



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**DPTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)**

TESIS DOCTORAL:

**NEW APPROACHES TO THE STUDY OF
MITOCHONDRIAL Ca²⁺ DYNAMICS**

Presentada por D. **SERGIO DE LA FUENTE PÉREZ** para optar al
grado de doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. María Teresa Montero Zoccola

Dr. Javier Álvarez Martín

Dra. Rosalba Inés Fonteriz García

**A mi madre y a mi padre,
a mis hermanos
y a Diana.**

*“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños”
Eleanor Roosevelt*

AGRADECIMIENTOS

Como dijo Francisco de Quevedo: “El agradecimiento es la parte principal de un hombre de bien”, así que me gustaría dedicar unas líneas de esta tesis a todas aquellas personas que, de una u otra manera me han acompañado en este largo y maravilloso viaje (siento si olvido mencionar a alguno, gracias a ellos también).

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis Mayte, Javier y Rosalba. No solo por haberme transmitido tantos conocimientos científicos sino también el buen hacer dentro de un laboratorio. También agradecerles de todo corazón su esfuerzo, paciencia, dedicación y confianza depositada en mí desde el primer día en este excelente grupo. Gracias también a M^a Carmen y a Alfredo por toda su ayuda y apoyo durante estos años.

Gracias a mis amigos/as y compañeros/as de laboratorio con quienes tantos y tan buenos momentos he compartido a lo largo de todos estos años. Agradecimientos que van dirigidos a los más veteranos: Teresa, Pilar, Pablo y Ana; a las más novatas: Inés, Jessica M. y Jessica A.; y a todos aquellos que durante más o menos tiempo han compartido horas de facultad conmigo: Enrique, Laura, Jesús, Dani, Sara, Paco, Josefina y tantos otros...

Gracias al Dr. Pedro J. de la Cruz porque sin él nada de esto hubiera sido posible. Toda mi vocación científica e investigadora, así como mi admiración por la naturaleza y las ciencias biológicas, parten de un primer paso dado junto a este mentor inigualable.

Gracias a los Dres. Jaime Santo Domingo y Sonia Mediavilla por su gran amistad y por todos los buenos consejos que he tenido el placer de recibir de ellos durante toda mi carrera científica.

Gracias a Curro por estar siempre ahí, en todo momento. Gracias también al resto de amigos de la “oficina” por tan estupenda compañía semana tras semana. A los amigos de toda la vida y a los de la carrera (Patricia, Rut, Esther, Sara, Laura, Escusol, etc...) por seguir a mi lado a pesar de la distancia y el tiempo.

Gracias a mi madre, a mi padre y a mis hermanos, porque a ellos les debo todo lo que soy. Gracias por su confianza infinita, por su apoyo en todos y cada uno de los momentos de mi vida, por ayudarme y darme todo su cariño una y otra vez sin dudarlo un solo instante.

Y por último gracias a Diana por conseguir que este maravilloso sueño esté completo. Gracias por estar a mi lado siempre, en los buenos momentos pero sobre todo en los malos. Gracias por confiar en mí y por demostrarme que la perseverancia, y luchar por lo que más queremos nos conduce a que los sueños más hermosos se hagan realidad.

Gracias a todos.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

Una parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en las siguientes revistas:

- **Sergio De la Fuente;** Rosalba I Fonteriz; Pedro J De la Cruz; Mayte Montero; Javier Álvarez. Mitochondrial free $[Ca^{2+}]$ dynamics measured with a novel low- Ca^{2+} affinity aequorin probe. *Bichem J. Acta.* 445, pp. 371 - 376. 01/08/2012.
- **Sergio De la Fuente;** Rosalba I Fonteriz; Mayte Montero; Javier Álvarez. Dynamics of mitochondrial $[Ca^{2+}]$ measured with the low- Ca^{2+} -affinity dye rhod-5N. *Cell Calcium.* 51, pp. 65 - 71. 30/11/2011.
- Rosalba I Fonteriz; **Sergio De la Fuente;** Alfredo Moreno; Carmen Domínguez Lobaton; Mayte Montero; Javier Álvarez. Monitoring mitochondrial $[Ca^{2+}]$ dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium.* 48, pp. 61 - 69. 27/07/2010.
- **Sergio De la Fuente;** Pablo Montenegro; Rosalba I Fonteriz; Alfredo Moreno; Carmen Domínguez Lobaton; Mayte Montero; Javier Álvarez. The dynamics of mitochondrial Ca^{2+} fluxes. *Biochem Biophys Acta.* 1797, pp.1727 - 1735. 25/06/2010.

Todos ellos se adjuntan en el apartado de apéndices.

Así mismo, se han presentado diversas comunicaciones en los siguientes congresos:

- **Título:** Mitochondrial free $[Ca^{2+}]$ dynamics measured with a novel low- Ca^{2+} affinity aequorin probe. Sergio de la Fuente; Rosalba Inés Fonteriz; Pedro José de la Cruz; Mayte Montero; Javier Álvarez.

Nombre del congreso: XII Congreso de la Sociedad de Biofísica de España.

Tipo evento: Congreso **Ámbito del congreso:** Internacional no UE

Tipo de participación: Póster

Ciudad de realización: Barcelona, Cataluña, España

Fecha de realización: 03/07/2012

- **Título:** Dinámica de Ca^{2+} mitocondrial en el rango milimolar medida con rhod-5N. Sergio de la Fuente; Rosalba Inés Fonteriz; Mayte Montero; Javier Álvarez.

Nombre del congreso: XI Congreso de la Sociedad de Biofísica de España.

Tipo evento: Congreso **Ámbito del congreso:** Nacional

Tipo de participación: Póster

Ciudad de realización: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha de realización: 01/06/2011

- **Título:** Monitoring mitochondrial $[Ca^{2+}]$ dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. Rosalba Inés Fonteriz; Sergio de la Fuente; Alfredo Moreno; Carmen Domínguez; Mayte Montero; Javier Álvarez.

Nombre del congreso: 16th European Bioenergetics Conference

Tipo evento: Congreso **Ámbito del congreso:** Unión Europea

Tipo de participación: Póster

Ciudad de realización: Varsovia, Polonia

Fecha de realización: 17/07/2010

- **Título:** The dynamics of mitochondrial Ca^{2+} fluxes. Sergio de la Fuente; Pablo Montenegro; Rosalba Inés Fonteriz; Alfredo Moreno; Carmen Domínguez; Mayte Montero; Javier Álvarez.

Nombre del congreso: 16th European Bioenergetics Conference

Tipo evento: Congreso **Ámbito del congreso:** Unión Europea

Tipo de participación: Póster

Ciudad de realización: Varsovia, Polonia

Fecha de realización: 17/07/2010

INDEX

ABBREVIATIONS

FIGURES INDEX

<u>SUMMARY</u>	1
<u>INTRODUCTION</u>	7
I. THE Ca²⁺ AS SECOND MESSENGER	9
1. CELLULAR FUNCTIONS REGULATED BY Ca²⁺	9
2. Ca²⁺ SIGNALING PROPERTIES	13
3. CELLULAR Ca²⁺ BUFFERS	14
4. CYTOSOLIC Ca²⁺ CONCENTRATION INCREASE	16
4.1. Ca²⁺ entry from extracellular medium	16
4.1a Voltage operated channels	17
4.1b Receptor operated channels	19
4.1c Second messenger operated channels	20
4.1d Store operated channels	21
4.1e Trp channels	23
4.2. Ca²⁺ release from intracellular stores	24
4.2a Inositol trisphosphate receptors	25
4.2b Ryanodine Receptors	26
4.3. Ca²⁺ microdomains	28
5. RECOVERY OF THE CYTOSOLIC Ca²⁺ RESTING LEVELS	29
5.1. Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase	29
5.2. Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase	30
5.3. Secretory pathway Ca ²⁺ ATPase	31
5.4. Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger	32
II. THE MITOCHONDRIA AS ESSENTIAL PART OF THE CELL	34
1. MITOCHONDRIAL STRUCTURE	34
2. MITOCHONDRIAL FUNCTIONS	37
2.1. ATP production	37
2.2. Thermogenesis	38
2.3. Reactive oxygen species control	38

2.4.	Subcellular Ca²⁺ homeostasis	38
2.4a	Mitochondrial Ca ²⁺ entry	40
	• Mitochondrial Ca ²⁺ uniporter	40
2.4b	Mitochondrial Ca ²⁺ release	43
	▪ Na ⁺ /Ca ²⁺ /Li ⁺ exchanger	43
	▪ Ca ²⁺ /H ⁺ exchanger	44
2.5.	Apoptosis and PTP	46
III.	INTRACELLULAR Ca²⁺ STUDY TECHNIQUES	48

AIMS **51**

MATERIALS AND METHODS **55**

I.	CELL CULTURE	57
1.	Cell lines	57
2.	HeLa cells maintenance	57
3.	Cell seeding	58
4.	Transfections	59
II.	MEDIUMS, SOLUTIONS AND COMPOUNDS	60
1.	Mediums and solutions	60
2.	Compounds	63
III.	MOLECULAR BIOLOGY	64
1.	Plasmids and vectors	64
2.	Transformations, amplifications and DNA extractions	65
3.	Directed mutagenesis	66
IV.	FLUORESCENCE MICROSCOPY AND IMAGING SYSTEM	68
1.	Measurements with rhod derived Ca ²⁺ -sensitive dyes	69
2.	Measurements with the Ca ²⁺ -sensitive targeted protein ratiometric pericam	72
3.	Mitochondrial Membrane potential measurements with TMRE dye	73
4.	Confocal studies	74
V.	Ca²⁺ MEASUREMENTS WITH THE PHOTOPROTEIN AEQUORIN.	75
1.	The probe	75
2.	Equipment	78
3.	Calibration	81
4.	Transformation from luminescence data to Ca ²⁺ concentration	82
5.	Experimental procedure	83
6.	Statistical analysis	84
VI.	MATERIALS	84

<u>RESULTS</u>	85
I. COMPARISON AND CONFIRMATION OF SEVERAL MITOCHONDRIAL Ca^{2+} MEASURING METHODS	87
II. RHOD-5N CALIBRATION	102
III. OBTAINMENT AND CALIBRATION OF NEW TARGETED AEQUORINS	105
IV. MITOCHONDRIAL Ca^{2+} INFLUX AND EFFLUX MEASURED WITH AEQUORIN	109
V. MITOCHONDRIAL Ca^{2+} INFLUX AND EFFLUX MEASURED WITH RHOD-5N	122
VI. PHOSPHATE EFFECT ON THE MITOCHONDRIAL Ca^{2+} LEVEL	125
VII. EFFECT OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE DEPolarIZATION ON MITOCHONDRIAL Ca^{2+} DYNAMICS	129
VIII. Ca^{2+} -DEPENDENCE OF PTP OPENING	132
IX. Ca^{2+} DYNAMICS IN INTACT CELLS UNDER VARIOUS STIMULI	134
X. MITOCHONDRIAL Ca^{2+} MEASUREMENT AT SUBCELLULAR LEVEL	141
XI. EFFECT OF SILENCING THE MITOCHONDRIAL Ca^{2+} UNIPORTER	143
<u>DISCUSSION</u>	145
<u>CONCLUSIONS</u>	159
<u>REFERENCES</u>	163
<u>APPENDIX</u>	185

ABBREVIATIONS

[Ca²⁺]:	Ca ²⁺ concentration.
[Ca²⁺]_C:	Cytosolic Ca ²⁺ concentration.
[Ca²⁺]_M:	Mitochondrial Ca ²⁺ concentration.
[Ca²⁺]_{RE}:	Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ concentration.
2-APB:	2-Aminoethoxydiphenyl borate.
AEQ wt:	Native aequorin.
ANT:	Adenine Nucleotide Translocator.
APC:	Anaphase-Promoting Complex.
ATP:	Adenosine Triphosphate.
BHQ:	Butyl benzohydroquinone.
BSA:	Bovine Serum Albumine.
BRET:	Bioluminescence Resonance Energy Transfer.
CaM:	Calmodulin.
CaMKI:	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase I.
CaMKII:	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II.
CaMKIV:	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase IV.
cAMP:	Cyclic Adenosine Monophosphate.
Caps:	Capsaicine.
Celent:	Coelenterazine.
CICR:	Calcium Induced-Calcium Release.
CytAEQ:	Native aequorin targeted to cytosol.
CNGC:	Cyclic Nucleotide Gated Channel.
CpYFP:	Circularly permuted Yellow Fluorescent Protein.
CRAC:	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺ current.
CREB:	cAMP-Response-Element Binding Protein.
DAG:	Diacylglycerol.
DHPR:	Dihydropyridine Receptor.
Dig:	Digitonin.
DMEM:	Dubelcco's Modified Eagle's Medium.
DNA:	Deoxyribonucleic acid.
DREAM:	Downstream Regulator Element Antagonist Modulator.
Drp1:	Dinamyn-related protein.
EGFP:	Enhanced Green Fluorescence Protein.
EGTA:	Ethylene Glycol Tetraacetic acid.
FADH₂:	Flavin Adenine Dinucleotide.
FBS:	Fetal Bovine Serum.
FCCP:	Carbonyl cyanide trifluoromethoxy phenylhydrazone.
FRET:	Föster Resonance Energy Transfer.
GECI:	Genetic Encoded Ca ²⁺ Indicator.
GFP:	Green Fluorescence Protein.
HEDTA:	Hydroxyethylethylenediamine triacetic acid.
HEPES:	Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic acid.
His:	Histamine.

IP₃:	Inositol trisphosphate.
IP₃R:	Inositol trisphosphate Receptor.
LAMitAEQ:	Double-mutated aequorin targeted to mitochondria.
MAMs:	Mitochondria-Associated Membranes.
MCU:	Mitochondrial Ca ²⁺ uniporter.
MitEGFP:	Enhanced Green Fluorescence Protein targeted to mitochondria.
MitmutAEQ:	Mutated aequorin targeted to mitochondria.
MitRP:	Ratiometric Pericam targeted to mitochondria.
mutAEQ:	Mutated aequorin.
nAChR:	Nicotinic Acetylcholine Receptor.
NADH:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide.
NCLX:	Na ⁺ /Ca ²⁺ /Li ⁺ mitochondrial exchanger.
NCX:	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger.
NFAT:	Nuclear Factor of Activated T-cells.
NMDA:	N-methyl-D-aspartate.
NMDAR:	N-methyl-D-aspartate Receptor.
PBS:	Phosphate Buffered Saline System.
PDHK:	Pyruvate dehydrogenase kinase.
PDHP:	Pyruvate dehydrogenase Phosphatase.
PHD:	Pyruvate dehydrogenase.
Pi:	Inorganic Phosphate.
PKA:	Protein kinase A.
PKC:	Protein kinase C.
PLC:	Phospholipase C.
PMCA:	Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase.
PTP:	Permeability Transition Pore.
RaM:	Rapid Mode uptake.
RE:	Endoplasmic Reticulum.
RNA:	Ribonucleic acid.
ROC:	Receptor Operated Channel.
ROS:	Reactive Oxygen Species.
RS:	Sarcoplasmic Reticulum.
RyR:	Ryanodine Receptor.
SERCA:	Sarco(endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase.
siRNA:	Small interfering RNA.
SMOC:	Second Messenger Operated Channel.
SNARE:	Soluble NSF Attachment protein Receptor.
SOC:	Store Operated Channel.
SOCE:	Store operated Calcium entry.
SPCA:	Secretory Pathway Ca ²⁺ ATPase.
TMRE:	Tetramethylrhodamine Ethyl Ester.
TNF:	Tumor necrosis factors.
TRP:	Transient Receptor Potential.
UcPs:	Uncoupling Proteins.
VDAC:	Voltage Dependent Anion Channel.
VOC:	Voltage Operated Channel.

FIGURES INDEX

INTRODUCTION

Figure 1: Three-dimensional structure of calmodulin.	16
Figure 2: General structure of Voltage operated channels.	18
Figure 3: Three-dimensional structure of nicotinic acetylcholine receptor.	20
Figure 4: Operating mechanism of Orai1 y STIM1.	22
Figure 5: Diagram and three-dimensional structure of TRPV1 channel.	24
Figure 6: Three-dimensional structure of IP ₃ and ryanodine receptors.	27
Figure 7: Three-dimensional structure of endoplasmic reticulum ATPase.	31
Figure 8: Diagram of the major systems involved in the Ca ²⁺ transport.	33
Figure 9: Examples of mitochondrial mobility.	35
Figure 10: Images of contacts between endoplasmic reticulum and mitochondria.	36
Figure 11: Three-dimensional structure of mitochondrial Ca ²⁺ uniporter.	42
Figure 12: Diagram of mitochondrial Ca ²⁺ transporter.	45
Figure 13: Function diagram of Ca ²⁺ -sensitive fluorescence proteins.	49
Figure 14: Function diagram of Ca ²⁺ -sensitive bioluminescence proteins.	50

MATERIALS AND METHODS

Figure 15: PcDNA 3.1 vector diagram.	64
Figure 16: Diagram of the inserts used as Ca ²⁺ -sensitive proteins.	65
Figure 17: Image of the perfusion chamber fluorescence microscope.	68
Figure 18: Molecular structures of the dyes derived from rhod.	70
Figure 19: Spectra of dyes derived from rhod.	70
Figure 20: Spectra of ratiometric pericam.	72
Figure 21: Molecular structure of TMRE.	73
Figure 22: Three-dimensional structure of aequorin and coelenterazine cofactor.	75
Figure 23: Representation of aequorin reaction.	76
Figure 24: Diagram of the measuring aequorin equipment.	80

RESULTS

I. COMPARISON AND CONFIRMATION OF SEVERAL MITOCHONDRIAL Ca²⁺ MEASURING METHODS

Figure 25: Intact cells response to histamine measure with rhod-2.	88
Figure 26: Intact cells response to histamine measure with pericam.	89

Figure 27: Intact cells response to histamine measured with aequorin.	90
Figure 28: Comparison between 1st and 2nd histamine peak measured with aequorin.	90
Figure 29: $[Ca^{2+}]_M$ increase measured with rhod-2 and rhod-FF.	92
Figure 30: $[Ca^{2+}]_M$ increase measured with pericam.	92
Figure 31: $[Ca^{2+}]_M$ increase measured with aequorin.	93
Figure 32: $[Ca^{2+}]_M$ increase measured with aequorin at 22°C and 37°C.	95
Figure 33: $[Ca^{2+}]_M$ increase measured with aequorin under FCCP effect.	95
Figure 34: $[Ca^{2+}]_M$ increase measured with pericam under FCCP effect.	96
Figure 35: Effects of rhod-2 loading on mitochondrial morphology.	97
Figure 36: $[Ca^{2+}]_C$ increases under histamine stimulus in cells loaded with rhod-2 or rhod-FF	98
Figure 37: Bar chart with $[Ca^{2+}]_C$ maximum levels in different loading conditions with rhod-2.	99
Figure 38: $[Ca^{2+}]_M$ increases under histamine stimulus in cells loaded with rhod-2 or rhod-FF.	100
Figure 39: Bar chart with the $[Ca^{2+}]_M$ maximum levels in different rhod-2 loading conditions	100
Figure 40: Effect of rhod-2 loading on the membrane potential	101
II. RHOD-5N CALIBRATION	
Figure 41: Intracellular calibration of rhod-5N.	103
Figure 42: Calibration curve of rhod-5N.	104
III. OBTAINMENT AND CALIBRATION OF NEW TARGETED AEQUORINS	
Figure 43: Agarose gel with the fragments of the new mutated aequorin.	106
Figure 44: Calibration curves of different aequorins.	108
IV. MITOCHONDRIAL Ca^{2+} INFLUX AND EFFLUX MEASURED WITH AEQUORIN	
Figure 45: Kinetics of mitochondrial Ca^{2+} release at different $[Na^+]$, 37°C.	110
Figure 46: Dependence of the rate of Ca^{2+} release on the $[Ca^{2+}]_M$, 37°C.	111
Figure 47: Kinetics of mitochondrial Ca^{2+} release at different $[Na^+]$, 22°C.	112
Figure 48: Dependence of the rate of Ca^{2+} release on the $[Ca^{2+}]_M$, 22°C.	112
Figure 49: Kinetics of mitochondrial Ca^{2+} uptake at different $[Ca^{2+}]_C$ and $[Na^+]$, 37°C.	113
Figure 50: Dependence of the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ increase rate on $[Ca^{2+}]_M$, 37°C.	115
Figure 51: Calculation of unidirectional Ca^{2+} influx rates.	117
Figure 52: Effect of $[Na^+]$ on mitochondrial $[Ca^{2+}]$ increase, 37°C.	119
Figure 53: Kinetics of mitochondrial Ca^{2+} uptake at different $[Ca^{2+}]_C$ and $[Na^+]$, 22°C.	119
Figure 54: Dependence of the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ increase rate on $[Ca^{2+}]_M$, 22°C.	121

V. MITOCHONDRIAL Ca^{2+} INFLUX AND EFFLUX MEASURED WITH RHOD-5N	
Figure 55: Rhod-5N fluorescence increase under perfusion of different $[\text{Ca}^{2+}]$ buffers.	123
Figure 56: Transformation from rhod-2 fluorescence data to Ca^{2+} concentration.	123
Figure 57: Rhod-5N fluorescence increase and its transformation to $[\text{Ca}^{2+}]_M$ under perfusion of different $[\text{Ca}^{2+}]$ buffers.	124
Figure 58: Kinetics of mitochondrial Ca^{2+} release at different $[\text{Na}^+]$, measured with rhod-5N.	124
VI. PHOSPHATE EFFECT ON THE MITOCHONDRIAL Ca^{2+} LEVEL	
Figure 59: Effect of perfusion of $[\text{Ca}^{2+}]$ buffers on $[\text{Ca}^{2+}]_M$ in presence of different phosphate concentrations.	126
Figure 60: Effect of different $[\text{Na}^+]$ and phosphate concentrations on $[\text{Ca}^{2+}]_M$ dynamics.	127
Figure 61: Effect of the inhibitor CGP37157 on $[\text{Ca}^{2+}]_M$.	128
VII. EFFECT OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE DEPolarIZATION ON MITOCHONDRIAL Ca^{2+} DYNAMICS	
Figure 62: Effect of FCCP on the steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_M$ measured with aequorin.	130
Figure 63: Effect of FCCP on the steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_M$ measured with rhod-5N.	131
VIII. Ca^{2+}-DEPENDENCE OF PTP OPENING	
Figure 64: Long lasting $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase.	133
Figure 65: Long lasting $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase with H_2O_2 .	133
IX. Ca^{2+} DYNAMICS IN INTACT CELLS UNDER VARIOUS STIMULI	
Figure 66: $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase under histamine stimulus, measured with aequorin.	134
Figure 67: Rhod-5N fluorescence increase and its transformation to $[\text{Ca}^{2+}]_M$ under histamine stimulus	135
Figure 68: $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase under histamine stimulus, measured with rhod-5N.	136
Figure 69: $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase under histamine stimulus in the presence of kaempferol, measured with rhod-5N and aequorin.	137
Figure 70: Parallel measurement of cytosolic and mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ peaks in single cells.	139
Figure 71: Cytosolic and mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ peaks in cells with the TRPV1 channel, under capsaicine stimulus.	140
X. MITOCHONDRIAL Ca^{2+} MEASUREMENT AT SUBCELLULAR LEVEL	
Figure 72: $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase at subcellular level, measured with rhod-5N.	142
XI. EFFECT OF SILENCING THE MITOCHONDRIAL Ca^{2+} UNIporter	
Figure 73: Effect of silencing of the MCU on mitochondrial Ca^{2+} entry.	144



SUMMARY

Several cellular processes are controlled by intracellular Ca^{2+} signals, from development and differentiation to cell death. Mitochondria play a key role in the modulation of all of these Ca^{2+} signals. The most important methods available to monitor $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ are the fluorescent dyes such as rhod-2 and specifically targeted proteins such as aequorin and pericam. However, significant discrepancies, both quantitative and qualitative, exist in the literature between the results obtained with these different methods.

In this study we have made a systematic comparison among the dynamic Ca^{2+} measurements obtained using either the fluorescent dyes rhod-2 and rhod-FF, or the Ca^{2+} -sensitive proteins aequorin and pericam. Moreover, we have tuned up new methods in order to measure more suitably the dynamics of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$. We have used the very low Ca^{2+} -affinity fluorescent dye rhod-5N and we have developed a new double-mutated aequorin form also with very low affinity for Ca^{2+} . Thanks to this variety of methods, we have been able to study in detail the dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ in HeLa cells, both intact and permeabilized. These studies have been focused in the mitochondrial Ca^{2+} entry and release, the effect of phosphate in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ dynamics and the HeLa cells response to different agonists, both in cellular population, at the single cell level and at the subcellular level.

Regarding to the comparative study between different $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ measuring methods, our results show that the measurements obtained using aequorin or pericam are consistent each other in terms of $[\text{Ca}^{2+}]$ dynamics. However the fluorescent dyes were not able to respond correctly to the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ changes, particularly during repetitive stimulations. The reason for this behavior is not clear. The loading with these dyes causes mitochondrial morphology changes and mitochondrial membrane depolarization. These changes were small and reversible at low loading concentrations (1-2 μM), but they produced large and prolonged damage at higher concentrations. Our results suggest that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ data obtained with these dyes should be taken with care.

As previously reported, available methods to measure $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ include fluorescent dyes and targeted proteins. Targeted proteins usually report much higher $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ values than fluorescent dyes, up to two orders of magnitude. In this study we show that the very low Ca^{2+} affinity dye rhod-5N provides similar $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ values to those reported by targeted aequorin, suggesting that the discrepancies between the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ values are mainly due to the higher Ca^{2+} affinity of the fluorescent dyes used.

SUMMARY

Rhod-5N has an *in situ* intramitochondrial K_d around 0,5mM. Addition of Ca^{2+} buffers containing between 4,5 and 10 μ M to permeabilized cells loaded with rhod-5N induced increases in calibrated $[Ca^{2+}]_M$ up to the 100 μ M-1mM range, the same values previously reported by aequorin. Then, we have also used this dye in order to measure the HeLa cells $[Ca^{2+}]_M$ response to agonist stimulation, both at the single cell and the subcellular level. Addition of the agonist histamine induced $[Ca^{2+}]_M$ increments very different in different cells, with peak $[Ca^{2+}]_M$ values ranging from 10 to 100 μ M, although the mean was about 25 μ M, quite similar to that obtained with aequorin. Simultaneous measurement of cytosolic and mitochondrial peaks did not show a clear correlation among the heights of the peaks in both compartments, perhaps because of the single cell variability and the presence of additional factors influencing ER-mitochondria signaling. The subcellular study also showed significant heterogeneities among different regions in the same cell. The $[Ca^{2+}]_M$ increase was higher in those mitochondria close to the nucleus, which showed agonist-induced $[Ca^{2+}]_M$ increases about 2-fold higher than those far from the nucleus.

We have also investigated the kinetics of mitochondrial Ca^{2+} entry and release and their dependence on cytosolic $[Ca^{2+}]$ and $[Na^+]$. The rate of Ca^{2+} release from mitochondria increased linearly with $[Ca^{2+}]_M$ while Na^+ -dependent Ca^{2+} release was predominant at low $[Ca^{2+}]_M$ but became saturated at $[Ca^{2+}]_M$ around 400 μ M. Na^+ -independent Ca^{2+} release was very slow at $[Ca^{2+}]_M$ below 200 μ M, and then increased at higher $[Ca^{2+}]_M$, perhaps through the opening of a new pathway. Similar results were obtained by using the low Ca^{2+} -affinity dye rhod-5N. Half-maximal activation of Na^+ -dependent Ca^{2+} release occurred at 5-10mM $[Na^+]$, within the physiological range of cytosolic $[Na^+]$. Ca^{2+} entry rates were comparable in size to Ca^{2+} exit rates at $[Ca^{2+}]_C$ below 7 μ M, but the rate of uptake was largely increased at higher $[Ca^{2+}]_C$. As a consequence, the presence of $[Na^+]$ could be very important in the modulation of mitochondrial Ca^{2+} entry at $[Ca^{2+}]_C$ below 7 μ M, therefore under most physiological conditions. Regarding the effect of temperature, exit rates were more dependent on the temperature than uptake rates, thus making the $[Ca^{2+}]_M$ transients to be much more prolonged at lower temperature.

The development of a new double-mutated mitochondrially targeted aequorin has allowed us measuring $[Ca^{2+}]_M$ in the millimolar range for long periods of time without problems derived from aequorin consumption along the experiment. Thanks to this new aequorin type we have observed that addition of Ca^{2+} buffers to permeabilized HeLa cells induced $[Ca^{2+}]_M$ increments up to 3mM in the absence of phosphate. In the

presence of phosphate, these levels only reached 0,5-1mM suggesting that the calcium phosphate precipitates formation only occurs when the free $[Ca^{2+}]$ inside the mitochondria reaches these values. Mitochondrial pH acidification partially re-dissolved these precipitates. Moreover, these millimolar $[Ca^{2+}]_M$ levels were stable for long periods of time, without signs of mitochondrial permeability transition pore opening.



INTRODUCCIÓN

I. EL CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO

El Ca^{2+} es una de las moléculas de señalización celular más ampliamente distribuidas por el cuerpo humano y está implicado en la regulación de múltiples funciones celulares, desde la regulación del ciclo celular hasta la apoptosis, pasando por procesos tan variados como la neurotransmisión o la exocitosis (Berridge et al., 2003). Así mismo, se han descrito alteraciones en la señalización por Ca^{2+} que podrían estar en el origen de numerosas enfermedades, entre ellas, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, enfermedades cardíacas y otras (Berridge, 2012).

1. FUNCIONES CELULARES REGULADAS POR Ca^{2+}

Como se ha descrito anteriormente, el Ca^{2+} está implicado en infinidad de funciones celulares y su papel como segundo mensajero es de vital importancia. La variación de su concentración en los diferentes compartimentos celulares, principalmente el aumento en la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) presente en el citosol, es la señal que va a activar o regular los diferentes mecanismos biológicos. A continuación se detalla el papel del Ca^{2+} en algunas de estas funciones.

Durante la fertilización de los huevos de *Xenopus*, la polispermia es evitada mediante dos mecanismos diferentes mediados por Ca^{2+} , uno de ellos rápido y el otro lento, permitiendo que un solo espermatozoide se fusione con el óvulo (Nader et al., 2013). En el punto exacto en el que se realiza la fusión entre el espermatozoide y el óvulo se produce un rápido incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólica. Este incremento se propaga a lo largo de todo el oocito, lo que provoca la apertura de canales de Cl^- y la inmediata despolarización de la membrana gracias a la salida de los iones Cl^- . Esta despolarización representa el bloqueo rápido y la primera barrera frente a la polispermia. Sin embargo, el cambio de potencial es transitorio y se necesita un segundo bloqueo más duradero que el anterior. El primer incremento en la concentración de Ca^{2+} , no solo provoca la despolarización de la célula, sino que también activa la fusión de gránulos corticales con la membrana plasmática. Esta fusión permite la liberación de enzimas específicas, glicolíticas y proteolíticas, que modifican la matriz extracelular, convirtiendo ésta en una barrera impermeable al resto de espermatozoides. Al igual que en *Xenopus*, señales de Ca^{2+} han sido descritas en el bloqueo frente a la polispermia en diferentes mamíferos (Jaffe et al., 1983; Grey et al., 1974; Abbott et al., 2001). Otro mecanismo fundamental en el que interviene el

Ca^{2+} durante la fertilización es la salida de la fase MII del ciclo celular y su progresión en la mitosis. Este paso está activado gracias a la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII). La actividad de CaMKII junto con la de la calcineurina causarán en última instancia el inicio de la anafase II a través del APC (Anaphase-Promoting Complex) (Morin et al., 1994).

El Ca^{2+} también participa directa o indirectamente modulando la transcripción del DNA a largo plazo (Barbado et al., 2009). El desarrollo de nuevos métodos de análisis ha proporcionado una extensa lista de genes cuya expresión está modulada por la homeostasis de Ca^{2+} (Feske et al., 2001). El aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólica y nuclear mediado por la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) a través de IP_3 en células musculares esqueléticas, desencadena la fosforilación del factor de transcripción CREB (cAMP-Response-Element Binding protein) que regula la expresión de numerosos genes (Powell et al., 2001). Del mismo modo, el factor de transcripción NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) es desfosforilado gracias a la calcineurina, una fosfatasa activada por Ca^{2+} (Oh-Hora & Rao, 2008). También se ha descrito la participación de proteína-quinasas dependientes de calmodulina (CaMKI, CaMKII o CaMKIV) en la fosforilación y activación del factor de transcripción CREB (Yokokura et al., 1997). Por último, la apertura de canales de calcio operados por voltaje (VOCs) desencadena la liberación de DREAM (Downstream Regulator Element Antagonist Modulator) de la doble cadena de DNA permitiendo así la transcripción de diversos genes. Cabe mencionar que la actividad de canales de Ca^{2+} también ha sido relacionada con otros reguladores de la transcripción como MEF2, SRF o NF κ B (Greer et al., 2008; Mao et al., 1999; Misra et al., 1994).

La información transmitida de una neurona a otra mediante sinapsis no puede ser de naturaleza eléctrica, ya que la discontinuidad entre las membranas de dos neuronas contiguas impide la transmisión del estímulo despolarizante. Debido a ello, es necesaria la existencia de una señal química que proporcione continuidad a este estímulo despolarizante. En el terminal presináptico es donde el Ca^{2+} juega un papel fundamental. La llegada del potencial de acción provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje y una entrada desde el medio extracelular de grandes cantidades de Ca^{2+} hacia el citosol. Esta entrada se produce en milisegundos y los microdominios de Ca^{2+} generados pueden llegar incluso a $300\mu\text{M}$, aunque concentraciones de $25\mu\text{M}$ son suficientes para transducir la señal (Schneppenburger & Neher, 2005). Las vesículas de secreción que contienen los neurotransmisores poseen

una proteína sensora de Ca^{2+} llamada sinaptotagmina. Esta proteína posee cinco dominios de unión a Ca^{2+} , así como un dominio de unión al complejo SNARE (Soluble NSF Attachment protein Receptor). La sinaptotagmina sin calcio unido estabiliza el complejo SNARE que mantiene a las vesículas de secreción en un punto intermedio de fusión. La rápida entrada de Ca^{2+} y su unión a la sinaptotagmina desestabiliza el complejo SNARE, permitiendo la completa apertura del poro de fusión (Sudhof, 2004). Todo el proceso tiene que estar meticulosamente regulado espacial y temporalmente y algunos estudios sugieren que proteínas endógenas amortiguadoras de Ca^{2+} como la calbindina pueden estar participando activamente en este proceso (Burnashev & Rozov, 2005).

La contracción muscular se inicia en una unión neuromuscular especializada en la que el potencial de acción libera un neurotransmisor, en concreto, la acetilcolina. Este neurotransmisor se unirá a los receptores nicotínicos de acetilcolina de la membrana plasmática para permitir la activación de los canales de Na^+ musculares (SCN4A). Estos canales generarán un potencial de acción que se propagará a través del sarcolema y de toda la fibra muscular (Patton, 2003). La transducción de este potencial de acción en una señal de Ca^{2+} intracelular se lleva a cabo en los lugares de unión entre los túbulos transversales (túbulos-T) y el retículo sarcoplásmico. El potencial de acción provoca un cambio conformacional en los receptores de dihidropiridinas operados por voltaje (DHPR). La estrecha relación entre estos receptores situados en los túbulos-T y el receptor de rianodina localizado en la membrana del retículo sarcoplásmico, permite una liberación de Ca^{2+} desde los depósitos y un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólica (Flucher et al., 2005). La liberación de Ca^{2+} a través del receptor de rianodina tiene que ser cuidadosamente regulada para que la contracción muscular sea la adecuada. Con este propósito, proteínas como la S100A1 permanecen unidas al receptor como moduladores (Volkers et al., 2010). El Ca^{2+} liberado se une a la subunidad reguladora NC de la troponina, ésta a su vez libera la subunidad inhibidora NI permitiendo que la tercera y última subunidad de la troponina mueva ligeramente la tropomiosina, dejando al descubierto los sitios de unión de la miosina a la actina, causando en última instancia la contracción de la fibra muscular (Smith et al., 2013).

La apoptosis es un proceso altamente regulado mediante el cual se produce una muerte celular individual en favor del organismo entero. Se considera una muerte programada caracterizada por procesos muy concretos como la reducción del tamaño celular, la condensación de la cromatina y la degradación del DNA (Nagata, 1997). La

apoptosis es esencial para la homeostasis y para mantener bajo control el número total de células en un organismo, pero su activación incorrecta conduce a numerosas situaciones patológicas (Thompson, 1995). La apoptosis se puede iniciar mediante un receptor de muerte (vía extrínseca), o mitocondrialmente (vía intrínseca). El Ca^{2+} es una señal pro-apoptótica crítica y se cree que una sobrecarga en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial junto con otros factores como las especies reactivas de oxígeno (ROS) o la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, pueden provocar la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP). La liberación al citosol de otros factores pro-apoptóticos como el citocromo c, la procaspasa-9 o el complejo Smac/DIABLO también están implicados en este proceso (Joza et al., 2001). Los mecanismos exactos y bajo qué circunstancias concretas se produce la formación de este poro son aún desconocidas. Existen una serie de proteínas reguladoras del proceso apoptótico, algunas de ellas lo promueven, como por ejemplo, BAK y BAX, y otras lo inhiben, como Bcl-2 o Bcl-XL. La sobreexpresión de Bcl-2 provoca una disminución en la cantidad de Ca^{2+} acumulado en el retículo endoplásmico por lo que, tras un estímulo, la cantidad de Ca^{2+} liberada será menor, impidiendo la sobrecarga de Ca^{2+} por parte de la mitocondria y reduciendo así la probabilidad de apertura del poro de transición (Pinton et al., 2000).

