por inhibidores como el rojo de rutenio (RR), Ru360 y CGP37157 (Jiang D. et al, 2009; Hajnóczky G. and Csordás G., 2010; Malli R. and Graier W.F., 2010).

3. PROTEÍNAS DESACOPLANTES UCP2 Y UCP3.

La primera proteína desacoplante descrita en los años 70 fue UCP1, conocida como termogenina debido a su expresión específica en tejido adiposo pardo de mamíferos, donde ejerce su actividad termogénica. UCP1 actúa disipando el gradiente de H^+ generado por la cadena de transporte de electrones, desacoplando así la producción de ATP de la respiración mitocondrial al generar un flujo de entrada de protones a la matriz a través de la IMM. Estudios posteriores confirmaron la existencia de dos mRNA que codificaban para dos proteínas con un elevado porcentaje de homología respecto a UCP1 pero sin actividad termogénica. Estas nuevas proteínas desacoplantes se denominaron UCP2 y UCP3. Hasta el momento, se han descrito tres funciones principales llevadas a cabo por UCP2 y UCP3: contribución en la actividad del uniportador de calcio mitocondrial, flujo de entrada de H^+ hacia la matriz mitocondrial y transporte de ácidos grasos desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (Graier W.F. et al, 2008).

3.1. CONTRIBUCIÓN DE UCP2 Y UCP3 A LA CAPTACIÓN DE CALCIO MITOCONDRIAL.

Estudios recientes han demostrado que las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3 intervienen en el mecanismo de captación de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), tanto en la capacidad como en la velocidad de secuestro de Ca^{2+} . Dichos estudios han basado sus conclusiones en los resultados obtenidos a través de experimentos de sobreexpresión, de knockdown y de ratones modificados genéticamente (Graier W.F. et al, 2008; Malli R. and Graier W.F., 2010; Jean-Quartier C. et al, 2012).

De esta forma, en los experimentos de sobreexpresión de UCP2/UCP3 se ha detectado un aumento en la acumulación mitocondrial del Ca^{2+} liberado del RE tras la estimulación celular con agonistas pero no así del Ca^{2+} que entra desde el medio extracelular (Trenker M. et al, 2007; Waldeck-Weiermair M. et al, 2010). En el caso de los experimentos de knockdown de UCP2/UCP3 llevados a cabo a través de siRNA, los resultados obtenidos muestran un bloqueo en la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial en respuesta al incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y/o entrada de Ca^{2+} en la célula (Trenker M. et al, 2007; Waldeck-Weiermair M. et al, 2010a). Por último, mitocondrias hepáticas aisladas de ratones UCP2^{-/-} mostraron pérdidas en la capacidad de captación de Ca^{2+} por la mitocondria sensible a rojo de rutenio; sin embargo, presentaban un mecanismo de captación no sensible a dicho inhibidor, lo que podría representar una adaptación del tejido (Graier W.F. et al, 2008).

Por otro lado, mutaciones puntuales en la secuencia de UCP2/UCP3 dan lugar a proteínas con un efecto dominante negativo sobre la función de las originales. Las mutaciones más importantes se han encontrado en el dominio formador del lazo intermembrana 2 (IML2), cuya elevada homología en UCP2 y UCP3 difiere respecto a UCP1. Además, estudios realizados sobre mutantes UCP3 muestran varios sitios en IML2 esenciales en el proceso de captación de Ca^{2+} mitocondrial, ya que mutaciones en uno u otro dan lugar a diferente especificidad en cuanto a la captación del Ca^{2+} liberado desde los depósitos intracelulares o en cuanto al Ca^{2+} que entra desde el medio extracelular (Waldeck-Weiermair M. et al, 2010b).

Todos estos estudios sugieren que tanto UCP2 como UCP3 podrían participar en la entrada de calcio a la mitocondria. Sin embargo, se trata de estudios realizados todos ellos por el mismo grupo y existe mucha controversia actualmente en el campo sobre la validez de estos datos. De hecho, varios grupos han descrito evidencias contra esta idea mostrando por ejemplo que mitocondrias hepáticas purificadas de ratones $\text{UCP2}^{-/-}$ y $\text{UCP3}^{-/-}$ captan calcio normalmente (Brookes et al, 2008). Más recientemente se han planteado también hipótesis alternativas para explicar los resultados del grupo de Graier. Así, en investigaciones llevadas a cabo con UCP3, se ha planteado la hipótesis de que dicha proteína no funciona como un uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, sino que actuaría modulando negativamente la producción de ATP por la mitocondria, lo que daría lugar a una menor actividad de la ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA). De esta forma, se favorecerían los incrementos en las $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica y mitocondrial tras la estimulación celular (De Marchi U. et al, 2011).

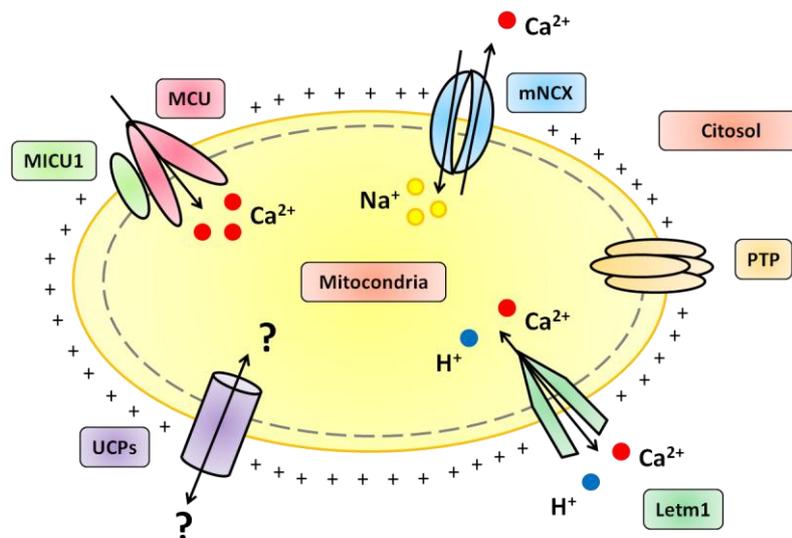


Figura 3: Principales sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondrial.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

El principal objetivo de este proyecto es verificar la implicación de las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3 en los flujos de Ca^{2+} mitocondrial y su relación con el uniportador de calcio mitocondrial MCU. Para ello, realizaremos estudios de sobreexpresión utilizando plásmidos conteniendo los genes que codifican para las proteínas UCP2 y UCP3 en células endoteliales EAhy926 de vena umbilical y en células de tumor de cuello de útero HeLa, determinando la captación de calcio mitocondrial con la fotoproteína sensible a calcio Aequorina.

Los objetivos concretos que se abordarán son los siguientes:

- Estudio, en células intactas, del efecto de la estimulación celular con histamina sobre la magnitud de los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en células que expresan UCP2/UCP3 respecto de las que no lo expresan, tanto en presencia de calcio externo libre (1mM) como sin calcio en el medio extracelular de perfusión. De esta forma se podrá observar si existe variación en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ debido a la presencia de UCP2/UCP3 y si esta variación se debe únicamente a la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares o también a la entrada desde el medio extracelular.
- Estudio de los efectos de kaempferol y CGP, compuestos bien conocidos como activador de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria, el primero, e inhibidor del intercambiador mitocondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, el segundo, sobre la magnitud de los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en células que expresan o no UCP2/UCP3 para profundizar en el mecanismo de la implicación de dichas proteínas en la captación o extrusión mitocondrial de Ca^{2+} .
- Estudio del efecto de la expresión de UCP2/UCP3 sobre la velocidad de captación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en células permeabilizadas con digitonina mediante la perfusión de tampones con $[\text{Ca}^{2+}]$ conocidas, tanto en presencia como en ausencia de segundos mensajeros que actúan en la cascada de señalización para la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Para este Proyecto de Investigación se han realizado estudios de captación de calcio por la mitocondria en dos tipos de líneas celulares: células HeLa y células EAhy926.

HeLa:

Es una línea celular epitelial humana derivada de un carcinoma de cuello de útero (American Type Culture Collection (ATCC) (CCL-2). En el estudio se ha utilizado un subclon de células HeLa obtenido en nuestro laboratorio, la línea MM5 (Montero M. et al, FASEB J, 2002), que expresa de manera constitutiva aequorina mitocondrial mutada (de menor afinidad que la nativa). La utilización de este subclon para el estudio de la dinámica del calcio en la mitocondria supone una enorme ventaja, ya que al expresar la aequorina de forma estable, se evitan problemas de eficacia y rendimiento en las cotransfecciones.

El crecimiento celular de las células MM5 se llevó a cabo mediante cultivo en monocapa sobre frascos de 25 cm² (Falcon) y fueron mantenidas con medio DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium) de baja glucosa (1mg/ml), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), 1% de solución de penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 UI/ml) y geneticina (G418 0,4 mg/ml) para preservar la expresión de aequorina.

EAhy926:

Es una línea celular endotelial humana derivada de vena de cordón umbilical (American Type Culture Collection (ATCC) (CRL-2922)). También se trata de un cultivo adherente, por lo que fueron cultivadas en monocapa en frascos Falcon de 25 cm². El medio de cultivo utilizado fue DMEM de alta glucosa (4mg/ml) suplementado con 10% de FBS y 1% de solución de penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 UI/ml).

Los cultivos se mantuvieron en un incubador dotado de flujo laminar vertical con filtro HEPA (Forma Scientific Inc., modelo 3862), a 37 °C en atmósfera de 8% CO₂/92% aire y humedad relativa del 95%

Todas las manipulaciones de los cultivos se realizaron en una cabina de flujo laminar vertical (Teslar AV-10).

2. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIÓN DE LOS CULTIVOS

2.1. Constructos y vectores de expresión.

Para las medidas de Ca²⁺ en la mitocondria hemos utilizado un constructo de aequorina recombinante dirigida a la mitocondria en su versión mutada, con menor afinidad por Ca²⁺ que las aequorinas silvestres (mitmutAEQ) (Montero et al Nat. Cell. Biol. 2000), clonado en el plásmido pcDNA 3.1(+) de Invitrogen.

El plásmido pcDNA3.1(+) tiene 5.4 Kb y está diseñado para obtener un elevado nivel de expresión, tanto estable como transitoria, en células de mamíferos.

Los principales elementos que constituyen el vector pcDNA3.1(+) son:

- Promotor de citomegalovirus humano (pCMV): permite una alta eficiencia del nivel de expresión de la secuencia de interés.

- Sitio de clonación múltiple en la orientación (+): facilita la inserción del gen de interés.
- Sitio del promotor T7 que permite la transcripción *in vitro* con orientación correcta y la secuenciación a través del inserto.
- Genes de resistencia a antibióticos, tanto para su amplificación en bacterias (ampicilina), como para la selección de líneas celulares estables (neomicina).