La célula utiliza el Ca^{2+} para activar numerosos procesos biológicos, y dichos procesos consumen una alta cantidad de energía en forma de ATP, por lo que es lógico pensar que este incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico también es utilizado como regulador de la producción de ATP (Glancy & Balaban, 2012). La mitocondria, a través del uniportador de calcio mitocondrial (MCU), es capaz de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} en su interior, no solo actuando como modulador de la señal de Ca^{2+} citosólico, sino también aprovechando este Ca^{2+} incorporado como regulador de la producción de ATP. La elevada concentración de Ca^{2+} acumulado en relación con el escaso volumen disponible en el interior de la matriz mitocondrial, hace que la señal se propague rápidamente por toda la mitocondria. Se han descrito varias deshidrogenasas cuya actividad está regulada por Ca^{2+} , que estimula así la producción de NADH y por tanto de ATP. La primera de ellas es la piruvato deshidrogenasa (PHD), cuya actividad es regulada mediante la PDHP (piruvato deshidrogenasa fosfatasa) y la PDHK (piruvato deshidrogenasa quinasa). La PDHP se activa cuando aumenta el Ca^{2+} dentro de la mitocondria y entonces defosforila la PDH activándola (Denton et al., 1972). El Ca^{2+} también actúa uniéndose directamente al complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa y a la isocitrato deshidrogenasa favoreciendo la unión de ambas enzimas con sus respectivos

sustratos (Lawlis & Roche, 1981; Denton et al., 1978). Así mismo, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial, muy activa especialmente en fibras musculares y en células β -pancreáticas, también ve incrementada su afinidad por el glicerol-3-fosfato al unir Ca^{2+} a alguno de sus dos dominios EF-hand (MacDonald & Brown, 1996). Para finalizar, el Ca^{2+} no solo modula la actividad de estas deshidrogenasas sino que también puede afectar a la actividad de transportadores mitocondriales, como el intercambiador aspartato/glutamato o el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) (Palmieri et al., 2001).

2. CARACTERÍSTICAS DE LAS SEÑALES DE Ca^{2+}

Las señales de Ca^{2+} son extremadamente versátiles y participan en multitud de procesos biológicos. Estas señales son de muy diversa naturaleza tanto espacial como temporal y requieren de un control muy preciso para que su acción sea la deseada. Las señales de Ca^{2+} pueden durar desde unos pocos milisegundos, en el caso de la exocitosis o la contracción muscular, hasta minutos o incluso horas, en procesos como la fecundación o la modulación de la expresión génica. Para conseguir esta variedad de efectos, cada tipo celular es capaz de expresar una maquinaria en particular, con el fin de que la señal de Ca^{2+} sea la adecuada y atienda a unos fines concretos. En este sentido hay evidencias de que el propio Ca^{2+} podría estar involucrado en la regulación de la expresión génica de componentes que participan en la señal de Ca^{2+} (Deisseroth et al., 1998; Wheeler et al., 2008).

A diferencia de otros segundos mensajeros, el Ca^{2+} no se puede metabolizar, por lo que el principal sistema que controla su actividad es la compartimentalización y la membrana plasmática constituye la primera barrera para la misma. La concentración de Ca^{2+} libre en el medio extracelular está en torno a 1-2mM, mientras que en el citosol se encuentra entre 50 y 200nM en situación de reposo. La concentración Ca^{2+} en el citosol se mantiene en estos niveles gracias a las ATPasas dependientes de Ca^{2+} que son capaces de bombear este ión en contra del gradiente electroquímico, bien hacia el medio extracelular o bien hacia depósitos intracelulares, como el retículo endoplásmico, donde la concentración de Ca^{2+} se sitúa entre 0,5 y 1mM (Montero et al., 1997; Barrero et al., 1997). Estas bombas se encuentran en continuo funcionamiento debido a su escasa regulación, por lo que la célula gasta gran parte del ATP producido en el mantenimiento de este gradiente electroquímico entre el citosol, los depósitos intracelulares y el medio extracelular. Además, en la membrana plasmática de muchos tipos celulares podemos encontrar intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ que colaboran en la salida de Ca^{2+} aprovechando la energía libre generada por el transporte a favor de gradiente de Na^+ o K^+ (Guerini et al., 2005).

Los canales implicados en la señalización por Ca^{2+} son muy numerosos, existen múltiples tipos, su expresión es muy diferente dependiendo del tipo celular, y todos ellos están altamente regulados. Bajo ciertos estímulos fisiológicos, estos canales se activan generando flujos de entrada de Ca^{2+} hacia el citosol muy superiores a la capacidad de los flujos de salida a través de las bombas descritas anteriormente. De esta manera se produce una rápida elevación en la concentración de Ca^{2+} citosólica, debida bien a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular o bien a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, principalmente del retículo endoplásmico (Karlstad et al., 2012). Este incremento está altamente modulado mediante diversos factores entre los que destacan los amortiguadores de Ca^{2+} y las mitocondrias.

Las mitocondrias juegan un papel fundamental como amortiguadores de la señalización por Ca^{2+} , gracias a su capacidad para captar Ca^{2+} citosólico a través del MCU, pudiéndose alcanzar niveles cercanos a 1mM de Ca^{2+} en el interior de la matriz mitocondrial (Montero et al., 2000). Mediante este sistema, la señal citosólica es regulada tanto espacial como temporalmente. Una vez finalizado el estímulo, diversos intercambiadores liberan el Ca^{2+} desde las mitocondrias de nuevo al citosol. Así mismo, el cese de la actividad de los canales y el bombeo del Ca^{2+} citosólico hacia el medio extracelular o hacia los depósitos de Ca^{2+} permiten a la célula volver a su situación de reposo, dejándola dispuesta para responder a nuevos estímulos (Berridge, 1997).

A continuación se describirán en detalle los principales elementos implicados en la señalización de Ca^{2+} .

3. AMORTIGUADORES CELULARES DE Ca^{2+}

Algunas de las primeras proteínas que participan en la regulación espacio-temporal de la señalización de Ca^{2+} son los amortiguadores de Ca^{2+} . El término de amortiguadores de Ca^{2+} se aplica fundamentalmente a una familia de proteínas que contienen motivos "EF-hand" capaces de unir iones Ca^{2+} , incluyendo parvalbúminas, calbindinas y calretinina. La mayoría de las proteínas pertenecientes a esta familia funcionan como sensores de Ca^{2+} , que cambian de conformación al unir Ca^{2+}

actuando como reguladores de dianas específicas. El ejemplo más común de este tipo de proteínas es la calmodulina (CaM) (Chin & Means, 2000). A concentraciones bajas, estos sensores no alteran significativamente la $[Ca^{2+}]$. Sin embargo, a concentraciones suficientemente altas, estos sensores se convierten en amortiguadores de Ca^{2+}

La expresión de estos amortiguadores varía en gran medida dependiendo del tipo celular. La parvalbúmina se expresa a altas concentraciones en células de músculo estriado (alrededor de 1mM) y en niveles mucho más bajos en otras células, como las células cocleares (50-150 μ M) (Heizmann et al., 1982; Hackney et al., 2005). La parvalbúmina es un quelante de baja afinidad y afecta de una manera particular a la cinética del aumento de Ca^{2+} durante los estímulos, ya que apenas tiene efecto sobre incrementos rápidos en la concentración de Ca^{2+} citosólico, pero retrasa significativamente procesos lentos como la salida de Ca^{2+} . La calbindina y la calretinina por el contrario tienen una alta afinidad por Ca^{2+} y su expresión es también muy heterogénea pudiendo variar desde 30 μ M en gránulos del cerebelo hasta 300 μ M en células de Purkinje (Schwaller et al., 2002). Entre las funciones en las que participan estos dos amortiguadores podemos destacar la reabsorción de Ca^{2+} en el hígado, la regulación de la producción de insulina o la neuroprotección (Boros et al., 2009; Sooy et al., 1999).

El retículo endoplásmico, al participar tan activamente en la señalización por Ca^{2+} también posee sus propias proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} , muchas de las cuales actúan como chaperonas, responsables del correcto plegamiento de las proteínas y su transporte a través del retículo endoplásmico (Michalak et al., 2009). La más importante de estas proteínas es la calreticulina, con una $K_d = 2$ mM, que es la responsable de hasta el 50% de la capacidad amortiguadora del retículo endoplásmico (Nakamura et al., 2001). Su presencia es esencial en la liberación de Ca^{2+} por parte del retículo endoplásmico en respuesta a un estímulo (Li et al., 2002). Otras proteínas también juegan un papel importante como amortiguadores de Ca^{2+} , entre las cuales destacan BiP, GRP94, y la calsecuestrina en el caso del retículo sarcoplásmico (Prins & Michalak, 2011; Murphy et al., 2009).

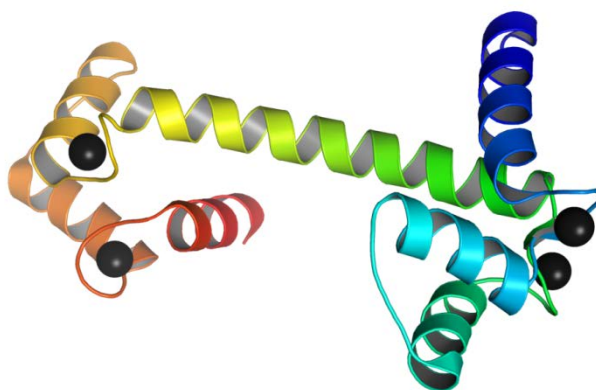


Figura 1: Estructura tridimensional de la calmodulina, con cuatro iones Ca^{2+} ligados (Wikimedia Commons).

4. INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} CITOSÓLICA

Tras determinados estímulos, las células responden aumentando drásticamente la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). Este aumento repentino puede deberse bien a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior de la célula o bien a la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, principalmente del retículo endoplásmico.

4.1. Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular

La entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular está favorecida por una diferencia de concentraciones entre ambos compartimentos de cuatro órdenes de magnitud (en torno a 1mM en el exterior y 100nM en el citosol) y por otra parte por el potencial de membrana, unos 60mV negativos en el interior, generando en su conjunto un importante gradiente electroquímico. A pesar de este gradiente, la membrana plasmática es prácticamente impermeable a Ca^{2+} . La entrada se produce a través de diferentes tipos de canales localizados en la membrana plasmática, y aunque estos canales permanecen abiertos durante espacios de tiempo muy breves, la cantidad de Ca^{2+} que entra a través de ellos es suficiente como para provocar aumentos muy significativos en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica, especialmente en las bocas de los canales, donde se producen microdominios de alto Ca^{2+} (Rizzuto & Pozan, 2006).

El tipo y cantidad de canales de Ca^{2+} va a variar dependiendo del tipo celular y de su estado de desarrollo. Así mismo, no todos los tipos celulares van a expresar todos los tipos de canales. La distribución de estos canales tampoco va a ser homogénea a lo largo de toda la membrana, sino que en ocasiones pueden agruparse

en ciertas zonas favoreciendo la creación de los mencionados microdominios. Estos canales se pueden agrupar en los siguientes tipos: canales operados por voltaje (VOCs), canales operados por receptor (ROCs), canales operados por depósitos intracelulares (SOCs) y canales operados por segundos mensajeros (SMOCs). Mencionamos aparte también la superfamilia de los canales TRP (Transient Receptor Potential) que incluye algunos canales operados por receptor junto con otros tipos de canales que actúan como mecanorreceptores o termosensores.

La selectividad por Ca^{2+} de estos canales es muy variable, desde muy alta en el caso de los VOCs (casi tres órdenes de magnitud a favor de Ca^{2+} en comparación con Na^+) o muy baja en el caso de algunos miembros de la familia TRP.

4.1a. Canales operados por voltaje (VOCs)

Los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (Voltage Operated Channels) actúan como transductores de señales eléctricas, permitiendo la entrada de Ca^{2+} en respuesta a un estímulo despolarizante. Estos canales se encuentran presentes solamente en células excitables, como pueden ser las neuronas (Catterall & Few, 2008), células endocrinas (Yang & Berggren, 2006) o células musculares esqueléticas (Tanabe et al., 1993). En estado de reposo y con la membrana hiperpolarizada, estos canales se encuentran cerrados, pero con la llegada de estímulos despolarizantes se activan permitiendo la entrada de Ca^{2+} y desencadenando procesos como la transmisión sináptica, la secreción de hormonas o la contracción rápida en células musculares. Algunos de estos canales no solo actúan permitiendo la entrada de Ca^{2+} , sino que se pueden acoplar directamente con otras proteínas, como pueden ser el receptor de rianodina (RyR1) o el complejo SNARE.

Los canales operados por voltaje están formados por un complejo multimérico en el que la subunidad α_1 forma el poro en sí mismo, y otras subunidades asociadas (α_2 , β , δ y γ) participan en su regulación funcional o de expresión (Pérez-Reyes et al., 1989; Singer et al., 1991). La combinación entre diferentes variantes de cada una de las subunidades da como resultado una gran variedad de canales. Los canales se clasifican en tres familias diferentes, Ca_v 1, 2 o 3, atendiendo a las propiedades de la subunidad α_1 .

La subfamilia Ca_v1 ($Ca_v1.1$ a $Ca_v1.4$) se expresa principalmente en músculo esquelético, corazón, células endocrinas y neuronas. Estos canales conducen corrientes de Ca^{2+} de tipo L que se caracterizan por activarse a un alto voltaje ($\approx 30mV$), poseer una alta conductancia y una inactivación lenta voltaje-dependiente. Estos canales son inhibidos por agonistas como dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzodiazepinas (Reuter, 1979; Tsien et al., 1988). Además, estas corrientes son susceptibles de ser reguladas mediante fosforilación en muchos tipos celulares.

La subfamilia Ca_v2 ($Ca_v2.1$ a $Ca_v2.3$) se encuentra principalmente en el sistema nervioso, y su función principal es participar en la transmisión sináptica. Estos canales conducen corrientes de tipo N, P/Q o R. Todas ellas requieren una gran despolarización para ser activadas, al igual que las tipo L, sin embargo su conductancia en general es algo menor. Los canales $Ca_v2.1$ conducen corrientes P/Q y son inhibidos específicamente por ω -agatoxina IVA (con alta afinidad para corrientes P y con baja afinidad por corrientes Q) (Llinás et al., 1989; Mintz et al., 1992). Los canales $Ca_v2.2$ conducen corrientes de tipo N y son inhibidos mediante ω -conotoxina (Olivera et al., 1994). Por último, los canales $Ca_v2.3$ conducen corrientes tipo R, descritas en neuronas granulares de cerebelo, y son resistentes a la inhibición por la mayoría de péptidos orgánicos, siendo su único inhibidor conocido el SNX-428, una toxina peptídica procedente de tarántulas (Newcomb et al., 1998).

La subfamilia Ca_v3 ($Ca_v3.1$ a $Ca_v3.3$) conduce corrientes de tipo T que se caracterizan por una activación a potenciales de membrana bajos ($\approx -60mV$), una rápida inactivación y una conductancia baja (Nowycky et al., 1985). Estas propiedades sirven a fines específicos en los que son necesarios patrones de estimulación repetitivos y constantes, como puede ocurrir en el nodo sinoatrial o en la reacción acrosómica de los espermatozoides. La kurtoxina inhibe estas corrientes, mientras que son insensibles a las toxinas citadas anteriormente (Chuang et al., 1998).

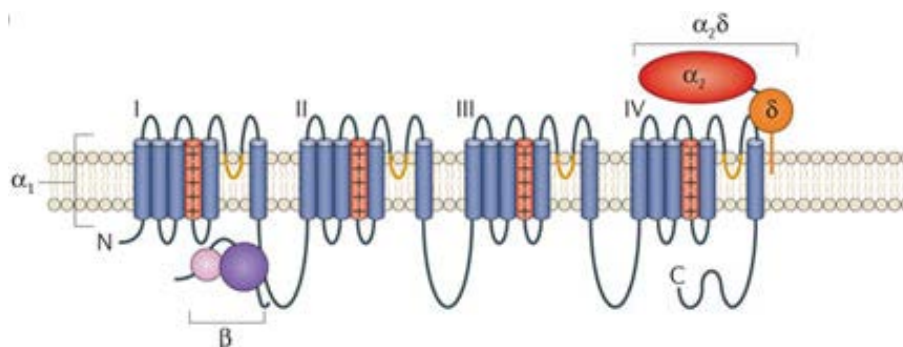


Figura 2: Estructura general de canales de Ca^{2+} operados por voltaje en el que se pueden apreciar los dominios transmembrana y las diferentes subunidades (Dolphin, 2012).

4.1b. Canales operados por receptor (ROCs)

Los canales operados por receptor (Receptor Operated Channels) son aquellos que van a ser activados en respuesta a la unión de agonistas extracelulares, como pueden ser las hormonas o los neurotransmisores. Estos canales están situados en la membrana plasmática y la recepción de la señal se puede llevar a cabo en el propio canal, o en receptores íntimamente ligados al él. Pueden llevar a cabo el proceso de señalización mediante dos vías, la primera de ellas consiste en generar una despolarización de la membrana plasmática al ser permeables a iones Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} . La segunda vía sería la entrada de Ca^{2+} directamente a través del canal, que actúa en sí mismo como segundo mensajero. Entre los canales que se incluyen en este grupo cabe destacar los siguientes:

Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChRs). Estos receptores están activados principalmente por acetilcolina aunque la nicotina puede mimetizar su efecto activándolos de igual modo, de ahí su nombre. Los canales están formados por pentámeros, con diferente número de subunidades dependiendo de dónde se estén expresando. Así mismo, la permeabilidad por Ca^{2+} varía notablemente en función del tejido. La principal función de este receptor es la de transmitir señales en las uniones neuromusculares o en las sinapsis, aunque también pueden llevar a cabo su efecto en células no excitables. Como se ha descrito anteriormente los nAChRs pueden transmitir información de dos maneras diferentes, causando una despolarización de la membrana plasmática gracias a la entrada de cationes Na^+ y Ca^{2+} o activando la señalización por Ca^{2+} . Algunas de las funciones activadas mediante esta segunda vía son la regulación de la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, glutamato y noradrenalina o la regulación en macrófagos inhibiendo la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) (Gotti & Clementi, 2004; Miyazawa et al., 2003; Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004).

Receptor N-metil-d-aspartato (NMDAR): este receptor es activado mediante la unión del neurotransmisor glutamato y requiere una previa despolarización para que la apertura del canal pueda producirse (en condiciones de reposo el Mg^{2+} actúa como bloqueante del canal y la despolarización provoca que el Mg^{2+} sea liberado). El canal está compuesto por un complejo heteromérico con una subunidad NR1 esencial para el funcionamiento del canal, y otras cuatro subunidades NR2. El canal es altamente permeable a Ca^{2+} aunque también permite el paso de Na^+ . Este canal tiene una

importancia vital en los procesos de memoria y aprendizaje, ya que participa en la plasticidad sináptica a través de Ca^{2+} (Paoletti et al., 2013).

Receptores P2X: estos receptores responden a ATP extracelular induciendo una despolarización de la membrana, además de una entrada de Ca^{2+} . Están formados por tres subunidades que pueden ser homo o heterotriméricas y su funcionalidad depende de la unión de tres moléculas de glicina. La composición de este trímero define sus características biofísicas, ya que pueden mediar respuestas rápidas como la transmisión sináptica u otras mucho más lentas como el crecimiento celular o la coagulación sanguínea (Vial et al., 2004).

Además de los receptores descritos, existen otros que también permiten el paso de iones Ca^{2+} como pueden ser los receptores 5-hidroxitriptamina, los receptores AMPA y los receptores kainato.

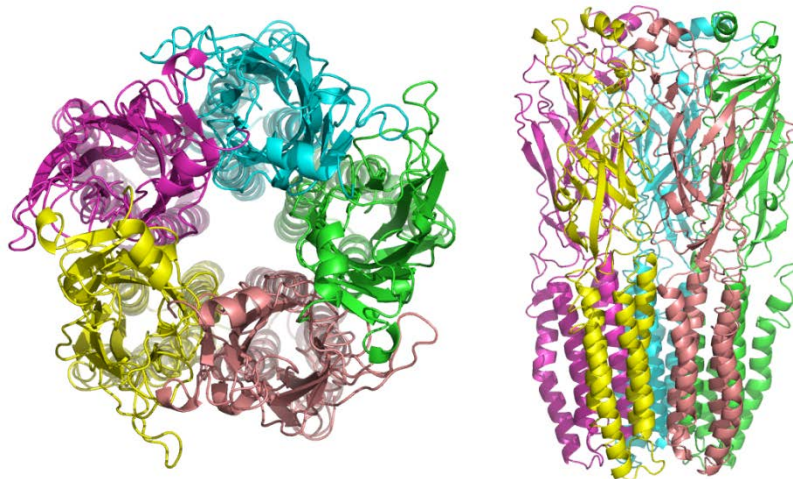


Figura 3: Estructura tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina, en vistas sagital y transversal (Wikimedia Commons).

4.1c. Receptores operados por segundos mensajeros (SMOCs)

Los receptores operados por segundos mensajeros (Second Messenger Operated Channels) se verán activados en respuesta a la unión de diferentes mensajeros intracelulares como por ejemplo el IP_3 , nucleótidos cíclicos o el ácido araquidónico.

Uno de los grupos más representativos son los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGCs). Estos canales juegan un papel fundamental en la transducción de señales visuales, olfativas y gustativas, aunque también se expresan

en otros tipos celulares como cerebro o hígado. En mamíferos existen 6 genes que codifican para subunidades de este grupo. Mientras que las subunidades CNGA1 a GNCA3 forman el poro, las otras tres actúan como subunidades reguladoras. Todos ellos son permeables a Ca^{2+} aunque con una baja selectividad, por lo que también permiten el paso de Na^+ . Su regulación se lleva a cabo a través de calmodulina, por lo tanto, el propio Ca^{2+} actúa como regulador (Trudeau & Zagotta, 2002). En los bastones retinales, los canales responden a GMP cíclico, mientras que en los cilios olfatorios la respuesta se produce a través de AMP cíclico (cAMP) (Bradley et al., 2005).

4.1d. Canales operados por depósitos intracelulares (SOCs)

Los canales operados por depósitos intracelulares se activan en respuesta a una disminución en la concentración de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. La apertura de estos canales da como resultado la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y el posterior rellenado del retículo endoplásmico, corriente denominada I_{CRAC} (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current). Esta corriente está presente en todos los tipos celulares, incluidas las neuronas o células musculares esqueléticas (Parekh & Putney, 2005). Los SOC son activados por estímulos que provocan la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, como pueden ser el Inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) a través de los receptores de IP_3 o el propio Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina. La corriente CRAC es activada exclusivamente por la depleción del retículo endoplásmico, independientemente de receptores de superficie, despolarizaciones o cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólica.

A pesar de la importancia de este proceso, ha sido en los últimos años cuando se han identificado los principales componentes de esta entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE), así como su posible funcionamiento. Orai1 ha sido identificado como el canal que permite la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y una de sus propiedades más características es su alta selectividad por Ca^{2+} frente al Na^+ (1000 frente a 1). Su identificación se debió a que mutaciones en este canal provocaban cambios importantes en la I_{CRAC} (Yeromin et al., 2006). La otra proteína involucrada en el proceso es STIM1. Esta proteína fue rápidamente identificada como el sensor de Ca^{2+} en el interior del retículo endoplásmico, ya que poseía un dominio EF-hand situado hacia el lumen (Liou et al., 2005).

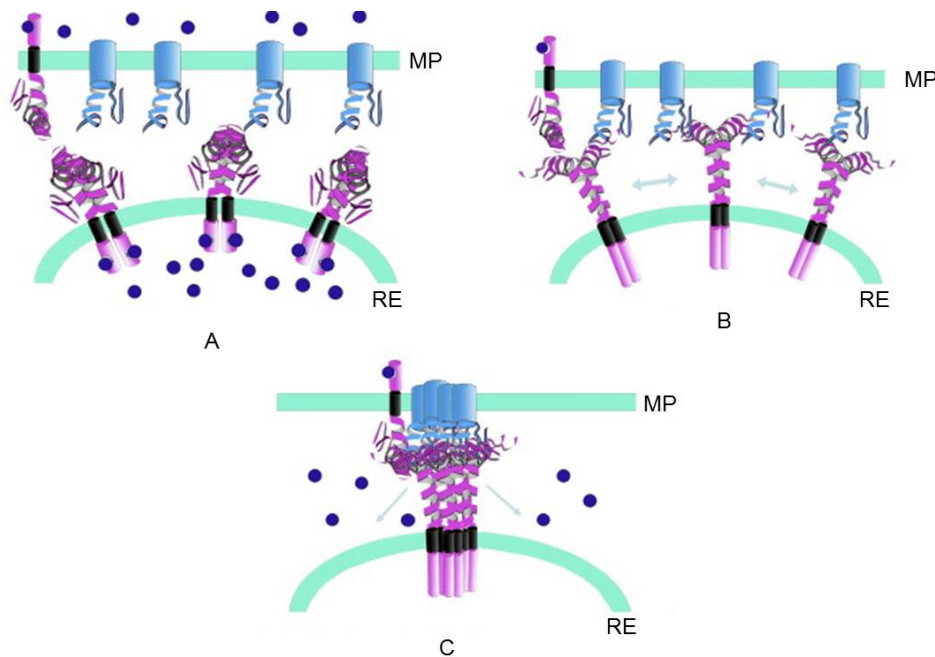


Figura 4: Diagrama del mecanismo de funcionamiento de Orai1 (proteínas azules) y STIM1 (proteínas rosas). En el esquema A se muestra la disposición de las proteínas cuando el RE está lleno de Ca^{2+} . En el B, el RE se vacía de Ca^{2+} y STIM1 interacciona con Orai1. Por último en la figura C se representa como el agrupamiento de STIM1 y Orai1 provocan la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Dziadek & Johnstone. 2007).

En situaciones de reposo, cuando el retículo endoplásmico está lleno de Ca^{2+} , STIM1 y Orai1 son capaces de moverse con facilidad a lo largo de la membrana del RE y de la membrana plasmática respectivamente. En segundos, el vaciamiento del RE causa que STIM1 se acumule en zonas periféricas de la célula, que se corresponden con zonas de RE liso muy cercanas a la membrana plasmática (Wu et al., 2006). En el estado de reposo, un ión Ca^{2+} unido al EF-hand actúa a modo de ancla para que el SOCE no se active espontáneamente. Cuando este ion Ca^{2+} es liberado durante la depleción, se produce un cambio conformacional que provoca la oligomerización de STIM1. Este paso de monómeros a oligómeros es fundamental para la activación del SOCE (Stathopoulos et al., 2006). Al mismo tiempo, Orai1 se acumula en la membrana plasmática enfrentado directamente a STIM1. Cuando STIM1 se une a Orai1 se abre el canal, generando un microdominio de Ca^{2+} altamente localizado que rellena el RE. Todo este proceso es reversible y el ensamblaje de todos los componentes suele ser lento en la mayoría de las células (de unos pocos a decenas de segundos).

4.1e. Superfamilia TRP

La superfamilia de los canales TRPs (Transient Receptor Potential) constituye otra de las posibles vías de entrada de Ca^{2+} al interior celular. Los canales TRPs son activados por un amplio rango de estímulos, incluidos mensajeros intra o extracelulares, estímulos químicos, térmicos, mecánicos o incluso osmóticos. Todos los TRPs están formados por seis hélices transmembrana y se ensamblan formando homo o heterotetrámeros, dando lugar a canales selectivos para cationes mono o divalentes. Además todos ellos poseen regiones consenso susceptibles de fosforilación. Esta superfamilia se divide en siete familias; TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML y TRPN (Clapham, 2003; Montell et al., 2002).

La subfamilia TRPV está formada por seis isoformas (TRPV1-TRPV6), siendo las dos últimas variantes las que presentan una selectividad más alta por Ca^{2+} frente a Na^+ . Todos ellos presentan características similares aunque la isoforma más estudiada es la TRPV1 ya que fue la primera en ser descubierta en mamíferos. Se expresa sobre todo en terminales nerviosos periféricos y centrales aunque también se puede encontrar en muchos tipos celulares no neuronales (Planells-Cases et al., 2005). Este canal está implicado en la nocicepción y se activa mediante compuestos vaniloideos como la capsaicina o la resiniferatoxina pero también responde ante cambios en la temperatura ($\geq 43^\circ\text{C}$) o pH ($\leq 5,9$) (Caterina et al., 2000).

Los canales de la subfamilia TRPC no son especialmente selectivos a Ca^{2+} y esta selectividad varía dependiendo de la isoforma. Se han descrito siete isoformas diferentes y todas ellas se expresan en multitud de tipos celulares, incluso un mismo tipo celular puede expresar varias isoformas, lo que hace que su estudio sea muy complejo (Strubing et al., 2003). Todos los miembros de esta familia son activados mediante la estimulación de diferentes isoformas de la fosfolipasa C (PLC).

La subfamilia TRPM presenta una alta variedad en la permeabilidad a Ca^{2+} y Mg^{2+} , desde totalmente impermeables a Ca^{2+} en el caso de TRPM4 y 5 hasta muy permeables a Ca^{2+} y Mg^{2+} en el caso de TRPM6 y 7. Esta familia está implicada en múltiples funciones como la supresión de tumores, sensores del estado redox celular o incluso la transducción de señales específicas (Hara et al., 2002; Zhang et al., 2003).

El resto de subfamilias de TRPs presentan una selectividad catiónica mucho menor y participan en múltiples procesos celulares.

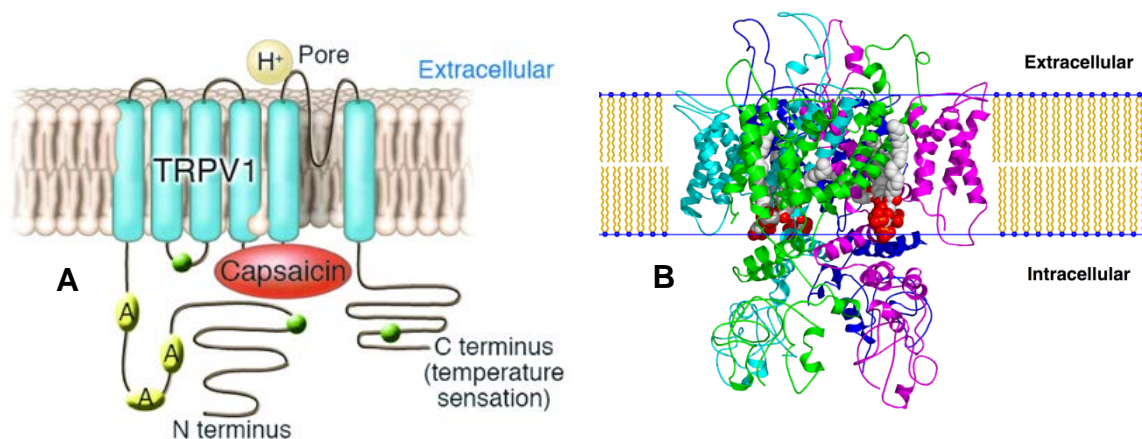


Figura 5: Esquema (A) y representación tridimensional del canal TRPV1 (B). (Brauchi et al., 2007).

4.2. Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares

El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica no solo puede deberse a una entrada del Ca^{2+} extracelular sino también a una liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico o sarcoplásmico en el caso de células musculares. Este compartimento es el reservorio intracelular de Ca^{2+} más importante, pudiendo acumular en su interior grandes cantidades de Ca^{2+} , bien ligado con baja afinidad a proteínas como la calreticulina o calsecuestrina o bien en forma libre, en cuyo caso la concentración se sitúa entre 0,5 y 1mM (Montero et al., 1997, De la Fuente et al., 2013). En los últimos años se ha propuesto incluso que la distribución del Ca^{2+} libre en el interior del retículo endoplásmico puede no ser homogénea, existiendo en su interior diferentes compartimentos (Aulestia et al., 2011; Dagnino-Acosta & Guerrero-Hernández, 2009; De la Fuente et al., 2013).

La liberación de Ca^{2+} desde el RE se produce a través de dos familias de canales que son los receptores de IP_3 y los receptores de rianodina. Existe además una salida constante de Ca^{2+} por difusión pasiva llamada “leak”, aunque su funcionamiento exacto aun no es bien conocido (Guerrero-Hernández et al., 2010).

4.2a. Receptores de IP₃ (IP₃R)

En mamíferos se han descrito tres isoformas de este receptor (IP₃R1-IP₃R3) aunque la forma más estudiada ha sido el IP₃R1 ya que fue la primera en ser descubierta (Furuichi et al., 1989). Estudios posteriores identificaron las otras dos isoformas, siendo todos ellos complejos proteicos inusualmente grandes, formados por tetrámeros de unos 2700 aminoácidos por subunidad. Estos receptores son canales catiónicos de muy alta conductancia, pero de escasa selectividad frente a cationes monovalentes, aunque esto no supone un problema, ya que en el interior del RE, el Ca²⁺ es el único catión que presenta un gradiente electroquímico significativo con el citosol (Foskett et al., 2007).

La activación de este canal se produce gracias a la unión de IP₃ y del propio ion que permea, el Ca²⁺. El IP₃ es un segundo mensajero producido gracias a la acción de la fosfolipasa C que hidroliza el fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato de la membrana plasmática, dando lugar a diacilglicerol e IP₃. La actividad de la PLC esta normalmente acoplada a la activación de proteínas G asociadas a receptores de membrana. Cada una de las subunidades del receptor posee un sitio de unión a IP₃, no obstante la unión de al menos dos moléculas de IP₃ es suficiente para la activación del canal (Boehning & Joseph, 2000). La unión de Ca²⁺ también es necesaria para la apertura completa del canal, sin embargo existe una acción bifásica del ion. A concentraciones bajas de hasta 1μM se produce una activación del receptor, mientras que a concentraciones más altas la respuesta observada es inhibitoria. Esto da como resultado una probabilidad de apertura del canal en forma de campana dependiente del Ca²⁺ citosólico (Marshall & Taylor, 1993). Las tres isoformas presentan esta regulación bifásica por Ca²⁺, y su presencia es totalmente necesaria para la activación del canal. Esto significa que en el receptor de IP₃ también funciona el fenómeno conocido como CICR (Calcium Induced-Calcium Release, o liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺), originalmente descrito en los receptores de Ryanodina (ver más abajo).

La actividad de los IP₃Rs no solo está regulada por IP₃ y Ca²⁺ sino que en ella también participan otras proteínas como la calmodulina, la proteína quinasa dependiente de calmodulina o la proteína quinasa C. Aunque no existen inhibidores específicos del IP₃R, algunos compuestos como la heparina, el 2-aminoetil difenilboronato (2-APB) o las Xestosponginas reducen significativamente su actividad (Worley et al., 1987; Maruyama et al., 1997; Gafni et al., 1997).

4.2b. Receptores de rianodina (RyR)

Al igual que en el caso de los receptores de IP_3 , existen tres isoformas que se expresan en mamíferos (RyR1-RyR3). RyR1 fue la primera en ser detectada y se expresa sobre todo en músculo esquelético aunque puede expresarse también con menos relevancia en tejidos como músculo liso, estómago o timo. Ésta es la forma más estudiada, debido a su alta expresión en este tejido y a su facilidad para ser extraído. Posteriormente fueron descritas las isoformas 2 y 3 expresadas en músculo cardíaco y en tejido nervioso respectivamente (Takeshima et al., 1989; Nakai et al., 1990; Hakamata et al., 1992).

Este receptor es el canal iónico más grande conocido hasta el momento. Está formado por homotetrámeros cuyas subunidades constan aproximadamente de unos 5000 residuos aminoacídicos. El canal posee una elevada conductancia y es capaz de incrementar rápidamente la $[Ca^{2+}]$ citosólica (Smith et al., 1985). La estructura de la proteína expuesta hacia el citosol contiene múltiples sitios de unión a moléculas y proteínas reguladoras.

El principal activador de este canal, especialmente en la isoforma cardíaca RyR2, es el Ca^{2+} citosólico, y por ello este canal constituye el ejemplo clásico del mecanismo de activación CICR mencionado anteriormente. En este caso, el Ca^{2+} también actúa de manera bifásica, activando el canal a concentraciones bajas e inhibiéndolo a concentraciones superiores a $100\mu M$, aunque esta inhibición a concentraciones de Ca^{2+} tan altas probablemente no ocurre en condiciones fisiológicas. El receptor posee diferentes sitios de unión a Ca^{2+} , unos de alta y otros de baja afinidad, gracias a los cuales se ejercen los efectos de activación o inhibición respectivamente. Este receptor también puede detectar el Ca^{2+} presente en el interior del RE, que actúa también como activador, y bajo ciertas circunstancias el canal se puede abrir espontáneamente (Endo et al., 1970; Palade et al., 1983).

En el caso del RyR1 del músculo esquelético, la activación se produce sin necesidad de la unión de Ca^{2+} , gracias a un acoplamiento directo entre el canal $Ca_v1.1$ de membrana plasmática (receptor de dihidropiridinas, DHPR) y el receptor de rianodina. Cuando la despolarización llega a la célula muscular, ésta se transmite hasta el interior celular mediante los Túbulos-T provocando un cambio de conformación en el $Ca_v1.1$ y una pequeña entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Tanto la interacción mecánica directa entre ambos canales (DHPR y

RyR), como el fenómeno CICR provocan una apertura de los RyR y la consiguiente contracción muscular (Rios & Brum, 1987). Los RyRs también juegan un papel importante en la transducción de señales en osteoclastos y contribuyen a la secreción, plasticidad sináptica, aprendizaje y apoptosis en el sistema nervioso (Chavis et al., 1996; Schwab et al., 2001; Zaidi et al., 1992).

Además del Ca^{2+} y DHPR los receptores de rianodina están también regulados en mayor o menor medida por Mg^{2+} , ATP, proteína quinasa A (PKA), CaM, CaMKII, calsecuestrina y triadina. El Mg^{2+} y el ATP ejercen su función desde el citosol, y mientras que el ATP actúa como un activador, el Mg^{2+} actúa como inhibidor, bien compitiendo por el Ca^{2+} por los sitios de alta afinidad, o uniéndose directamente a los sitios de unión de baja afinidad (Laver et al., 1997). La presencia de altas concentraciones de Mg^{2+} libre en el interior de las células hace difícil determinar si el ATP o el MgATP producen efectos diferentes.

La CaM produce efectos regulatorios directos tanto a nivel de $\text{Ca}_v1.1$ como de RyR. La CaM libre de Ca^{2+} (ApoCaM) activa todas las isoformas de RyR, mientras que la forma unida a Ca^{2+} (CaCaM) actúa como inhibidor de RyR1 (Yamaguchi et al., 2005; Rodney et al., 2001). La calsecuestrina es el tampón de Ca^{2+} más importante en el lumen del retículo sarcoplásmico (RS) y oligómeros de esta proteína junto con la triadina parecen regular la actividad del receptor (Beard et al., 2009).

Por último, los dominios citosólicos del receptor poseen múltiples sitios susceptibles de fosforilación. Quinasas como la PKA, CaMKII, y la quinasa dependiente de cGMP participan en la regulación de las isoformas de RyRs (Rodríguez et al., 2003; Xiao et al., 2006).

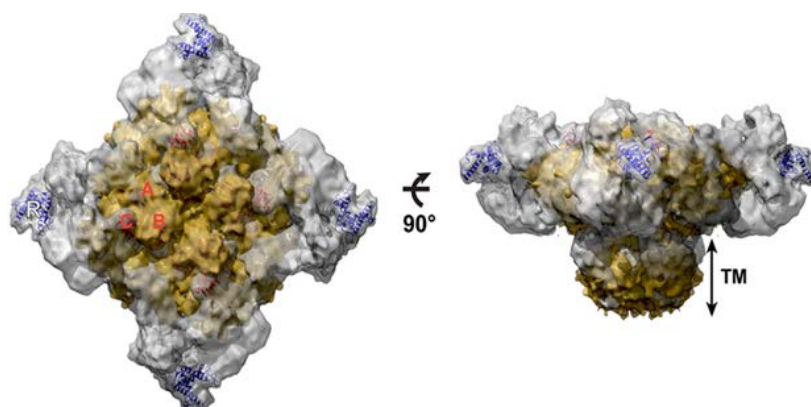


Figura 6: Superposición de las representaciones de los receptores de IP_3 (amarillo) y de rianodina (gris) así como su porción transmembrana (TM) y los sitios susceptibles de fosforilación en rojo (A, B, C) (Sharma et al., 2012).

4.3. Microdominios de Ca^{2+}

El término microdominio de Ca^{2+} se define como un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ que no se produce homogéneamente en todo el citosol, sino que se encuentra localizado en una parte concreta de la célula. Éstos se producen debido a las características físico-químicas del interior celular. El Ca^{2+} difunde en el agua a una velocidad de $500\mu\text{m}^2/\text{s}$, sin embargo, la presencia de amortiguadores citosólicos reducen la velocidad de difusión del Ca^{2+} hasta niveles situados entre $10\text{-}50\mu\text{m}^2/\text{s}$ en el interior celular. Además, la existencia de estructuras altamente organizadas capaces de secuestrar y liberar Ca^{2+} y el agrupamiento de canales de Ca^{2+} tanto en la membrana plasmática como en los diferentes orgánulos favorecen la formación de estos dominios de alto Ca^{2+} . (Allbritton et al., 1992; Rizzuto & Pozzan, 2006). Hoy en día, se denomina microdominio de Ca^{2+} a regiones muy concretas y microscópicas con una alta concentración de Ca^{2+} , generadas en las bocas de los canales y debido a la apertura de los mismos (referido tanto a los canales de Ca^{2+} de membrana plasmática como de RE).

Tanto la amplitud del microdominio como la difusión espacial del mismo dependen en gran medida de la conductancia del canal de Ca^{2+} , de su selectividad, de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el medio extracelular o en el interior del RE, del potencial de membrana y de la naturaleza y cantidad de amortiguadores intracelulares. Se han descrito valores de entre 100 y $300\mu\text{M}$ para estas regiones de alto Ca^{2+} dependiendo del tipo celular (Heidelberger et al., 1994; Schneggenburger & Neher, 2000).

Estos dominios de alto Ca^{2+} son de vital importancia en varios procesos celulares, como pueden ser la secreción de neurotransmisores o la contracción muscular. En el primer caso, las vesículas de secreción necesitan una $[\text{Ca}^{2+}]$ diez veces superior a la generada en el conjunto del citosol para poder ser liberadas, por lo tanto estos microdominios de Ca^{2+} generados gracias a los VOCs justo debajo de la membrana plasmática, son los responsables de la fusión de estas pequeñas vesículas sinápticas (Bollmann & Sakmann, 2005). En el segundo caso, la liberación de Ca^{2+} por parte de los RyRs genera unos microdominios de Ca^{2+} denominados “sparks” que controlan los procesos de excitación-contracción, tanto en el músculo esquelético como cardíaco (Tsugorka et al., 1995; Sun et al., 1995).

5. RECUPERACIÓN DE LOS NIVELES BASALES DE Ca^{2+} CITOSÓLICO

Al finalizar el estímulo que ha producido el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica, la célula necesita recuperar los niveles de Ca^{2+} iniciales para poder responder ante nuevos estímulos. Para ello, la célula transportará Ca^{2+} hacia el medio extracelular y reciclará parte del Ca^{2+} liberado desde los depósitos intracelulares, asegurándose de que estos depósitos se mantengan siempre llenos.

Para ello, la célula cuenta con tres sistemas de bombeo fundamentales que son la ATPasa de membrana plasmática (PMCA), la ATPasa del retículo sarco(end)plásmico (SERCA), y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX). En el aparato de Golgi podemos encontrar las ATPasas de la vía de secreción (SPCA), aunque éstas poseen un papel menos importante que las anteriores. Las ATPasas tienen una alta afinidad por Ca^{2+} pero una baja tasa de transporte, siendo estas bombas las encargadas de la regulación fina de los niveles de Ca^{2+} en reposo, manteniéndolos en torno a 100nM. Una mención aparte merece el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. Este canal no es responsable de mantener los niveles basales de Ca^{2+} citosólico pero contribuye a la modulación de la señal de Ca^{2+} acumulando parte de este Ca^{2+} en el interior de la mitocondria. Posteriormente se abordará en detalle la función y estructura de este transportador.

5.1. ATPasa de membrana plasmática (PMCA)

Esta ATPasa se encarga de bombear Ca^{2+} desde el citosol hacia el medio extracelular. Posee una alta afinidad por Ca^{2+} y aunque su tasa de transporte es baja, es capaz de operar en un rango de bajas concentraciones de Ca^{2+} , donde el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es relativamente ineficiente. Fue descrita por primera vez en eritrocitos aunque posteriormente se ha caracterizado y purificado en numerosos tipos celulares (Schatzmann, 1966; Niggli et al., 1979).

La PMCA pertenece a la familia de las ATPasas de tipo P y está formada por diez dominios transmembrana y tres grandes dominios citosólicos, el A, N y P. La bomba consume una molécula de ATP por cada ión Ca^{2+} transportado y aunque su K_d en estado de reposo se encuentra entre 10 y 20 μM , ésta puede disminuir incluso por debajo de 1 μM debido a interacciones con la CaM o con fosfolípidos ácidos (Brini & Carafoli, 2009; Niggli et al., 1981). El extremo carboxilo terminal contiene los

principales dominios de regulación entre los que se encuentran el dominio de unión a CaM y sitios susceptibles de fosforilación por la PKA o PKC.

En humanos se han descrito cuatro isoformas de PMCA (PMCA1-PMCA4). Las isoformas 1 y 4 se expresan en la mayoría de tejidos pero las variantes 2 y 3 se expresan en tejidos más concretos como pueden ser el cerebro, el músculo estriado o las glándulas mamarias. Curiosamente la regulación transcripcional de estas bombas está regulada por el propio Ca^{2+} (Carafoli et al., 1999).

5.2. ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico (SERCA)

Al igual que la PMCA esta ATPasa pertenece a la familia de las ATPasas de tipo P y posee una estructura similar a las anteriores con sus tres dominios citosólicos A, N y P, pero en este caso el número de dominios transmembrana se eleva a once. En humanos existen tres genes codificantes para esta ATPasa (SERCA1-SERCA3) aunque la proteína SERCA2 es la más ampliamente estudiada, contando así mismo con diferentes variantes (2a, 2b, 2c, 2d) (Vandecaetsbeek et al., 2009a; Vandecaetsbeek et al., 2009b; Dally et al., 2006). Las diferentes variantes ascienden a diez, expresándose de manera diferente dependiendo del tipo celular y del estado de desarrollo.

La función de la SERCA es doble, por un lado se encarga de devolver la concentración de Ca^{2+} en el citosol a niveles basales, y por otro lado rellena el RE de Ca^{2+} asegurando que la concentración de Ca^{2+} es suficientemente alta como para responder ante sucesivos estímulos. A diferencia de la PMCA, la SERCA es capaz de transportar dos iones Ca^{2+} al interior del RE por cada ATP consumido. Durante el proceso se intercambian además dos protones, por lo que todo el proceso es electrogénico. La hidrólisis del ATP se lleva a cabo en el dominio P citosólico, aunque este proceso no tiene lugar hasta que los dos iones Ca^{2+} se han unido a sus respectivos sitios de anclaje. La accesibilidad del Ca^{2+} a estos sitios está controlada por procesos de fosforilación y desfosforilación (Moller et al., 2005M; Toyoshima, 2009).

Se han descrito diversas proteínas implicadas en la regulación de la actividad de la SERCA aunque las más estudiadas son el fosfolamban y la sarcolipina. El fosfolamban actúa como un inhibidor en su estado nativo, disminuyendo la afinidad de la SERCA por el Ca^{2+} citosólico, aunque su fosforilación por parte de la PKA o la

CaMKII provocan su disociación de SERCA, revirtiendo el proceso inhibitorio (MacLennan & Kranias, 2003). La sarcolipina parece tener las mismas propiedades regulatorias que el fosfolamban actuando sobre los mismos sitios de regulación. La acción conjunta de ambos parece provocar una inhibición superior, aunque este proceso no está del todo estudiado (Asahi et al., 2002). Además de estos reguladores fisiológicos, la SERCA puede ser inhibida de forma específica por la thapsigargina (inhibidor irreversible) o por el 2,5-di(terbutil)-1,4-benzohidroquinona (Inhibidor reversible, BHQ) (Davidson & Varhol, 1995; Moore et al., 1990).

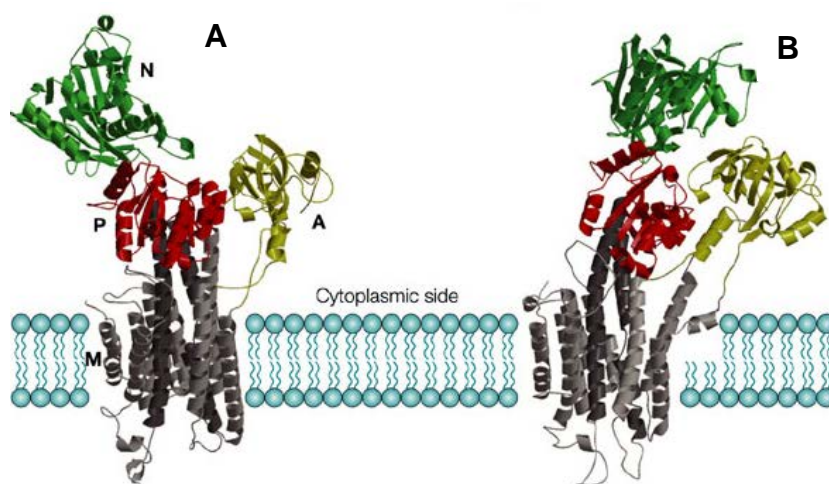


Figura 7: Diagrama tridimensional de la ATPasa de retículo endoplásmico en el que se muestran los dominios citosólicos A, N y P así como su porción transmembrana M. El diagrama A representa la bomba en su estado nativo, mientras que el B la muestra en su estado inhibido por thapsigargina (Kühlbrandt, 2004).

5.3. ATPasas de la vía de secreción (SPCA)

Estas ATPasas aparecen en el aparato de Golgi con la misma función que las anteriores, aunque su importancia fisiológica es menor. Difiere de las anteriores en que solo posee un sitio de unión a Ca^{2+} para su transporte, así mismo también es capaz de transportar Mg^{2+} (Vangheluwe et al., 2009). Estas ATPasas juegan un papel importante en procesos de secreción de diversos tipos (Mitchell et al., 2004).

5.4. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana plasmática (NCX)

Este intercambiador, al contrario que las ATPasas anteriores posee una alta tasa de transporte pero una baja afinidad por Ca^{2+} . El NCX transporta Ca^{2+} aprovechando el gradiente electroquímico del Na^+ , sacando un ión Ca^{2+} por cada tres iones Na^+ que introduce en el citosol. La unión de iones Ca^{2+} en el dominio citosólico induce su activación, mientras que la unión de Na^+ lo inactiva. Aunque el intercambiador habitualmente se encarga de sacar Ca^{2+} e introducir Na^+ , también puede funcionar de forma reversa, dependiendo de los gradientes existentes de Ca^{2+} y Na^+ (Lytton, 2007). Un ejemplo del funcionamiento en estado reverso se da en células cardiacas, cuando la despolarización de la membrana provoca la apertura de canales de Na^+ operados por voltaje. Durante esta despolarización la concentración de Na^+ se ve incrementada en el citosol y el intercambiador actúa sacando Na^+ e introduciendo Ca^{2+} . Este Ca^{2+} juega un papel fundamental en el control de los procesos de excitación-contracción.

El NCX está formado por nueve dominios transmembrana, con un gran bucle entre los dominios 5 y 6 hacia el lado citosólico. El Na^+ actúa como regulador uniéndose a la primera porción de este bucle, mientras que en la segunda porción existen dos sitios de unión para el Ca^{2+} . Además de estos dos iones existen numerosas moléculas que actúan como reguladores del NCX. Entre ellas podemos destacar el ATP, la PKA y PKC, radicales hidroxilo o la calcineurina (Matsuoka et al., 1997; Iwamoto et al., 1998; He et al., 2000,).

Se han descrito tres isoformas de NCX (NCX1-NCX3) codificadas por tres genes independientes (Marshall et al., 2005). El NCX1 se expresa en la mayoría de células aunque su expresión es mayor en cerebro corazón y riñones. NCX2 y 3 se expresan específicamente en cerebro, músculo esquelético y en algunas poblaciones neuronales. Al igual que en el caso de PMCA, la transcripción de estos genes está regulada por el propio Ca^{2+} . Como se ha descrito anteriormente el NCX juega un papel fundamental en la contracción del músculo cardiaco, aunque también participa en otros procesos fisiológicos importantes como la reabsorción de Ca^{2+} en las nefronas (Brini & Carafoli, 2011).

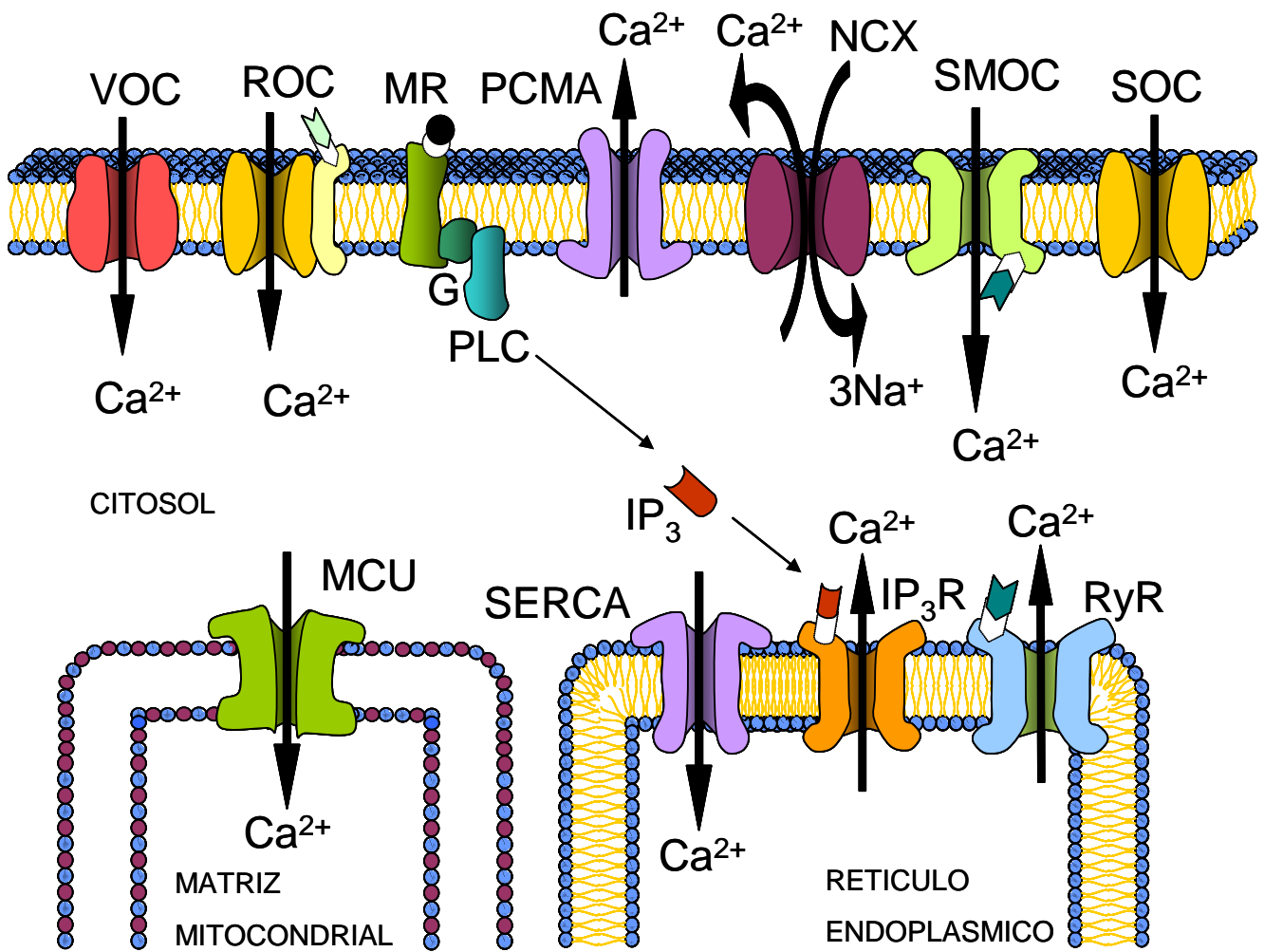


Figura 8: Diagrama esquemático de los principales sistemas implicados en el transporte de Ca^{2+} , en membrana plasmática y retículo endoplásmico: canales operados por voltaje (VOC), canales operados por receptor (ROC), receptor metabotrópico (MR) asociado a proteínas G, fosfolipasa C, ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA), intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana plasmática (NCX), canal de Ca^{2+} operado por segundo mensajero (SMOC), canal de Ca^{2+} operado por depósitos (SOC), ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico (SERCA), receptor de IP_3 (IP_3R), receptor de rianodina (RyR) y por último el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial.

II. LAS MITOCONDRIAS COMO PARTE FUNDAMENTAL DE LA CÉLULA

Las mitocondrias son orgánulos de vital importancia para las células ya que se encargan de proporcionar la energía necesaria para su supervivencia y división, aunque no solo tienen función energética, sino que participan activamente en otros procesos como pueden ser la apoptosis, la regulación de señales celulares o el control de las especies redox (Duchen & Szabadkai, 2010). Las mitocondrias están distribuidas por todo el citosol y su tamaño y densidad dependen del tipo celular y de sus requerimientos energéticos. Por ejemplo, en células musculares, el número de mitocondrias es más elevado, mientras que en otras como las células epiteliales su presencia es menor. En cualquier caso, las mitocondrias son un orgánulo que está presente en la totalidad de los tipos celulares eucarióticos, a excepción de los hematíes.

1. ESTRUCTURA DE LAS MITOCONDRIAS

El tamaño, aspecto y organización de las mitocondrias varía dependiendo de las especies, tejidos o incluso condiciones fisiológicas, pero siempre están formadas por dos membranas, una externa y otra interna. Entre ambas existe un espacio de unos 10nm de espesor denominado espacio intermembrana. En este espacio podemos encontrar algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo, como pueden ser la adenilato quinasa o la creatina quinasa. La membrana interna delimita a su vez un espacio interior llamado matriz mitocondrial.

La membrana externa se encuentra en contacto directo con el citosol y está compuesta aproximadamente por un 60-70% de proteínas y un 30-40% de lípidos. Esta membrana es muy permeable a todo tipo de moléculas cuyo peso sea inferior a 10kD como pueden ser iones, metabolitos y muchos polipéptidos. Todas ellas atraviesan la membrana mitocondrial externa gracias a unos poros proteicos llamados porinas o VDAC (Voltage Dependent Anion Channel). Estos canales están compuestos por un polipéptido sencillo de unos 30kD, delimitando en su interior un barril de estructura beta, cuyo diámetro interior es de 2,5nm aproximadamente. La función principal de este canal es la de facilitar y regular el transporte de metabolitos entre el citosol y el espacio intermembrana (Colombini, 2012).

Por su parte, la membrana mitocondrial interna está formada por un 80% de proteínas y es virtualmente impermeable a iones y metabolitos, siendo mucho más selectiva que la membrana externa. Esta membrana posee unas invaginaciones que se adentran en la matriz mitocondrial, aumentando significativamente su superficie. En esta membrana se encuentran las proteínas que forman la cadena de transporte electrónico, la ATP sintasa y numerosos sistemas de transporte. La impermeabilidad de esta membrana a iones permite generar un potencial eléctrico entre el interior y el exterior de unos $-130/-180\text{mV}$ (Parekh, 2003).

Las mitocondrias son orgánulos que poseen una elevada plasticidad, son capaces de moverse a lo largo del citoesqueleto y distribuirse en zonas celulares de alta demanda energética. Las mitocondrias cambian su morfología mediante procesos de fusión y fisión en respuesta a las diferentes condiciones celulares y procesos de diferenciación. Estos procesos son importantes en el mantenimiento del número y función mitocondrial, pudiendo dar lugar a mitocondrias filamentosas, partículas individuales o una mezcla de ambas. Los procesos bioenergéticos son los principales responsables de estos cambios morfológicos pero se dan también durante el ciclo celular o la apoptosis (Westermann, 2010; Sauvanet et al., 2010). Las proteínas encargadas de la fusión mitocondrial son las mitofusinas 1 y 2 en el caso de la membrana mitocondrial externa y la proteína Opa1 en la interna. La proteína responsable de la fisión es la Drp1 (Dinamyn-related protein) que se encuentra localizada en el citoplasma y es reclutada por la mitocondria, formando oligómeros durante los procesos de fisión (Santel & Fuller, 2001; Frezza et al., 2006; Smirnova et al., 1998). Gracias a estos procesos las mitocondrias son capaces de recambiar DNA, proteínas o lípidos dañados y mantener su funcionalidad siempre intacta.

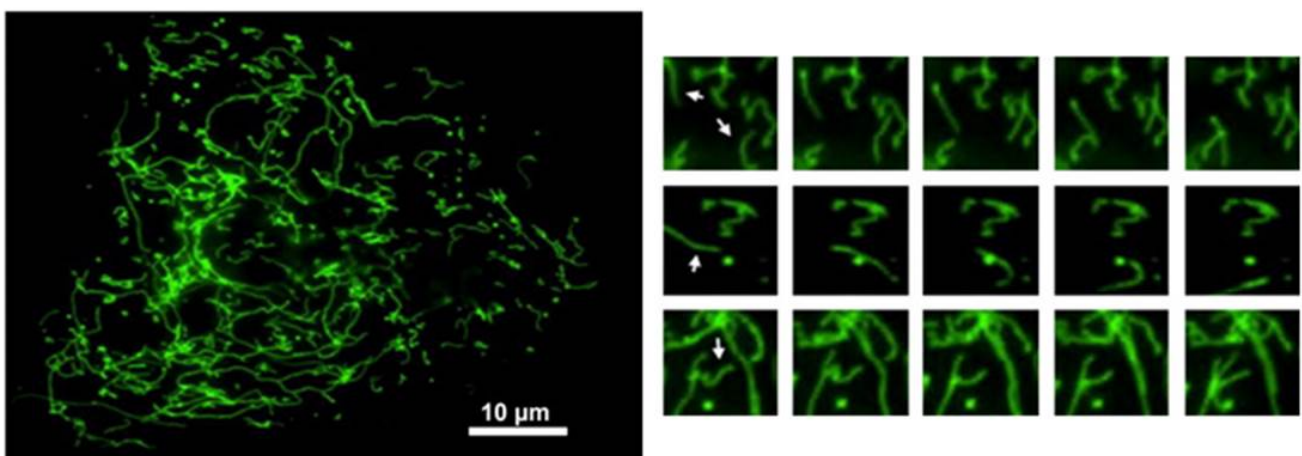


Figura 9: Imagen de microscopía confocal mostrando ejemplos de movilidad mitocondrial en células astrocíticas (Kremneva et al., 2013).

Cabe destacar la estrecha relación estructural y funcional existente entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Ésta fue puesta en evidencia por el grupo de Rizzuto en 1998, y en los últimos años se ha demostrado la existencia de contactos físicos entre ambos orgánulos (Rizzuto et al., 1998; Csordas et al., 2006). Estos contactos entre RE y mitocondria son inferiores a 200nm, se pueden purificar bioquímicamente y han sido denominados MAMs (Mitocondria-Associated Membranes). Estas uniones estables facilitan la sincronización de funciones entre ambos orgánulos, como pueden ser el control de la biosíntesis de lípidos, la fisión mitocondrial o la señalización a través de Ca^{2+} (Rowland & Voeltz., 2012). La liberación de Ca^{2+} por parte del receptor de IP_3 genera un microdominio de alto Ca^{2+} en la boca del canal. La proximidad entre ambos orgánulos provoca que este microdominio de Ca^{2+} sea rápidamente detectado por el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, modulando de la señal de Ca^{2+} casi al instante. Aunque las proteínas que estabilizan estos contactos no están del todo caracterizadas, se cree que la mitofusina-2 puede participar activamente en este proceso. Así mismo, los VDAC parece que pueden interactuar con los receptores de IP_3 a través de una chaperona de unos 75kD denominada HSPA9. El silenciamiento de esta proteína mediante siRNA disminuye el acoplamiento funcional entre VDAC y los receptores de IP_3 (Szabadkai et al., 2006). Todas las proteínas anteriores están expresadas en una alta concentración dentro de los MAMs.

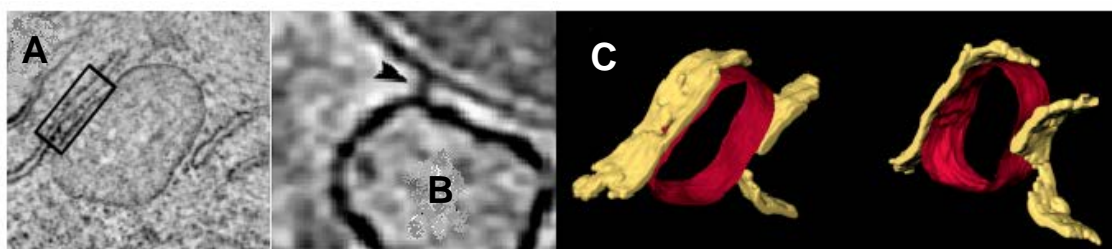


Figura 10: Imágenes tomadas con microscopía electrónica en las que se aprecian los contactos entre mitocondria y RE (A y B), y una representación tridimensional de la estructuras de mitocondria (rojo) y RE (amarillo) (C). (Csordas et al., 2006).

2. FUNCIONES MITOCONDRIALES

Las mitocondrias están implicadas en varios procesos fisiológicos, algunos de los cuales son fundamentales para la célula. La función más conocida e indispensable es la de proporcionar energía a la célula en forma de ATP, pero ésta no es su única función. Existen otras no tan conocidas pero también importantes para el correcto funcionamiento celular y tisular. Algunas de estas otras funciones son la termogénesis, el control de las especies reactivas de oxígeno (ROS), la homeostasis del Ca^{2+} subcelular y la apoptosis (Kowaltowski, 2000).

2.1. Producción de ATP

Gracias a las mitocondrias, el metabolismo celular aumenta significativamente la cantidad de energía obtenida a partir de la glucosa. En ausencia de este orgánulo, la única vía de obtención de energía es la glucólisis anaerobia. A partir de esta ruta, únicamente se obtienen dos moléculas de ATP por cada glucosa. La oxidación total de los glúcidos en la mitocondria se lleva a cabo en el interior de la matriz mitocondrial, ya que es allí donde actúan todas las enzimas implicadas en el ciclo de Krebs y otras rutas degradativas. El producto más importante de la degradación de carbohidratos, lípidos y proteínas es el acetil-CoA, el cual continúa su proceso de oxidación hasta convertirse en CO_2 y H_2O . Los electrones de alta energía obtenidos en las sucesivas oxidaciones serán finalmente transferidos para formar moléculas de NADH y FADH₂. Posteriormente estas dos moléculas cederán sus electrones a la cadena de transporte electrónico, cuyos componentes se encuentran situados en la membrana mitocondrial interna. El transporte electrónico a través de los complejos de la cadena, generará un bombeo de protones hacia el espacio intermembrana. El retorno de protones hacia el interior de la matriz mitocondrial se llevará a cabo a favor de gradiente gracias a la ATP sintasa. Dicho transporte será aprovechado por la ATP sintasa para generar ATP (hasta 32 moléculas de ATP por cada glucosa). Las mitocondrias no solo se encargan de esta fosforilación oxidativa, sino que también participan en otros procesos metabólicos como la beta-oxidación de ácidos grasos o ciertas reacciones del ciclo de la urea.

2.2. Termogénesis

En el tejido adiposo, las mitocondrias se comportan de manera diferente al resto de tejidos. Las mitocondrias de los adipocitos son especialmente permeables a los protones, gracias a la presencia de proteínas desacoplantes en la membrana mitocondrial interna (UcPs). Durante este proceso, parte de la energía almacenada en forma de diferencia de potencial es disipada en forma de calor cuando regresan a la matriz mitocondrial (Clarke & Portner, 2010).

2.3. Control de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

Como resultado del transporte electrónico, una pequeña parte del O_2 molecular es transformado en el radical superóxido $O_2^{\cdot-}$. Esta pequeña, pero continua pérdida de electrones, convierte a la mitocondria en el principal generador de especies reactivas de O_2 . Catalizado por la superóxido dismutasa mitocondrial, este radical $O_2^{\cdot-}$ puede formar H_2O_2 y los subsecuentes $OH^{\cdot-}$. En condiciones normales, las mitocondrias poseen eficientes mecanismos antioxidantes que evitan causar daños permanentes (Kowaltowski et al., 2009). Los propios radicales actúan como señales que activan procesos de ajuste de masa mitocondrial, distribución y fenotipo de las mismas, con el fin de seleccionar las mitocondrias más activas y degradar las más dañadas. Todo este proceso conlleva una replicación del DNA, síntesis de proteínas, fusiones y fisiones mitocondriales y proliferación mitocondrial (Piantadosi & Suliman, 2012; Larsen et al., 2012).

2.4. Homeostasis del Ca^{2+} subcelular

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la regulación de la señalización intracelular por Ca^{2+} . Cuando, después de un estímulo, la concentración de Ca^{2+} citosólica aumenta, las mitocondrias son capaces de captar y acumular grandes cantidades de Ca^{2+} en su interior (Arnaudeau et al., 2001; Montero et al., 2002; Filippin et al., 2003; Pinton et al., 2004), llegando incluso a superar concentraciones de $500\mu M$, regulando y modulando esta señal espacial y temporalmente (Montero et al., 2000). Las mitocondrias fueron el primer orgánulo en ser asociado con la captación de Ca^{2+} y las primeras medidas de esta captación fueron hechas ya hace medio siglo (Vasington & Murphy, 1962). Sin embargo, existen todavía hoy importantes discrepancias sobre los niveles de Ca^{2+} libre que se alcanzan dentro de las mitocondrias durante la estimulación celular. Mientras algunos autores, como se

menciona más arriba, miden aumentos de $[Ca^{2+}]$ en la mitocondria de 50-500 μ M, otros autores mantienen que los sistemas tampón de la mitocondria y la precipitación de especies complejas de Ca^{2+} y fosfato impiden que la $[Ca^{2+}]$ mitocondrial suba por encima de 2-5 μ M (Chalmers and Nicholls, 2003; Nicholls, 2005).

El Ca^{2+} entra en la mitocondria gracias a la existencia de una diferencia de potencial eléctrico en la membrana mitocondrial interna (-130/-180mV), generada por el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana mediante la cadena de transporte electrónico. Estos protones solo pueden volver al interior de la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa (Stock et al., 1999). Este potencial de membrana se puede disipar bien inhibiendo el bombeo de protones por parte de la cadena de transporte electrónico con compuestos como la rotenona o el cianuro, o con protonóforos que introducen protones en la matriz mitocondrial como el FCCP. Bajo estas circunstancias, con el potencial de membrana disipado, la ATP sintasa puede funcionar de manera reversa, sacando protones de la matriz mitocondrial con gasto de ATP.

La demostración de que las mitocondrias son capaces de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} bajo estimulación con agonistas, implica el tomar muy en cuenta a este orgánulo cuando se habla de la capacidad amortiguadora total del citosol. Esta alta capacidad amortiguadora por parte de las mitocondrias tiene una gran influencia en las señales intracelulares de Ca^{2+} y por lo tanto en la función celular. Esta regulación se puede llevar a cabo mediante dos estrategias diferentes.

En primer lugar, la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria es capaz de regular la actividad de los canales de Ca^{2+} , tanto de retículo endoplásmico como de membrana plasmática. Las mitocondrias toman el Ca^{2+} citosólico de los microdominios de alto Ca^{2+} generados en las bocas de los canales del RE o la membrana plasmática, disminuyendo así la $[Ca^{2+}]$ citosólica local y modulando la actividad de dichos canales. El Ca^{2+} citosólico disponible modula estos canales de Ca^{2+} bien inhibiéndolos o activándolos dependiendo de la $[Ca^{2+}]$. Por ejemplo, $[Ca^{2+}]$ citosólicas muy bajas o muy altas inhiben el receptor de IP_3 del RE, mientras que $[Ca^{2+}]$ intermedias lo activan, por lo que en este caso, las mitocondrias cercanas al canal, secuestran parte del Ca^{2+} liberado, permitiendo que el canal se mantenga abierto por más tiempo (Jouaville et al., 1995). En células cardiacas, la liberación de Ca^{2+} se produce a través de los receptores de rianodina. En este caso, las mitocondrias también son capaces de reducir la frecuencia y amplitud de los incrementos de Ca^{2+} citosólicos, controlando así

el acoplamiento entre excitación y contracción (Pacher et al., 2002). Los canales de Ca^{2+} de membrana plasmática también se ven afectados en mayor o menor medida por esta regulación mitocondrial.

Por otra parte, la distribución espacial de las mitocondrias dentro de tipos celulares concretos, controla el gradiente de Ca^{2+} dentro de dichas células. La capacidad amortiguadora de las mitocondrias puede conseguir que grandes cantidades de Ca^{2+} se acumulen en un dominio subcelular concreto. Esto sucede, por ejemplo en neuronas, donde las mitocondrias se acumulan en el terminal sináptico y modulan cuidadosamente el proceso de liberación de neurotransmisores (David & Barrett, 2003). En las células acinares pancreáticas sucede algo parecido. En estas células las mitocondrias se acumulan formando un “cinturón” y evitando que las señales de Ca^{2+} se propaguen más allá de la zona apical, donde se produce la secreción vesicular (Voronina et al., 2002).

Las mitocondrias poseen una vía principal de entrada de Ca^{2+} , el MCU y dos mecanismos de salida de Ca^{2+} , el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. Aunque estos mecanismos de entrada y salida de la mitocondria han sido estudiados fisiológicamente durante muchos años, sus identidades moleculares no han sido resueltas hasta hace poco. La identificación de los genes que codifican para estos transportadores, así como la de nuevas proteínas implicadas en su regulación, ha permitido la apertura del estudio del Ca^{2+} mitocondrial a nuevos horizontes.

2.4a. Entrada de Ca^{2+} en la mitocondria

Para que la entrada de Ca^{2+} se produzca, es necesario que el ion sea transportado a través de las dos membranas mitocondriales. La membrana mitocondrial externa no opone resistencia al transporte de iones, ya que todos ellos pueden difundir libremente a través del VDAC. La membrana mitocondrial interna por el contrario, es altamente selectiva, y la entrada de Ca^{2+} solo se produce mediada por el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial.

- El uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU)

La entrada de Ca^{2+} a través del MCU se produce únicamente, gracias a la existencia de un gradiente electroquímico. El MCU se ha descrito como un canal de alta selectividad por Ca^{2+} pero de baja afinidad por el ion (Kirichok et al., 2004). Esto

sugiere que es necesaria una alta concentración de Ca^{2+} para activar el transporte. Sin embargo, el pico de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico que se obtiene en respuesta a estímulos fisiológicos está habitualmente en torno o por debajo de $1\mu\text{M}$. Esta aparente discrepancia fue resuelta con la demostración de la existencia de los dominios de alto Ca^{2+} y la estrecha relación entre las mitocondrias y los lugares donde se producen dichos microdominios (las bocas de los canales de Ca^{2+} de RE o membrana plasmática) (Szalai et al., 2000; Csordas et al., 2001). En estos puntos de contacto, el MCU es capaz de detectar las altas $[\text{Ca}^{2+}]$ generadas por los microdominios, activándose e introduciendo grandes cantidades de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. La magnitud de estos microdominios, en términos de $[\text{Ca}^{2+}]$, puede ser hasta 10 veces mayor que en el conjunto global del citosol (Giacomelo et al., 2010, Csordas et al., 2010) y puesto que el propio Ca^{2+} actúa como un modulador de la actividad del uniportador, la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]$ de los microdominios devuelve al uniportador a su estado de reposo inactivado y listo para responder ante sucesivos estímulos.

El MCU es inhibido de forma no competitiva por compuestos derivados del rutenio, como el rojo de rutenio y el Ru360 (este último de manera más específica), lantánidos, y por el también inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana plasmática KB-R7943 (Bernardi et al., 1984; Mela, 1969; Santo-Domingo et al., 2007). Entre los activadores más destacados del MCU podemos encontrar la espermina, el PPT, y el Kaempferol (Kroner, 1988; Lobaton et al., 2005; Montero et al., 2004).

En el año 2011, dos grupos independientes identificaron el gen *CCDC109A* como la secuencia que codificaba para el MCU. Los resultados obtenidos tanto con la sobreexpresión como con el silenciamiento de esta nueva proteína parecen indicar que, efectivamente, se trata del tan buscado uniportador (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011). La proteína tiene un tamaño de 40kD y está formada por dos dominios transmembrana. Esta estructura por sí sola no es capaz de formar un canal, así que es probable que oligomerice formando un multímero, aunque aún son desconocidos tanto el número de integrantes como su disposición espacial. Se ha propuesto una posible conformación tetramérica y la posible participación de un nuevo componente llamado MCUB que actuaría como un dominante negativo cuando forma heteromultímeros con el MCU (Raffaello et al., 2013).