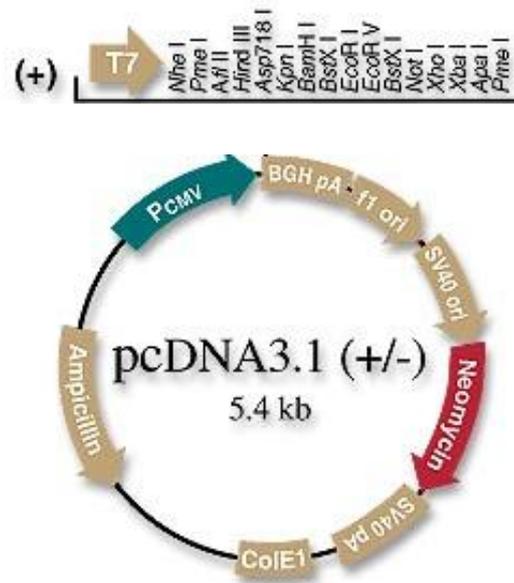


Figura 4: Plásmido pcDNA 3.1. Mapa genómico con los principales elementos que constituyen este vector. Promotor de citomegalovirus; sitio de clonación múltiple; sitio del promotor T7; genes de resistencia a neomicina y ampicilina.

Para conseguir una sobreexpresión eficiente de las proteínas mitocondriales UCP2 y UCP3 en las líneas celulares se utilizaron TrueORF Gold expresión-validated cDNA clones de Origene®, conteniendo las ORF (open reading frames) que codifican para las proteínas humanas UCP2 y UCP3. Ambas secuencias de interés fueron subclonadas y transfectadas utilizando el vector plasmídico pCMV6 obtenido de Origene®.

El plásmido pCMV6 consta de 4.9 kb y está diseñado para la expresión, en células de mamíferos, de proteínas con el extremo carboxílico marcado con Myc-DDK, lo que facilita los procesos de aislamiento y purificación mediante anticuerpos anti-Myc o anti-DDK. Además, sirve como vector de entrada en el caso de que se necesite subclonar el ORF de interés desde un vector a otro, proceso que requiere la digestión con las enzimas de restricción Sgf I y Mlu I, seguido de ligación y selección mediante resistencia a ampicilina.

Los principales elementos que constituyen el vector pCMV6 son:

- Promotor de citomegalovirus humano (pCMV): permite una alta eficiencia del nivel de expresión de la secuencia de interés.
- Múltiples sitios de clonación: facilitan la inserción del gen de interés.
- PolyA: marca el lugar de poliadenilación del mRNA y, por tanto, el final de la transcripción.
- f1 ori: facilita el rescate de DNA de cadena simple.
- SV40 ori: confiere un alto grado en la eficiencia y expresión del gen de resistencia a neomicina.
- Genes de resistencia a neomicina y kannamicina: permiten la selección de colonias transfectadas positivamente.

- ColE1: da lugar a la obtención de un elevado número de copias durante la replicación y favorece el crecimiento en *E.coli*.

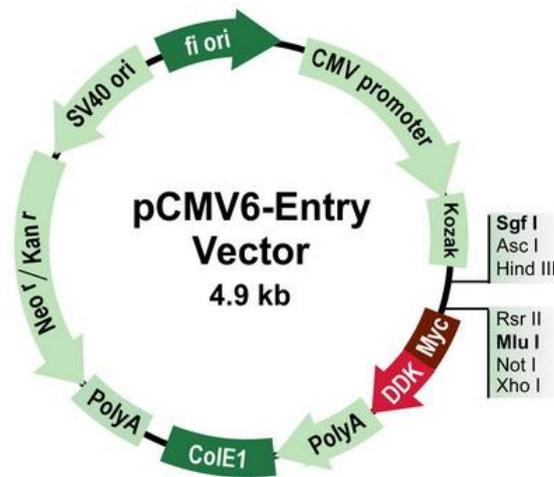


Figura 5: Plásmido pCMV6. Mapa genómico con los principales elementos que constituyen este vector: promotor de citomegalovirus, múltiples lugares de clonación, gen activador del crecimiento y proliferación de *E.coli* y genes de resistencia a neomicina y kannamicina.

2.2. Amplificación del DNA plasmídico.

Los plásmidos conteniendo los DNAs de interés fueron utilizados para transformar cepas de *E. Coli* competentes. Para ello, el método seguido fue:

10 µg de DNA se disolvieron en 20 µl de agua destilada estéril y 0,8 µl de esta solución se añadieron a 120 µl de bacterias competentes DH5α y se dejaron en hielo durante 20 minutos.

Tras este tiempo se dio un choque térmico de 50 segundos a 42 °C y se dejaron después en hielo durante 2 minutos. Se completó el volumen hasta 1 ml con Luria Broth (LB) y se incubaron con agitación suave a 37 °C durante una hora. Al cabo de ese tiempo, se sembraron 100 o 200 µl del cultivo en placas de Petri preparadas con agar y Kanamicina (25 µg/ml) o Ampicilina (50 µg/ml) según la resistencia que confería el plásmido en cuestión, incubándose las placas en estufa a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron colonias individuales que se sembraron en medio LB conteniendo Kanamicina (25 µg/ml) o Ampicilina (50 µg/ml), según el caso, y se incubaron a 37 °C con agitación fuerte durante unas 12 horas, tras lo cual, 1,5 ml del cultivo se inocularon en 50 ml de medio LB conteniendo Kanamicina (25 µg/ml) o Ampicilina (50 µg/ml), según el caso, y se incubaron en las mismas condiciones durante otras 12 horas.

Para la obtención del DNA plasmídico a partir de estos cultivos se utilizó el método de MiniPrep de BioRad.

2.3. Métodos de transfección

Debido a que se han utilizado dos líneas celulares distintas para llevar a cabo los estudios de la dinámica del calcio en la mitocondria, los métodos de transfección utilizados para conseguir una buena expresión de las proteínas de interés UCP2 y UCP3 han sido optimizados de forma individual para cada línea celular.

En las células MM5, que expresan de forma estable aequorina mitocondrial mutada, el protocolo de transfección de los genes de interés es más sencillo, ya que no requiere cotransfección de distintos

plásmidos. Se utilizó el reactivo de transfección Metafectene® Pro, obtenido de Biontex Laboratories GmbH. La transfección se llevó a cabo en células sembradas en monocapa adherente sobre cristales estériles de 13 mm de diámetro, en placas de 24 pocillos y a una densidad de $5-8 \times 10^4$ células/ml (contaje con cámara de Neubauer). Para obtener una eficiencia óptima de transfección de los plásmidos ORF-UCP2 y ORF-UCP3, la relación DNA/Metafectene® empleada ha sido de 0.5 µg DNA/2 µl Metafectene®, tal y como se indica en el Protocolo proporcionado por Biontex. La eficiencia de transfección se estudió mediante ensayos de transfección de la proteína fluorescente EGFP dirigida a mitocondria y se visualizó en microscopio de fluorescencia.

Para las células EAhy926, ha sido necesario llevar a cabo un proceso de cotransfección de los plásmidos de expresión de la proteína aequorina mitocondrial mutada (pcDNA3.1 mitmutAEQ) y las proteínas UCP2 o UCP3 (ORF-UCP2 y ORF-UCP3). En este caso, el agente de transfección empleado ha sido Transfast®, proporcionado por Promega. Siguiendo el Protocolo de transfección de Promega, la relación de cargas Transfast®/DNA óptima en la que se ha obtenido la máxima eficacia de transfección con la mínima toxicidad posible en esta línea celular ha sido de 2.5:1 (7.5 µl Transfast®/µg de DNA), siendo las cantidades de DNA cotransfectadas de 0.35 µg para mitmutAEQ y de 0.7 µg para UCP2/UCP3.

En ambos casos, los estudios de captación de calcio mitocondrial se llevaron a cabo entre las 36-48 horas tras la transfección/cotransfección.

3. MEDIDA DE CALCIO MITOCONDRIAL MEDIANTE BIOLUMINISCENCIA

3.1. AEQUORINA

Para llevar a cabo las medidas de calcio mitocondrial se ha utilizado la aequorina que es una fotoproteína sensible a calcio procedente de la medusa *Aequorea victoria* (Shimomura O. et al, 1962; Blinks J. R. et al, 1978). La estructura proteica de la aequorina está constituida por una apoproteína de aproximadamente 21 kDa y su grupo prostético, la celenteracina, de unos 400 Da. La apoproteína presenta tres dominios de unión a calcio de tipo EF-hand, siendo uno de ellos de gran interés debido a que se pueden realizar sobre él modificaciones genéticas que permiten modificar la afinidad de la proteína por calcio y obtener mejores resultados en la medición de calcio mitocondrial.

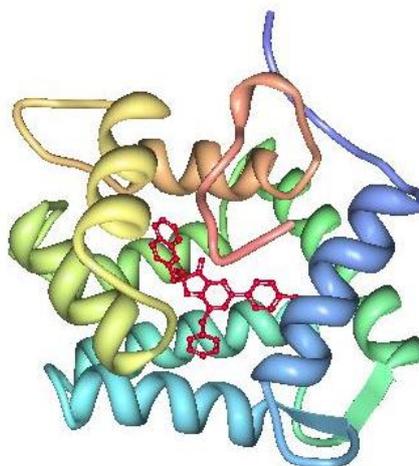


Figura 6: Estructura terciaria de la aequorina. En la parte central de la molécula y en rojo se representa el grupo prostético celenteracina (imagen modificada de PDB).

La reacción que tiene lugar y que nos permite cuantificar la concentración de calcio consiste en una reacción de oxidación de la celenteracina unida a la apoproteína a celenteramida, que sólo ocurre en presencia de calcio, dando lugar a la emisión de bioluminiscencia en forma de fotones en el rango visible (470 nm), proporcional a la concentración de calcio a la que se expone la fotoproteína. A medida que transcurre el proceso, la cantidad de aequorina disponible disminuye (consumo de aequorina) debido a que dicha molécula tarda mucho tiempo en volver a unirse a la celenteracina, por lo que se puede considerar que se trata de un proceso irreversible. De esta manera, en los experimentos de bioluminiscencia llevados a cabo se ha podido cuantificar la concentración de calcio en función de los datos de emisión de fotones obtenidos.