Asociado a este canal, también han sido descritas en los últimos años algunas proteínas que podrían estar participando en la regulación funcional de dicho canal y cuya presencia es fundamental para su correcto funcionamiento. Los moduladores

descritos hasta el momento son: MICU1, MICU2, y MCUR1. Estas proteínas aún no están del todo caracterizadas y sus funciones concretas se encuentran actualmente bajo un estudio exhaustivo (Perocchi et al., 2010; Csordas et al., 2013; Plovanich et al., 2013; Mallilankaraman et al., 2012). Muchas de estas proteínas reguladoras poseen sitios de unión tipo EF-Hand por lo que inhibidores competitivos clásicos del MCU como pueden ser el Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} y el propio Ca^{2+} (Carafoli et al., 1965; Drahota et al., 1969) podrían no solo estar uniéndose al MCU, sino también a alguno de estos moduladores.

Por último, ha sido descrito un modo de captación rápido de Ca^{2+} , cinéticamente diferente a la captación a través del MCU, denominado RaM (Rapid Mode of uptake). Mediante este mecanismo, la mitocondria sería capaz de acumular Ca^{2+} en respuesta a pulsos de Ca^{2+} por encima de 200nM, sin necesidad de llegar a las altas concentraciones presentes en los microdominios. El mecanismo solo ha sido descrito en mitocondrias provenientes de hígado y corazón, bajo pulsos de entre 1 y 10 segundos (Sparagna et al., 1995; Buntinas et al., 2001). Esta captación parece ser un modo alternativo de funcionamiento del MCU ya que se ve afectado por los mismos inhibidores y activadores (Gunter & Gunter, 2001).

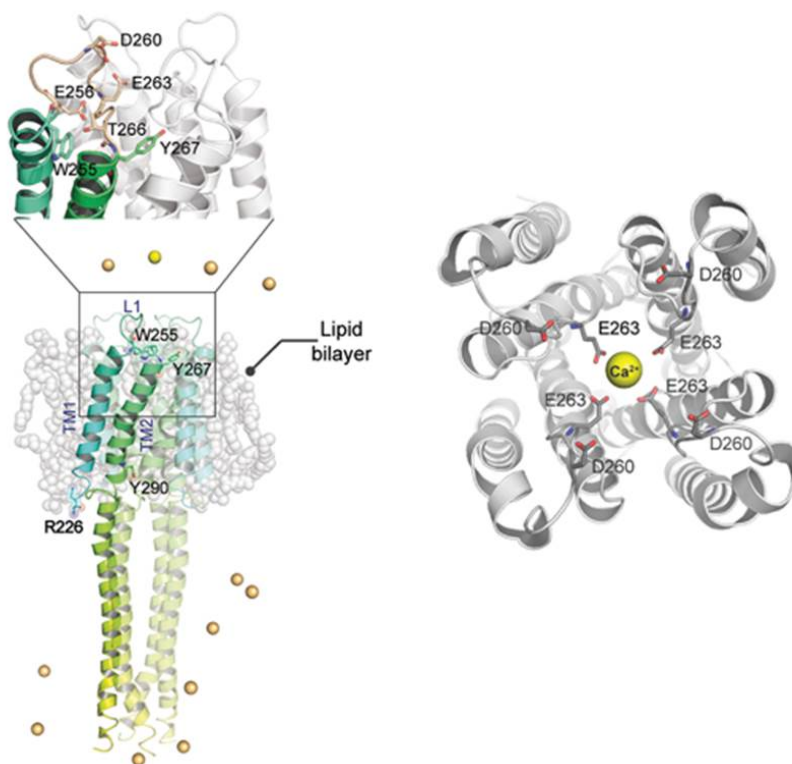


Figura 11: Representación tridimensional de la posible estructura cuaternaria del MCU, formando un oligómero con sus cuatro subunidades (Modificada de Raffaello et al., 2013).

2.4b. Salida de Ca^{2+} de la mitocondria

Cuando el estímulo que ha provocado la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria termina, este Ca^{2+} es liberado a través de dos mecanismos principales, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. Esta liberación al cese del estímulo provoca el “hombro” característico de la cinética de Ca^{2+} citosólica, permitiendo que el incremento citosólico se alargue unos instantes (Simpson et al., 1998).

- Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCLX)

Este intercambiador es la principal vía de salida de Ca^{2+} de la mitocondria y su activación es continua siempre y cuando exista Na^+ disponible en el citosol. La velocidad de salida de Ca^{2+} a través de este intercambiador es función de la $[\text{Na}^+]$ presente en el citosol, intercambiándose en el proceso al menos tres iones de Na^+ por cada Ca^{2+} (Dash & Beard, 2008; Palty et al., 2006). El intercambiador presenta una alta selectividad por Ca^{2+} frente a Mg^{2+} o Mn^{2+} , sin embargo solo tiene una selectividad moderada por Na^+ , pudiéndose sustituir éste fácilmente por Li^+ (Carafoli et al., 1974). Aunque el NCLX había sido descrito previamente en membrana plasmática (Palty et al., 2004), posteriormente se observó que esta misma proteína estaba localizada principalmente en la membrana mitocondrial interna en vez de en la membrana plasmática. Los resultados obtenidos con el NCLX mitocondrial concordaban con los ya existentes relacionados con el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, lo que condujo a la identificación del NCLX como dicho intercambiador (Palty et al., 2010). La tardía identificación de este transportador fue debida a que durante muchos años se pensó que éste era una isoforma del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana plasmática, sin embargo no es así, ya que sus características físico-químicas son diferentes.

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ esta modulado por varios iones y moléculas. Su actividad está regulada estrechamente en un rango de pH entre 7,5 y 7,6 aunque no está claro si es debido a un sensor de pH o a que se encuentra localizado cerca de otros transportadores como el Na^+/H^+ (Baysal et al., 1991). La actividad del NCLX esta potenciada por K^+ , alcoholes de cadena corta y albúmina de suero bovina, por el contrario se ve inhibido por iones como Zn^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} o Ba^{2+} (Liguetti et al., 1981; Lukacs & Fonyo, 1986). Existen otros inhibidores como el diltiazem, el verapamil, y el amiloride, aunque el más selectivo y efectivo es la benzodiazepina CGP-37157 (Matlib et al., 1983; Chiesi et al., 1988).

Fisiológicamente, el NCLX está regulado por las proteína-quinasas PKC y PINK1, y por la proteína BCL-2 (Gandhi et al., 2009; Baines et al., 2003; Zhu et al., 2001).

- Intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ de membrana plasmática

Recientemente se ha identificado a la proteína Letm1 como uno de los componentes del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ mitocondrial (Jiang et al., 2009). La proteína fue identificada gracias a que es la única capaz de cambiar la $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial y el pH al mismo tiempo. Esta proteína se encuentra localizada en la membrana mitocondrial interna y cataliza la salida de un ión Ca^{2+} por cada H^{+} introducido, por lo que el proceso global es electrogénico. La estructura predicha para esta proteína es de un dominio transmembrana, un extremo C-terminal hacia el lado intermembrana con dos dominios EF-hand y un dominio N-terminal hacia la matriz susceptible de fosforilación por la PKC (Endele et al., 1999). Letm1 es capaz de transportar Ca^{2+} cuando éste se encuentra a concentraciones en el rango nanomolar, por lo que su afinidad es muy alta aunque su tasa de transporte sea baja (Jiang et al., 2013). Estos resultados relacionados con Letm1 son aún muy recientes y no está claro si esta proteína participa realmente en el transporte de Ca^{2+} o si funciona únicamente como intercambiador $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ (Nowikovsky et al., 2012).

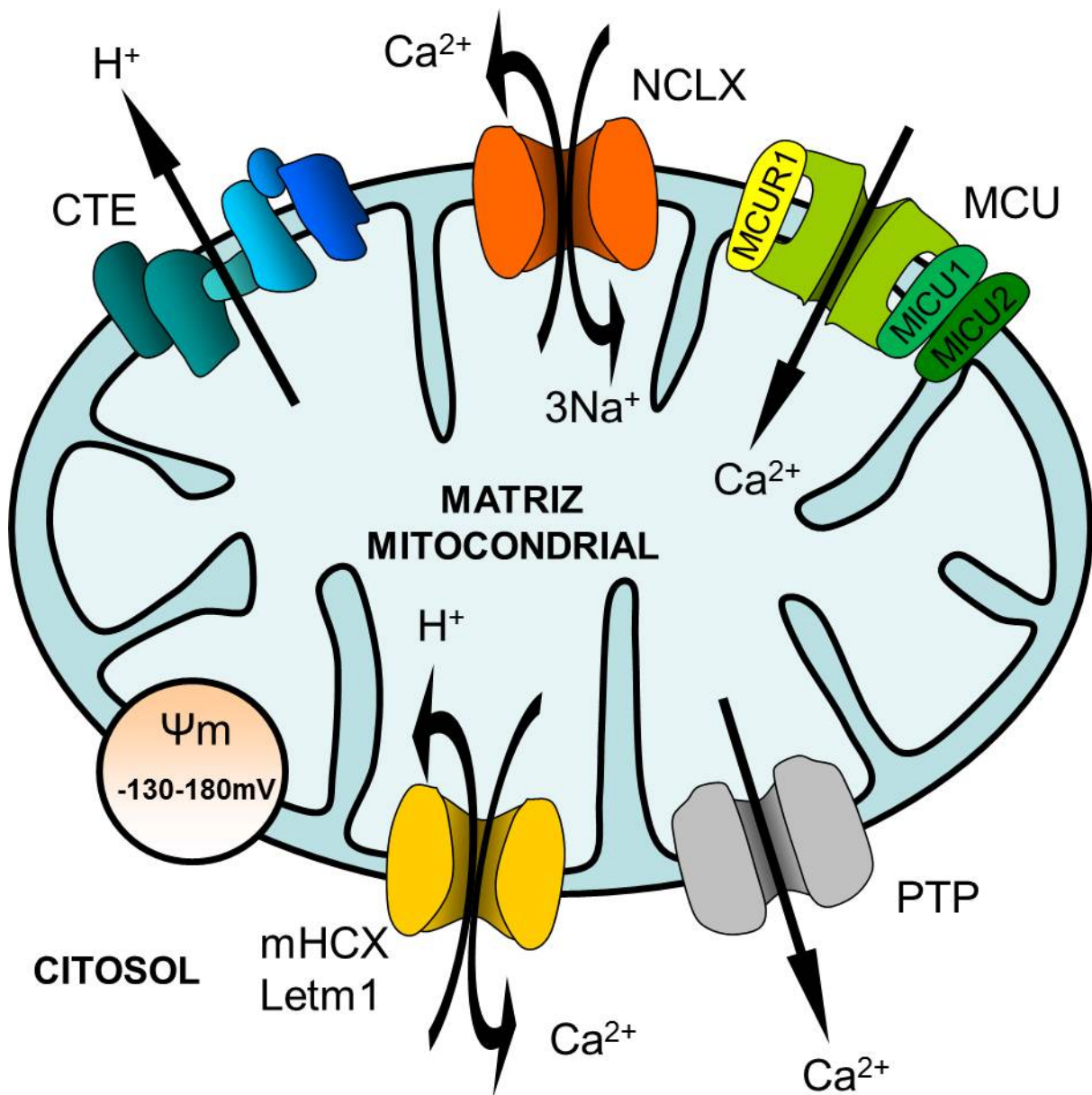


Figura 12: Diagrama de la mitocondria y de los principales transportadores implicados en los flujos de Ca^{2+} mitocondriales. Cadena de transporte electrónico (CTE), intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial (NCLX), uniportador de calcio mitocondrial (MCU), proteínas reguladoras de uniportador de calcio mitocondrial (MICU1, MICU2, MCUR1), intercambiador H^+/Ca^{2+} mitocondrial (mHCX) y el poro de transición de permeabilidad.

2.5. Apoptosis y PTP

La apoptosis o muerte celular programada, está controlada por multitud de rutas de señalización y una de ellas implica activamente a la mitocondria y a la sobrecarga de Ca^{2+} en el interior de la matriz mitocondrial. Tal y como se ha descrito anteriormente, el Ca^{2+} participa activamente como segundo mensajero, pero alteraciones de dicha señalización, ya sean fisiológicas o patológicas, pueden desencadenar los procesos apoptóticos que terminarán con la vida de la célula. Si por algún motivo el Ca^{2+} se mantiene elevado durante mucho tiempo en el citosol, la mitocondria acumulará continuamente Ca^{2+} en su interior. Esta sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial junto con otros factores como el estrés oxidativo (producción de ROS) o la producción de ceramidas de cadena corta análogas de la C2, provocarán en última instancia la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) (Jacobson & Duchon, 2002; Davidson et al., 2012). La apertura de este poro provoca la liberación de señales pro-apoptóticas como SMAC/DIABLO, AIF o el citocromo c, y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial con la consecuente incapacidad de formar ATP y la consiguiente muerte celular (Liu et al., 1996; Verhagen et al., 2000; Smaili et al., 2000).

Algunos mecanismos que reducen esta entrada de Ca^{2+} en la mitocondria han sido propuestos como elementos anti-apoptóticos. Por ejemplo, las proteínas de la familia BCL-2 y BCL-XL disminuyen los niveles de Ca^{2+} en el interior del RE, provocando que, frente a un estímulo, la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria sea menor, disminuyendo la probabilidad de apertura del PTP (Pinton et al., 2000; White et al., 2005). Por otra parte aquellos factores que inducen la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria actúan como mecanismos pro-apoptóticos, entre ellos podemos encontrar las proteínas BAX, BAK o el supresor de tumores (FHIT) (Jones et al., 2007; Rimessi et al., 2009).

Aunque el fenómeno de apertura del PTP y su relación con la muerte celular y situaciones patológicas fue descrito en los años 70 (Hunter et al., 1976), después de décadas de investigación, aun no se conoce ni su composición ni los mecanismos que lo activan específicamente. El PTP se conoce clásicamente como un canal iónico de alta conductancia que abarca ambas membranas mitocondriales, y que es capaz de provocar un aumento súbito en la permeabilidad de las membranas mitocondriales. Gracias a su apertura son liberados solutos y moléculas de pesos inferiores a 1,5kD, causando el colapso del gradiente de protones (Hoek et al., 1995; Bernardi & Petronilli,

1996). Además, su apertura provoca un aumento de volumen de la matriz mitocondrial por efecto osmótico, que puede llevar a la rotura de la membrana mitocondrial externa con liberación de los contenidos del espacio intermembrana al citosol. El PTP ha sido descrito en muchos organismos eucariotas, tanto mamíferos como no mamíferos y su localización parece estar preferentemente en los puntos de contacto entre las membranas internas y externas facilitando así las posibles interacciones proteína-proteína y los cambios conformacionales (Vyssokikh et al., 2003).

Las propuestas actuales sobre la formación del PTP son variadas. Durante mucho tiempo se asumió que el PTP estaría formado por un complejo multiproteico que incluiría diversos componentes como la ciclofilina D, creatin quinasa, VDAC, la hexoquinasa y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) (Beutner et al., 1998; Halestrap et al., 1997). Sin embargo, diversos estudios de knock-out realizados con estos posibles componentes no consiguieron en ningún caso abolir la actividad del PTP, lo que ha llevado a propuestas alternativas sobre su estructura que aún están en debate (Halestrap, 2009). Se ha propuesto también que el PTP puede tener dos estados, uno de baja conductancia, dependiente de pH y en el que solo se permite la difusión de pequeñas moléculas como Ca^{2+} y H^+ y otro de gran conductancia que desencadena los procesos apoptóticos (Icha & Mazat, 1998).

Con el paso del tiempo se han ido identificando diversos activadores del poro en su modalidad de alta conductancia como por ejemplo el Ca^{2+} , cambios de pH, estado redox de la mitocondria, especies reactivas de oxígeno. (Zoratti & Szabo, 1995; Vercesi et al., 1997) Entre los activadores no fisiológicos podemos destacar algunos inhibidores de ANT como el atractilósido, agentes oxidantes, ditioles oxidados y reductores del potencial de membrana.

Por otra parte la ciclosporina-A fue descrita como el primer inhibidor (temporal) de la apertura del PTP, debido a su interacción con la ciclofilina-D causando su disociación del complejo de PTP (Broekemeier et al., 1989). Existen otros inhibidores de la formación del PTP como el ácido bongkrékico, la ubiquinona o el glutamato, aunque estos últimos pueden tener efectos indeseados sobre otras dianas celulares (Halestrap et al., 2003; Fontaine et al., 1998; Gincel et al., 2000).

III. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR

Debido a la importancia y complejidad de los procesos en los que está implicado el Ca^{2+} intracelular, durante las últimas décadas se han ido desarrollando nuevos métodos que permiten estudiar la dinámica del Ca^{2+} en cada uno de los orgánulos celulares. Estos métodos se encuentran en continua evolución, lo que permite acercarse cada vez más a la realidad fisiológica de la dinámica del Ca^{2+} intracelular.

Los indicadores de Ca^{2+} más ampliamente utilizados en la actualidad se pueden dividir en dos grupos, por un lado los fluoróforos químicos y por otro lado los indicadores de Ca^{2+} codificados genéticamente (GECIs). Dentro de este último grupo, los indicadores pueden ser fluorescentes o bioluminiscentes (Perez-Koldenkova & Nagai, 2013). Todos estos métodos solo son capaces de unir e interactuar con iones de Ca^{2+} difusibles. Este hecho es importante debido a que la mayoría del calcio se encuentra unido a tampones celulares, en una relación de 100 a 1 en el caso del citosol y 10 a 1 en el caso del retículo endoplásmico (Roderick et al., 2000; Raeymaekers, 1998). Todos los indicadores de Ca^{2+} actúan en sí mismos como tampones, por lo que hay que prestar especial atención no solo a sus características espectrales, sino también a sus propiedades de unión a Ca^{2+} . El término constante de disociación K_d describe con cuánta afinidad se une el Ca^{2+} a ese indicador en concreto. La K_d se mide en unidades molares y se corresponde con la $[\text{Ca}^{2+}]$ a la que la mitad de las moléculas del indicador se encuentran unidas a Ca^{2+} . Los indicadores, por lo tanto, son ideales para medir $[\text{Ca}^{2+}]$ que varían entre 0,1 y 10 veces su K_d .

En el caso de los fluoróforos químicos, su mayor ventaja es el amplio rango de afinidad por Ca^{2+} que poseen y que son muy fáciles de encontrar comercialmente. Así mismo son muy rápidos y fáciles de introducir a nivel celular. Por el contrario, estos indicadores son muy difíciles de dirigir a orgánulos concretos y además es posible que sean eliminados de la célula durante experimentos largos (Rehberg et al., 2008; Palmer & Tsien, 2006). La mayoría de estos indicadores poseen una K_d en el rango submicromolar (0.1-1 μM) y solo algunos en niveles micromolares bajos (<30 μM). Algunas raras excepciones poseen afinidades más bajas por Ca^{2+} (Paredes et al., 2008).

Dentro de los GECIs fluorescentes se pueden encontrar diferentes variantes (Whitaker, 2010). En primer lugar, los indicadores basados en FRET (Föster Resonance Energy Transfer) en los que dos proteínas fluorescentes derivadas de GFP se encuentran unidas por el péptido M13 y una calmodulina. A estos sensores se les dio el nombre de Camaleons y su funcionamiento se basa en un aumento de la fluorescencia del segundo fluoróforo, gracias al acercamiento ente ambos producido por la unión de Ca^{2+} a la calmodulina y resultando una transferencia de energía entre el primero y el segundo (Miyawaki et al., 1997). Estos constructos fueron pioneros y a partir de ellos fueron desarrollándose nuevos indicadores. El siguiente paso consistió en emplear un solo fluoróforo unido a la calmodulina y al péptido M13 generando así los GCaMP, Pericams y Camgaroos (Baird et al., 1999; Nagai et al., 2001; Nakai et al., 2001). Los GCaMP son fluoróforos de excitación y emisión simple, por su parte el Pericam posee una variante ratiométrica de doble excitación, lo que significa que en presencia de Ca^{2+} la fluorescencia de una de las longitudes de onda va a aumentar y la otra disminuir. Por último, la característica principal de los Camgaroos es que solo son capaces de emitir fluorescencia en presencia de Ca^{2+} .

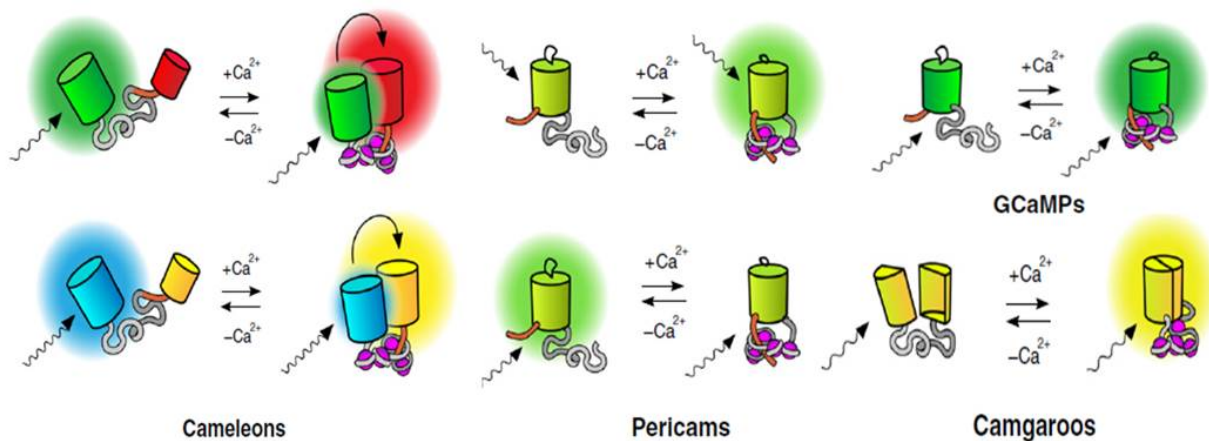


Figura 13: diagramas de los mecanismos de funcionamiento de los diferentes GECIs fluorescentes, Camaleons, Pericams, GCaMPs y Camgaroos. (Perez-Koldenkova & Nagai, 2013).

INTRODUCCIÓN

Incluida dentro de los GECIs bioluminiscentes, se encuentra la aequorina. Aunque ha sido la más ampliamente utilizada como indicador de Ca^{2+} *in vivo*, no es el único sensor bioluminiscente ya que existen otros como la obelina, la clitina, la mitrocomina y la fotina (Markova et al., 2002; Inouye & Sahara, 2007; Inouye & Sahara, 2009; Bovolenta et al., 2007). La aequorina fue el primer indicador de Ca^{2+} y sus formas recombinantes pueden ser fácilmente dirigidas a orgánulos como las mitocondrias o el retículo endoplásmico. A diferencia de los GECIs fluorescentes son capaces de emitir luz por sí mismas, sin necesidad de ser excitadas, pero tienen el inconveniente de que la reacción de emisión de luz es irreversible durante el experimento (Shimomura et al., 1963). La aequorina se puede fusionar con la GFP dando lugar a la técnica conocida como BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) que curiosamente emula a la reacción fisiológica llevada a cabo por la medusa *Aequorea victoria* en su medio marino (Gorokhovatsky et al., 2004).



Figura 14: diagramas de los mecanismos de funcionamiento de los diferentes GECIs bioluminiscentes, Aequorina y la técnica BRET basada en la fusión de la Aequorina y la GFP (Perez-Koldenkova & Nagai, 2013).



OBJETIVOS

Debido a la gran importancia que poseen las mitocondrias como reguladoras de las señales de Ca^{2+} intracelulares, y las discrepancias que aún existen sobre cuestiones tan básicas como los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]$ que se pueden alcanzar en la matriz mitocondrial o los requerimientos de $[\text{Ca}^{2+}]$ en la matriz mitocondrial para la apertura del poro de transición de permeabilidad, nos hemos planteado como objetivo básico de este trabajo estudiar en detalle la dinámica de los flujos de entrada y salida de Ca^{2+} de la mitocondria bajo diversas condiciones experimentales y aplicando toda una variedad de métodos de medida.

Con este fin, los objetivos específicos marcados para esta tesis serán los siguientes:

1. Poner a punto y validar nuevos métodos para medir la concentración de Ca^{2+} mitocondrial en todos los rangos de concentración, desde el nivel micromolar al milimolar. Con el fin de obtener resultados más fiables, utilizaremos además diversos tipos de sondas, por un lado GECIs, tanto luminiscentes como fluorescentes, y por otro lado colorantes fluorescentes sensibles a Ca^{2+} .

2. Utilizando las diversas técnicas generadas en el punto anterior, estudiar la dinámica de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial bajo distintas condiciones, obteniendo información sobre los siguientes puntos:

- Los flujos de entrada y salida de Ca^{2+} de la mitocondria en células permeabilizadas, en presencia de concentraciones de Ca^{2+} citosólicas conocidas.

- La dependencia del nivel de Ca^{2+} mitocondrial en células permeabilizadas con la concentración de Ca^{2+} y de fosfato citosólicas, y el papel de la precipitación de fosfato cálcico.

- La dependencia de Ca^{2+} de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

- La dinámica de Ca^{2+} mitocondrial en células intactas bajo diversos niveles de estimulación.



MATERIALES Y MÉTODOS

I. CULTIVOS CELULARES

1. Líneas celulares

En este estudio se ha utilizado la línea celular HeLa como modelo para la realización de los diferentes experimentos. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada en los laboratorios de todo el mundo desde mediados de los años 50. La línea celular proviene en su origen de una muestra de cáncer cérvico-uterino humano, perteneciente a la paciente Henrietta Lacks, de ahí su acrónimo. Esta línea celular fue la primera en cultivarse con éxito *in vitro*, demostrando ser particularmente efectiva tanto en velocidad de crecimiento como en perdurabilidad temporal. Aunque el cariotipo actual de esta línea dista mucho del cariotipo humano habitual (Macville et al., 1999), es una línea utilizada en cualquier tipo de estudio científico, como por ejemplo los relacionados con el cáncer, sustancias tóxicas, SIDA, mapeo genético, etc...

2. Mantenimiento de la línea celular HeLa

Las células fueron cultivadas en frascos Nunc de plástico de 25cm² cuyo tapón a rosca posee un filtro de 0,2mm de tamaño de poro en una membrana hidrofóbica. Las células se mantuvieron creciendo en 5-6ml de medio DMEM + GlutaMAX I (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 5%, penicilina 100 UI/ml y estreptomina también 100UI/ml. Estos frascos se guardaron en un incubador Hera cell (Heraeus) manteniendo constante la temperatura a 37°C, con una concentración de CO₂ del 10% y un ambiente saturado de humedad.

Cuando las células alcanzaban la confluencia, pero encontrándose aún en monocapa, se tripsinizaron para mantenerlas en condiciones óptimas. Para la realización de este proceso se procedió a retirar el medio en el que se encontraban las células y posteriormente se lavaron con 2-3 ml de tampón salino fosfato. Una vez retirado el tampón salino, la monocapa quedaba limpia de posibles células muertas y otros detritus. A continuación se añadió 1ml de una solución de tripsina-EDTA al 0.05% y se colocó el frasco encima de una placa calefactora a 37°C durante 3-4 minutos, hasta que las células quedaron completamente en suspensión. A continuación, se añadió sobre la solución de tripsina 6ml de medio DMEM, para inactivar la tripsina y a su vez poder recoger todas las células, transfiriéndolas a un

tubo de fondo cónico de 10ml y tapón a rosca. Estas células se centrifugaron a 1200rpm durante 5 minutos. Al finalizar la centrifugación, se decantó todo el medio de cultivo, y las células fueron resuspendidas en 1 ml del mismo medio. De este mililitro de medio se tomó una alícuota de 10 μ l y se diluyó 10 veces para poder ser contada en una cámara de Neubauer (el 50% de la dilución contenía el colorante vital azul tripán). Una vez calculado el número total de células que había en el frasco, se tomó el volumen necesario para que volvieran a quedar en el frasco en torno a 100.000 células, lo que permitió seguir manteniendo el cultivo celular en condiciones óptimas.

3. Siembra de células

Para la realización de los experimentos fue necesario sembrar las células en cubreobjetos redondos de 12 ó 13mm de diámetro para su posterior uso en el microscopio de fluorescencia o en el equipo de medida de aequorina (aequorinómetro), respectivamente. Estos cubreobjetos redondos fueron colocados previamente en el fondo de cada uno de los pocillos de placas de 4 ó 24 pocillos para su posterior siembra. Cuando el frasco de cultivo se encontraba a confluencia se procedió a tripsinizar las células de la misma manera que se ha descrito para el mantenimiento de los cultivos celulares. Una vez realizado el contaje, se calcularon las células necesarias para realizar los experimentos, y se sembraron 100.000 células por pocillo para experimentos a las 24 horas desde la transfección ó 80.000 células por pocillo para experimentos a las 48 horas desde la transfección. En el caso de que las células fueran a ser usadas en el microscopio de fluorescencia sin necesidad de transfección, se sembraron 80.000 células por pocillo. La alícuota de células se tomó del mililitro en el que fueron resuspendidas y se añadió al volumen correspondiente de medio, teniendo en cuenta que se utilizó 1ml por pocillo en las placas de 24 pocillos ó 0,5ml en las placas de 4 pocillos. El volumen final de medio que contenía las células necesarias se repartió en cada uno de los pocillos (con el cubreobjetos ya colocado en el fondo del pocillo) teniendo especial cuidado de que el cubreobjetos se mantuviera en el fondo, para que así las células se adhirieran mayoritariamente a la cara superior del cubre. Una vez finalizado el proceso, la placa se colocó en el incubador, en las mismas condiciones que los frascos, manteniéndolo en estas condiciones al menos 24 horas antes de la transfección.

4. Transfecciones

La transfección es una técnica mediante la cual se consigue introducir un plásmido circular que contiene un gen de interés con su propio promotor en un tipo celular concreto. La línea celular puede contener o no dicho gen, por lo que con esta técnica se consigue una sobreexpresión de la proteína o la síntesis *de novo* de una proteína exógena.

En las transfecciones se emplearon dos tubos cónicos de 10 ml de capacidad, marcados como tubo A y tubo B. En el tubo A se mezcló medio DMEM sin antibióticos ni suero, con el reactivo de transfección, en este caso Metafectene Pro (Biontex). La cantidad de DMEM añadida fue proporcional a la cantidad de pocillos a transfectar, añadiendo 50µl por pocillo. Lo mismo ocurrió con el Metafectene, pero en este caso la cantidad fue de 2µl por pocillo. En el tubo marcado como B se añadió la misma cantidad de medio DMEM que en el tubo A y una solución acuosa con el DNA de interés (Aequorina nativa dirigida a citosol, Aequorina mutada dirigida a mitocondria o pericam ratiométrico dirigido a mitocondria). La cantidad de DNA añadido fue de 0,5µg por pocillo. En cada caso fue necesario realizar los cálculos para saber cuánto volumen era requerido para tener la cantidad adecuada de DNA, puesto que la concentración de DNA en solución acuosa para cada uno de los plásmidos era variable.

Una vez preparados los dos tubos, se mezcló el contenido del tubo B sobre el contenido del tubo A con cuidado y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Pasado este tiempo se añadieron, gota a gota, 100µl de la mezcla total sobre 500µl de medio a cada uno de los pocillos (debido a que las células fueron sembradas en 1ml de medio, unos instantes antes de la adición de la mezcla de transfección, se retiró el mililitro de medio inicial y se añadieron 500µl de medio nuevo a cada uno de los pocillos). Posteriormente se agitó la placa suavemente y se introdujo de nuevo en el incubador. Para que la expresión de las diferentes proteínas fuera óptima, se esperó entre 24 y 48 horas antes de la realización de cualquier tipo de experimentos con las células transfectadas.

II. MEDIOS, SOLUCIONES Y COMPUESTOS

1. Medios y soluciones

Durante la realización de todos los experimentos presentados en este trabajo se utilizaron diversos medios con diferente composición atendiendo a su propósito. En todos los medios el agua destilada y desionizada actuó como solvente principal, estando disueltas en ella las diferentes sales, tampones, sustratos o quelantes.

Para los experimentos en células intactas se emplearon dos medios, uno con Ca^{2+} 1mM y otro en ausencia de éste, utilizando como quelante de Ca^{2+} el compuesto EGTA. Ambos medios son similares en su composición y osmolaridad al medio extracelular que baña las células en condiciones fisiológicas. El pH de estos medios fue ajustado a 7,4 con NaOH. La composición de estos medios se detalla a continuación.

Tabla 1	Medios extracelulares	
	Medio externo Ca^{2+} 1mM	Medio externo EGTA 0,5mM
NaCl	145mM	145mM
KCl	5mM	5mM
MgCl ₂	1mM	1mM
Glucosa	10mM	10mM
HEPES	10mM	10mM
CaCl ₂	1mM	-
EGTA	-	0,5mM

Tabla 1: Composición de medios extracelulares empleados en los experimentos con células intactas, ajustados a pH 7,4 con NaOH.

En el caso de células permeabilizadas se utilizaron también medios intracelulares de composición y osmolaridad similar a la fisiológica. Se prepararon medios libres de Ca^{2+} (en presencia del quelante EGTA) o con concentraciones de Ca^{2+} conocidas. Para concentraciones de Ca^{2+} entre 3,5 y 20 μM se emplearon medios con el quelante HEDTA y a partir de estos medios se añadieron las cantidades adecuadas de CaCl_2 y MgCl_2 para obtener la concentración de Ca^{2+} deseada. La abreviatura Pi en cada una de las tablas representa el fosfato inorgánico.

Tabla 2 Medios intracelulares libres de Ca^{2+}
(Medio interno EGTA)

	Na⁺ 10mM Pi 1mM (estándar)	Na⁺10mM Pi 0	Na⁺10mM Pi 3mM	Na⁺ 0 Pi 1mM	Na⁺ 0 Pi 0	Na⁺ 0 Pi 3mM
KCl	130mM	130mM	130mM	140mM	140mM	140mM
NaCl	10mM	10mM	10mM	-	-	-
MgCl ₂	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM
H ₂ KPO ₄	1mM	-	3mM	1mM	-	3mM
HEPES	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
Succinato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
Malato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
glutamato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
ATP potásico	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM
ADP	20μM	20μM	20μM	20μM	20μM	20μM
EGTA	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM

Tabla 3 Medios intracelulares para tampones de Ca^{2+}
(Medio interno HEDTA)

	Na⁺ 10mM Pi 1mM (estándar)	Na⁺10mM Pi 0	Na⁺10mM Pi 3mM	Na⁺ 0 Pi 1mM	Na⁺ 0 Pi 0	Na⁺ 0 Pi 3mM
KCl	130mM	130mM	130mM	140mM	140mM	140mM
NaCl	10mM	10mM	10mM	-	-	-
MgCl ₂	4,5mM	4,5mM	4,5mM	4,5mM	4,5mM	4,5mM
H ₂ KPO ₄	1mM	-	3mM	1mM	-	3mM
HEPES	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
Succinato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
Malato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
glutamato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
ATP potásico	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM
ADP	20μM	20μM	20μM	20μM	20μM	20μM
HEDTA	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM

Tabla 4	Tampones de bajo Ca^{2+} 37°C		Tampones de bajo Ca^{2+} 22°C	
	CaCl_2	MgCl_2	CaCl_2	MgCl_2
	$[\text{Ca}^{2+}]$ 3,5 μM	110 μM	1mM	216 μM
$[\text{Ca}^{2+}]$ 4.5 μM	138 μM	1mM	270 μM	0,6mM
$[\text{Ca}^{2+}]$ 5.5 μM	165 μM	1mM	318 μM	0,6mM
$[\text{Ca}^{2+}]$ 7 μM	215 μM	0,9mM	425 μM	0,38mM
$[\text{Ca}^{2+}]$ 10 μM	303 μM	0,82mM	588 μM	0,24mM
$[\text{Ca}^{2+}]$ 20 μM	577 μM	0,57mM	1mM	-

Tablas 2, 3 y 4: Composición de medios intracelulares libres de Ca^{2+} , medios intracelulares con HEDTA para la preparación de tampones de Ca^{2+} y cantidades de CaCl_2 y MgCl_2 necesarias para cada uno de los tampones. Las cantidades de CaCl_2 y MgCl_2 que se indican en la Tabla 4 deben añadirse al medio correspondiente de la Tabla 3 para completar el tampón de la $[\text{Ca}^{2+}]$ indicada. Todos ellos fueron ajustados a pH 7 con KOH.

En los medios con Ca^{2+} de 100 y 200 μM no fue necesaria la adición de quelantes de calcio, debido a que las concentraciones de Ca^{2+} eran suficientemente altas. En esta última tabla se muestran las composiciones de estos medios de alto Ca^{2+} .

Tabla 5	Medios intracelulares para tampones de alto Ca^{2+}					
	Ca^{2+} 100 μM	Ca^{2+} 100 μM	Ca^{2+} 100 μM	Ca^{2+} 200 μM	Ca^{2+} 200 μM	Ca^{2+} 200 μM
	Pi 1mM	Pi 0	Pi 3mM	Pi 1mM	Pi 0	Pi 3mM
KCl	130mM	130mM	130mM	130mM	130mM	130mM
NaCl	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
MgCl_2	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM
H_2KPO_4	1mM	-	3mM	1mM	-	3mM
HEPES	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
Succinato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
Malato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
glutamato	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
ATP potasico	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM
ADP	20 μM	20 μM	20 μM	20 μM	20 μM	20 μM
CaCl_2	100 μM	100 μM	100 μM	200 μM	200 μM	200 μM

Tabla 5: Composición medios intracelulares para tampones de alto Ca^{2+} , ajustados a pH 7 con KOH.

En los medios internos con concentraciones de Na⁺ 2, 5, 7 o 20mM, se añadió NaCl al medio correspondiente sin Na⁺ para obtener la concentración de Na⁺ adecuada.

Para conseguir la correcta permeabilización de las células se perfundió durante un minuto un medio estándar EGTA pero sin ADP ni ATP, con el fin de evitar posibles respuestas celulares ante los mismos. Además, este medio de permeabilización contenía el detergente digitonina a una concentración de 100µM. Gracias a la permeabilización de las células con este detergente, el interior celular se encuentra fácilmente accesible para todos los medios intracelulares que se desee perfundir.

Los diferentes compuestos utilizados fueron disueltos en agua (histamina), DMSO (CGP37157, BHQ), etanol (FCCP, Kaempferol) o metanol (celenterazinas). Todos los compuestos empleados se conservaron a -20°C a excepción de las celenterazinas que se conservaron a -80°C.

2. Compuestos

BHQ:	2,5-di-(t-butyl)-1,4-hidroquinona.
CGP37157:	7-Cloro-5-(2-clorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona.
EGTA:	Etilen glicol-bis(2-aminoetileter)- <i>N,N,N',N'</i> -ácido tetraacético.
FCCP:	Mesoxalonitrilo 4-trifluorometoxifenilhidrazona.
HEDTA:	<i>N</i> -(2-Hidroxietil)etilenediamina- <i>N,N,N'</i> -ácido triacético.
Histamina:	2-(4-Imidazolil)etilamina.
Kaempferol:	3, 5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona.
TMRE:	Tetrametilrodamina etil ester perclorato.
Tempol:	1-Oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxipiperidina
Ko143:	(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,12 <i>aS</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12 <i>a</i> -Octahidro-9-metoxi-6-(2-metilpropil)-1,4-dioxopirazino[1',2':1,6]pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3- ácido propanoico-1,1-dimetiletil ester.
Reversan:	<i>N</i> -[3-(4-Morfolinil)propyl]-5,7-difenilpirazol[1,5- <i>a</i>]pirimidina-3-carboxamida

III. BIOLOGÍA MOLECULAR

1. Constructos y plásmidos

En este trabajo se emplearon diferentes plásmidos que contenían las secuencias genéticas de los GECIs. Estas proteínas son la aequorina citosólica y mitocondrial y el pericam ratiométrico mitocondrial. Todas las secuencias genéticas de dichas proteínas están clonadas en el vector de expresión pcDNA 3.1 (+). Este vector posee un gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, lo que permitió su selección en organismos procariontas.

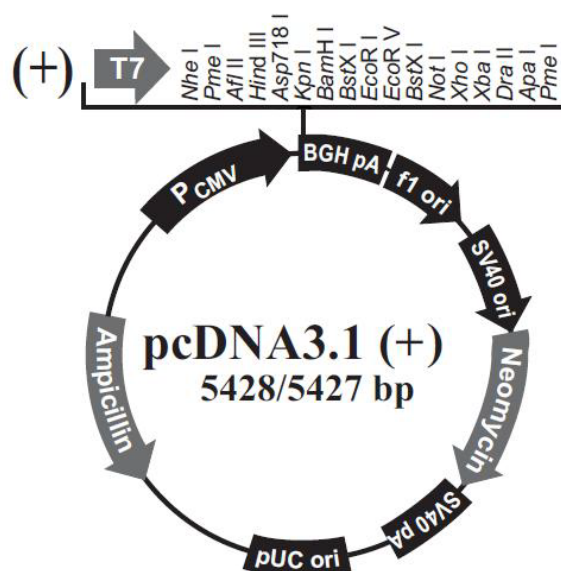


Figura 15: Diagrama del pcDNA 3.1, detallando los sitios de corte para enzimas de restricción situados en el polilinker.

La aequorina está clonada en este vector mediante sitios de corte EcoR I y el pericam en los sitios Hind III y EcoR I.

Todos los insertos, a excepción de la aequorina citosólica, poseen además de la propia secuencia de la proteína, una secuencia de dirección a mitocondria. En el caso de la aequorina esta secuencia es una porción del cDNA codificante para la subunidad VIII de la citocromo c oxidasa humana (Rizzuto et al., 1992) y de la subunidad IV para el pericam ratiométrico (Nagai et al., 2001). En el caso del pericam, esta secuencia de dirección mitocondrial está duplicada para obtener una mejor eficiencia en el envío a la mitocondria (constructo 2mt8PR, ver Filippin et al., 2005).

Las aequorinas incluyen además un dominio HA1 de reconocimiento de anticuerpos para poder determinar su localización (Brini et al., 1995). A continuación se muestran los esquemas de cada uno de los insertos.

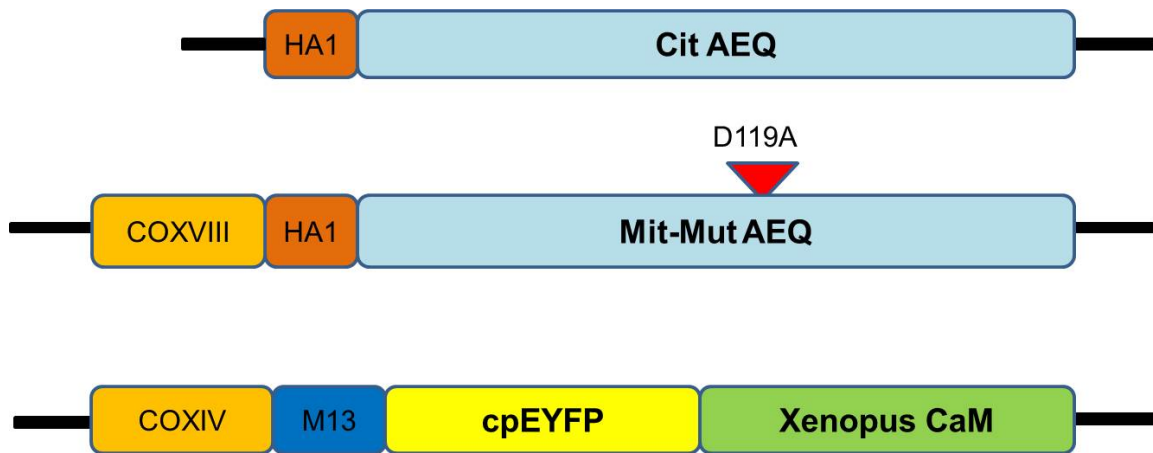


Figura 16: Diagramas de los diferentes insertos empleados: la aequorina citosólica, la aequorina mutada dirigida a mitocondria y el pericam ratiométrico dirigido a mitocondria de arriba hacia abajo.

2. Transformaciones, amplificaciones y extracciones

Para poder amplificar y posteriormente transfectar estos plásmidos en células eucariotas, fue necesario en primer lugar transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α con dichos plásmidos, lo que aseguraba el tener siempre disponibles bacterias para realizar amplificaciones de DNA. La realización de estas transformaciones se hizo siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogene) para esta clase de bacterias en concreto.

Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con 125 μ g/ml de ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C en una estufa. Una vez crecidas las colonias de bacterias que contenían los plásmidos de interés, se tomó una de estas colonias aisladas y se puso a crecer en 2ml de medio líquido LB-broth suplementado también con ampicilina 125 μ g/ml. Las bacterias se dejaron creciendo a 37°C durante un mínimo de 16h en agitación (250rpm en un agitador orbital Innova 4000). Al día siguiente se tomaron 500 μ l de este medio con bacterias y se mezcló con otros 500 μ l de medio de congelación de bacterias, esta mezcla se congeló en criotubos de 2ml a -80°C para su conservación y posterior uso.

El resto de medio con bacterias (1,5ml) fue transferido a otros 40ml de medio LB-broth de nuevo suplementados con 125µg/ml de ampicilina. El cultivo se dejó crecer 24h en agitación a 37°C.

La extracción del DNA plasmídico contenido en estas bacterias se realizó utilizando el kit comercial “Quantum prep® plasmid midiprep” de Biorad, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El DNA obtenido, fue disuelto en agua desionizada estéril y conservado a -20°C hasta su utilización.

3. Mutagénesis dirigida

Mediante esta técnica se realizó la mutación en el aminoácido 28 de la aequorina, cambiando un residuo de asparragina por uno de leucina. Concretamente en la secuencia de DNA se cambiaron dos adeninas por una citosina y una timina (AAT → CTT). Además este cambio introdujo un nuevo sitio de corte para la enzima Sty I, permitiendo así la identificación de secuencias con la nueva mutación fácilmente. Involuntariamente, además de esta mutación, se introdujo una mutación más en el aminoácido 26, cambiando un residuo de asparragina por uno de aspártico. Esta mutación no debería afectar negativamente a la capacidad de unir Ca^{2+} de este EF-hand, por lo que la mutación en el aminoácido 28 debe ser la responsable de la pérdida de afinidad.

En el proceso de realización de esta mutación se empleó el kit de mutagénesis “QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene. El oligonucleótido utilizado fue:

5'-TCAATTCCTTGATGTCGACCACCTTGGAAAATCTCTCTTGACG-3'.

Este kit utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar nuevos plásmidos circulares de hasta 10Kb, a partir de una pareja de oligonucleótidos, en la que uno de ellos contiene la mutación de interés.

La mezcla de reacción, elaborada a partir de las recomendaciones del fabricante, contenía: 5µl de buffer de reacción 10x, 20ng del plásmido original (aequorina mitocondrial mutada en pcDNA 3.1), 125ng del oligonucleótido sense, 125ng del oligonucleótido antisense, 1,5µl de mezcla de nucleótidos y 36,5µl de agua desionizada estéril, lo que completa un volumen total de 50µl. Para llevar a cabo la reacción, a esta mezcla se le añadió 1µl de la polimerasa PFU turbo.

En la reacción de la PCR se utilizó un Mastercycler® personal de Eppendorf utilizando el siguiente programa de ciclos:

Numero de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	1'
25	95°C	50"
	60°C	50"
	68°C	12'
1	68°C	7'

Tabla 6: Programa de ciclos empleado en el termociclador para llevar a cabo el proceso de mutagénesis dirigida.

Al terminar la PCR se añadió al tubo de reacción 1µl de la enzima Dpn I y se incubó en un baño a 37°C durante 2 horas. Con esta digestión se consigue que las hebras de DNA originales sean degradadas mediante esta enzima, ya que corta DNA plasmídico previamente metilado, (los plásmidos originales extraídos de las bacterias DH5α poseen esta metilación) manteniendo intactos los plásmidos mutados obtenidos mediante PCR. Este producto de PCR se utilizó directamente para la transformación de bacterias.

Con el propósito de verificar si la mutación deseada se había generado correctamente, se procedió a digerir el DNA mutado obtenido de varias colonias de bacterias (al menos 4 colonias diferentes), con la enzima de restricción Sty I. El DNA poseía un nuevo punto de corte para esta enzima, generado por la nueva mutación. En la mezcla para la realización de la digestión enzimática se añadieron unos 200-300ng de DNA mutado, 0,5µl de la enzima Sty I, 0,2µl de albumina de suero bovina (BSA), 2µl de tampón de reacción 10x, y se completó con agua desionizada estéril hasta los 20µl de volumen final. Esta mezcla se incubó en un baño a 37°C durante 2 horas para que tuviera lugar la correcta digestión del DNA. Una vez terminada la digestión se corrió un gel de agarosa al 1% durante 1h 30' a 100V que contenía en varios de sus pocillos todo el volumen de la digestión más 4µl del tampón de carga 6x. Las imágenes del gel de agarosa se tomaron mediante un Kodak image station 2000r.

IV. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y MEDIDAS EN EL SISTEMA DE IMAGEN

Las medidas de concentración de Ca^{2+} mitocondrial realizadas mediante GECIs o colorantes fluorescentes, así como las medidas del potencial de membrana mitocondrial se llevaron a cabo en un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert 200. En este apartado se explicarán las generalidades de los experimentos realizados en el sistema de imagen y posteriormente se detallarán las condiciones experimentales para cada una de las proteínas o colorantes fluorescentes en particular.

Para la realización de estos experimentos, las células HeLa fueron sembradas en cubreobjetos redondos de cristal de 12mm de diámetro. Este cubreobjetos se colocó en la parte inferior de la cámara de perfusión del microscopio (RC-25 Warner instruments), manteniéndose el cristal adherido y sellado a la cámara por una fina capa de grasa de silicona colocada en el borde.



Figura 17: Imagen de la cámara de perfusión empleada en el microscopio de fluorescencia.

Las células fueron perfundidas continuamente por gravedad a una velocidad de flujo constante de 5ml/min con diferentes soluciones, todas ellas termostalizadas a 22°C o 37°C según se indique, mediante un calentador on-line de Harvard Apparatus. El paso de las diferentes soluciones se controló mediante un sistema de electroválvulas. Las longitudes de onda de excitación adecuadas se obtuvieron mediante un monocromador Cairn y las imágenes de fluorescencia se registraron mediante una cámara Hamamatsu ORCA-ER. Los registros fueron obtenidos y posteriormente analizados con el programa Metafluor (Universal Imaging).

1. Medidas con los colorantes fluorescentes sensibles a Ca^{2+} derivados del rhod

Las sondas fluorescentes de la familia rhod fueron desarrolladas a partir de moléculas de rodamina, específicamente para realizar medidas de Ca^{2+} intracelular (Minta et al., 1989). El primer colorante de esta familia en ser utilizado fue el rhod-2, cuya fluorescencia presenta unas longitudes de excitación y emisión máxima a 552nm y 581nm respectivamente y una K_d de 570nM. A partir del rhod-2 se han ido desarrollando nuevas variantes con diferentes características, tanto espectrales como de afinidad. Por ejemplo, los X-rhod tienen un espectro más lejano (excitación a 580nm y emisión a 603nm); por otro lado, los colorantes rhod-FF o rhod-5N tienen una menor afinidad por calcio (19 μM y 320 μM respectivamente).

Dentro de esta familia de colorantes podemos encontrar las formas esterificadas de los rhod descritos anteriormente, conocidos como rhod-AM. Estas formas esterificadas, son capaces de atravesar la membrana plasmática y la doble membrana mitocondrial gracias a la presencia del grupo acetoximetil ester, y a su carácter lipofílico, acumulándose en el interior de las mitocondrias gracias a su carga positiva. Una vez en su interior, las esterasas mitocondriales rompen los enlaces éster y liberan los grupos ácido, quedando las moléculas de rhod, ahora ya cargadas negativamente, atrapadas en el interior de la matriz mitocondrial.

En este trabajo se han utilizado el rhod-2, rhod-FF y rhod-5N, todos ellos en su forma AM. El aumento de fluorescencia de cada uno de ellos en presencia de Ca^{2+} permitirá realizar las medidas de Ca^{2+} mitocondrial.

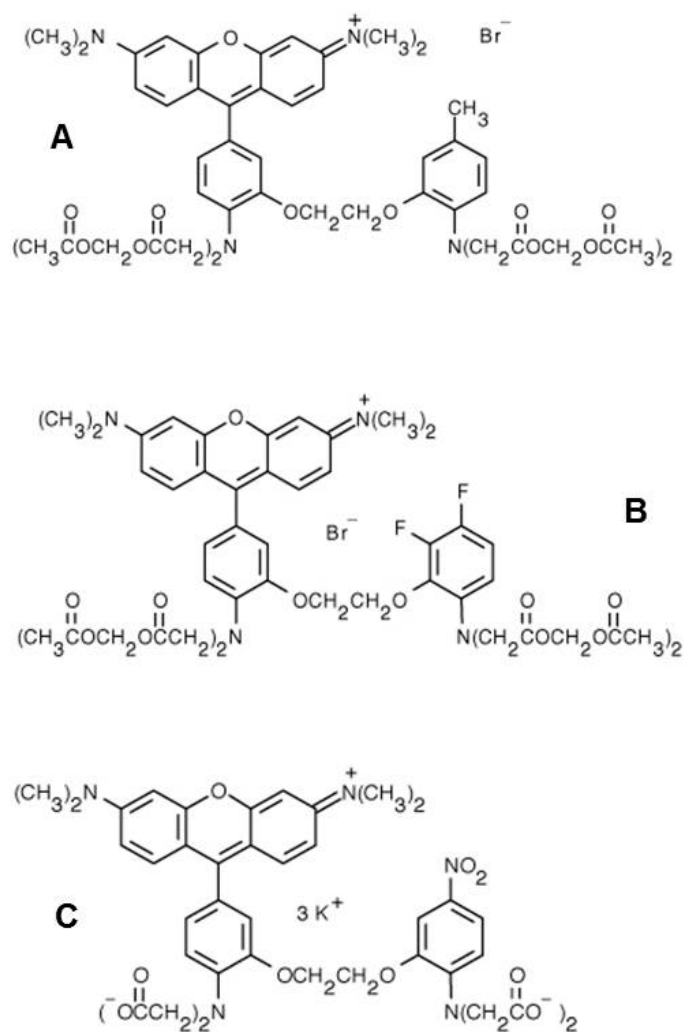


Figura 18: Estructuras moleculares de los compuestos rhod-2 (A), rhod-FF (B), y del rhod-5N (C).

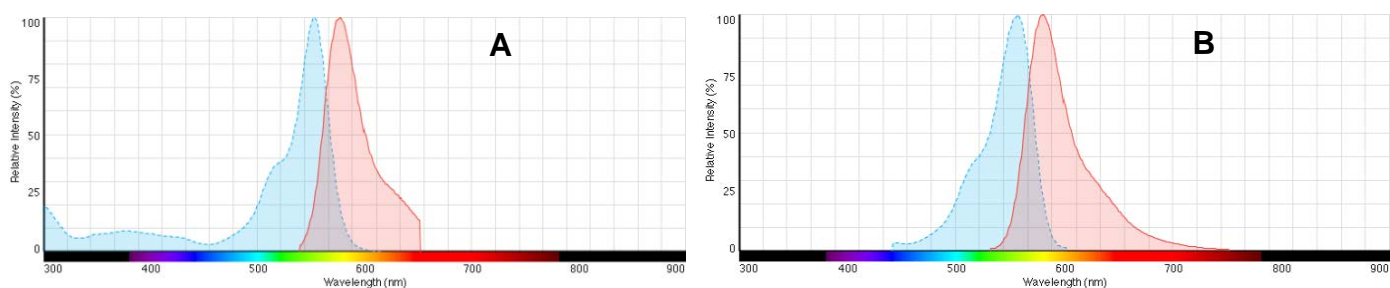


Figura 19: Espectros de excitación y de emisión de los compuestos rhod-2 (A), y rhod-5N (B).

Tipo de rhod	Excitación (nm)	Emisión (nm)	K_d
rhod-2	552	581	570nM
rhod-FF	552	580	19 μ M
rhod-5N	551	576	320 μ M

Tabla 7: Longitudes de onda de excitación y emisión de cada uno de los tipos de rhod, así como la K_d de cada uno de ellos.

Con el objetivo de realizar la conversión de los datos de fluorescencia a datos de concentración libre de Ca^{2+} se empleó la siguiente ecuación (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[Ca^{2+}]_{libre} = K_d \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)}$$

Donde K_d es una constante conocida, F_{max} es la fluorescencia máxima cuando el rhod está saturado de Ca^{2+} , F_{min} es la fluorescencia en ausencia de Ca^{2+} y F es la fluorescencia de la muestra experimental.

Las células HeLa sembradas en cristales de 12mm de diámetro fueron incubadas con los diferentes tipos de rhod-AM disueltos a una concentración de 1-10 μ M (indicado en cada caso) en medio externo Ca^{2+} 1mM durante 30 minutos, posteriormente fueron lavadas otros 30 minutos en medio externo Ca^{2+} 1mM sin rhod, todo ello a temperatura ambiente y bajo una leve agitación (en algunos casos se cargaron las células con Fura-2-AM 2 μ M simultáneamente junto con el rhod, en cuyo caso se indicará). El cristal con las células adheridas se colocó en la cámara de perfusión del modo en que se ha descrito anteriormente y se procedió al inicio del experimento.

Los colorantes fueron excitados a una longitud de onda de 545nm con un ancho de banda de 10nm durante 300ms cada 2 segundos. Los experimentos se realizaron con objetivos Zeiss fluar de 40x o planApo 63x, un espejo dicroico 565DCLP y un filtro de emisión E590LPV2 (ambos de Chroma technology). En el caso de medidas simultáneas de rhod-5N y Fura-2 las células se excitaron consecutivamente a 340, 380 y 550nm usando el monocromador Cairn, un dicroico 73100 y un filtro de emisión 73101, ambos de Chroma Technology. Se empleó en este caso un objetivo fluar 40x. Las imágenes obtenidas se registraron con una cámara Hamamatsu ORCA-

ER, y el análisis de todos los experimentos se realizó con el programa Metafluor. Los experimentos fueron realizados a 22°C o 37°C según se indique.

2. Medidas con el GECI fluorescente pericam ratiométrico

Los GECIs conocidos como pericam fueron creados en el año 2000 mediante técnicas de ingeniería genética para ser utilizadas como sensores de Ca^{2+} . La secuencia codificante para estas proteínas consta de 3 partes. La primera de ellas es la denominada M13, esta región codifica para un péptido de 26 residuos derivado de la región de unión a calmodulina de la quinasa de cadena ligera de la miosina de músculo esquelético. En segundo lugar posee una cpYFP (circularly permuted Yellow Fluorescence Protein) y por último la secuencia de la calmodulina. En este constructo, la calmodulina proporciona el sitio de unión a Ca^{2+} , mientras que la cpYFP emite fluorescencia a diferente intensidad dependiendo de la unión del Ca^{2+} a la región anterior. La unión del Ca^{2+} produce un cambio conformacional causado por la unión de la calmodulina al péptido M13, modificando las intensidades en la fluorescencia (Nagai et al., 2001)

A partir de este pericam original se fueron introduciendo diferentes cambios en la secuencia genética hasta conseguir crear un pericam ratiométrico. Este pericam presenta 2 longitudes de onda de excitación 415 y 494, y una de emisión a 517, siendo su K_d en torno a $2\mu\text{M}$ (Filippin et al., 2005). Gracias a la inclusión de la secuencia COX IV (citocromo c oxidasa, subunidad IV) fue posible dirigir el pericam ratiométrico a mitocondrias.

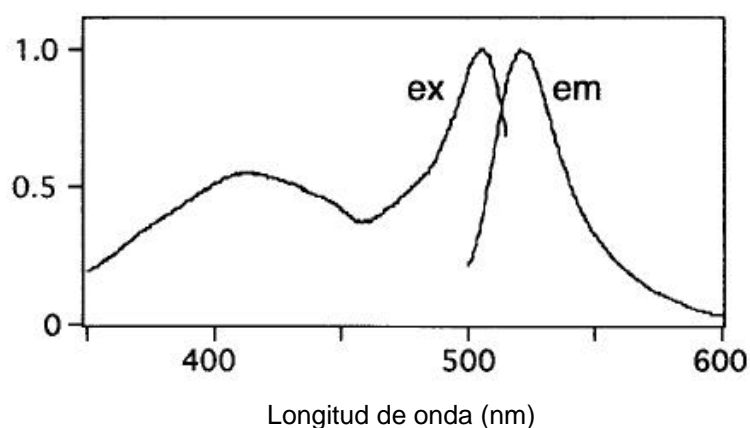


Figura 20: Espectros de excitación y emisión del pericam ratiométrico.

Las células HeLa sembradas en cristales de 12mm de diámetro fueron transfectadas con pericam ratiométrico 48 horas antes de la realización de los experimentos, para que la proteína pudiera expresarse correctamente. Los cristales fueron colocados en la cámara de perfusión de igual modo que se hizo para los experimentos de rhod. En este caso el espejo dicróico usado fue un 505DCXR y el filtro de emisión un HQ535/50m (ambos de Chroma technology). Estos experimentos se realizaron a 22°C y bajo perfusión continua con las diferentes soluciones empleadas. Las células fueron excitadas secuencialmente a las longitudes de onda de 415 y 485 durante 200ms (con 10nm de ancho de banda) cada una y tomando cada par de imágenes a intervalos de 2 segundos. Tanto la cámara como el microscopio fueron los mismos empleados anteriormente.

3. Medidas del potencial de membrana mitocondrial mediante el colorante TMRE

El potencial de membrana mitocondrial se ha medido utilizando el colorante TMRE (Tetrametilrodamina Etil Ester). Este colorante se acumula en el interior de la matriz mitocondrial gracias a su carga neta positiva.

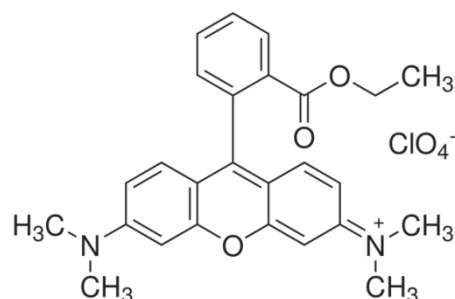


Figura 21: Estructura molecular del TMRE.

Las células HeLa se incubaron en medio externo Ca^{2+} 1mM con 100nM de TMRE durante 1 minuto en agitación. Posteriormente se retiró el medio con TMRE y se lavaron durante otro minuto solo con medio externo Ca^{2+} 1mM. A continuación se añadió rhod-2 AM a una concentración de 5 μM y se procedió al inicio del experimento.

Los experimentos fueron realizados con células HeLa intactas y con perfusión únicamente de medio externo Ca^{2+} 1mM. Las células se excitaron a 540nm y las longitudes de onda emitidas se recogieron entre 570 y 630nm con un objetivo fluar

40x. Tanto la cámara como el programa de análisis fueron los mismos que se utilizaron en las medidas de rhod y pericam.

4. Estudios en el microscopio confocal

Para los estudios de microscopia confocal se utilizó un espectrofotómetro confocal Leica TCS SP2 con un objetivo de inmersión en aceite 63x. La proteína EGFP dirigida a mitocondria (mitEGFP) fue excitada a 488nm con un láser de argón. La fluorescencia emitida fue recogida entre 500 y 600nm. Todos los experimentos se realizaron a 22°C.

V. MEDIDAS CON EL GECI BIOLUMINISCENTE AEQUORINA

1. La sonda

La proteína aequorina es una fotoproteína sensible a iones Ca^{2+} procedente de la medusa *aequorea victoria*. En su medio marino, estos cnidarios utilizan pulsos de Ca^{2+} para activar la emisión de fotones en el rango del azul, que serán transmitidos hacia la GFP (Green Fluorescent Protein) para transformar esta luz azul en la luz verde emitida característicamente por este grupo de medusas. Estas señales bioluminiscentes son utilizados por las medusas como señales de advertencia hacia otros animales o incluso como medio de comunicación entre ellas.

La aequorina está formada por una apo-proteína de 189 residuos aminoacídicos con un peso molecular de 21kD. Posee cuatro dominios de unión a Ca^{2+} , de los cuales solo tres son funcionales (Shimomura, 1995). Para que esta apo-proteína sea funcional necesita de la presencia de su co-factor, la celenterazina con un peso aproximado de 420Da y la presencia de O_2 en el medio.

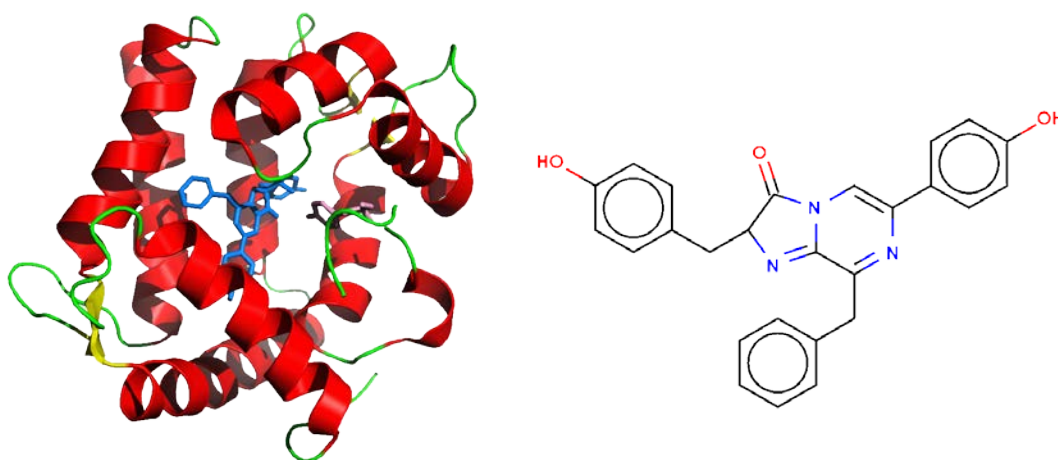


Figura 22: Representación tridimensional de la proteína aequorina y de su grupo prostético la celenterazina.

Para que la reacción de bioluminiscencia se pueda llevar a cabo es necesaria la unión previa de forma no covalente de la apo-proteína con la celenterazina. A este proceso se le denomina reconstitución. Una vez reconstituida la aequorina y en presencia de iones Ca^{2+} y O_2 la reacción tendrá lugar produciéndose una descarboxilación oxidativa de la celenterazina, liberándose en este paso CO_2 y el

co-factor oxidado, la celenteramida. Al término de la reacción será emitido un fotón por cada molécula de aequorina, a una longitud de onda de 470nm (luz azul, dentro del rango visible). La cantidad de fotones de luz emitidos será proporcional a la cantidad de Ca^{2+} libre en el medio, de manera que para cada $[\text{Ca}^{2+}]$, una determinada fracción de moléculas de aequorina emite su fotón por segundo. Esta reacción es irreversible durante el tiempo de realización de los experimentos, lo que conlleva un “consumo” de la sonda a lo largo del experimento.

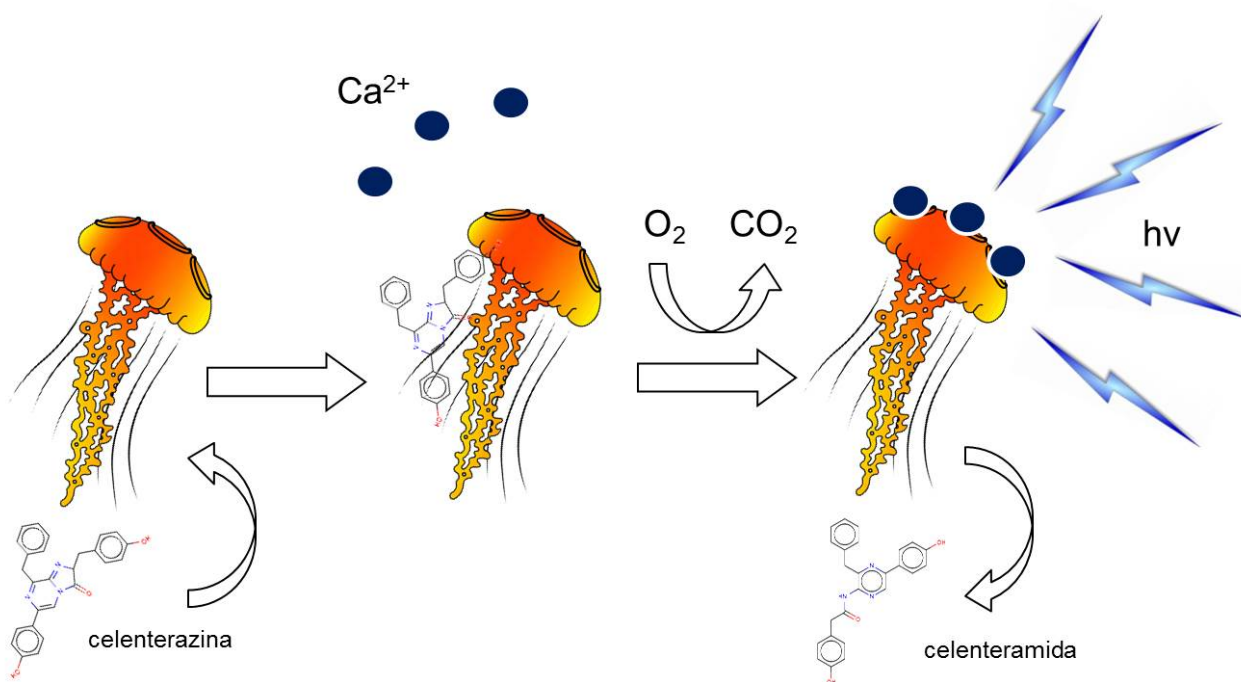


Figura 23: Representación de la reacción llevada a cabo por la aequorina para la emisión de fotones en presencia de Ca^{2+} .

La aequorina fue aislada y purificada por Shimomura en 1962 (Shimomura, 1962) pero durante muchos años la medida de Ca^{2+} citosólico con esta sonda requirió previamente microinyectarla en las células de estudio. Debido a la dificultad de la técnica, los primeros trabajos fueron realizados en fibras musculares de percebe gigante (*balanus nubilus*) o en el axón gigante del calamar (*loligo forbesi*) (Ridgway et al., 1967; Baker et al., 1971). Posteriormente en 1985 se consiguió clonar el cDNA codificante para la aequorina (Inouye et al., 1985; Prasher et al., 1985), lo que permitió expresarla en diferentes tipos celulares, así como desarrollar aequorinas recombinantes dirigidas específicamente a diversos orgánulos de interés en el estudio de la homeostasis del Ca^{2+} . Algunos de los orgánulos hacia los que se ha dirigido la aequorina y en los cuales se han realizado medidas de Ca^{2+} son los siguientes: citosol (Brini et al., 1995), mitocondrias (Rizzuto et al., 1992), núcleo (Brini et al., 1993) o retículo endoplásmico (Montero et al., 1995).

En este trabajo se han utilizado aequorinas dirigidas a citosol y a mitocondria, ambas insertas en el plásmido pcDNA 3.1 y con la secuencia de dirección COX VIII en el caso de la aequorina mitocondrial (la aequorina citosólica no necesita ningún tipo de secuencia de dirección).

La aequorina nativa (AEQ wt) tiene una alta afinidad por Ca^{2+} y solamente permite medir concentraciones de Ca^{2+} de forma fiable entre 0.1 y $5\mu\text{M}$. A concentraciones más altas de Ca^{2+} la aequorina se consumiría en muy pocos segundos y las medidas serían erróneas. Para evitar en parte este problema de consumo se ha utilizado una aequorina que posee una mutación en el segundo dominio de unión a Ca^{2+} (mutAEQ), concretamente se sustituyó en la posición 119 un residuo de aspartato por uno de alanina (Kendall et al., 1992). Esta mutación redujo un orden de magnitud la afinidad de la proteína por Ca^{2+} permitiendo realizar medidas fiables hasta $[\text{Ca}^{2+}]$ de $100\mu\text{M}$. Otra estrategia para reducir la afinidad de la aequorina por Ca^{2+} es la utilización de celenterazinas semisintéticas (celenterazina *n*) (Montero et al., 1997) en lugar de la celenterazina nativa (celenterazina *w*). La combinación de la aequorina mutada con la celenterazina *n* da un rango de medida idóneo entre $20\mu\text{M}$ y 1mM (Alvarez & Montero, 2002). A pesar de ello el consumo a altas contracciones de Ca^{2+} se produce en un periodo de tiempo relativamente corto. Si se reduce la temperatura de trabajo de 37°C a 22°C se consigue algo más de tiempo a la hora de realizar los experimentos, pero con la desventaja de que la temperatura no es fisiológica.

De este modo se pueden combinar las diferentes aequorinas en su forma nativa o mutada, las celenterazinas *w* o *n* y realizar los experimentos a 37°C o 22°C para obtener múltiples posibilidades de medida en un amplio rango de concentraciones de Ca^{2+} , en cada uno de los orgánulos. Aun con todas estas combinaciones, el consumo de la aequorina es rápido sobre todo a altas concentraciones de Ca^{2+} y a 37°C de temperatura, lo que limita la realización de experimentos a tiempos cortos.

		CELENTERAZINA	
		<i>w</i>	<i>n</i>
AEQ	Nativa	0.1-10 μ M	10-100 μ M
	Mutada	10-100 μ M	100 μ M-1mM

Tabla 8: Rangos de medida de concentraciones de Ca^{2+} para cada una de las combinaciones de aequorinas y celenterazinas.

2. Equipo

La cantidad de fotones que son emitidos durante la reacción de bioluminiscencia es proporcional a la cantidad de Ca^{2+} que se está uniendo a la aequorina. Por lo tanto, todo el equipo está especialmente diseñado para optimizar la captura de estos fotones y posteriormente transformar esta cantidad de luz en datos de concentración de Ca^{2+} . Este luminómetro consta en su parte inferior de una cámara de perfusión de 15mm de diámetro y 2mm de profundidad, termostatizada mediante una camisa de agua, y construida en su totalidad de metacrilato negro con el fin de evitar la entrada de luz desde el exterior. La base de esta cámara de perfusión está compuesta por una lámina de aluminio reflectante, lo que permite que todos los fotones emitidos sean dirigidos hacia el fotomultiplicador situado en la parte superior de la cámara. En esta cámara de perfusión se colocarán los cubreobjetos de 13mm de diámetro con las células HeLa adheridas y que expresan la aequorina correspondiente. Esta cámara se sellará por su parte superior utilizando un cubreobjetos de 24x24mm adherido a ella mediante una fina película de grasa de silicona. La cámara posee 2 orificios, uno de entrada y otro de salida para las diferentes soluciones perfundidas. La cámara se mantiene termostatizada continuamente mediante una camisa de agua que es renovada continuamente a través de una bomba colocada en un baño externo al equipo. Para asegurarse de que la temperatura es la correcta, cerca de la vía de entrada de las diferentes soluciones se coloca un calentador on-line de Harvard Apparatus.

La cámara de perfusión se sitúa inmediatamente debajo de un fotomultiplicador de elevada ganancia EMI 9789a de Electron Tubes, que recogerá los fotones emitidos mediante un fotocátodo de 10mm, colocado directamente encima de la cámara de perfusión que contiene las células adheridas. Todo este sistema se encuentra colocado en el interior de una nevera a 4°C, para evitar la emisión térmica de

electrones por parte del fotocátodo, con lo que se reduce significativamente el ruido basal de la muestra. La diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo del fotomultiplicador es generada por una fuente de alto voltaje tipo Thorn EMI modelo PM28B. La señal emitida por el fotomultiplicador es enviada a través de un discriminador-amplificador EMI AD2 hacia un CT2 Counter Timer de Electron Tubes, desde el que se introducen los datos al ordenador. Los datos de luminiscencia son recogidos cada segundo y visualizados en el ordenador mediante el programa Electron Tubes EM6 counter/timer software. Estos datos almacenados, posteriormente serán transformados en datos de concentración de Ca^{2+} mediante un programa de calibración previamente diseñado. (Álvarez & Montero, 2002).