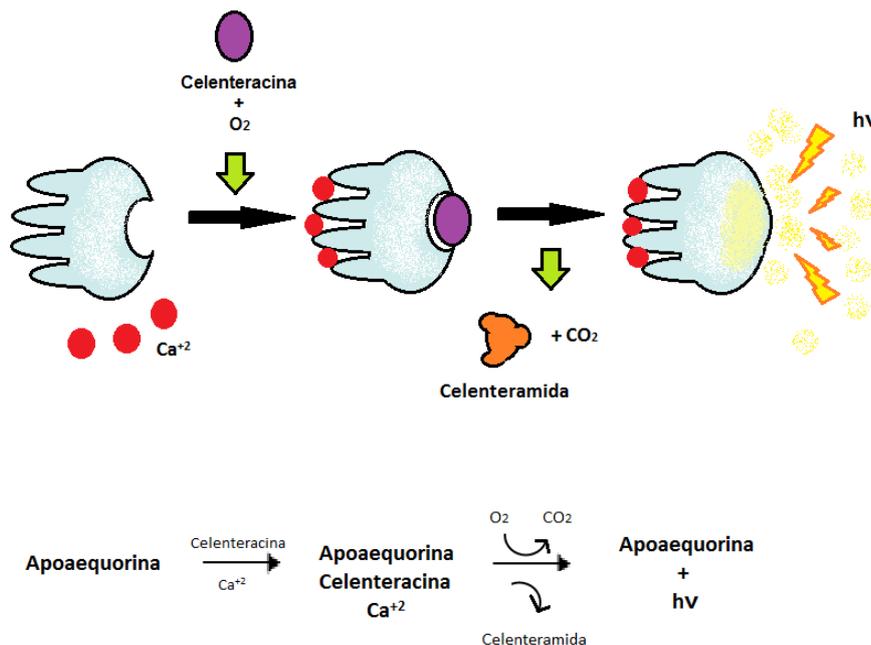


Figura 7: Representación de la reacción de reconstitución de la aequorina con su grupo prostético celenteracina.

En los primeros experimentos en los que se utilizó la aequorina, años 60 y 70, la sonda tuvo que ser primero purificada a partir de la medusa y posteriormente microinyectada en las células, por lo que los experimentos presentaban importantes limitaciones técnicas. Sin embargo, los estudios posteriores que permitieron la obtención de aequorinas recombinantes gracias a la clonación de su cDNA permitieron llevar a cabo la transfección y expresión de la proteína en un mayor número de tipos celulares. Así mismo, el hecho de poder llevar a cabo modificaciones en la secuencia de la proteína clonada ha permitido dirigir la aequorina a diferentes compartimentos subcelulares (mitocondria, retículo endoplásmico, vesículas de secreción...) pudiéndose así cuantificar los niveles de calcio en los mismos sin alterar las propiedades de la sonda.

En este trabajo de investigación, la aequorina ha sido dirigida a la mitocondria, por lo que las modificaciones en la secuencia de la proteína clonada consisten en: incorporación del epítipo de 9 aminoácidos de la hemaglutinina al extremo 5' de la región que codifica la proteína (aequorina nativa citosólica), lo que permite la detección de la sonda mediante anticuerpos; y la fusión, al extremo N-terminal de dicho epítipo, del cDNA de la presecuencia mitocondrial derivada de la subunidad VIII del citocromo c oxidasa humana (COX). De esta manera se obtiene la aequorina nativa dirigida a la mitocondria, concretamente a la matriz mitocondrial (mitAEQ) (Rizzuto R. et al, 1992; Brini et al, 1995).

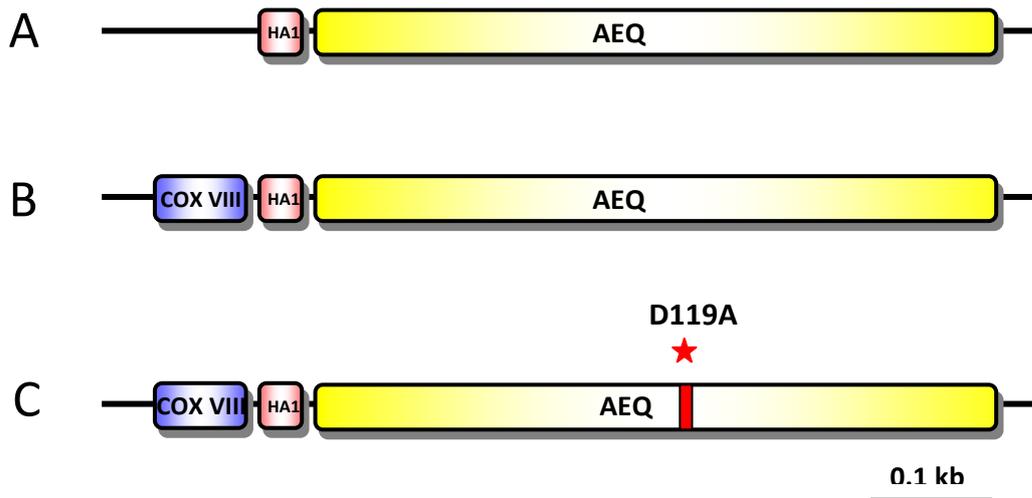


Figura 8: Representación esquemática del gen que codifica para la aequorina. A: cDNA de la aequorina citosólica con el epítipo HA1 en el extremo 5'. B: cDNA de la aequorina mitocondrial con el epítipo HA1 y la secuencia de direccionamiento a mitocondrias COX. C: cDNA de la aequorina mitocondrial mutada con el epítipo HA1, la presecuencia COX y la mutación D119A.

Las modificaciones anteriormente descritas permiten cuantificar cambios en la concentración de calcio en el rango 0.1-5 μM ; sin embargo, al estimular las células, las mitocondrias pueden llegar a presentar valores de hasta 500 μM , por lo que se necesita una fotoproteína de menor afinidad por el calcio. Es por ello que se ha utilizado una aequorina que presenta una modificación en su secuencia (mitmutAEQ), de manera que mediante el intercambio del aminoácido aspartato de la posición 119 por alanina (Asp119 \rightarrow Ala) se ha obtenido una mutación puntual en el segundo dominio de unión al calcio de la fotoproteína, disminuyendo así su afinidad por el ion (Kendall J. M. et al, 1992). Una segunda estrategia para reducir la afinidad por calcio es la reconstitución de la fotoproteína con el grupo prostético semisintético celenteracina n, lo que disminuye aún más la afinidad por el calcio (de 20 μM a 1 mM) (Barrero M. J. et al, 1997). Para las medidas de Ca^{2+} realizadas en células intactas hemos utilizado aequorina mutada reconstituida con celenteracina normal (wt) y para las realizadas en células permeabilizadas aequorina mutada reconstituída con celenteracina n.

3.2. EQUIPO DE BIOLUMINISCENCIA:

Las medidas de variación en la concentración de calcio mitocondrial cuantificadas a partir de los fotones emitidos por la aequorina, una vez que ésta ha sido reconstituida con celenteracina, se han llevado a cabo en un luminómetro. Este luminómetro consta principalmente de dos partes: la cámara de perfusión y el fotomultiplicador, ambas instaladas en un refrigerador que mantiene el equipo a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Cámara de perfusión:

La cámara de perfusión consiste en un pequeño espacio de 15 mm de diámetro y 2 mm de altura donde se coloca el cubreobjetos en el que están adheridas las células, que descansa sobre una superficie especular y que permite reflejar el mayor número de fotones emitidos al fotomultiplicador. Una vez colocado el cristal

con las células, la cámara se sella con un cubreobjetos cuadrado de 24 mm de lado gracias a una fina película de silicona. El espacio formado entre el cristal que contiene las células y el cubreobjetos que protege la cámara permite perfundir distintos tipos de soluciones mediante un orificio de entrada y otro de salida. Las soluciones a perfundir se controlan mediante un sistema de electroválvulas que, mediante la diferencia de alturas entre el baño termostatzado en el que se sitúan dichas soluciones y la cámara de perfusión, consiguen que el flujo sea de 1 ml/min aproximadamente. Además, la cámara está rodeada de una camisa de agua termostatzada que mantiene las soluciones a la temperatura deseada. Finalmente, destacar que para evitar la transferencia de calor y la posible pérdida de fotones, la cámara de perfusión está construida de metacrilato negro.

Fotomultiplicador:

El fotomultiplicador utilizado en los experimentos es de elevada ganancia, bajo ruido y lleva incorporado un discriminador-amplificador (EMI 9789 A, Thorn EMI, Ruislip, Middlesex, U.K.). Se encuentra situado en completa oscuridad y a 4 °C para evitar la emisión térmica de electrones desde el fotocátodo, lo que se denomina corriente oscura o basal. El fotocátodo mencionado se encuentra separado de la cámara de perfusión aproximadamente 3 mm y, una vez que le llega la señal luminosa, genera una corriente de salida proporcional a la de entrada. Los electrones emitidos atraviesan una serie de electrodos intermedios, llamados dinodos, que amplifican la señal antes de llegar al ánodo. La diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo está proporcionada por una fuente de alto voltaje de tipo Thorn EMI, modelo PM28B. La corriente que sale del fotomultiplicador llega a un amplificador-discriminador de tipo Thorn EMI AD2 y es redirigida a un microchip de tipo Thorn EMI PCB CT2 para su posterior procesamiento y análisis en ordenador.

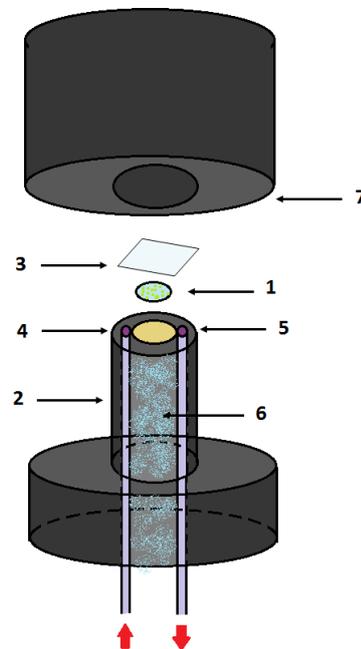


Figura 9: Representación esquemática del equipo de bioluminiscencia. 1. Cristal con las células. 2. Cámara de perfusión. 3. Cubreobjetos que sella la cámara. 4. Orificio de entrada. 5. Orificio de salida. 6. Camisa de agua termostatzada. 7. Fotomultiplicador.