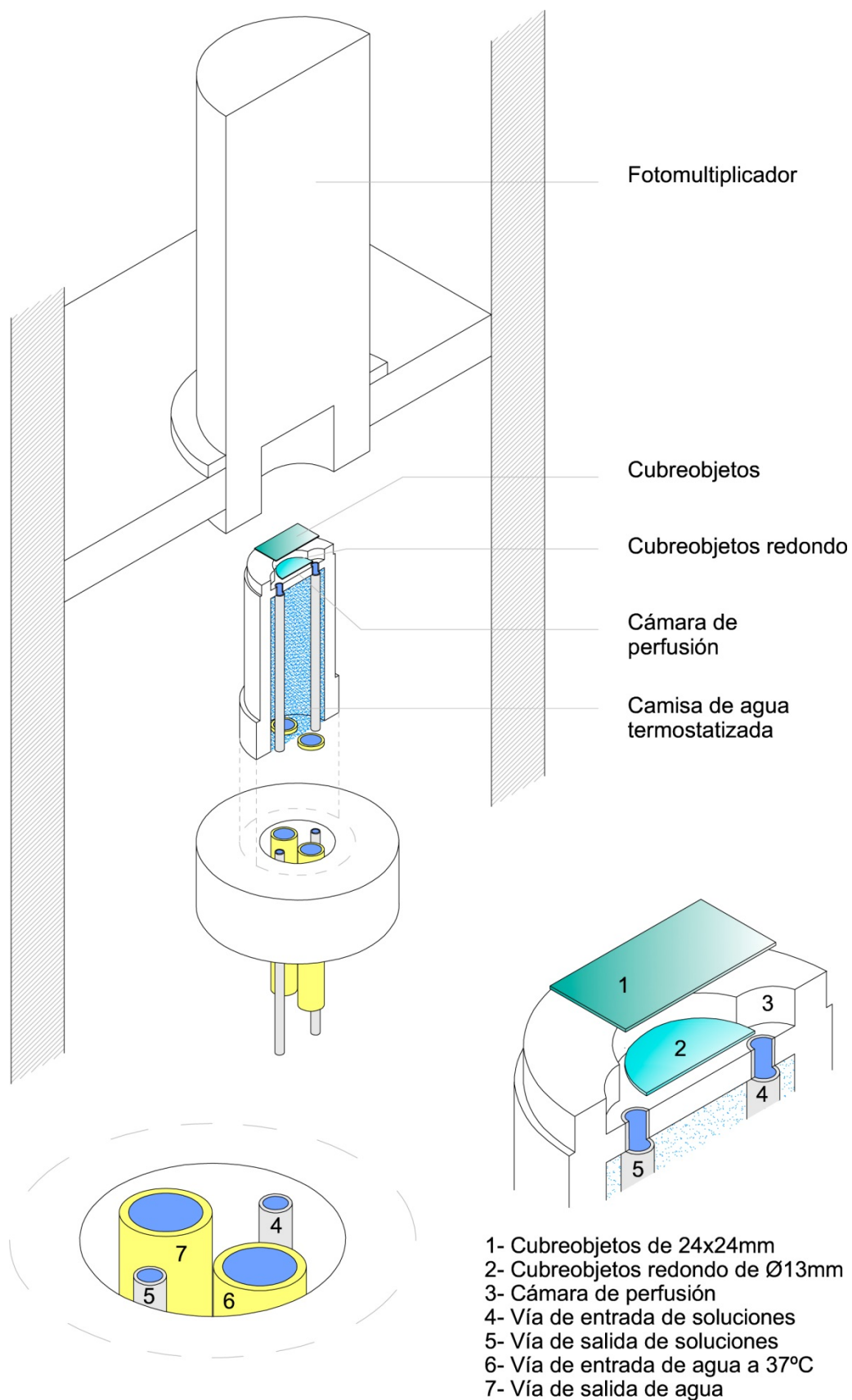


Figura 24: Diagrama del luminómetro empleado en la realización de los experimentos de aequorina, detallándose en él cada una de las partes que lo componen.

3. Calibración

Con el fin de poder transformar los datos de luminiscencia obtenidos en datos de concentración de Ca^{2+} libre es necesario calcular una curva de calibración para cada una de las combinaciones posibles de aequorinas y celenterazinas, así como obtener también curvas de calibración a 22°C y a 37°C. Para las aequorinas nativas y celenterazinas *w* y *n* estas curvas ya habían sido obtenidas previamente (Montero et al., 1995).

En el presente estudio ha sido necesario realizar una nueva calibración de la aequorina mitocondrial doblemente mutada con las celenterazinas *w* e *i*. Para realizar esta calibración, en primer lugar, se depletaron las células de Ca^{2+} incubándolas durante 10 minutos en medio externo EGTA y en presencia del inhibidor de la ATPasa de Ca^{2+} de retículo endoplásmico BHQ a una concentración de 10 μM . Posteriormente se retiró este medio y se volvió a añadir el mismo medio pero ya con la celenterazina *w* o *i* 2 μM , añadiendo además thapsigargina 1 μM para evitar una posible interferencia del retículo endoplásmico durante la calibración. Las células fueron incubadas en este medio a temperatura ambiente durante al menos 1h 30 minutos para reconstituir la aequorina. A continuación se procedió a iniciar el experimento, colocando el cubreobjetos con las células en el luminómetro y perfundiendo medio externo EGTA 0,5mM. Se prosiguió perfundiendo las células con el medio de permeabilización descrito anteriormente durante 1 minuto, para hacer accesible el interior celular a los posteriores medios. A continuación fue perfundido un medio intracelular con EGTA 0,5mM pero sin ATP ni ningún tipo de sustratos y con los ionóforos ionomicina (1 μM) y FCCP (2 μM), oligomicina (5 μM), y el inhibidor de la SERCA BHQ (10 μM). La ionomicina se encarga de facilitar la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria, el FCCP abole el gradiente de protones y la oligomicina bloquea específicamente el transporte de protones a través de la ATPsintasa. El medio fue tamponado con HEPES 10mM y ajustado a pH 8. Bajo estas condiciones, la mitocondria no es capaz de acumular Ca^{2+} y se convierte en un simple contenedor de aequorina, totalmente permeable a Ca^{2+} y a H^+ . Seguidamente se perfundieron medios con las mismas características pero sin EGTA y con una cantidad de Ca^{2+} conocida no tamponada, desde 50 μM a 10mM. Al final de todos los experimentos se perfundió una solución de Ca^{2+} 10mM para consumir totalmente la aequorina, ya que es necesario saber la luminiscencia total que son capaces de emitir las células en cada uno de los experimentos con el fin de poder transformar estos datos de luminiscencia en datos de concentración de Ca^{2+} . A partir

de estos experimentos se obtienen valores de L/L_{max} (ver a continuación) para cada $[Ca^{2+}]$ perfundida, que posteriormente permiten ajustar la calibración.

4. Transformación de los datos de luminiscencia en datos de concentración de Ca^{2+}

El programa informático usado para realizar esta transformación calcula las fracciones de L/L_{max} en cada punto a lo largo del experimento, donde L es el valor de la luminiscencia menos la luminiscencia basal y L_{max} es la luminiscencia total desde cada punto (1 punto por segundo) hasta el final del experimento (a la que también se sustrae la luminiscencia basal). Los valores obtenidos de L/L_{max} son transformados en valores de concentración de Ca^{2+} mediante el siguiente algoritmo matemático.

$$[Ca^{2+}] (M) = \frac{ratio + (ratio \times K_{TR}) - 1}{K_R - (ratio \times K_R)}$$

$$donde \textit{ratio} = \left(\frac{L}{L_{max} \times \lambda} \right)^{1/n}$$

Esta ecuación deriva del modelo matemático propuesto para explicar la dependencia de la emisión de luz por parte de la aequorina respecto a la concentración de Ca^{2+} (Allen et al., 1977), pero en este trabajo se usa como una simple transformación matemática que ajusta los valores de luminiscencia a cada concentración de Ca^{2+} . Los valores de los diferentes parámetros para las diferentes combinaciones de aequorinas y celenterazinas conocidas previamente son los siguientes (Montero et al., 1997).

	AEQ wt Celent w	MutAEQ Celent w	MutAEQ Celent n
K_R	4.18×10^7	1.61×10^7	8.47×10^7
K_{TR}	601	22000	165600
n	2.3	1.43	1.2038
λ	1	1	0.138

Tabla 9: Valores para cada uno de los parámetros dependiendo de la combinación de aequorina y celenterazina. Estos valores fueron obtenidos a partir de las curvas de calibración de cada una de las combinaciones de aequorina y celenterazina.

5. Determinación experimental

Previamente a todos los experimentos fue necesario reconstituir la aequorina con la celenterazina correspondiente, ya fuera *w*, *n* o *i*. Las células HeLa fueron incubadas en medio externo Ca^{2+} 1mM con $2\mu\text{M}$ de celenterazina durante al menos 1-2 horas a temperatura ambiente, antes de la realización del experimento.

Una vez reconstituida la aequorina, el cubreobjetos con las células adheridas fue colocado en el luminómetro para poder realizar las medidas. En los experimentos realizados en células intactas, se perfundió continuamente medio externo Ca^{2+} 1mM, y sobre este mismo medio fueron añadidos los diferentes agonistas, inhibidores, etc... Al finalizar estos experimentos se añadió una solución de Ca^{2+} 10mM en agua desionizada junto con digitonina $100\mu\text{M}$, con el fin de permeabilizar las células por completo y consumir totalmente la aequorina para obtener la luminiscencia total de la muestra.

En el caso de células permeabilizadas, en primer lugar se perfundió al menos 2 minutos una solución de medio externo EGTA $0,5\text{mM}$ para retirar el calcio que pudiera encontrarse en el medio. A continuación, las células fueron permeabilizadas con la solución de permeabilización durante 1 minuto, tiempo suficiente para que el citosol sea accesible al resto de soluciones, pero al mismo tiempo insuficiente como para dañar la estructura y función mitocondrial. Posteriormente se continuó perfundiendo medio interno libre de Ca^{2+} , con EGTA y con todos los sustratos necesario para el metabolismo mitocondrial. Las células se mantuvieron en este medio al menos 2 ó 3 minutos para que la señal de luminiscencia basal fuera lo más estable posible. Una vez conseguida esta señal basal ya fueron añadidos los diferentes tampones de concentración de Ca^{2+} conocida, así como los diferentes compuestos empleados en cada uno de los protocolos experimentales. Al concluir estos experimentos en células permeabilizadas, y puesto que la digitonina ya había estado presente, para consumir por completo la aequorina solo fue necesario perfundir Ca^{2+} 10mM disuelto en agua desionizada.

La mayoría de los experimentos fueron realizados a 37°C aunque en algunos se bajó la temperatura a 22°C para reducir el consumo de aequorina y poder realizar medidas durante más tiempo, sobre todo a altas $[\text{Ca}^{2+}]$.

6. Análisis estadístico

Tanto los análisis gráficos como estadísticos se realizaron con el programa Origin8.5 de OriginLab. Los datos fueron calculados como media \pm error estándar de al menos tres experimentos de cada tipo. Para comprobar diferencias entre los diferentes grupos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). El nivel de significación se muestra como * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

VI. MATERIALES

Las celenterazinas *w*, *n*, *i*, el rhod-FF, rhod-2, y TMRE fueron obtenidos de Molecular Probes o Biotium. El rhod-5N se obtuvo de Anaspec.

El medio de cultivo DMEM, el FBS y los antibióticos fueron suministrados por GIBCO y el metafectene por Biontex.

El kit de mutagénesis dirigida se compró a Stratagene.

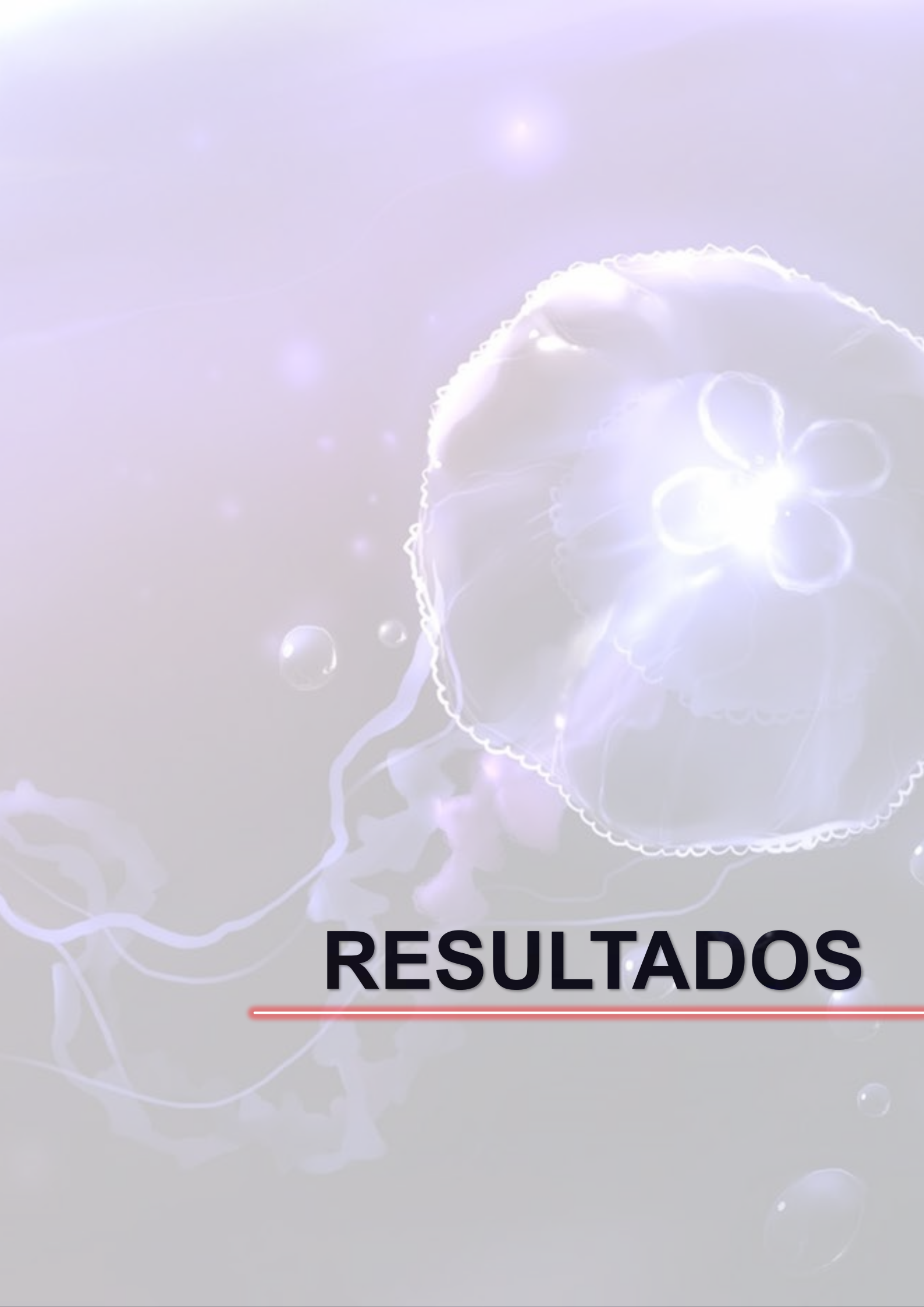
Los oligonucleótidos se encargaron a Thermo Scientific.

Todos los reactivos necesarios para biología molecular son de Biorad.

Las bacterias competentes DH5 α se compraron a Invitrogene.

El CGP37157, Tempol, Ko143 y Reversan fue suministrado por Tocris.

Los siguientes compuestos: kaempferol, digitonina, thapsigargina, FCCP, BHQ, EGTA, HEDTA, histamina así como el resto de sales y sustratos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich



RESULTADOS

I. COMPARACIÓN Y VALIDACIÓN DE DIVERSOS MÉTODOS DE MEDIDA DEL Ca^{2+} MITOCONDRIAL

En la introducción se ha descrito la existencia de muchos y muy diversos tipos de indicadores de Ca^{2+} . Sin embargo no todos ellos son capaces de monitorizar correctamente la dinámica del Ca^{2+} mitocondrial, bien sea porque no tienen la capacidad de dirigirse específicamente a estos orgánulos o porque no poseen la afinidad adecuada. En la literatura aún existen discrepancias relativas a la dinámica del Ca^{2+} mitocondrial, generadas por el método de medida de Ca^{2+} empleado.

Los primeros experimentos de este trabajo se realizaron con el objetivo de esclarecer las discrepancias existentes entre las medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ mitocondrial obtenidas con el colorante fluorescente rhod-2 y la proteína fluorescente ratiométrica pericam, en su variante dirigida a mitocondria (mitRP). Estas discrepancias no solo son cuantitativas sino también cualitativas. Los resultados obtenidos mediante estos dos métodos de medida de Ca^{2+} mitocondrial, se han comparado a su vez con las medidas registradas con la proteína bioluminiscente aequorina en su forma de baja afinidad, dirigida también a mitocondria (mitmutAEQ).

Los primeros resultados se obtuvieron al estimular células HeLa con dos pulsos sucesivos de histamina $100\mu\text{M}$ durante un minuto, con un intervalo de 10 minutos entre ambos, con el fin de comprobar las características de los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ registrados con los diferentes métodos de medida: rhod-2, mitRP y mitmutAEQ. Los resultados confirmaron las discrepancias existentes en la magnitud de la respuesta frente a un segundo estímulo de histamina. En la figura 25, las células fueron cargadas con rhod-2 AM y perfundidas con una solución de medio externo Ca^{2+} 1mM . Como se puede apreciar, ante un segundo estímulo con histamina $100\mu\text{M}$, la respuesta con rhod-2 está sustancialmente disminuida con respecto a la primera, siendo en algunos casos totalmente inapreciable (tal y como se describe en Collins et al., 2001; Moreau et al, 2006). En este último trabajo, los autores concluyen a partir de este dato y otros similares que el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial se inhibe de forma dependiente de Ca^{2+} durante la primera estimulación.

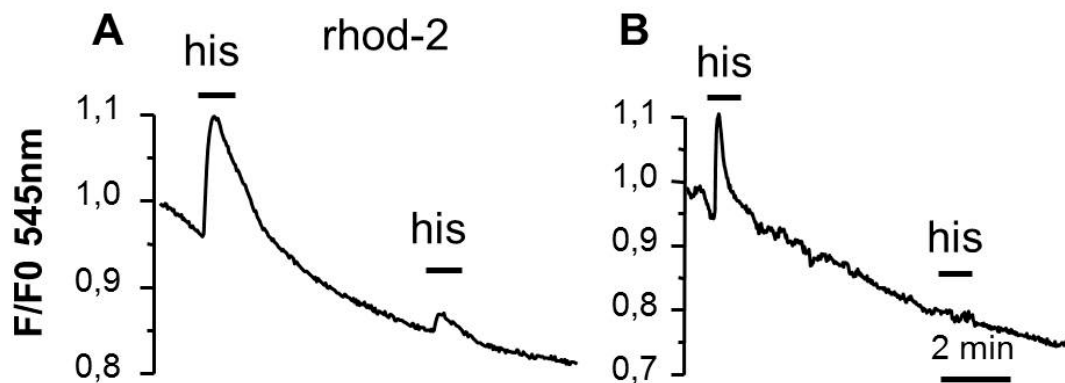


Figura 25: Trazados de dos experimentos diferentes (A y B) en los que las células fueron cargadas con rhod-2 AM $1\mu\text{M}$ y estimuladas con dos pulsos de histamina $100\mu\text{M}$ de 1 minuto, con 10 minutos de lavado entre ellos. Cada uno de los trazados corresponde a la media de todas las células presentes en el campo del microscopio, 13 en experimento A y 16 en el B. Los trazados son representativos de los resultados obtenidos en 22 experimentos similares. Todos los experimentos fueron realizados a 37°C .

El mismo experimento se repitió en las mismas condiciones con células HeLa que expresaban mitRP. En esta ocasión se observó que la respuesta frente al segundo estímulo tenía una magnitud muy similar a la primera, no apreciándose una disminución en la altura del pico frente al segundo estímulo (ver también Filippin et al., 2003). En la figura 26 se pueden ver las gráficas de los experimentos realizados con mitRP, correspondientes a tres células individuales (paneles A, B y C) y una última gráfica con la respuesta media de 16 células (panel D).

La figura 27 (panel A) muestra los experimentos realizados con aequorina. Las medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ se realizaron en células HeLa que expresaban mitmutAEQ reconstituidas con celenterazina n durante al menos 1 hora y media. Al igual que en los experimentos con mitRP, las células fueron perfundidas con medio externo Ca^{2+} 1mM y los dos pulsos de histamina $100\mu\text{M}$ fueron de 1 minuto con 10 minutos de lavado entre ellos. Seguidamente se repitieron los experimentos anteriores pero esta vez las células que expresaban mitmutAEQ fueron cargadas además con rhod-2 AM $2\mu\text{M}$ durante 30 minutos y posteriormente lavadas otros 30 minutos con medio externo Ca^{2+} 1mM (durante esta última media hora de lavado el medio no contenía ni rhod-2 ni celenterazina). La finalidad de estos últimos experimentos era comprobar si el rhod-2 actúa como un tampón de Ca^{2+} , disminuyendo así la cantidad de Ca^{2+} que es capaz de unirse a la aequorina y en consecuencia registrar valores de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ menores. Como se puede apreciar en el panel B de la figura 27, la presencia de rhod-2 no modificó en absoluto los resultados obtenidos.

Estos datos fueron representados en un diagrama de barras. Se compararon las medidas de las $[Ca^{2+}]_M$ máximas obtenidas, tanto del primer pico inducido por histamina como del segundo, en ausencia y en presencia de rhod-2. En la figura 28 se puede ver que no existen diferencias significativas entre los picos de $[Ca^{2+}]_M$ inducidos por el primero o el segundo pico de histamina, tanto en ausencia como en presencia de rhod-2. Todos estos datos están en consonancia con los obtenidos a partir de mitRP.

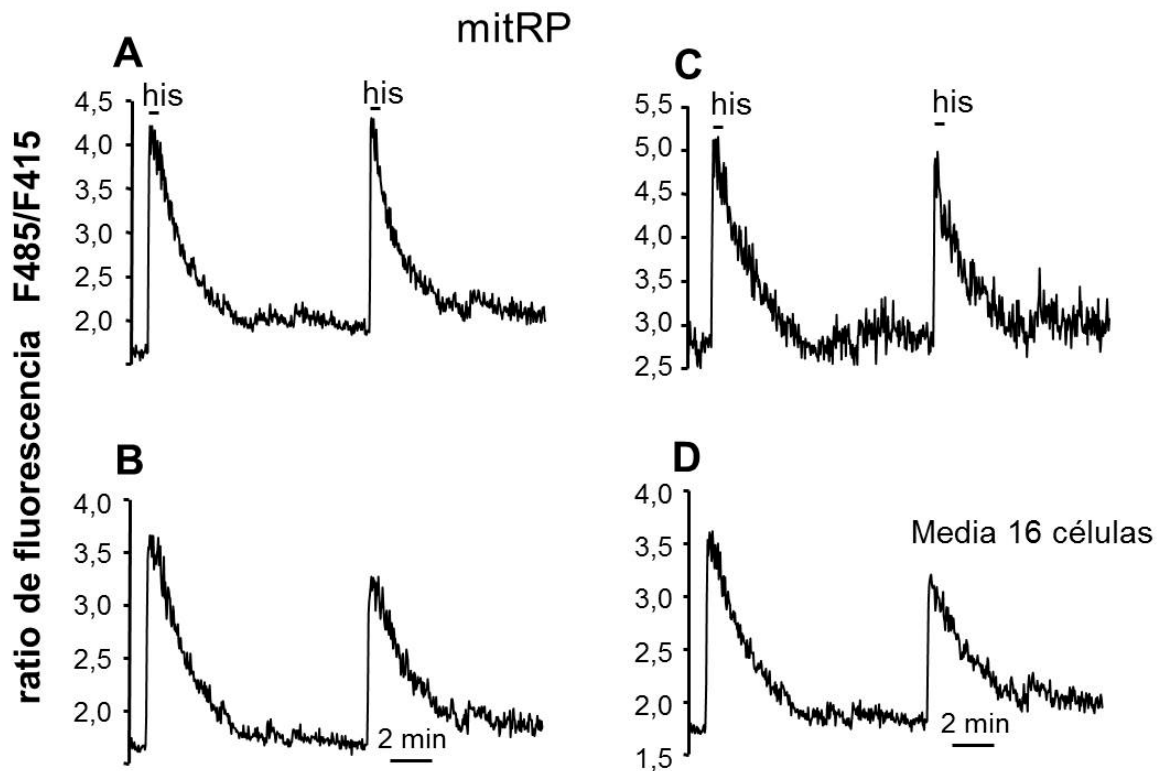


Figura 26: Trazados de las respuestas de 3 células individuales (paneles A, B y C) y el trazado medio de 26 células (Panel C) que expresaban mitRP, tras dos estímulos con histamina $100\mu\text{M}$ de 30 segundos, con 10 minutos de lavado en medio externo Ca^{2+} 1mM entre ellos. El experimento es representativo de 23 experimentos similares. Los experimentos fueron realizados a 22°C .

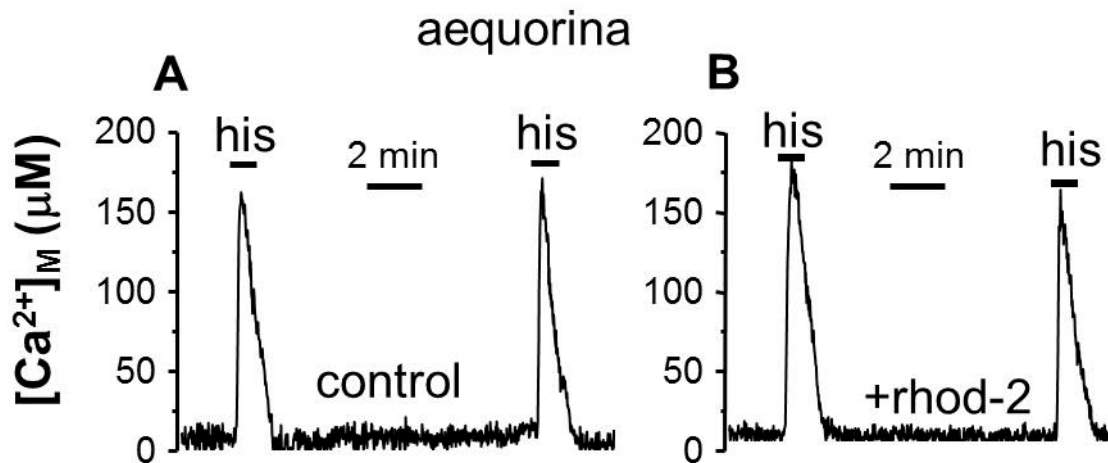


Figura 27: Registro del aumento en la $[Ca^{2+}]_M$ de células HeLa que expresan mitmutAEQ reconstituida con celenterazina n a $37^\circ C$, en respuesta a dos estímulos de histamina $100\mu M$ de 1 minuto con 10 minutos de lavado entre ellos. El panel A muestra los trazados control y el panel B los registros en presencia de rhod-2 cargado en las células.

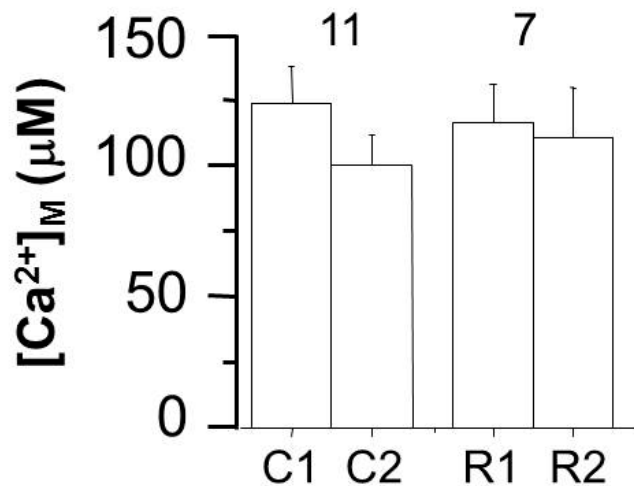


Figura 28: Diagrama de barras que representa la media y el error estándar de las $[Ca^{2+}]_M$ máximas de la primera y segunda respuesta en los experimentos control (C1 y C2 respectivamente) y de los experimentos en los que las células fueron cargadas con rhod-2 (R1 y R1). El número en la parte superior de las barras indica el número de experimentos realizados en cada condición.

Para el cálculo de la $[Ca^{2+}]_M$ en estos experimentos, se ha asumido, de acuerdo con datos previos (Rizzuto et al., 1994), que solamente el 30% de las mitocondrias se encuentran cercanas a los sitios de liberación desde el RE y solamente éstas son capaces de acumular Ca^{2+} frente a un estímulo de histamina. Por lo tanto, al calcular la $[Ca^{2+}]_M$ se ha asumido que la luminiscencia provenía solamente de un 30% de la aequorina total ($L_{max} = 30\%$ de la luminiscencia total).

A continuación se quiso comprobar si este comportamiento de los diferentes métodos de medida se producía no solo en células intactas sino también en células permeabilizadas. Para realizar la correcta permeabilización de las células, se perfundió una solución de medio interno EGTA que contenía digitonina 100 μ M durante 1 minuto. A continuación se mantuvo a las células en medio interno EGTA y cuando la señal basal fue estable, se añadió un tampón con una $[Ca^{2+}]$ conocida de 10 μ M.

En los paneles A y B de la figura 29 se muestran los trazados de dos experimentos diferentes en los que las células fueron cargadas con rhod-2 AM. Las células fueron perfundidas con un tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M en dos ocasiones durante un periodo de 2 minutos, lavándose con medio interno EGTA previamente y entre ambas adiciones. Al igual que en las células intactas, el segundo aumento en la $[Ca^{2+}]_M$ es significativamente más pequeño que el primero, pudiendo incluso llegar a desaparecer. El mismo resultado se obtuvo cuando se cargaron las células con el colorante de baja afinidad rhod-FF. En este caso, incluso la perfusión de Ca^{2+} 1mM apenas produjo un incremento en la señal de fluorescencia (panel C).

Estos mismos experimentos fueron repetidos en células HeLa que expresaban mitRP. En la figura 30 se puede observar como las dos adiciones del tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M provocaron dos incrementos en la $[Ca^{2+}]_M$ muy parecidos, no apreciándose en ningún caso una disminución de la segunda respuesta con respecto a la primera.

La repetición de los experimentos anteriores, exactamente en las mismas condiciones, pero en células HeLa que expresaban mitmutAEQ, proporcionaron resultados muy similares a los obtenidos con mitRP. Como se puede observar en la figura 31, no existe disminución en el segundo incremento de $[Ca^{2+}]_M$ causado por la adición del tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M (panel A).

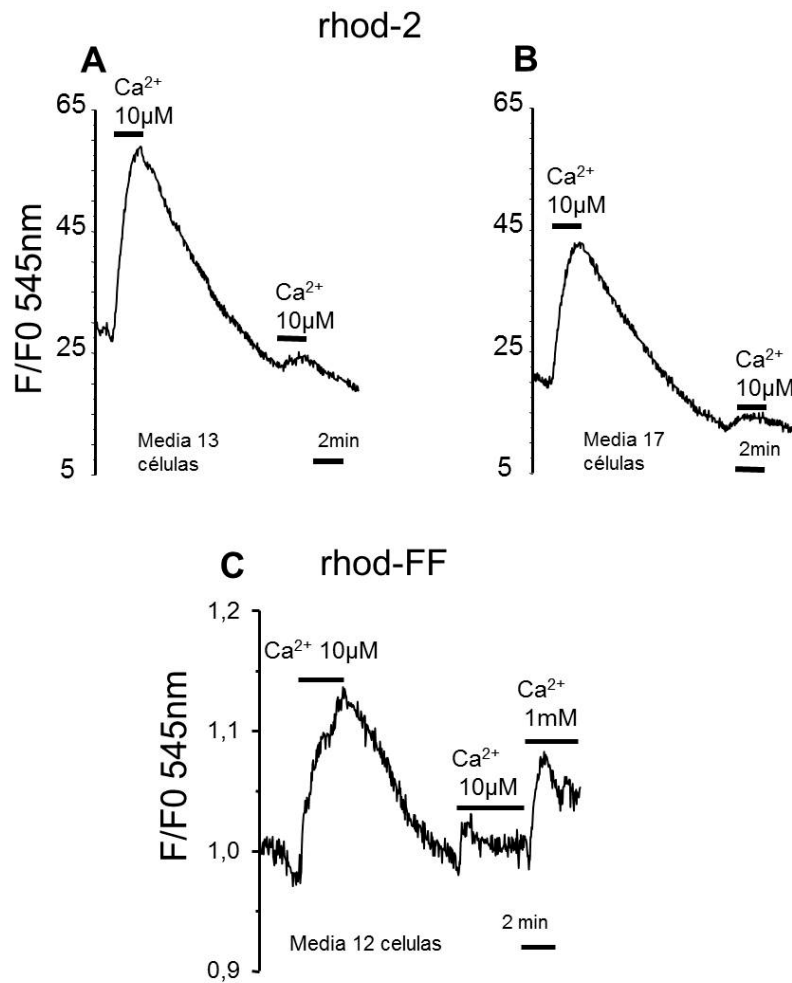


Figura 29: Trazados de las medidas de fluorescencia de dos experimentos diferentes con rhod-2 AM cargado a una concentración de 1 μ M (paneles A y B) y rhod-FF AM a 2 μ M (panel C), es las que se perfundió un tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M en dos ocasiones durante 2 minutos con 10 minutos de lavado en medio interno EGTA entre ambos. En el caso del trazado de rhod-FF se perfundió además Ca^{2+} 1mM al finalizar el experimento. Los experimentos son representativos de 11 similares en el caso del rhod-2 y de 7 similares en el caso del rhod-FF. Los experimentos fueron realizados a 22°C

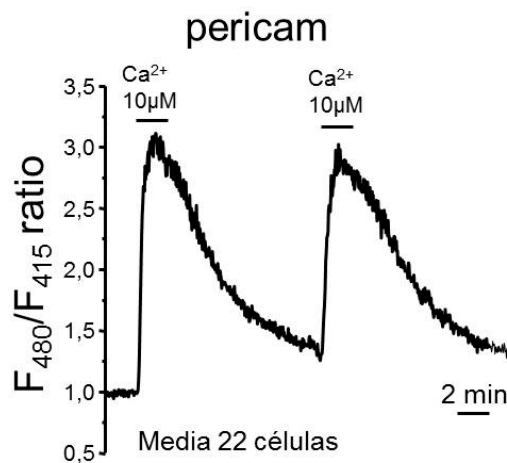


Figura 30: Registro de la fluorescencia media de 22 células que expresaban mitRP, en respuesta a 2 adiciones de 2 minutos de un tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M con 10 minutos de lavado en medio interno EGTA entre ellas. El registro es representativo de 10 experimentos similares. Los experimentos se realizaron a 22°C.

En el panel B de la figura 31 se muestra el mismo protocolo experimental que en el A, pero en esta ocasión las células además de expresar aequorina también fueron cargadas con rhod-2 AM. Bajo estas condiciones tampoco se aprecia una disminución en el segundo incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ con respecto al primero. Estos resultados son similares a los obtenidos en células intactas, en ambos casos, la carga de las células con rhod-2 no parece afectar a la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria, puesto que la segunda respuesta en ambos casos es muy similar a la primera.

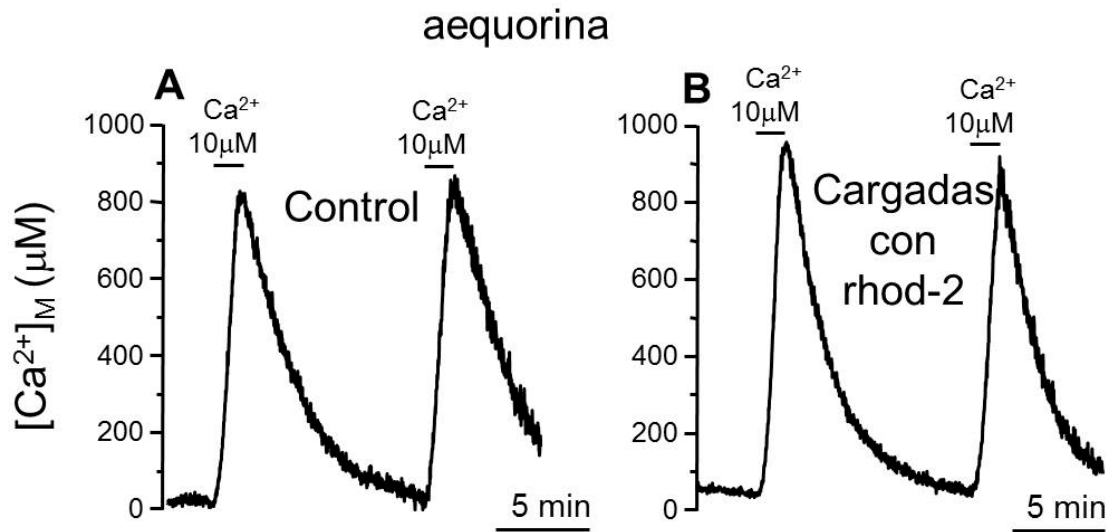


Figura 31: Incrementos en la $[Ca^{2+}]_M$ en células HeLa permeabilizadas bajo dos adiciones de un tampón de $[Ca^{2+}]$ $10 \mu M$ durante 2 minutos, con 10 minutos de lavado en medio interno EGTA entre ambas. En el panel A se muestra el trazado obtenido en células control y en el panel B en células cargadas con rhod-2 AM $2 \mu M$. Las medidas fueron realizadas con mitmutAEQ reconstituida con celenterazina *n*. Los experimentos fueron realizados a $22^\circ C$. Los trazados son representativos de 3 experimentos similares de cada tipo.

Los datos obtenidos en las figuras anteriores no parecen indicar que el propio rhod-2 modifique la entrada real de Ca^{2+} en la mitocondria, sin embargo sí parece existir una pérdida de sensibilidad del colorante al Ca^{2+} a lo largo del experimento, poniendo en evidencia una clara dificultad para monitorizar correctamente la $[Ca^{2+}]_M$ bajo determinadas circunstancias, especialmente si las células son estimuladas en repetidas ocasiones.

Con el fin de investigar más en profundidad la causa de esta pérdida de sensibilidad por parte del rhod-2, se repitieron los experimentos mostrados en la figura 29, pero en esta ocasión se estudiaron además los efectos provocados por la adición del scavenger de ROS tempol y los inhibidores de multi-transportadores Ko143 y Reversan. Los resultados obtenidos para la altura relativa del segundo incremento con

RESULTADOS

respecto al primero fueron los siguientes (media \pm error estándar del porcentaje): control, $7,4 \pm 0,6\%$ (n=40 células); reversan, $13 \pm 0,6\%$ (n=37 células); Ko143, $10,4 \pm 1,2\%$ (n=27 células). Teniendo en cuenta estos datos, ni los ROS, ni la extrusión del rhod-2 por parte de los multi-transportadores son los causantes de la pérdida de sensibilidad del rhod-2.

Aunque las figuras anteriores muestran la dificultad para monitorizar estos aumentos en la $[Ca^{2+}]_M$ durante estimulaciones repetidas, en ocasiones esta pérdida de sensibilidad a Ca^{2+} se puede aparecer incluso sin una estimulación previa. Moreau y colaboradores observaron que en células cargadas con rhod-2, el protonóforo FCCP abolía por completo la entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias de células permeabilizadas, cuando se perfundía un tampón de $[Ca^{2+}]$ 10-100 μ M (Moreau et al., 2006).

Debido a la alta afinidad del rhod-2 por el Ca^{2+} , con una K_d in situ en mitocondria de 1,3 μ M (Collins et al., 2001), resultaba sorprendente que perfundiendo tampones de $[Ca^{2+}]$ 10, 20 y 100 μ M en células HeLa permeabilizadas, el rhod-2 no fuera capaz de detectar el aumento en la $[Ca^{2+}]_M$ generado al equilibrarse las concentraciones entre la mitocondria y el citosol. Este aumento debería de haber saturado por completo la señal de fluorescencia del rhod-2. Para estudiar este fenómeno se realizaron experimentos similares pero midiendo la $[Ca^{2+}]_M$ con aequorina. En esta ocasión, se observó que en mitocondrias despolarizadas con FCCP, el Ca^{2+} entraba lentamente, tendiendo a alcanzar la misma $[Ca^{2+}]$ del tampón utilizado.

En la figura 32 se muestra cómo es la dinámica de entrada de Ca^{2+} en la mitocondria al perfundir un tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M en células HeLa permeabilizadas. Esta adición produce un rápido incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ tanto a 22°C (panel A) como a 37°C (panel B), aumentando la $[Ca^{2+}]_M$ hasta valores de cientos de micromolar en pocos segundos.

aequorina

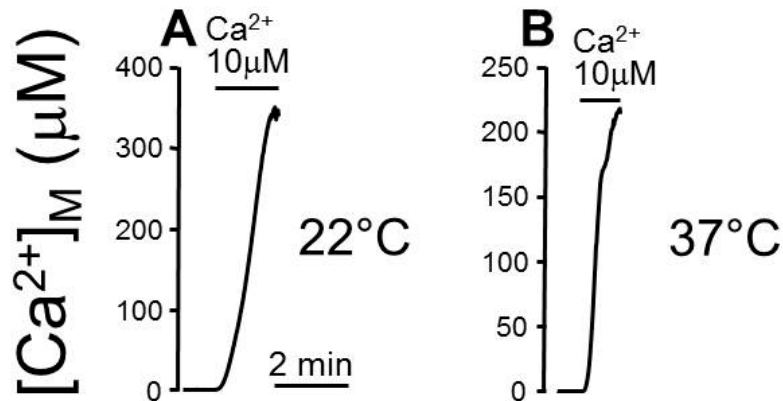


Figura 32: Incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ en células HeLa permeabilizadas que expresaban mitmutAEQ reconstituida con celenterazina *n*, al ser perfundidas con un tampón de $[Ca^{2+}]$ $10\mu M$ tanto a $22^\circ C$ (panel A) como a $37^\circ C$ (panel B).

En la figura 33 se puede observar cómo en presencia del protonóforo FCCP, el incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ es mucho más lento al perfundir tampones de $[Ca^{2+}]$ 10, 20 o $100\mu M$, sobre todo a $22^\circ C$. En todos los paneles se puede ver cómo este incremento lento en el interior de la mitocondria, tiende a alcanzar la $[Ca^{2+}]$ del tampón, por un simple equilibrio de concentraciones entre el interior y el exterior mitocondrial.

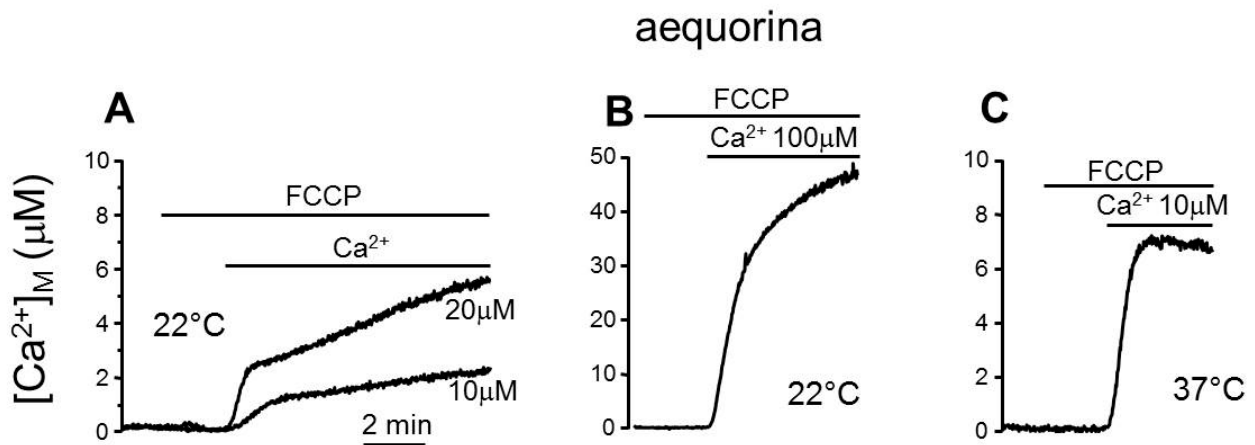


Figura 33: Incrementos en la $[Ca^{2+}]_M$ en células HeLa permeabilizadas, que expresaban mitmutAEQ reconstituida con celenterazina *n*, y cuyo potencial de membrana fue abolido con el protonóforo FCCP $2\mu M$. Se perfundieron tampones de $[Ca^{2+}]$ 10 y $20\mu M$ a $22^\circ C$ (panel A), de $100\mu M$ a $22^\circ C$ (panel B) y de $10\mu M$ a $37^\circ C$. Los experimentos son representativos de 3-4 experimentos de cada tipo.

RESULTADOS

Este mismo protocolo fue aplicado a células HeLa que expresaban mitRP, y el resultado obtenido fue el mismo que con mitmutAEQ. La perfusión de un tampón de $[Ca^{2+}]_M$ 10 μ M provocó un aumento en la $[Ca^{2+}]_M$ incluso con el potencial de membrana abolido mediante FCCP (Figura 34).

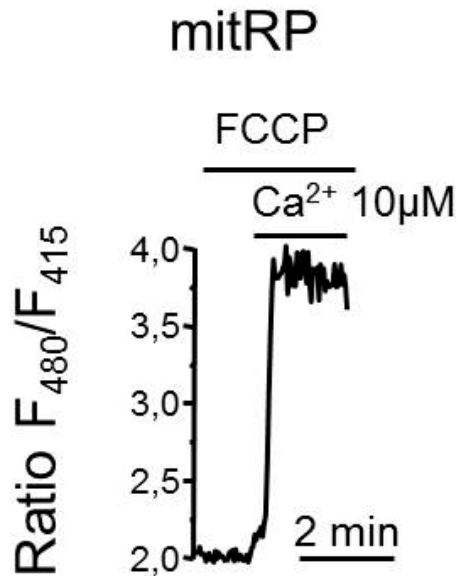


Figura 34: Incremento en la fluorescencia de células HeLa permeabilizadas, que expresaban mitRP, al perfundir un tampón de $[Ca^{2+}]_M$ 10 μ M durante 2 minutos en presencia del protonóforo FCCP 2 μ M a 22°C. El trazado mostrado es la respuesta media de 15 células y es representativo de 4 experimentos similares.

Con el objetivo de esclarecer el origen de estas discrepancias, se estudió en detalle si el rhod-2 afectaba de alguna manera a la morfología mitocondrial o a las respuestas en términos de $[Ca^{2+}]_M$, tanto citosólicas como mitocondriales.

Para estudiar la morfología mitocondrial, se emplearon células HeLa que expresaban EGFP dirigida a mitocondrias. Se tomaron imágenes, mediante microscopía confocal, previas a la carga con rhod-2. Posteriormente se cargaron las células con rhod-2 AM a una concentración de 1 o 5 μ M, tomando imágenes de la fluorescencia de EGFP durante los 30 minutos siguientes, correspondientes a la carga, y en algunos casos durante los 30 minutos de lavado posterior. En la figura 35 se puede apreciar cómo la carga con rhod-2 provoca una fisión mitocondrial, pasando de la forma tubular característica en células HeLa a mitocondrias redondas y pequeñas totalmente fragmentadas. Este proceso fue lento y parcial a una concentración de rhod-2 de 1 μ M y muy rápido y prácticamente completo a 5 μ M. El cambio fue revertido parcialmente con el lavado del colorante, sobre todo cuando el rhod-2 fue cargado a bajas concentraciones.

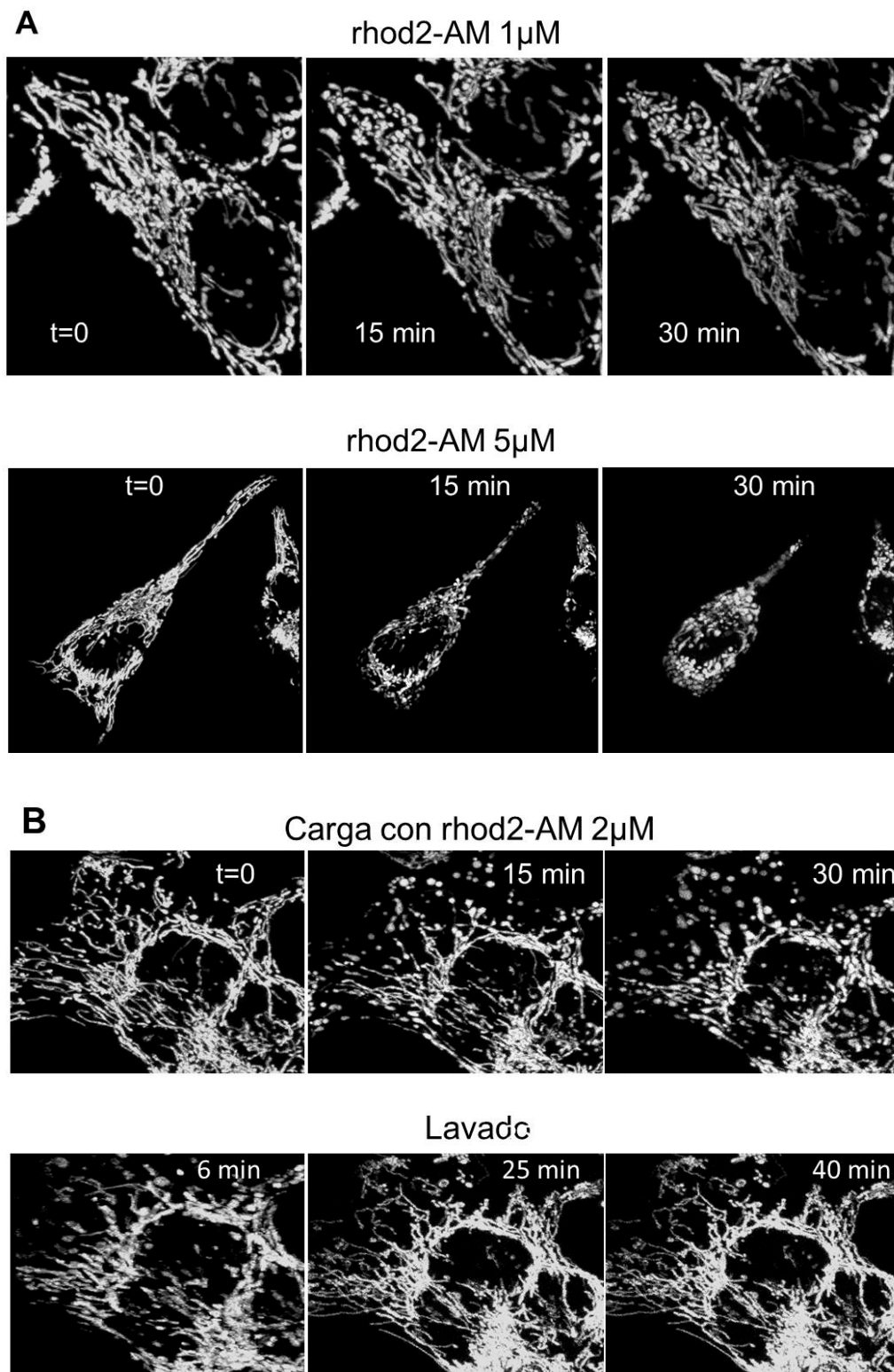


Figura 35: Cambios en la morfología mitocondrial inducidos por la carga con rhod-2 AM. Las imágenes de microscopía confocal del panel A pertenecen a células que expresan EGFP mitocondrial, tomándose imágenes a diferentes tiempos durante la carga con rhod-2 AM $1\mu\text{M}$ o $5\mu\text{M}$. En el panel B se muestra el efecto de la carga y el lavado a diferentes tiempos de rhod-2 AM $2\mu\text{M}$. Los experimentos mostrados son representativos de 7-17 similares de cada tipo.

RESULTADOS

El rhod-2 afectaba claramente a la morfología mitocondrial, sobre todo a concentraciones de rhod-2 superiores a $1\mu\text{M}$. Sin embargo, era necesario esclarecer si este cambio morfológico afectaba al incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ citosólica o mitocondrial inducido por estímulos fisiológicos.

A continuación se realizaron experimentos para comprobar si el rhod-2 tenía algún efecto sobre la magnitud del pico citosólico de Ca^{2+} evocado tras un estímulo. Estos experimentos se realizaron en células HeLa intactas que expresaban cytAEQ reconstituida con celenterazina *w*. La estimulación se realizó mediante el agonista histamina durante 1 minuto. En el panel A de la figura 36 se puede observar la respuesta de células control ante un estímulo de histamina $100\mu\text{M}$. En los paneles B y C se puede comprobar cómo la carga del colorante rhod-2 o de su derivado de baja afinidad rhod-FF, incluso a concentraciones de $10\mu\text{M}$, no tienen efecto alguno sobre el pico citosólico de Ca^{2+} inducido por histamina. En la figura 37 se muestran los datos promedios de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ máxima, obtenidos a partir de 5 – 6 experimentos de cada condición.

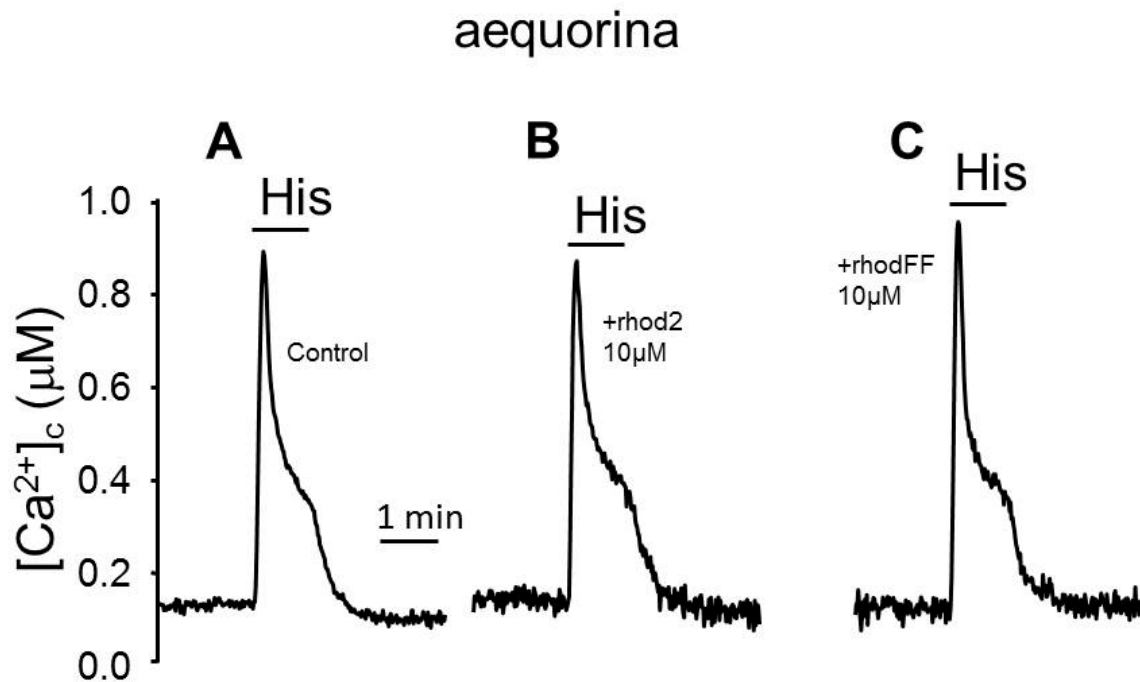


Figura 36: Registros de los aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ medidos en células HeLa intactas que expresaban cytAEQ reconstituidas con celenterazina *w*. Los experimentos se realizaron a 37°C , tras ser estimuladas con histamina $100\mu\text{M}$ durante 1 minuto. En el panel A se muestra el trazado de un experimento control, en el B un experimento con células cargadas con rhod-2 AM $10\mu\text{M}$ y en el C un experimento con células cargadas con rhod-FF AM $10\mu\text{M}$.

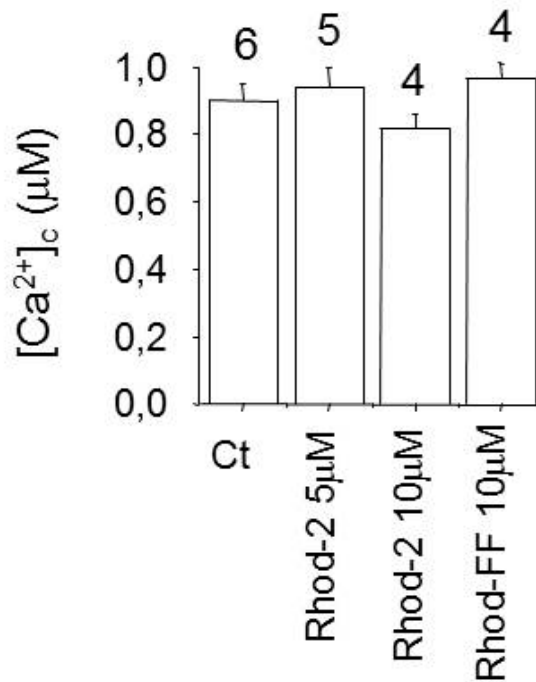


Figura 37: Diagrama de barras que representa la media de las $[Ca^{2+}]_c$ máximas alcanzadas en cada una de las condiciones experimentales, al estimular con histamina. Encima de cada barra aparece el número de experimentos realizados en cada condición.

Seguidamente se repitieron los experimentos anteriores en células HeLa intactas y con estímulos de histamina $100\mu M$, pero en esta ocasión se quiso comprobar si la carga de las células con diferentes concentraciones de rhod-2 y rhod-FF (2, 5 y $10\mu M$) provocaba algún tipo de cambio en los picos de Ca^{2+} mitocondriales, aunque no lo produjera en picos citosólicos. En la figura 38 se muestran los resultados de estos experimentos y contrariamente a lo observado en el citosol, el pico de Ca^{2+} mitocondrial medido con mitmutAEQ se vio disminuido con respecto al control. Cuando las células fueron cargadas con concentraciones de rhod-2 o rhod-FF de 5 o $10\mu M$, se apareció una clara disminución en la $[Ca^{2+}]_M$ máxima en el interior mitocondrial durante el estímulo de histamina. No se apreciaron diferencias en el pico de $[Ca^{2+}]_M$ con relación al control cuando las células se cargaron con rhod-2 o rhod-FF $2\mu M$. En la figura 39 se muestra el diagrama de barras con las medias de los diferentes experimentos. En él se puede apreciar como la carga con 5 y $10\mu M$ de rhod-2 y la carga con $10\mu M$ de rhod-FF producen una disminución significativa de la $[Ca^{2+}]_M$ máxima con respecto a las células control.

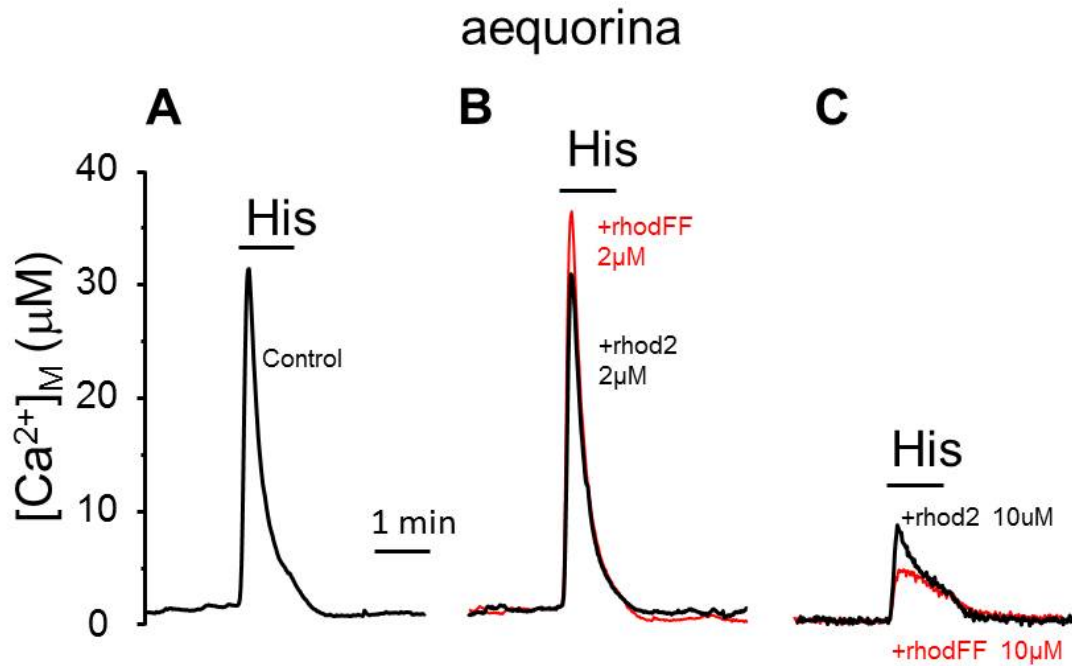


Figura 38: Registros en los incrementos en la $[Ca^{2+}]_M$ inducidos por histamina $100\mu M$ durante 1 minuto, en células HeLa intactas que expresan mitmutAEQ reconstituida con celenterazina *w*. Los experimentos fueron realizados a $37^\circ C$. En el panel A se observa el aumento de $[Ca^{2+}]_M$ en células control. En el panel B se muestra el registro de células cargadas con rhod-2 o rhod-FF $2\mu M$ y en el panel C, células cargadas con rhod-2 – rhod-FF $10\mu M$. Todas las cargas se realizaron durante 30 minutos seguidos de 30 minutos de lavado.

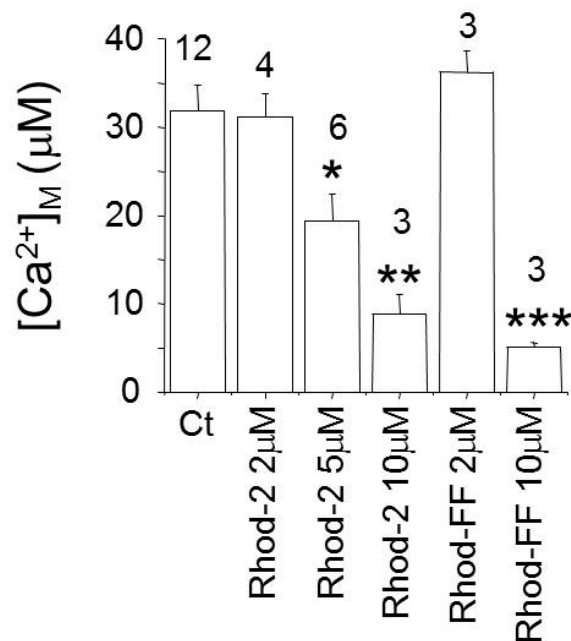


Figura 39: Diagrama de barras que representa la media de las $[Ca^{2+}]_M$ máximas obtenidas en cada una de las condiciones experimentales. Se puede comprobar como existen diferencias significativas aplicando el test de ANOVA entre las $[Ca^{2+}]_M$ alcanzadas en células control y las cargadas con rhod-2 AM 5 y $10\mu M$ y rhod-FF $10\mu M$. Los números encima de las barras indican el número de experimentos realizados para cada condición.

La causa de estos efectos podría estar en un aumento en la capacidad amortiguadora, debida a la alta concentración de rhod. Sin embargo los efectos de estas altas concentraciones de colorante sobre la morfología mitocondrial, parecen indicar que esta disminución en la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria podría estar relacionada además con un daño mitocondrial.

La carga de las células con rhod-2 $5\mu\text{M}$ induce además una pérdida parcial del potencial de membrana mitocondrial. Esta disminución fue evaluada mediante el colorante TMRE en un microscopio confocal. La disminución de la fluorescencia de este colorante refleja una disminución en el potencial de membrana mitocondrial. Estas medidas fueron tomadas a los 5, 15 y 30 minutos posteriores a la carga con rhod-2. En ausencia de rhod-2 la fluorescencia del TMRE no sufrió disminución alguna. Las imágenes obtenidas aparecen representadas en la figura 40.

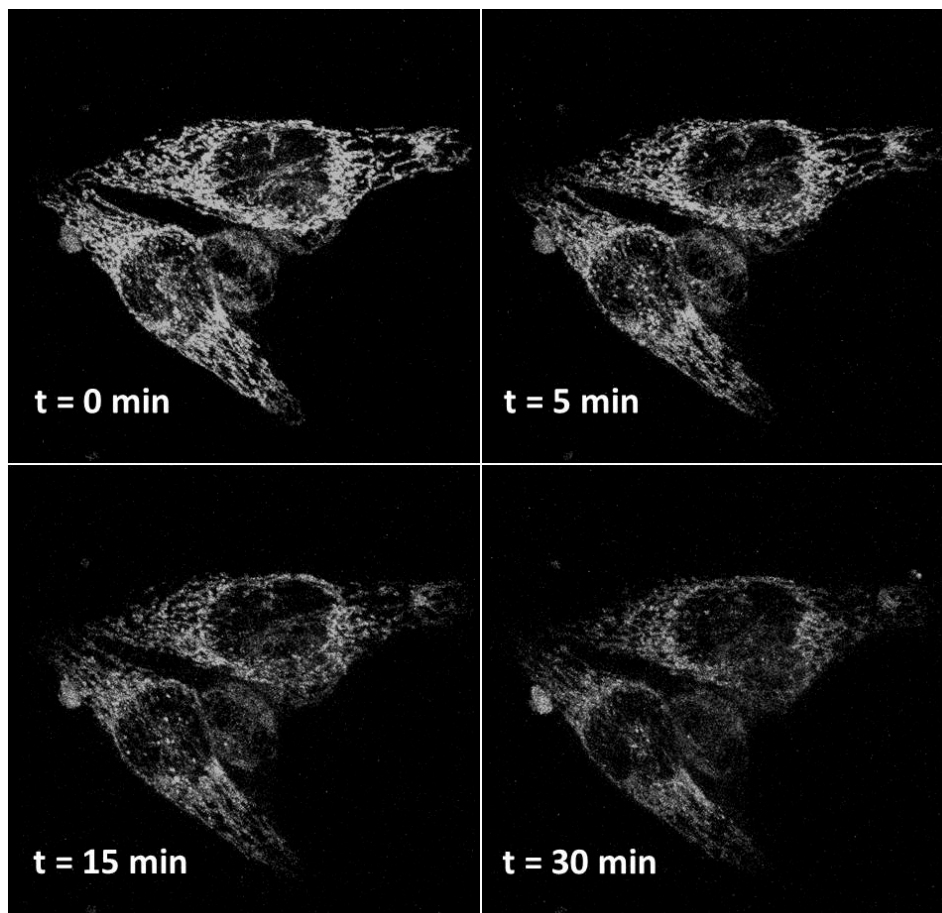


Figura 40: Imágenes de fluorescencia de células HeLa intactas cargadas con TMRE 100nM durante 1 minuto y con rhod-2 AM $5\mu\text{M}$ durante 30 minutos. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal a tiempo 0 y a los 5, 15 y 30 minutos. La intensidad media de la fluorescencia fue un 78, 58 y 47% de la inicial a los 5, 15 y 30 minutos respectivamente. Este experimento es representativo de 10 similares.

II. CALIBRACIÓN DEL RHOD-5N

Los resultados anteriores muestran la existencia de discrepancias en las medidas de $[Ca^{2+}]_M$ obtenidas con diferentes métodos. Los GECIs, como las aequorinas o los camaleones de baja afinidad miden valores de $[Ca^{2+}]_M$ mucho más altos que los obtenidos con colorantes como el rhod-2 o el rhod-FF. Estas discrepancias relativas a la $[Ca^{2+}]_M$ máxima que podría alcanzarse en el interior de la mitocondria en respuesta a un estímulo o bajo la perfusión de tampones de $[Ca^{2+}]$ conocida, deberían de ser resueltas con el uso de un colorante fluorescente sensible a Ca^{2+} de muy baja afinidad, como es el rhod-5N. Este colorante derivado del rhod-2 posee una K_d *in vitro* de $320\mu M$, característica que lo convierte en un candidato ideal para poder medir valores de $[Ca^{2+}]_M$ similares a los obtenidos con aequorina.

Para poder comparar los valores de $[Ca^{2+}]_M$ obtenidos con este colorante, fue necesario, en primer lugar, realizar una calibración intracelular *in situ*. Para realizar esta calibración, las células HeLa fueron cargadas durante 30 minutos con rhod-5N AM y lavadas durante otros 30 minutos antes de la realización de los experimentos. Posteriormente las células fueron permeabilizadas bajo perfusión y se mantuvieron en medio interno EGTA hasta que la señal de fluorescencia basal fue estable. A partir de este momento se perfundieron soluciones con $[Ca^{2+}]$ conocidas desde $50\mu M$ a $10mM$. Todas estas soluciones contenían el protonóforo FCCP, con el fin de despolarizar la membrana mitocondrial y que el Ca^{2+} entrara en el interior de la mitocondria mediante un simple equilibrio de concentraciones. Con cada adición de las soluciones de diferentes $[Ca^{2+}]$ se produjo un rápido incremento en la fluorescencia del rhod-5N, alcanzándose una señal estable en un corto periodo de tiempo. La $[Ca^{2+}]$ máxima perfundida fue de $10mM$, ya que a esta concentración, el colorante debería de estar casi saturado y la fluorescencia en este punto debería de ser muy cercana a la máxima. En la figura 41 se pueden observar registros de los incrementos en la señal de fluorescencia tras la adición de cada $[Ca^{2+}]$. Así mismo, se muestran varias imágenes en las que se aprecia este incremento de fluorescencia.

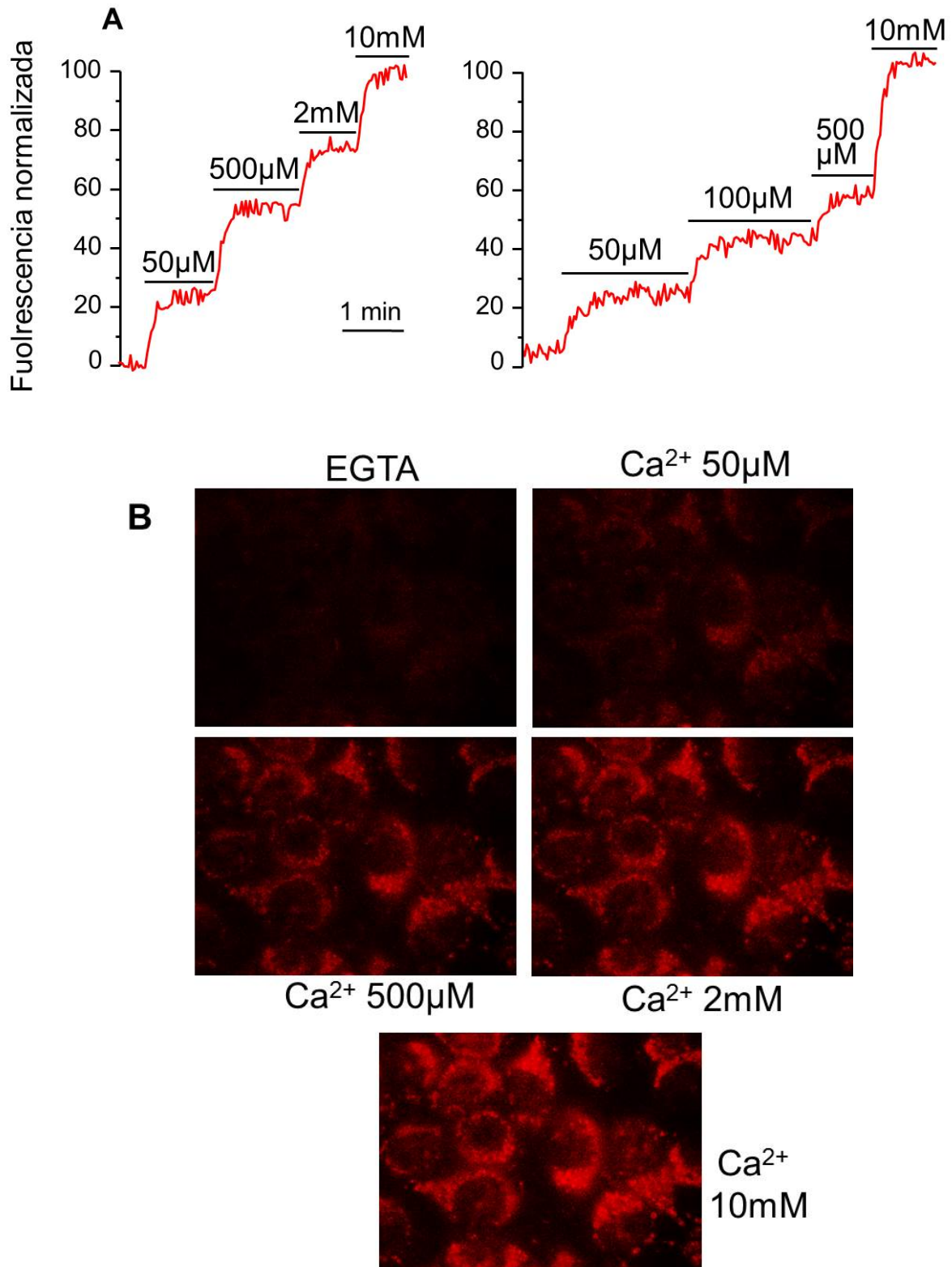


Figura 41: Calibración intracelular del rhod-5N a 22°C. Las células fueron cargadas con rhod-5N AM 2 μ M durante 30 minutos seguidos de otros 30 minutos de lavado. Todas las soluciones con [Ca²⁺] conocidas contenían FCCP 4 μ M y se ajustaron a pH 8. En el panel A se muestran los registros de los aumentos de fluorescencia correspondientes a las adiciones de [Ca²⁺] en dos experimentos diferentes. En el panel B se muestran imágenes de la fluorescencia correspondientes a las [Ca²⁺] indicadas.

RESULTADOS

Para realizar la curva de calibración se normalizaron todos los experimentos realizados, tomando como 0% de fluorescencia la fluorescencia basal obtenida bajo la perfusión del medio interno EGTA libre de Ca^{2+} y como 100% la fluorescencia registrada al añadir Ca^{2+} 10mM. Se ajustó una curva sigmoidea (típica de la cinética de unión de ligandos) a los datos obtenidos experimentalmente, obteniendo una K_d (50% de fluorescencia) de $470\mu\text{M}$, siendo ésta más alta que la obtenida *in vitro*. A partir de esta curva de calibración se transformarán todos los datos de fluorescencia obtenidos experimentalmente en datos de $[\text{Ca}^{2+}]$, normalizando siempre la señal de fluorescencia en cada experimento del modo en que se ha descrito anteriormente (al final de todos los experimentos realizados con rhod-5N se añadió $[\text{Ca}^{2+}]$ 10mM para poder realizar esta normalización).

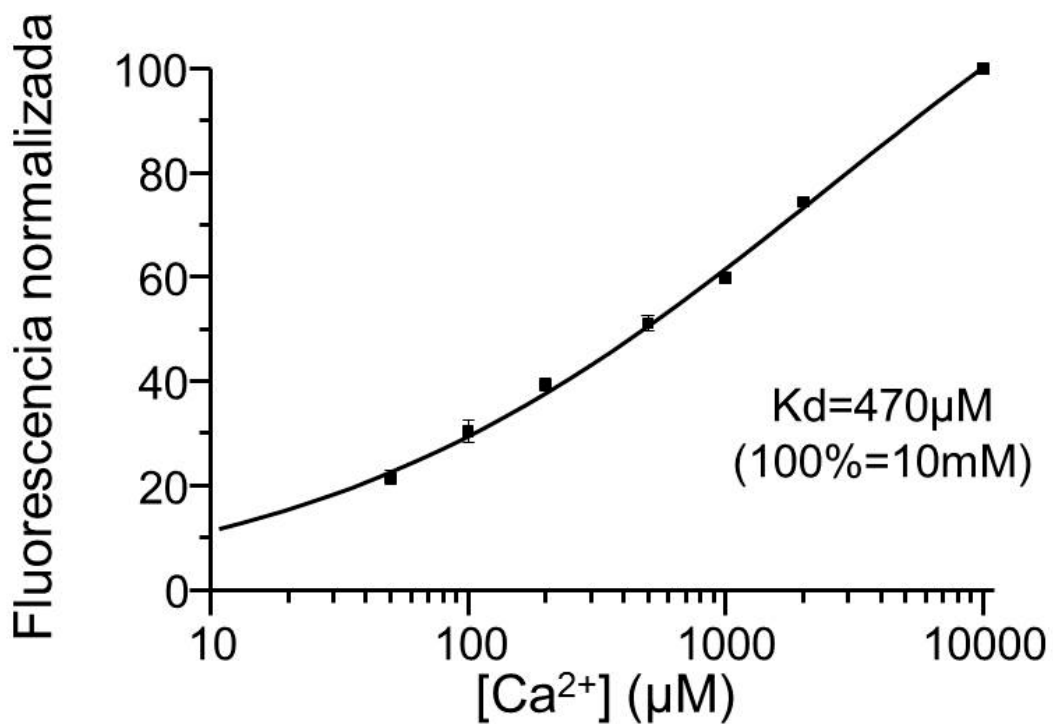


Figura 42: Curva de calibración para el rhod-5N, obtenida a partir del ajuste de una curva sigmoidea a los datos de fluorescencia. La media de los valores de cada punto se calculó a partir de entre 3 y 6 datos por punto.