3.2.1. Calibración:

A medida que transcurre el experimento se obtienen datos correspondientes a la luminiscencia emitida por la aequorina en cada segundo (cuentas por segundo, cps) expresadas en forma de ratio L/L_{max} . El valor de L hace referencia al total de cuentas por segundo registradas en un momento dado, restando las cuentas basales, y L_{max} se corresponde con el total de cuentas, restando también las basales, que se registrarían si toda la aequorina que aún queda activa en la muestra se expusiera a una concentración saturante de calcio, situación en la que se produciría el consumo total de la sonda (Allen D.G. et al., 1977). Para obtener el dato de L_{max} de cada experimento es necesario perfundir un medio de alto calcio suplementado con digitonina, proceso que se lleva a cabo al final del experimento. De esta manera se puede obtener la relación entre el ratio L/L_{max} y la concentración de calcio mediante la transformación de dichos cocientes con el siguiente algoritmo matemático (Brini M et al., 1995; Montero M. et al., 2001, 2002):

$$[Ca^{+2}] = \frac{\left(\frac{L}{L_{max} \cdot \lambda}\right)^{1/n} + \left[\left(\frac{L}{L_{max} \cdot \lambda}\right)^{1/n} \cdot K_{TR}\right] - 1}{K_R - \left[\left(\frac{L}{L_{max} \cdot \lambda}\right)^{1/n} \cdot K_R\right]}$$

La ecuación anteriormente descrita deriva de un modelo matemático que explica cómo depende la luminiscencia de la aequorina de la concentración de calcio. Este modelo, propuesto por Allen y colaboradores (1977), lo hemos utilizado para ajustar los datos obtenidos en la calibración de la sonda. Las constantes que aparecen en la ecuación toman valores diferentes según la aequorina utilizada y según el tipo de celenteracina con la que ha sido reconstituida (Montero y col., 1997). En nuestro caso, hemos utilizado aequorina mutada dirigida a la mitocondria (mitmutAEQ) y reconstituida con celenteracina nativa (wt) o celenteracina mutada n, no obstante, en la siguiente tabla se muestran los valores de las constantes tanto para nuestros experimentos como para otros posibles casos:

COMBINACIÓN	K_R	K_{TR}	n	λ	Rango $[Ca^{2+}]$
Aequorina: mitAEQ (nativa) Celenteracina: wt (nativa)	4.81×10^7	601	2.3	1	0.1-5 μM
Aequorina: mitmutAEQ (mutada) Celenteracina: wt (nativa)	1.61×10^7	2.2×10^4	1.43	1	2-100 μM
Aequorina: mitmutAEQ (mutada) Celenteracina: n	8.47×10^7	1.656×10^5	1.2038	0.138	20 μM -1 mM

3.3. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE $[Ca^{2+}]$ MITOCONDRIAL:

Las medidas de la concentración de calcio mitocondrial se llevaron a cabo en células sembradas sobre cubreobjetos de 13 mm de diámetro tras 36-48 horas de transfección (MM5) o cotransfección (EAhy926). Para ello, es necesario llevar a cabo el proceso de reconstitución, que consiste en añadir de forma exógena el grupo prostético celenteracina (1 μM) sobre un medio externo estándar (1 mM de Ca^{2+}) para favorecer su unión a la aequorina. Cuando los experimentos se realizaron en células intactas, éstas fueron reconstituidas con celenteracina wt durante 1-2 h en oscuridad; mientras que en el caso de experimentos en células permeabilizadas, las células se reconstituyeron con celenteracina n. En ambos casos las células fueron incubadas a temperatura ambiente.

Una vez reconstituidas las células, se colocó el cubreobjetos en la cámara de perfusión y se llevó a cabo el experimento a 37 °C. En las células intactas, primero se perfundió medio externo Ca^{2+} 1 mM y posteriormente los diferentes agonistas cuando el trazado estaba estable. En el caso de células permeabilizadas, primero se perfundió medio externo EGTA 0.5 mM durante 1 minuto seguido de 1 minuto de perfusión con digitonina en medio interno EGTA. Seguidamente, se lavó el detergente y se añadieron tampones de calcio a diferentes concentraciones.

Una vez obtenidos los valores de luminiscencia emitidos por la aequorina en cada segundo, se perfundió un medio con digitonina 100 μM y Ca^{2+} a saturación (10 mM) con el objetivo de consumir el total de aequorina no gastada durante el desarrollo del experimento. De esta manera, con los valores obtenidos de luminiscencia total y luminiscencia en cada punto del experimento, se puede llevar a cabo la calibración del mismo y la obtención de los valores en forma de concentración de calcio.

3.3.1. Composición de las soluciones utilizadas:

Para llevar a cabo los experimentos se han utilizado diferentes medios y tampones de calcio cuya composición se detalla a continuación:

- Medio externo Ca^{2+} 1 mM: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glucosa, 1 mM Ca^{2+} , pH 7.4 (NaOH).
- Medio externo EGTA 0.5 mM: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glucosa, 0.5 mM EGTA, pH 7.4 (NaOH).
- Medio Ca^{2+} 10 mM: 10 mM Ca^{2+} en agua.
 - Digitonina: 100 μM en medio Ca^{2+} 10 mM.
- Medio interno EGTA 0.5 mM: 120 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM H_2KPO_4 , 20 mM HEPES, 1 mM ATP, 20 μM ADP, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, pH 7.0 (KOH).
- Medio interno EGTA 0.5 mM (permeabilización): 120 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM H_2KPO_4 , 20 mM HEPES, 5 mM succinato, 5 mM glutamato, 5 mM malato, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, pH 7.0 (KOH).
 - Digitonina 20 μM en medio interno EGTA de permeabilización.
 - Digitonina 50 μM en medio interno EGTA de permeabilización.
- Medio interno HEDTA 5 mM: 120 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM H_2KPO_4 , 20 mM HEPES, 1 mM ATP, 20 μM ADP, 6.5 mM MgCl_2 , 5 mM HEDTA, pH 7.0 (KOH).
 - Ca^{2+} 3.5 μM : 110 μM CaCl_2 en medio interno HEDTA.
 - Ca^{2+} 4.5 μM : 138 μM CaCl_2 en medio interno HEDTA.
 - Ca^{2+} 5.5 μM : 165 μM CaCl_2 en medio interno HEDTA.
 - Ca^{2+} 10 μM : 303 μM CaCl_2 en medio interno HEDTA.
- Medio interno EGTA 0.1 mM: 120 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM H_2KPO_4 , 20 mM HEPES, 1 mM ATP, 20 μM ADP, 1.96 mM MgCl_2 , 0.1 mM EGTA, pH 7.0 (KOH).

Medio interno EGTA- Ca^{2+} 0.1 mM: 120 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM H_2KPO_4 , 20 mM HEPES, 1 mM ATP, 20 μM ADP, 1.96 mM MgCl_2 , 0.1 mM EGTA, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.0 (KOH).

- Ca^{2+} 200 nM: 63.6 % medio interno EGTA 0.1 mM y 36.4 % medio interno EGTA- Ca^{2+} 0.1 mM.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- EFICACIA DE LOS PROCESOS DE TRANSFECCIÓN:

Como se ha descrito anteriormente, para este proyecto se han utilizado dos líneas celulares distintas que a su vez han seguido procesos de transfección diferentes. El hecho de utilizar agentes de transfección distintos se debe a la eficacia del proceso obtenida por los mismos, medida en forma de rendimiento de la transfección. Dicha eficacia se ha medido al transfectar las células con mitEGFP y observar el porcentaje de células transfectadas con microscopía de fluorescencia (Microscopio ZEISS de tipo Akioskop 2 mut Plus, que lleva acoplada una cámara Coolsnap cf, obtenido de Photometrix. Programa informático de análisis de imagen Metamorph 6.1). De esta manera, el agente que mejores resultados ha dado lugar para las células MM5 ha sido el Metafectene Pro[®], mientras que para las células EAhy926 ha sido Transfast[®] (datos no mostrados).

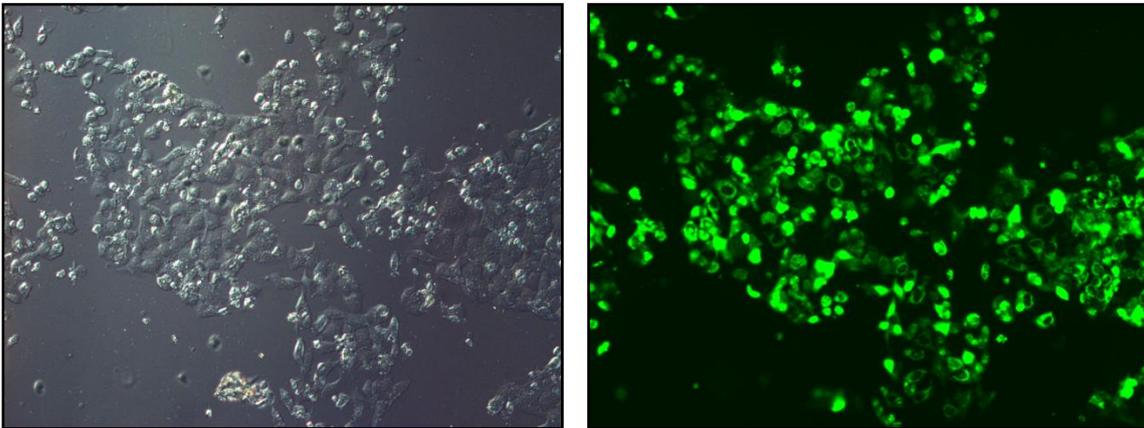


Figura 10: *Células HeLa (MM5) transfectadas con mitEGFP con el agente Metafectene Pro[®]. A la izquierda, imagen DIC de campo claro con óptica de Nomarski (10x). A la derecha, imagen de microscopía de fluorescencia (10x). Excitación a 488 nm, emisión a 520 nm, tiempo de exposición de 250 ms.*

2.- ESTUDIO EN CÉLULAS INTACTAS:

Los experimentos llevados a cabo en células intactas, tanto MM5 como EAhy926, tenían como objetivo investigar las posibles variaciones en el proceso de captación de calcio por la mitocondria, inducido por agonistas, en presencia o no de las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3. Por tanto, los primeros experimentos que se han llevado a cabo consisten en medir la amplitud del pico de $[Ca^{2+}]$ mitocondrial inducido por el agonista histamina, tanto en células control como en células que sobreexpresan cada una de estas proteínas desacoplantes. La histamina actúa en ambos tipos de células sobre receptores de la membrana plasmática que activan la cascada de la fosfolipasa C, induciendo la formación del segundo mensajero IP_3 , que libera Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico. Esta liberación induce un aumento de $[Ca^{2+}]$ en el citosol que induce a su vez un aumento transitorio de Ca^{2+} en las mitocondrias cercanas a los sitios de liberación. En el panel A de la figura se muestran los picos de $[Ca^{2+}]$ mitocondriales obtenidos en células EAhy926 tras estimular la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares con histamina 100 μM durante 1 minuto, seguido del lavado del agonista con medio externo. El panel B muestra la estadística. Además, para asegurarnos de que las variaciones en los picos de $[Ca^{2+}]$ mitocondriales se debían únicamente al calcio liberado de los depósitos y no al que pudiera entrar desde el medio extracelular por la vía capacitativa (SOCE), se realizaron también experimentos en presencia del quelante de Ca^{2+} EGTA (0.5 mM). Estos experimentos se realizaron en células MM5 y se muestran en el panel C (estadística en el panel D).

Los resultados obtenidos en células EAhy926 en presencia de Ca^{2+} muestran valores de los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mitocondrial}}$ de $27.7 \pm 2.3 \mu\text{M}$ en los controles ($n=3$), $49.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ en células que sobreexpresan UCP2 ($n=4$) y $47.3 \pm 1.2 \mu\text{M}$ en células que sobreexpresan UCP3 ($n=4$). En el caso de células MM5, los experimentos se hicieron en presencia de EGTA (0.5 mM), siendo los valores de los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mitocondrial}}$ de $16.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ en los controles ($n=4$) (células sin transfectar), 43.1 ± 4.8 en células que sobreexpresan UCP2 ($n=3$) y $40.2 \pm 3.1 \mu\text{M}$ en células que sobreexpresan UCP3.

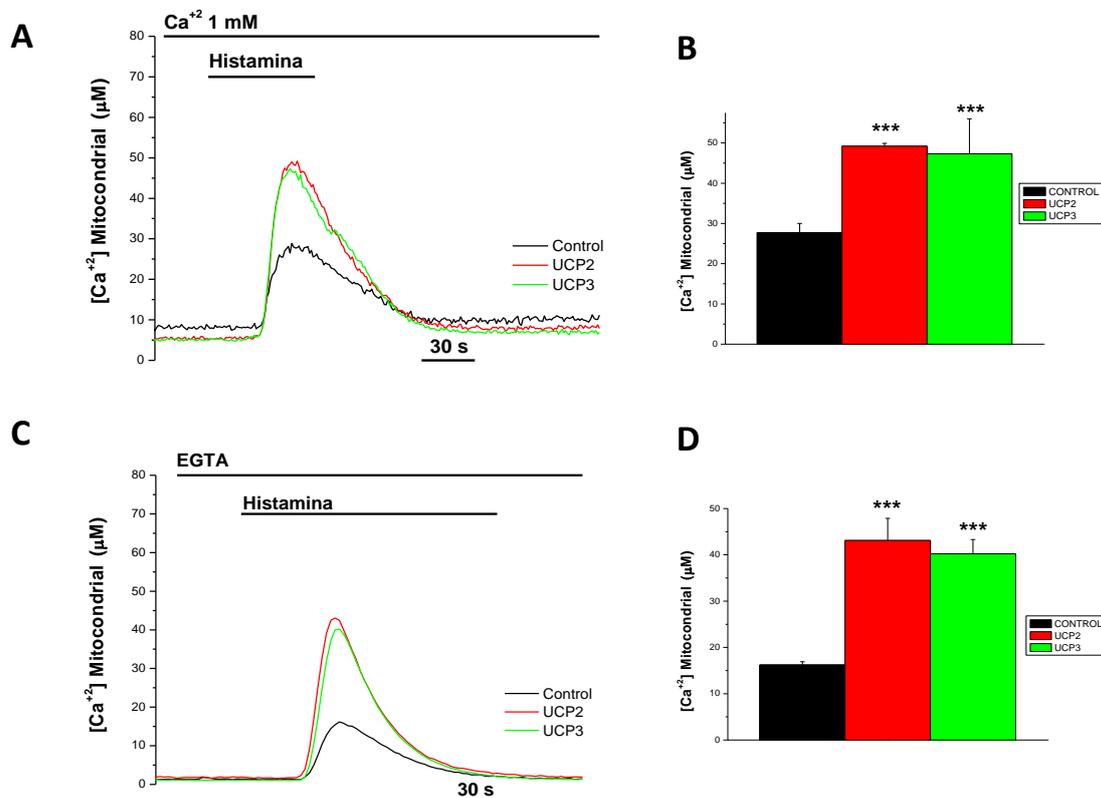


Figura 11: Efecto de la sobreexpresión de UCP2/UCP3 en los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ inducidos por histamina. **A.** Datos obtenidos en células EAhy926 transfectadas con mitmutAEQ y cotransfectadas con UCP2/UCP3, reconstituidas con celenteracina wt en medio externo Ca^{2+} 1 mM durante 1-2 h y estimuladas con histamina 100 μM durante 1 minuto. Los resultados mostrados son representativos de una media de 3 controles (negro), 4 UCP2 (rojo) y 4 UCP3 (verde). **B.** Significación estadística de los datos representados en A, *** $p < 0.005$. **C.** Resultados obtenidos en células MM5 que expresan constitutivamente mimutAEQ, transfectadas con UCP2/UCP3, reconstituidas con celenteracina wt durante 1-2 h en medio externo Ca^{2+} 1 mM y estimuladas con histamina 100 μM durante 1 minuto en medio externo conteniendo EGTA 0.5 mM. **D.** Significación estadística de los resultados mostrados en C, *** $p < 0.005$.

El siguiente paso que se llevó a cabo fue el estudio de la captación de calcio por la mitocondria en células que expresan o no las proteínas desacoplantes UCP2/UCP3 y en presencia de un activador de dicha captación de naturaleza flavonoide, el kaempferol, o bien en presencia del compuesto CGP37157, un inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial.

En estudios anteriores, se ha descrito al kaempferol como un flavonoide del grupo de los flavonoles cuyo efecto en células HeLa intactas estimuladas con histamina consiste en el aumento del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mitocondrial}}$ de manera dependiente de la concentración del flavonoide. En nuestro caso, lo que queríamos investigar es si dicho efecto estaba de alguna manera relacionado con el aumento de los pico de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mitocondrial}}$ que habíamos visto en células que sobreexpresaran las proteínas UCP2/UCP3. Los experimentos

llevados a cabo en células MM5 muestran que este compuesto produce un aumento en el pico de $[Ca^{2+}]_{mit}$ mitocondrial tanto en el control como en las células que sobreexpresan UCP2/UCP3. Los valores de los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ mitocondrial son en este caso de $60.6 \pm 8.9 \mu M$ en los controles (n=8), $88.3 \pm 4.7 \mu M$ en células que sobreexpresan UCP2 (n=8) y 83.0 ± 10.4 en células que sobreexpresan UCP3 (n=7). Dicho aumento es por tanto de 3.7 veces en los controles y algo menor, de 2.05 y 2.06 veces en el caso de las células que sobreexpresan UCP2 y UCP3, respectivamente. En todo caso, la diferencia en el valor del pico entre el control y las células con sobreexpresión de UCP2/UCP3 sigue siendo significativa, lo que sugiere que los efectos del kaempferol y de las proteínas desacoplantes son independientes.

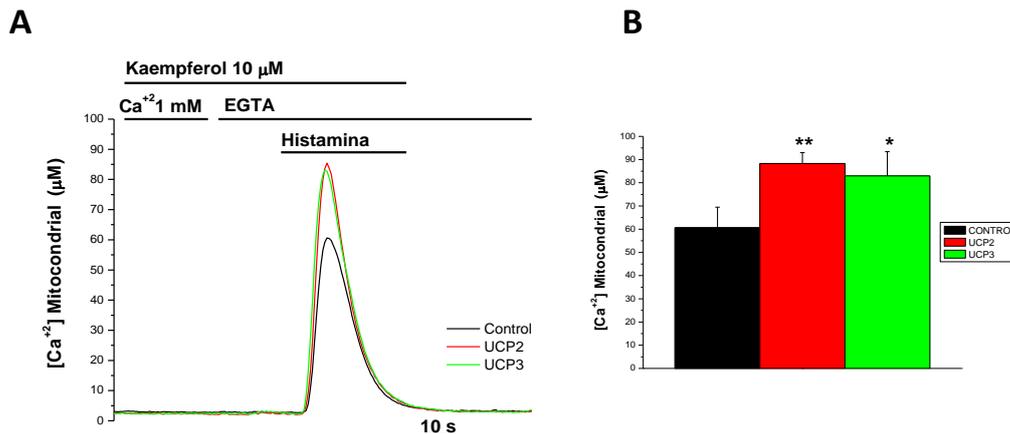


Figura 12: Efecto del kaempferol en los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducidos por histamina. A. Células MM5 que expresan constitutivamente *mitmutAEQ*, transfectadas con UCP2/UCP3 y reconstituidas con *celenteracina wt* durante 1-2 h en medio externo Ca^{2+} 1 mM. Las células fueron preincubadas durante 2 minutos con kaempferol 10 μM según muestra la figura. La histamina 100 μM fue perfundida durante 1 minuto en medio externo EGTA (0.5 mM) con kaempferol (10 μM) y seguidamente se lavó. Los resultados mostrados son representativos de una media de 8 controles (negro), 8 UCP2 (rojo) y 8 UCP3 (verde). **B.** Significación estadística de los datos representados en A, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Se ha descrito en estudios anteriores que la inhibición del intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial por CGP37157 reduce la liberación de Ca^{2+} de la mitocondria, participando así en la modulación del patrón de oscilaciones del Ca^{2+} citosólico generado tras la activación de los receptores de IP_3 (IP_3R). Además, la forma del pico de $[Ca^{2+}]_{mit}$ mitocondrial en presencia de este inhibidor difiere respecto al pico obtenido en ausencia del inhibidor, debido a que presenta una pendiente de caída de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ más lenta, consecuencia de la inhibición del intercambiador Na^+/Ca^{2+} y de la consiguiente salida del catión por otros mecanismos más lentos.

En este trabajo hemos llevado a cabo experimentos en células MM5 en presencia de CGP37157 para investigar si el efecto de las proteínas desacoplantes sobre los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ mitocondriales tiene algo que ver con alteraciones en el proceso de extrusión del catión desde la mitocondria al citosol. Para ello hemos estimulado las células MM5 con histamina en presencia del inhibidor, tanto los controles como las células con sobreexpresión de UCP2. Los resultados obtenidos en las células que sobreexpresan UCP2 siguen mostrando diferencias significativas en cuanto a los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ mitocondrial, alcanzando niveles de hasta $56.1 \pm 4.6 \mu M$ (n=9), respecto los picos obtenidos en los controles, que toman valores máximos de $38.2 \pm 1.5 \mu M$ (n=9). De estos resultados se puede deducir que el aumento del pico de $[Ca^{2+}]_{mit}$ mitocondrial inducido por UCP2 no se debe a alteraciones en la ruta de salida de Ca^{2+} de la mitocondria, en concreto el intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial, que es el mecanismo más importante.

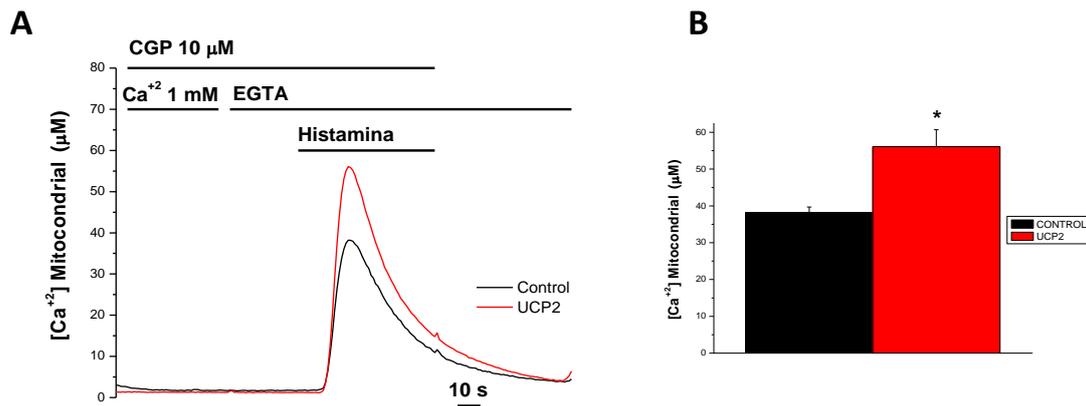


Figura 13: Efecto del inhibidor CGP37157 en los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducidos por histamina. Células EAhy926 transfectadas con mitmutAEQ y cotransfectadas con UCP2, reconstituidas con celenteracina wt durante 1-2 h en medio externo Ca^{2+} 1 mM. Las células fueron preincubadas durante 2 minutos con CGP37157 10 µM, tal y como se muestra en la figura. La histamina 100 µM fue perfundida durante 1 minuto en medio externo EGTA (0.5 mM) con CGP (10 µM) y seguidamente se lavó. Los datos mostrados representan la media de 9 controles (negro) y 9 UCP2 (rojo) y son representativos de 2 experimentos similares. **B.** Significación estadística de los datos representados en A, * $p < 0.05$.

3.- ESTUDIO EN CÉLULAS PERMEABILIZADAS:

Partiendo de los resultados obtenidos en células intactas estimuladas con histamina y en presencia o no de diferentes agonistas, el siguiente paso que se llevó a cabo fue investigar si en células permeabilizadas que sobreexpresaban las proteínas desacoplantes UCP2/UCP3 se obtenían también variaciones en los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducidos por variaciones de la $[Ca^{2+}]_{citos}$. En las células permeabilizadas las mitocondrias están directamente accesibles al medio de perfusión, y es por tanto más sencillo medir directamente la captación de Ca^{2+} por la mitocondria, sin necesidad de procesos intermedios como en el caso del estímulo con el agonista.

Para ello, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos:

1. En primer lugar, hemos estudiado el efecto directo del compuesto IP_3 (2 µM), que en las células permeabilizadas libera directamente Ca^{2+} del retículo endoplásmico generando picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ en las mitocondrias cercanas. Las células se permeabilizan con digitonina (20 µM) durante 1 minuto, seguido de lavado e incubación con un medio interno con baja concentración de calcio (200 nM) obtenido con un sistema tampón de Ca^{2+} con baja concentración de EGTA, para evitar que tampones el Ca^{2+} liberado del retículo endoplásmico.

2. El otro tipo de experimentos que se realizaron tenían como objetivo medir directamente la velocidad de captación de Ca^{2+} de las mitocondrias al perfundir sistemas tampón de $[Ca^{2+}]_{citos}$ conocida (4.5 µM y 5.5 µM). Para llevar a cabo este tipo de experimentos, las células fueron permeabilizadas con digitonina (50 µM) durante 1 minuto, seguido de un lavado con medio interno EGTA (0.5 mM) y a continuación la perfusión de los tampones de calcio.

3.1. Efecto de IP_3 en células permeabilizadas:

El IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato) es un segundo mensajero que interviene en la cascada de señalización de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), de forma que actúa sobre los receptores de inositol trifosfato (IP_3R) del retículo endoplásmico, favoreciendo la salida de calcio al citosol. A continuación, el Ca^{2+} liberado

sale rápidamente del citosol a través de las bombas de la membrana plasmática (PMCA), es captado por la mitocondria o bien vuelve a rellenar los depósitos de calcio.

Por tanto, los experimentos llevados a cabo en este punto tratan de evaluar si UCP2/UCP3 son capaces de aumentar los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ generados tras la estimulación directa de los receptores de IP_3 en las células permeabilizadas, en ausencia del proceso de señalización mediado por el agonista histamina.

Los resultados obtenidos difieren de un tipo celular a otro: en las células MM5, se obtuvieron resultados similares en cuanto a los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ mitocondrial tanto en controles como en células que sobreexpresan UCP2, alcanzando valores máximos de $23.8 \pm 4.1 \mu M$ (n=8) y $24.3 \pm 4.7 \mu M$ (n=7), respectivamente. Sin embargo, en células EAhy926, los picos obtenidos en las células control (transfectadas con mitmutAEQ) alcanzan concentraciones de Ca^{2+} superiores a las células cotransfectadas con UCP2, siendo los valores máximos obtenidos de $24.6 \pm 5.3 \mu M$ (n=7) y $13.4 \pm 1.4 \mu M$ (n=7), respectivamente. Por lo tanto, observamos en ambos casos que los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducidos directamente por el IP_3 no aumentan tras la sobreexpresión de UCP2, al contrario de lo que ocurría en células intactas. De hecho, en las células EAhy926, disminuyen de forma significativa.

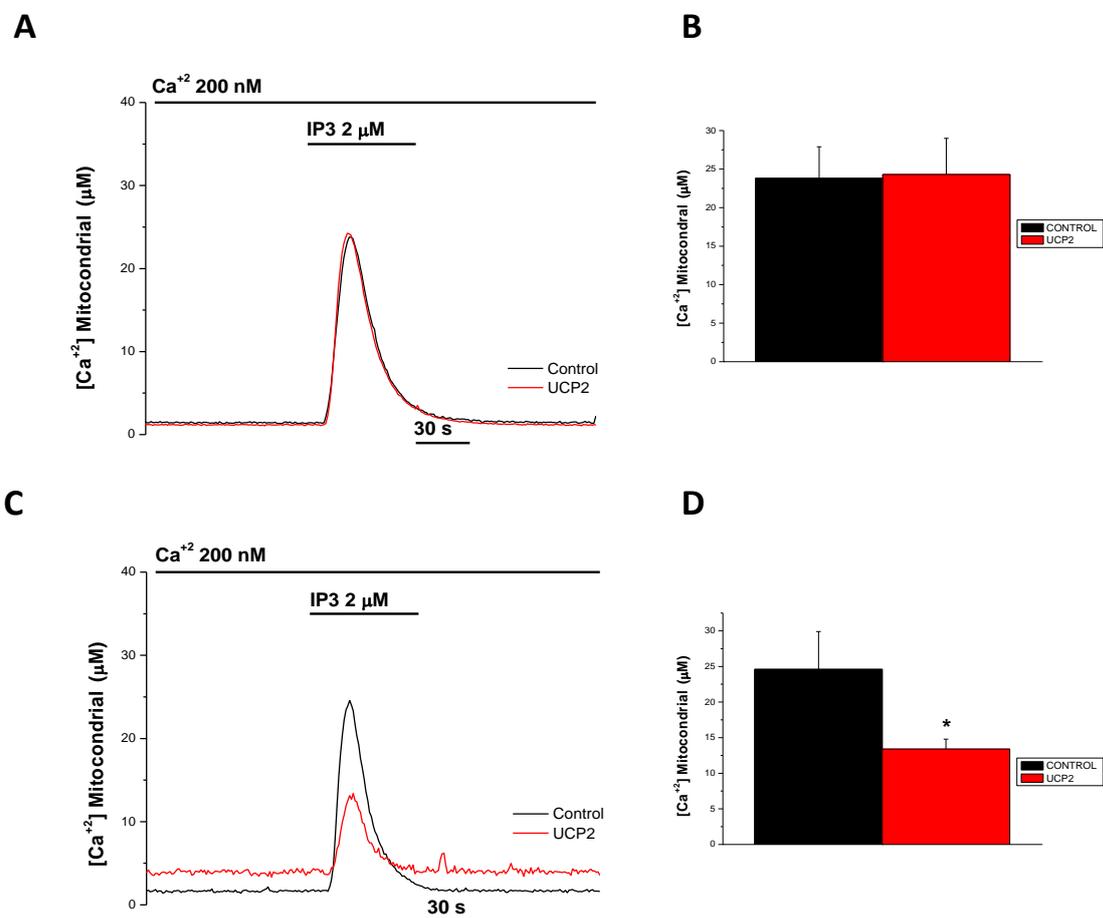


Figura 14: Efecto del IP_3 en los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ en células permeabilizadas con digitonina. **A.** Datos obtenidos en células MM5 que expresan mitmutAEQ de forma constitutiva, transfectadas con UCP2 y reconstituidas con celenteracina wt durante 1-2 h en medio externo Ca^{2+} 1 mM. Las células fueron permeabilizadas con digitonina 20 μM durante 1 minuto, seguido de 5 minutos de lavado e incubación en una solución de medio interno y 200 nM Ca^{2+} , obtenido con un tampón de Ca^{2+} conteniendo 0,1 mM EGTA. Tras este tiempo, las células fueron estimuladas con IP_3 2 μM , tal y como muestra la figura. Los datos mostrados son representativos de una media de 8 controles (negro) y 7 UCP2 (rojo). **B.** Significación estadística de los datos mostrados en A. **C.** Datos obtenidos en células EAhy926 transfectadas con mitmutAEQ y cotransfectadas con UCP2, reconstituidas con celenteracina wt durante 1-2 h en medio externo Ca^{2+} 1 mM. El experimento se llevó a cabo en las mismas condiciones anteriormente descritas para las células MM5. Los datos son representativos de una media de 7 controles (negro) y 7 UCP2 (rojo). **D.** Significación estadística de los resultados mostrados en C, * $p < 0.05$.

3.2. Efecto de diferentes tampones de calcio en células permeabilizadas:

En los experimentos llevados a cabo en células permeabilizadas con digitonina, en las que se perfundieron diferentes tampones de calcio de concentración conocida, no se observaron diferencias significativas en el proceso de captación de Ca^{2+} mitocondrial. Al perfundir un tampón de Ca^{2+} de $4.5 \mu\text{M}$ se obtuvo un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ similar en las células que sobreexpresaban UCP2 respecto los controles, siendo los valores máximos alcanzados de $25.03 \pm 0.51 \mu\text{M}$ y $27.00 \pm 0.64 \mu\text{M}$, respectivamente. En el mismo experimento se perfundió Ca^{2+} a mayor concentración, de $5.5 \mu\text{M}$, lo que dio lugar a elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en este caso algo menores para las células que sobreexpresaban UCP2 que en el caso de los controles, siendo los valores máximos de $42.32 \pm 1.22 \mu\text{M}$ y $56.76 \pm 2.23 \mu\text{M}$, respectivamente. Por lo tanto, nuevamente aquí observamos que la sobreexpresión de UCP2 no producía el aumento de captación de Ca^{2+} mitocondrial observado previamente en células intactas estimuladas con histamina.

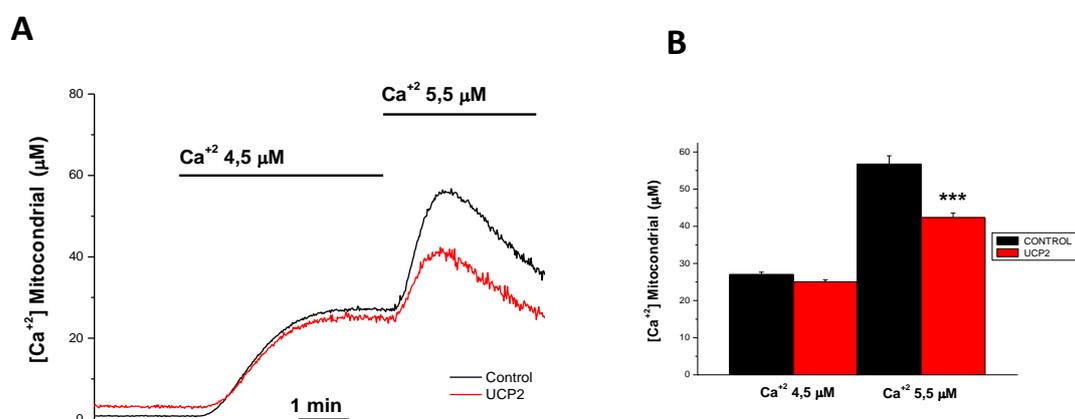


Figura 15: Efecto de la sobreexpresión de UCP2 sobre la captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas. **A** Células EAhy926 transfectadas con *mitmutAEQ*, cotransfectadas con UCP2 y reconstituidas con celenteracina *wt* en medio externo Ca^{2+} 1mM durante 1-2 h. Las células fueron permeabilizadas con digitonina $50 \mu\text{M}$ durante 1 minuto seguido de un lavado con medio interno EGTA (0.5mM) y la perfusión de tampones de Ca^{2+} 4.5 y $5.5 \mu\text{M}$. Los datos mostrados son representativos de una media de 5 controles (negro) y 6 UCP2 (rojo). **B.** Significación estadística de los datos mostrados en A, $***p < 0.005$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

UCP2 y UCP3 pertenecen a una superfamilia de proteínas desacoplantes cuyo miembro más conocido hasta ahora es la proteína UCP1 o termogenina. UCP1 actúa en la membrana mitocondrial interna disipando el gradiente de H^+ generado por la cadena de transporte de electrones de forma que desacopla la producción de ATP por la ATPasa mitocondrial de la cadena respiratoria. Sin embargo, aunque UCP2 y UCP3 pertenezcan a la misma superfamilia que UCP1 debido a la elevada homología que presentan respecto a la misma, su papel funcional no está suficientemente aclarado y no hay aún evidencia convincente de que se comporten funcionalmente como proteínas disipadoras del gradiente de H^+ .

Como se ha comentado anteriormente, el grupo de W Graier (Trenker et al., 2007) propuso recientemente que estas proteínas podrían jugar un papel importante en el mecanismo de captación de Ca^{2+} de las mitocondrias, aunque hasta el momento la evidencia a favor de esta hipótesis procede solamente de su grupo de trabajo y otros autores han publicado evidencia importante en su contra (Brookes et al., 2008). Los experimentos llevados a cabo en este proyecto y los resultados obtenidos a partir de los mismos, confirman que las proteínas UCP2 y UCP3 parecen jugar un papel en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial. En efecto, los datos obtenidos en células intactas muestran que la sobreexpresión de UCP2 o UCP3 produce un aumento muy significativo de la amplitud de los picos de $[Ca^{2+}]$ mitocondrial inducidos por el agonista histamina, tanto en la línea de carcinoma de cuello de útero HeLa como en la línea celular endotelial humana EAhy926. Esta activación fue además independiente de la inducida por el flavonoide kaempferol, y no se debía a una interferencia de estas proteínas con la salida de Ca^{2+} de las mitocondrias a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} .

Sin embargo, estos efectos de la sobreexpresión de UCP2 desaparecieron al estudiar directamente la captación de Ca^{2+} por la mitocondrias en células permeabilizadas. En este caso, cuando las mitocondrias están directamente accesibles desde el medio extracelular, la perfusión de tampones de $[Ca^{2+}]$ conocida activa directamente el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial e induce entrada acumulativa de Ca^{2+} en las mitocondrias. Esta entrada, sin embargo, no sufrió ninguna activación en las células que sobreexpresaban UCP2. Asimismo, tampoco se observó ningún efecto activador de la captación de $[Ca^{2+}]_{mit}$ tras la sobreexpresión de UCP2 cuando se utilizó IP_3 para liberar Ca^{2+} del retículo endoplásmico en células permeabilizadas, un protocolo en el que la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias utiliza un mecanismo muy similar al que tiene lugar en células intactas tras la estimulación con histamina. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que UCP2 y UCP3 parecen jugar un papel activador de la captación de Ca^{2+} mitocondrial, pero dicho papel requiere necesariamente de la integridad celular para ser efectivo.

Los datos publicados hasta el momento por el grupo de W. Graier sugieren la participación de estas proteínas en la captación del Ca^{2+} por la mitocondria, pero el mecanismo molecular por el que actúan aún no está claro. Estos autores proponen que existirían dos mecanismos de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria distintos según la fuente del catión (Waldeck-Weiermair M. et al, 2010). Así, cuando el Ca^{2+} es liberado intracelularmente, el mecanismo de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria sería a través de UCP2 /UCP3; sin embargo, cuando el Ca^{2+} entra en la célula por la vía capacitativa (SOCE), el mecanismo molecular de captación mitocondrial sería independiente de las proteínas UCP2/UCP3. Nuestros datos no apoyan esta hipótesis. Aunque sí es cierto que observamos un aumento de la captación de Ca^{2+} mitocondrial al liberar Ca^{2+} del retículo endoplásmico con histamina en células intactas, no observamos en cambio ningún efecto de UCP2 al liberar Ca^{2+} del retículo endoplásmico con IP_3 en células permeabilizadas. En ambos casos la vía de llegada del Ca^{2+} a las mitocondrias es la misma, los receptores de IP_3 del retículo endoplásmico. Por lo tanto, no parece que el efecto de estas proteínas dependa del origen del Ca^{2+} .

Estudios realizados por el grupo de N. Demaurex proponen un mecanismo molecular para UCP3 relacionado con una menor producción de ATP mitocondrial consecuencia del desacoplamiento inducido por esta proteína. Según estos autores, el silenciamiento de UCP3 aumentaría la producción de ATP por las mitocondrias y por tanto la actividad de las SERCA, llevando a un mayor relleno de Ca^{2+} del retículo

endoplásmico y a una inhibición del SOCE (De Marchi et al., 2011). La mayor actividad de la SERCA sería la responsable de disminuir la captación de Ca^{2+} mitocondrial en las células con UCP3 silenciada. Por lo tanto, según esta hipótesis, los cambios en la velocidad de captación de Ca^{2+} por la mitocondria serían la consecuencia final derivada de la acción que ejerce UCP3 sobre la producción de ATP mitocondrial.

Nuestros datos son en principio compatibles con esta hipótesis, ya que explicaría por qué los efectos se ven en células intactas, en las que el ATP es sintetizado en las mitocondrias, y no en células permeabilizadas, en las que el ATP se halla en el medio de perfusión y es por tanto independiente de la presencia o no de proteínas desacoplantes. También explicaría por qué en algunos casos la sobreexpresión de estas proteínas produce una disminución de la captación de Ca^{2+} mitocondrial en células permeabilizadas, que podría deberse al desacoplamiento y consiguiente disminución del potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, hay algunos puntos de esta hipótesis que requerirían un mayor estudio. En concreto, para explicar nuestros resultados con la sobreexpresión de UCP2/UCP3, deberíamos entender cómo es posible generar un aumento de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria como consecuencia de un desacoplamiento al menos parcial de las mitocondrias y por tanto de una reducción del potencial de membrana mitocondrial, que es la fuerza que dirige la captación de Ca^{2+} por la mitocondrias. De acuerdo con la hipótesis de Demaurex, sería la menor actividad de la SERCA (consecuencia del descenso de ATP por el desacoplamiento) la que permitiría un mayor acúmulo de Ca^{2+} citosólico tras su liberación desde el retículo endoplásmico y con ello aumentaría la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria. Sin embargo, la menor actividad de la SERCA llevaría también a una depleción de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y a una menor liberación de Ca^{2+} . Tendríamos en este caso varios factores contrapuestos, menor liberación de Ca^{2+} y menor potencial de membrana mitocondrial por un lado (que tienden a reducir la captación de Ca^{2+} por la mitocondria), y por otro lado menor retirada por la SERCA del Ca^{2+} liberado (que tiende a aumentarla). Sin más datos resulta difícil asumir que este último efecto predomine tan claramente sobre los primeros.

En resumen, aunque esta hipótesis sea de momento la más consistente con nuestros datos, creemos que son necesarios más estudios para aclarar definitivamente el mecanismo de acción de estas proteínas desacoplantes. En concreto, sería necesario estudiar en primer lugar con detalle los efectos de la sobreexpresión de UCP2 y UCP3 sobre las variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ en citosol y en el retículo endoplásmico durante la estimulación celular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se ha llegado a partir de los resultados obtenidos en los experimentos realizados en este proyecto se resumen en:

- En células intactas y tras la estimulación celular con un agonista, la sobreexpresión de las proteínas UCP2/UCP3 aumenta el valor del pico de $[Ca^{2+}]_{mit}$ de forma significativa respecto los valores obtenidos en ausencia de sobreexpresión, lo que sugiere que dichas proteínas contribuyen a un aumento de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria.
- Los experimentos llevados a cabo en presencia de kaempferol muestran que este flavonoide produce un aumento en los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducidos por histamina, pero dicho aumento se da tanto en los controles como en las células que sobreexpresan UCP2/UCP3 y se mantiene la diferencia significativa en cuanto a los valores máximos obtenidos en ambos grupos de estudio. Por tanto, los efectos estimuladores de la captación de Ca^{2+} mitocondrial del kaempferol y de la sobreexpresión de UCP2/UCP3 tienen lugar por rutas independientes.
- Así mismo, los experimentos llevados a cabo en presencia del inhibidor CGP37157 muestran que se siguen obteniendo diferencias significativas en el pico de $[Ca^{2+}]_{mit}$ en las células que sobreexpresan UCP2/UCP3 respecto los controles en presencia del inhibidor, lo que sugiere que el efecto de la sobreexpresión de UCP2/UCP3 no está mediado por alteraciones del proceso de extrusión de Ca^{2+} de la mitocondria.
- En células permeabilizadas, los resultados no concuerdan con los obtenidos en células intactas, ya que no se observan aumentos en los picos de $[Ca^{2+}]_{mit}$ en las células que sobreexpresan UCP2/UCP3 respecto los controles. En los experimentos llevados a cabo en presencia de IP_3 en células MM5 no se observaron diferencias significativas en los valores de los picos obtenidos en células que sobreexpresaban UCP2/UCP3 respecto a los controles, mientras que en las EAhy926 se observaron incluso disminuciones en el valor de los picos obtenidos bajo condiciones de sobreexpresión. Además, en los experimentos realizados en células EAhy926 con diferentes tampones de Ca^{2+} de concentraciones conocidas, los resultados obtenidos fueron también similares en el caso de sobreexpresión de UCP2/UCP3 respecto los controles. En conjunto, los experimentos llevados a cabo en células permeabilizadas no muestran ningún aumento en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en células que sobreexpresan UCP2/UCP3 respecto los controles.
- A la vista de las hipótesis planteadas para explicar el mecanismo de acción de UCP2/UCP3 sobre la homeostasis del Ca^{2+} , creemos que son necesarios más experimentos para aclarar definitivamente su papel funcional.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:

- Allen DG, B. J., Prendergast FG. (1977). "Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration--a calcium-independent component." Science. **195**(4282): 996-8.
- Altimimi HF, S. P. (2007). "Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles." Channels (Austin). **1**(2): 62-9.
- Alvarez J, M. M., García-Sancho J. (1999). "Subcellular Ca(2+) Dynamics." News Physiol Sci. **14**: 161-168.
- Barrero MJ, M. M., Alvarez J. (1997). "Dynamics of [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study." J Biol Chem. **272**(44): 27694-9.
- Baughman JM, P. F., Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V, Mootha VK. (2011). "Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter." Nature. **476**(7360): 341-5.
- Bernardi P (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition." Physiol Rev. **79**(4): 1127-55.
- Bezprozvanny I, W. J., Ehrlich BE. (1991). "Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum." Nature. **351**(6359): 751-4.
- Blinks JR, A. D., Prendergast FG, Harrer GC. (1978). "Photoproteins as models of drug receptors." Life Sci. **22**(13-15): 1237-44.
- Brini M, M. R., Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, Rizzuto R. (1995). "Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c). A critical evaluation." J Biol Chem. **270**(17): 9896-903.
- Brookes PS, P. N., Buckingham JA, Vidal-Puig A, Halestrap AP, Gunter TE, Nicholls DG, Bernardi P, Lemasters JJ, Brand MD. (2008). "UCPs--unlikely calcium porters." Nat Cell Biol **10**(11): 1235-7.
- Cahalan MD (2009). "STIMulating store-operated Ca(2+) entry." Nat Cell Biol. **11**(6): 669-77.
- Carafoli E (1987). "Intracellular calcium homeostasis." Annu Rev Biochem. **56**: 395-433.
- Carafoli, E. (2003). "Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship." Trends Biochem Sci. **28**(4): 175-81.
- Catterall WA (2011). "Voltage-gated calcium channels." Cold Spring Harb Perspect Biol. **3**(8): a003947.
- Csordás G, V. P., Golenár T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnóczky G. (2010). "Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface." Mol Cell. **39**(1): 121-32.
- De Marchi U, C. C., Demarex N. (2011). "Uncoupling protein 3 (UCP3) modulates the activity of Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by decreasing mitochondrial ATP production." J Biol Chem. **286**(37): 32533-41.
- De Stefani D, R. A., Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. (2011). "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter." Nature. **476**(7360): 336-40.
- Deluca HF, E. G. (1961). "Calcium uptake by rat kidney mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A. **47**(1744-50).
- Frey TG, R. C., Perkins GA. (2002). "Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography." Biochim Biophys Acta. **1555**(1-3): 196-203.

- Gasser J, P. P., Carafoli E, Chiesi M. (1988). "Heterogeneous distribution of calmodulin- and cAMP-dependent regulation of Ca²⁺ uptake in cardiac sarcoplasmic reticulum subfractions." Eur J Biochem. **176**(3): 535-41.
- Giacomello M, D. I., Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P, Pozzan T. (2010). "Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺ mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca²⁺ channels." Mol Cell. **38**(2): 280-90.
- Graier WF, T. M., Malli R. (2008). "Mitochondrial Ca²⁺, the secret behind the function of uncoupling proteins 2 and 3?" Cell Calcium. **44**(1): 36-50.
- Grinwald PM (1982). "Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: influence of extracellular sodium." J Mol Cell Cardiol. **14**(6): 359-65.
- Gunter KK, Z. M., Gunter TE. (1991). "The Na(+)-independent Ca²⁺ efflux mechanism of liver mitochondria is not a passive Ca²⁺/2H⁺ exchanger." J Biol Chem. **266**(32): 21640-8.
- Gunter TE, S. S. (2009). "Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms." Biochim Biophys Acta. **1787**(11): 1291-308.
- Hajnóczky G, C. G. (2010). "Calcium signalling: fishing out molecules of mitochondrial calcium transport." Curr Biol. **20**(20): R888-91.
- Jean-Quartier C, B. A., Alam MR, Trenker M, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF. (2012). "Studying mitochondrial Ca(2+) uptake - a revisit." Mol Cell Endocrinol. **353**(1-2): 114-27.
- Jiang D, Z. L., Clapham DE. (2009). "Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter." Science. **326**(5949): 144-7.
- Kaftan EJ, E. B., Watras J. (1997). "Inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) and calcium interact to increase the dynamic range of InsP3 receptor-dependent calcium signaling." J Gen Physiol. **110**(5): 529-38.
- Kendall JM, S.-N. G., Ghalaut V, Dormer RL, Campbell AK. (1992). "Engineering the CA(2+)-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium." Biochem Biophys Res Commun. **187**(2): 1091-7.
- Kirichok Y, K. G., Clapham DE. (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." Nature. **427**(6972): 360-4.
- Li W, S.-M. Z., Powers M, Sun X, Lane RD, Garlid KD. (1992). "Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria." J Biol Chem. **267**(25): 17983-9.
- Liou J, K. M., Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T. (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." Curr Biol. **15**(13): 1235-41.
- Lobatón CD, V. L., Hernández-Sanmiguel E, Santodomingo J, Moreno A, Montero M, Alvarez J. (2005). "Modulation of mitochondrial Ca(2+) uptake by estrogen receptor agonists and antagonists." Br J Pharmacol. **145**(7): 862-71.
- Ma J, H. S., Bhat MB. (2004). "Membrane topology and membrane retention of the ryanodine receptor calcium release channel." Cell Biochem Biophys. **40**(2): 207-24.
- Malli R, G. W. (2010). "Mitochondrial Ca²⁺ channels: Great unknowns with important functions." FEBS Lett. **584**(10): 1942-7.
- Montero M, A. M., Albillos A, Cuchillo-Ibáñez I, Olivares R, Villalobos C, Alvarez J. (2002). "Effect of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor stimulation on mitochondrial [Ca²⁺] and secretion in chromaffin cells." Biochem J. **365**(Pt 2): 451-9.

- Montero M, A. M., Albillos A, García-Sancho J, Alvarez J. (2001). "Mitochondrial Ca(2+)-induced Ca(2+) release mediated by the Ca(2+) uniporter." Mol Biol Cell. **12**(1): 63-71.
- Montero M, A. M., Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J, Alvarez J. (2000). "Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion." Nat Cell Biol **2**(2): 57-61.
- Montero M, B. M., Alvarez J. (1997). "[Ca²⁺] microdomains control agonist-induced Ca²⁺ release in intact HeLa cells." FASEB J. **11**(11): 881-5.
- Montero M, L. C., Hernández-Sanmiguel E, Santodomingo J, Vay L, Moreno A, Alvarez J. (2004). "Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids." Biochem J. **15**(384(Pt 1)): 19-24.
- Montero M, L. C., Moreno A, Alvarez J. (2002). "A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190." FASEB J. **16**(14): 1955-7.
- Moraru II, K. E., Ehrlich BE, Watras J. (1999). "Regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channels by InsP₃ and calcium: Simulation of single channel kinetics based on ligand binding and electrophysiological analysis." J Gen Physiol. **113**(6): 837-49.
- Palty R, S. W., Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvil D, Sekler I. (2010). "NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange." Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(1): 436-41.
- Pan S, R. S., Sheu SS. (2011). "Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca²⁺ influx mechanisms." Sci China Life Sci. **54**(8): 763-9.
- Periasamy M, K. A. (2007). "SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease." Muscle Nerve. **35**(4): 430-42.
- Perocchi F, G. V., Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK. (2010). "MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake." Nature. **467**(7313): 291-6.
- Raffaello A, D. S. D., Rizzuto R. (2012). "The mitochondrial Ca(2+) uniporter." Cell Calcium. **52**(1): 16-21.
- Rimessi A, G. C., Pinton P, Rizzuto R. (2008). "The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death." Biochim Biophys Acta. **1777**(7-8): 808-16.
- Rizzuto R, S. A., Brini M, Pozzan T. (1992). "Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin." Nature. **358**(6384): 325-7.
- Saris NE, Carafoli E (2005). "A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria." Biochemistry (Mosc). **70**(2): 187-94.
- Serysheva, I. I. (2004). "Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy." Biochemistry (Mosc). **69**(11): 1226-32.
- Shimomura O, J. F., Saiga Y. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea." J Cell Comp Physiol. **59**: J Cell Comp Physiol. 1962 Jun;59:223-39.
- Shin DM, M. S. (2010). "What the mitochondria see." Mol Cell. **39**(1): 6-7.
- Toyoshima C, N. M., Nomura H, Ogawa H. (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution." Nature. **405**(6787): 647-55.
- Trenker M, M. R., Fertschai I, Levak-Frank S, Graier WF. (2007). "Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport." Nat Cell Biol. **9**(4): 445-52.

- Várnai P, B. A., Hunyady L, Balla T. (2005). "Targeted expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) ligand-binding domain releases Ca²⁺ via endogenous IP3R channels." Proc Natl Acad Sci U S A. **102**(22): 7859-64. .
- Waldeck-Weiermair M, D. X., Naghdi S, Khan MJ, Trenker M, Malli R, Graier WF. (2010b). "Uncoupling protein 3 adjusts mitochondrial Ca(2+) uptake to high and low Ca(2+) signals." Cell Calcium. **48**(5): 288-301.
- Waldeck-Weiermair M, J.-Q. C., Rost R, Khan MJ, Vishnu N, Bondarenko AI, Imamura H, Malli R, Graier WF. (2011a). "Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial Ca²⁺ uptake pathways." J Biol Chem. **286**(32): 28444-55.
- Waldeck-Weiermair M, M. R., Naghdi S, Trenker M, Kahn MJ, Graier WF. (2010a). "The contribution of UCP2 and UCP3 to mitochondrial Ca(2+) uptake is differentially determined by the source of supplied Ca(2+)." Cell Calcium. **47**(5): 433-40.