III. OBTENCIÓN Y CALIBRACIÓN DE NUEVAS AEQUORINAS DIRIGIDAS

La proteína bioluminiscente aequorina ha sido utilizada desde hace más de 20 años para realizar medidas intracelulares de Ca^{2+} . Sin embargo la reacción bioluminiscente de la aequorina se considera irreversible en el tiempo en el que se realizan los experimentos, produciéndose un consumo de la sonda a lo largo del mismo. La aequorina nativa posee una alta afinidad por Ca^{2+} y su consumo es extremadamente rápido a altas $[\text{Ca}^{2+}]$ limitando el tiempo experimental a unos pocos minutos. El uso de la celenterazina semisintética *n* y la reducción de la temperatura experimental de 37°C a 22°C consiguen reducir la afinidad de la aequorina, aunque no lo suficiente como para medir $[\text{Ca}^{2+}]$ elevadas durante mucho más tiempo, con el inconveniente añadido de que los experimentos realizados a 22°C no se adaptarían a las condiciones reales fisiológicas

En 1992, el grupo de Kendall introdujo una mutación en la secuencia de la aequorina sustituyendo el aminoácido en posición 119 (aspártico) por una alanina. Esta mutación se encontraba localizada en el tercer dominio “EF-hand” de unión a Ca^{2+} y gracias a esta mutación se consiguió reducir la afinidad de la aequorina por Ca^{2+} en 1 orden de magnitud (119 mutAEQ). Sin embargo, aún con esta mutación y el uso de la celenterazina *n*, la afinidad de la aequorina por Ca^{2+} continuaba siendo demasiado alta como para poder medir $[\text{Ca}^{2+}]$ en el rango milimolar durante un tiempo prolongado a 37°C.

Para solucionar este problema, se diseñaron varias mutaciones en aminoácidos del primer o del cuarto dominio “EF-hand” con el fin de “inutilizar” un segundo dominio de unión a Ca^{2+} y reducir aún más la afinidad de la aequorina. Mediante el protocolo de mutagénesis dirigida fueron generadas nuevas aequorinas con mutaciones, tanto en el primer dominio de unión como en el cuarto. Algunas de estas mutaciones dieron lugar a formas no funcionales de la aequorina y otras no tuvieron efecto alguno sobre la afinidad por Ca^{2+} .

Sin embargo la mutación en el aminoácido 28, sustituyendo un residuo asparragina por uno de leucina sí que tuvo éxito, reduciendo un orden de magnitud más la afinidad de la aequorina y manteniendo su funcionalidad intacta (28, 119

RESULTADOS

mutAEQ). Por lo tanto, esta nueva aequorina doblemente mutada reconstituida con celenterazina *w* posee una afinidad 100 veces menor a la obtenida con la aequorina nativa reconstituida con la misma celenterazina. Este residuo de asparragina del primer "EF-hand" parece ser fundamental para la unión del Ca^{2+} , ya que su sustitución por otros aminoácidos como la histidina o la isoleucina produjeron el mismo resultado. Esta mutación, además de producir un cambio de aminoácido, introdujo un nuevo sitio de corte para la enzima de restricción Sty I, permitiendo así una fácil identificación de secuencias que contenían la nueva mutación. En la figura 43 se muestra una imagen de un gel de agarosa en el que se pueden apreciar los fragmentos de las secuencias que contenían la mutación de interés (cada una de estas secuencias se obtuvo a partir de una colonia de bacterias DH5 α transformada con el DNA generado mediante mutagénesis dirigida).

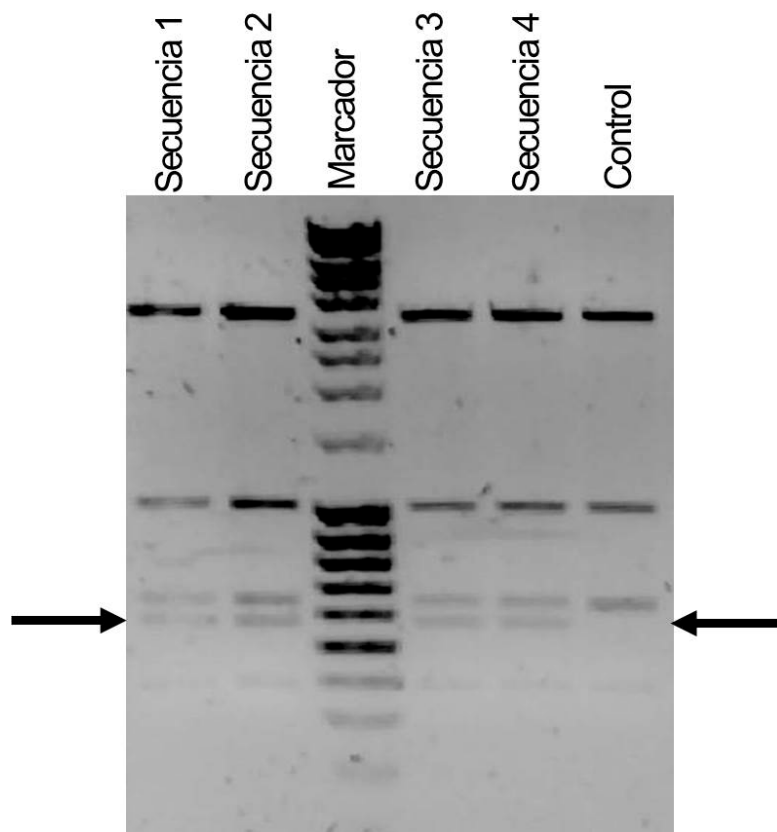


Figura 43: Imagen del gel de agarosa al 1% con los fragmentos de las secuencias obtenidos a partir de 4 colonias diferentes que contenían la nueva mutación de interés, las flechas indican la banda que aparece gracias al nuevo sitio de corte Sty I. Esta nueva banda no aparece en la secuencia control.

La reconstitución de esta nueva aequorina doblemente mutada con celenterazina *w* confería una afinidad ligeramente inferior a la obtenida con la 119 mutAEQ reconstituida con celenterazina *n*, permitiendo realizar medidas en un rango de $[\text{Ca}^{2+}]$ un poco más amplio y de mejor calidad, al ser mucho más eficiente la

reconstitución con celenterazina *w*. Por otra parte, la combinación de esta forma de aequorina 28,119 mutAEQ con la celenterazina *n* resultó tener demasiada baja afinidad como para detectar cambios de $[Ca^{2+}]$ fisiológicos, mostrando además una escasa luminiscencia. Para solucionar este inconveniente fue necesario reconstituir esta aequorina con una celenterazina que confiriera una afinidad intermedia entre la conseguida con la celenterazina *w* y la *n*. La reconstitución de esta aequorina con la celenterazina semisintética *i* proporcionó la afinidad adecuada para realizar medidas en el rango milimolar durante periodos prolongados de tiempo a 37°C. Esta nueva aequorina 28,119 mutAEQ fue dirigida a mitocondria (denominada a partir de ahora LAmitAEQ) de la misma manera que la mitmutAEQ. Esta aequorina fue calibrada reconstituida con celenterazinas *w* o *i*, del modo en que se explica en la sección de materiales y métodos. Los parámetros de esta nueva aequorina son los siguientes:

	LAmitAEQ Celent <i>w</i>	LAmitAEQ Celent <i>i</i>
K_R	4922000	56700
K_{TR}	250000	31480
<i>n</i>	1,08	1,089
λ	1	0,4

Tabla 10: Parámetros de la calibración de la LAmitAEQ reconstituida con celenterazina *w* o *i*.

Para la obtención de la curva de calibración se perfundieron medios con $[Ca^{2+}]$ no tamponadas de entre 50 μ M y 10mM, obteniéndose al menos 3 datos para cada punto. El consumo total de la sonda se consiguió perfundiendo Ca^{2+} 10mM al final de cada experimento. Cada punto experimental fue obtenido como el ratio entre la luminiscencia para una $[Ca^{2+}]$ concreta (*L*) y la luminiscencia restante desde ese punto hasta el final (L_{max}). La curva de calibración se ajustó a los diferentes puntos empleando el algoritmo descrito anteriormente. En la figura 44 se muestran las nuevas curvas de calibración obtenidas, así como las ya existentes, representando el log de la $[Ca^{2+}]$ frente al log (L/L_{max}). Como se puede observar en las curvas de calibración, la nueva aequorina posee una afinidad por Ca^{2+} más de 10 veces menor a la de menor afinidad existente hasta el momento.

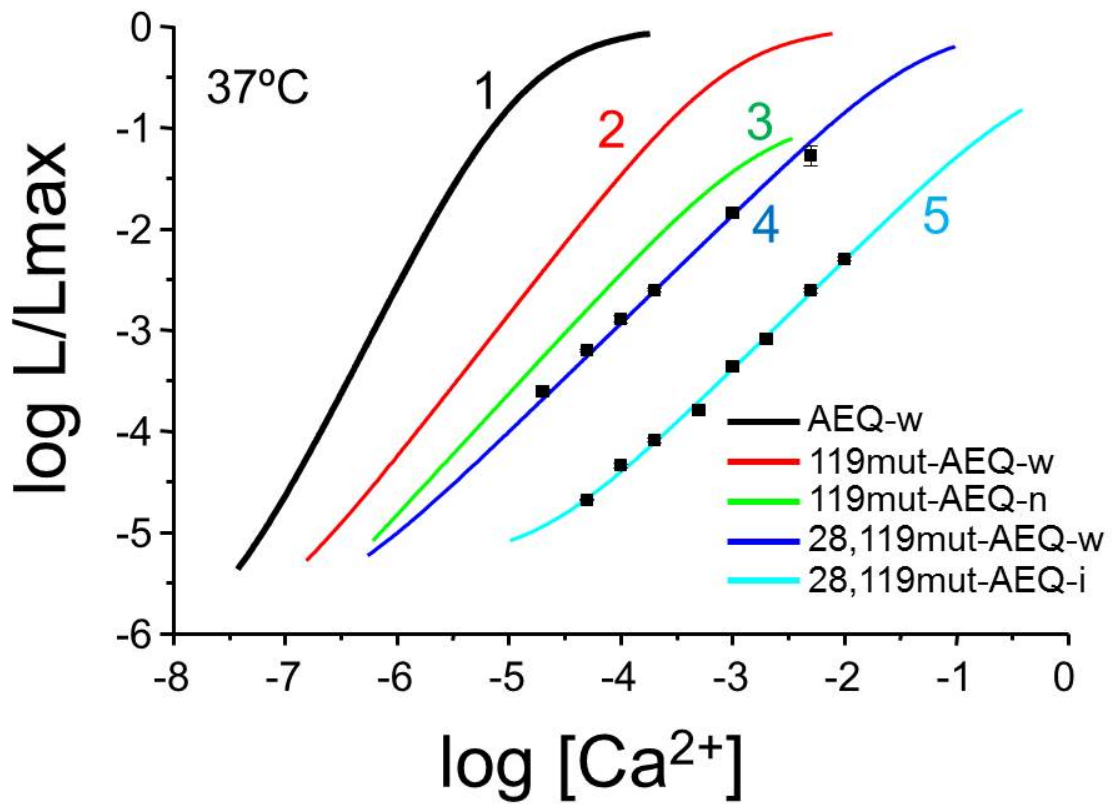


Figura 44: Curvas de calibración de las diferentes aequorinas incluida la nueva aequorina 28, 119 mutAEQ reconstituida con las celenterazinas *w* e *i*. Los puntos experimentales fueron obtenidos a partir de al menos 3 datos para cada [Ca²⁺]. En la gráfica se puede observar la comparación entre las diferentes combinaciones de aequorinas y celenterazinas, así como sus diferentes afinidades y sus rangos de medida idóneos. Todos los datos representados se corresponden a una temperatura experimental de 37°C.

IV. ESTUDIO DE LOS FLUJOS DE ENTRADA Y SALIDA DEL Ca^{2+} MITOCONDRIAL MEDIDOS CON AEQUORINA

Cuando después de una estimulación, la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ aumenta, este incremento no solo se debe a la entrada de Ca^{2+} a través del MCU, sino que supone un balance entre la entrada y la salida de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (salida dependiente de Na^+) y del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (salida independiente de Na^+). A pesar de la importancia de estos flujos de entrada y salida, aún no existen estudios directos detallados de los mismos. Los siguientes experimentos fueron diseñados con el fin de estudiar el comportamiento de estos flujos, atendiendo a diferentes condiciones como la presencia de diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ y $[\text{Na}^+]$ extramitocondriales y los cambios producidos por la temperatura.

En primer lugar se estudió la cinética de salida del Ca^{2+} de la mitocondria a 37°C . Para ello fue necesario que las mitocondrias acumularan previamente Ca^{2+} en su interior gracias a la perfusión de un medio intracelular que contenía un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $7\mu\text{M}$. A continuación este Ca^{2+} acumulado en la matriz fue liberado debido a la perfusión de medio intracelular, libre de Ca^{2+} y que contenía EGTA. Esta salida en presencia de Na^+ 10mM (concentración intracelular similar a la fisiológica) fue muy rápida, con una cinética muy parecida a la de entrada. Sin embargo, la ausencia de Na^+ en el medio produjo una salida de Ca^{2+} mucho más lenta, provocada por el bloqueo de la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El panel A de la figura 45 muestra esta entrada y salida de Ca^{2+} mitocondrial en presencia o en ausencia de Na^+ . El panel B muestra dos trazados, obtenidos como la media de experimentos similares, en los que se puede apreciar con más detalle cómo la salida de Ca^{2+} en ausencia de Na^+ (salida independiente de Na^+) es notablemente más lenta que en presencia de éste.

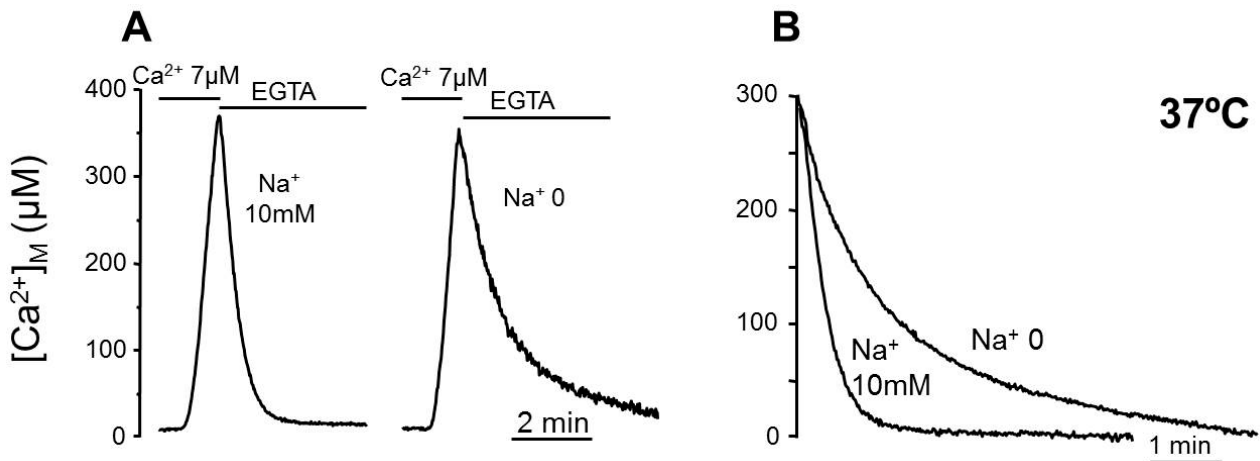


Figura 45: Cinética de salida del Ca^{2+} mitocondrial a 37°C en presencia de Na^{+} $10\mu\text{M}$ o en ausencia de éste, estudiada en células HeLa permeabilizadas que expresaban mitmutAEQ reconstituida con celenterazina *n*. En el panel A se muestra la entrada y salida de Ca^{2+} tras una breve perfusión de un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $7\mu\text{M}$. El panel B muestra una superposición de ambas salidas en la que se observa en más detalle una clara diferencia en la velocidad de salida del Ca^{2+} , en presencia o en ausencia de Na^{+} .

La figura 46 muestra la dependencia de la velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ con la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$, en presencia o en ausencia de Na^{+} . Los trazados de salida de Ca^{2+} anteriores fueron ajustados de forma polinómica para eliminar el ruido, y posteriormente se calculó la derivada primera de dichas curvas ajustadas para obtener la velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ en cada punto. La representación final de estos datos frente a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ correspondiente a cada velocidad de salida, muestran una figura en la que se observa cómo depende la velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ de la propia $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$. La velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ en presencia de Na^{+} es el resultado de las salidas a través del intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ y del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$. Restando la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ independiente de Na^{+} (a través del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$) de la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ total, se puede conseguir un nuevo trazado que muestra únicamente la velocidad de salida de Ca^{2+} dependiente de Na^{+} . La velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ en presencia de Na^{+} aumenta linealmente hasta alcanzar niveles cercanos a $800\mu\text{M}/\text{min}$ para $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ de $400\mu\text{M}$. Sin embargo la velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ en ausencia de Na^{+} es muy lenta a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ por debajo de $200\mu\text{M}$, y se incrementa a partir de estas concentraciones, aunque de manera no lineal. El trazado obtenido como resultado de la sustracción de ambas salidas, muestra que la velocidad de salida de Ca^{2+} dependiente de Na^{+} se ve saturada a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ superiores a $400\mu\text{M}$.

La conclusión de estos resultados es que la salida de Ca^{2+} dependiente de Na^+ es predominante a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ inferiores a $200\mu\text{M}$ siendo éste el único mecanismo de salida de Ca^{2+} significativo cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ se encuentra por debajo de $100\mu\text{M}$. Por el contrario, la salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ ve incrementada su actividad rápidamente a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ superiores a $200\mu\text{M}$. Debido al consumo de aequorina, no ha sido posible medir las velocidades de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ más altas, aunque los datos apuntan a una mayor importancia de la salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ , debido a la saturación de la salida dependiente de Na^+ a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ altas.

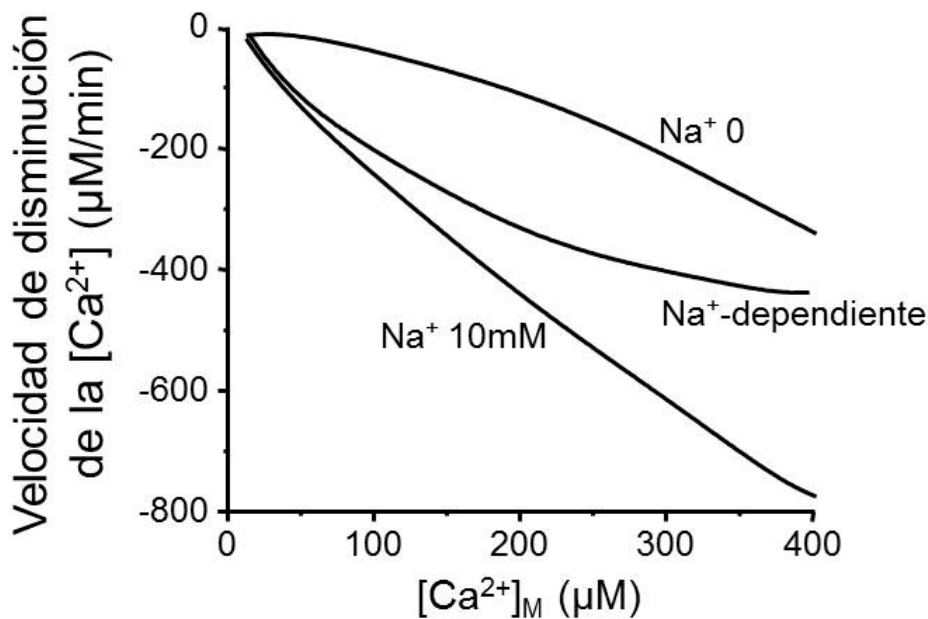


Figura 46: Dependencia de la velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ en función de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$. Los datos del panel B de la figura anterior fueron ajustados polinómicamente y la primera derivada de ellos ha sido representada frente a la $[\text{Ca}^{2+}]_M$. El trazado nombrado como Na^+ -dependiente se obtuvo sustrayendo la curva Na^+ 0 de la curva Na^+ 10mM.

A continuación se investigó cuál era el efecto de la temperatura sobre la cinética de salida de Ca^{2+} de la mitocondria. Para ello se realizaron experimentos a 22°C y en presencia de distintas $[\text{Na}^+]$. Debido al menor consumo de aequorina a esta temperatura, fue posible monitorizar las velocidades de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ más altas.

La figura 47, muestra que la salida del Ca^{2+} mitocondrial a 22°C es mucho más lenta que a 37°C y que a esta temperatura la dependencia de Na^+ es mayor. En los paneles A y B de la figura 48, los datos han sido transformados de la misma manera que se ha descrito anteriormente. En el panel B la curva correspondiente a los experimentos realizados en ausencia de Na^+ ha sido restada del resto de curvas, con el fin de mostrar únicamente la salida dependiente de Na^+ .

A partir de estos datos se puede concluir que la salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ es muy pequeña a 22°C alcanzando tasas que apenas llegan a los $40\mu\text{M}/\text{min}$ a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ cercanas a $500\mu\text{M}$. Estas velocidades de salida independientes de Na^+ son 10 veces menores a las que se obtuvieron a 37°C . Las velocidades de salida dependientes de Na^+ también se vieron disminuidas al reducir la temperatura de 37 a 22°C aunque en menor proporción. Para $[\text{Na}^+]$ de 10mM la velocidad de salida se redujo hasta $120\mu\text{M}/\text{min}$, aproximadamente 4 veces menor que a 37°C .

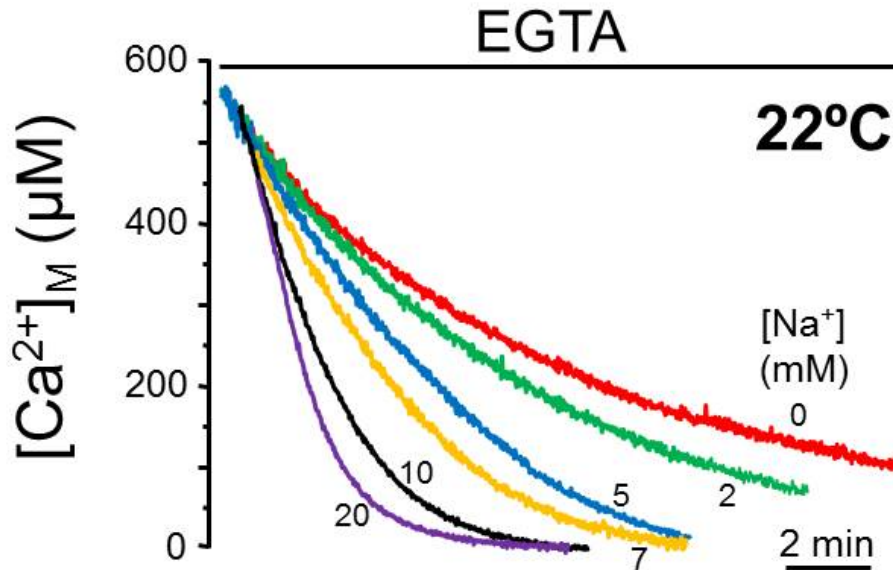


Figura 47: Cinética de salida de Ca^{2+} mitocondrial, medida en células HeLa permeabilizadas que expresaban mitmutAEQ reconstituida con celenterazina *n*. Las células fueron perfundidas brevemente con un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ $7\mu\text{M}$ y posteriormente con medio intracelular EGTA que contenía $[\text{Na}^+]$ variables, como se indica en la figura. Los trazados muestran la media de 4-8 experimentos similares de cada condición.

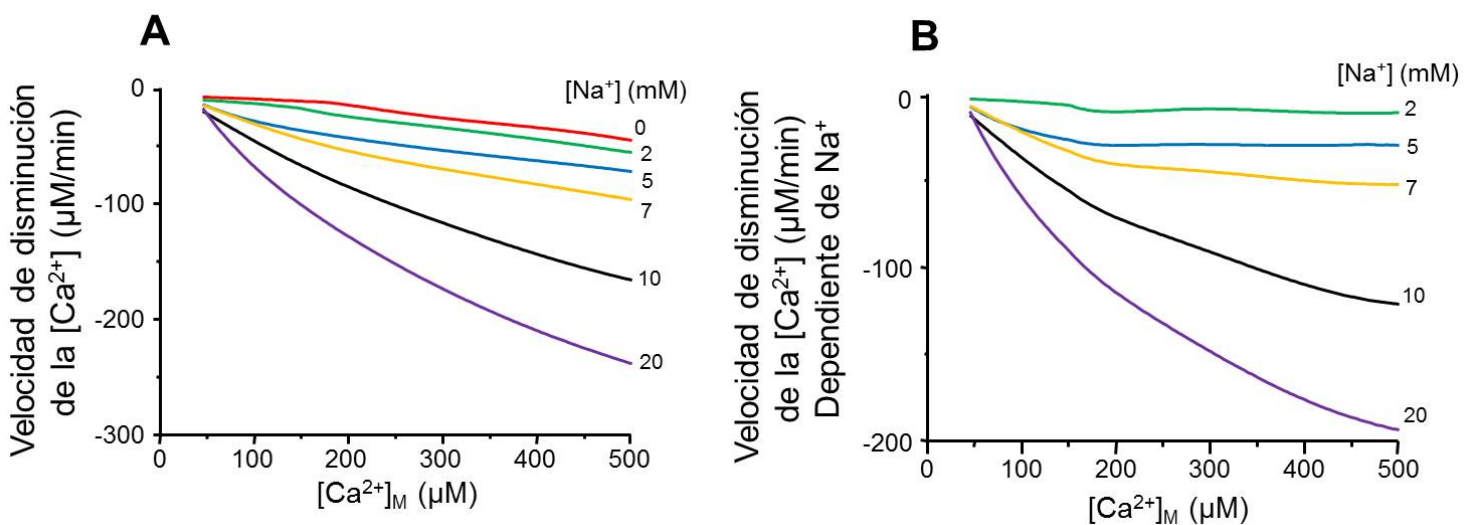


Figura 48: Dependencia de la velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ en función de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ y en presencia de varias $[\text{Na}^+]$ (panel A). El panel B muestra la salida dependiente de Na^+ , habiéndose sustraído previamente la salida independiente de Na^+ ($[\text{Na}^+] 0$) de todas las demás. Los datos han sido obtenidos de la misma manera que en la figura 46.

El siguiente paso fue estudiar los flujos de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en presencia de diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ a 37°C y qué efecto ejerce en este caso la presencia o ausencia de Na^+ en el medio. La figura 49 muestra los registros obtenidos al perfundir diferentes tampones de $[\text{Ca}^{2+}]$ conocidas en células HeLa permeabilizadas. Los medios perfundidos carecían de Na^+ en el caso de los registros del panel A y contenían Na^+ 10mM en el panel B. Se puede observar como en todos los casos, la velocidad del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ aumenta a medida que se aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]$ del tampón perfundido. La perfusión del tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ 10 μM incrementó la velocidad de entrada de Ca^{2+} sustancialmente, alcanzándose concentraciones superiores a 1mM en apenas unos segundos. La presencia de Na^+ 10mM en el medio consigue reducir notablemente este incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$, aunque sus efectos son más evidentes en tampones de $[\text{Ca}^{2+}]$ 7 μM o inferiores. El incremento producido por la perfusión del tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ 10 μM apenas se ve afectado por la presencia o ausencia de Na^+ en el medio.

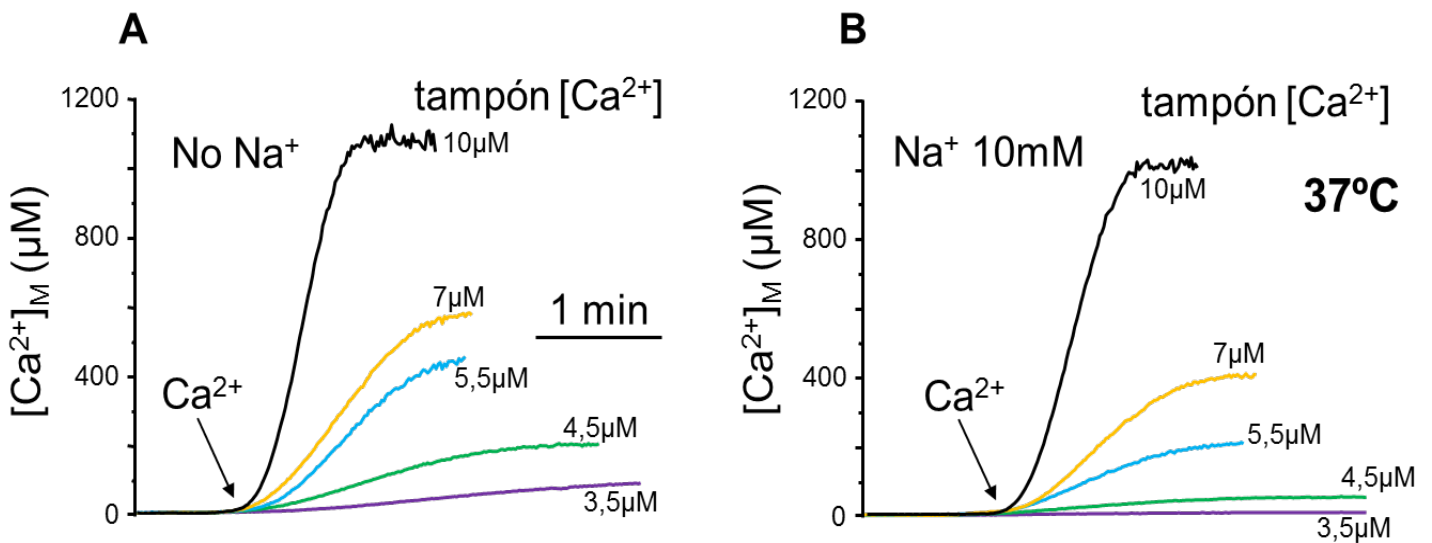


Figura 49: Cinética de la entrada de Ca^{2+} mitocondrial a 37°C a diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólicas y en ausencia o presencia de Na^+ 10mM. Los experimentos fueron realizados en células HeLa permeabilizadas que expresaban mitmutAEQ reconstituida con celenterazina *n*. Cada trazado muestra el incremento producido al perfundir un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ indicado en cada caso. En el panel A estos incrementos se produjeron en ausencia de Na^+ y en el panel B en presencia de Na^+ 10mM.

RESULTADOS

Estos datos fueron transformados de la misma manera que los datos de salida de Ca^{2+} . Se ajustaron los trazados experimentales a curvas polinómicas y a partir de éstas se obtuvo la derivada primera de cada una de ellas. Estas nuevas curvas fueron representadas en función de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ correspondiente a cada velocidad. Los datos de la velocidad de incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ mostrados se corresponden con la parte de la gráfica en la que ya se ha alcanzado la máxima velocidad, los datos anteriores a este punto no se muestran con el fin de facilitar la lectura de la propia gráfica.

En la figura 50 se pueden ver los resultados de las transformaciones descritas anteriormente. Los paneles A y B muestran los resultados en ausencia de Na^+ , mientras que los paneles C y D muestran los resultados en presencia de Na^+ (los paneles B y D son ampliaciones de los paneles A y C respectivamente). Las líneas punteadas representan las velocidades de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ a 37°C , tomadas de la figura 46. Estas velocidades de incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ suponen realmente un balance entre la entrada de Ca^{2+} a través del MCU y la salida a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$

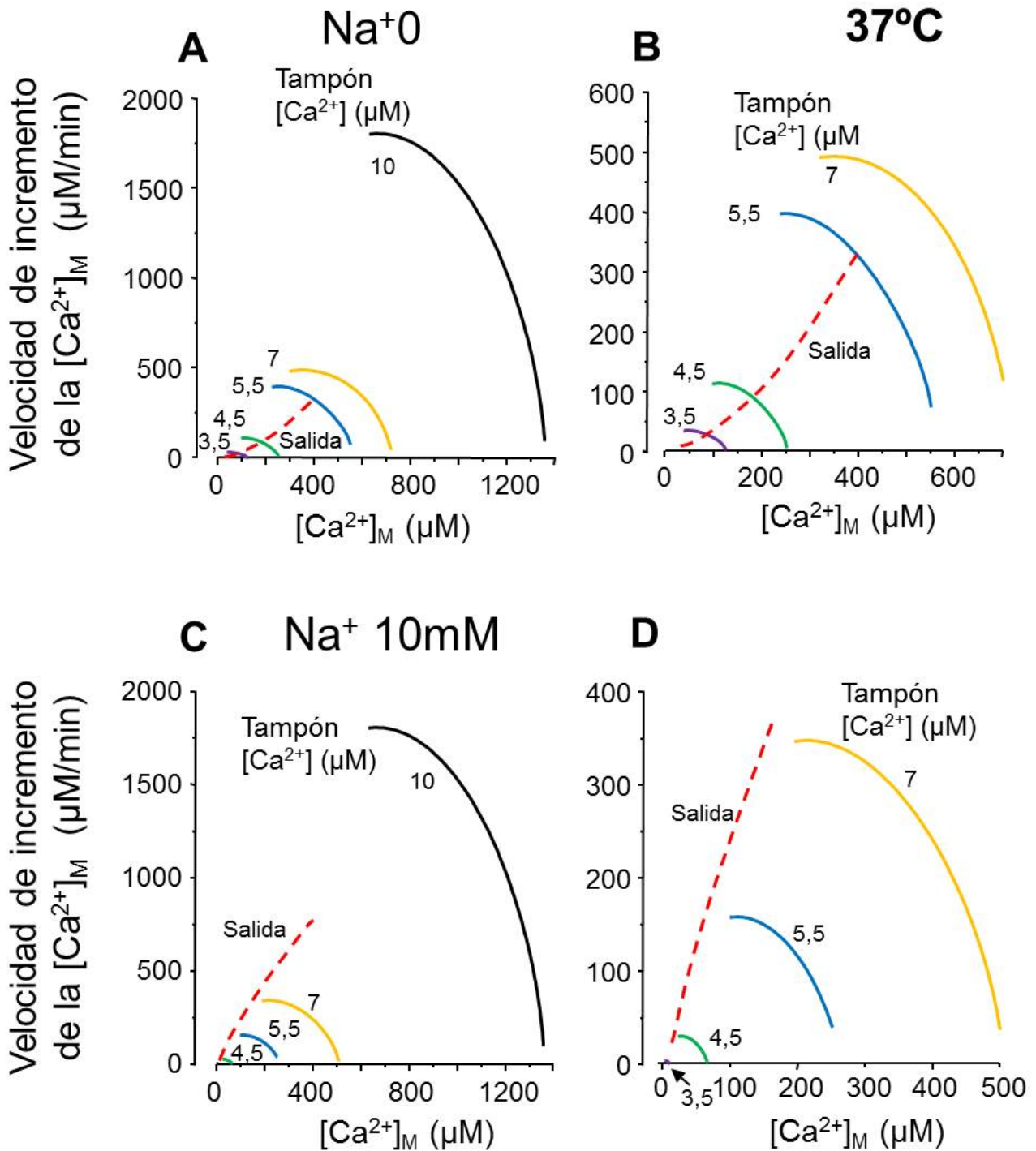


Figura 50: Dependencia de la velocidad de incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ en función de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ a 37°C para todas las $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólicas. Los datos de la figura 49 fueron transformados de igual modo que en la figura 46. En el panel A se muestra esta dependencia en presencia de Na^+ y en el B en ausencia de Na^+ . Los paneles B y D son ampliaciones de los paneles A y C respectivamente. En todos los casos la línea punteada representa la tasa de salida de Ca^{2+} tomada de la figura 46.

RESULTADOS

El incremento en la $[Ca^{2+}]$ que se muestra en las curvas anteriores no es debido sólo a la entrada de Ca^{2+} sino al balance entre la entrada y la salida a través de los distintos transportadores

La presencia de Na^+ en el medio provoca que los incrementos de Ca^{2+} sean menores a $[Ca^{2+}]$ bajas, debido a la mayor velocidad de disminución de la $[Ca^{2+}]_M$ causada a su vez por el funcionamiento conjunto del intercambiador Na^+/Ca^{2+} y del intercambiador Ca^{2+}/H^+ . Sin embargo, si solo se considera la entrada de Ca^{2+} a través del MCU, ésta debería de ser la misma tanto en presencia como en ausencia de Na^+ . Para calcular esta entrada unidireccional, se han utilizado las fases estables de las curvas anteriores. Cuando el incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ se mantiene en una situación estable, el balance entre la entrada y salida de Ca^{2+} se encuentra en equilibrio. En este punto de equilibrio, la $[Ca^{2+}]_M$ es estable y la velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ es igual a 0. En las gráficas anteriores, el punto de corte de cada una de las curvas de velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ con el eje X, muestra la $[Ca^{2+}]_M$ a la que la velocidad de entrada neta de Ca^{2+} es igual a la salida total. Si se calcula la velocidad de salida de Ca^{2+} para esta $[Ca^{2+}]_M$, este valor se corresponderá también con la velocidad de entrada unidireccional de Ca^{2+} para ese tampón de Ca^{2+} en concreto. Esta entrada unidireccional de Ca^{2+} debería de ser la misma, independientemente de si se calcula a partir de curvas obtenidas en presencia de Na^+ o en su ausencia.

Para ejemplificar esta situación se extrapolaron las curvas de la velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ inducido por las $[Ca^{2+}]$ $4,5\mu M$ y $5,5\mu M$ hasta el eje X, tanto en presencia de Na^+ como en su ausencia. Estas extrapolaciones nos dan valores de $[Ca^{2+}]_M$ en los que la entrada y la salida están en equilibrio. Por lo tanto en este punto la velocidad de incremento debería de ser igual a la velocidad de disminución, por lo que a partir de la curva de disminución de la velocidad de la $[Ca^{2+}]_M$ se podría obtener el valor del incremento debido únicamente a la entrada de Ca^{2+} . En la figura 51 se muestran estos ejemplos: para la $[Ca^{2+}]$ $4,5\mu M$ la velocidad de entrada unidireccional sería aproximadamente de $160\mu M/min$ y para la $[Ca^{2+}]$ $5,5\mu M$ estaría cercana a $550\mu M/min$.

Como se puede apreciar en las gráficas, estos valores son iguales tanto si los obtenemos a partir de los datos en presencia de Na^+ o en su ausencia

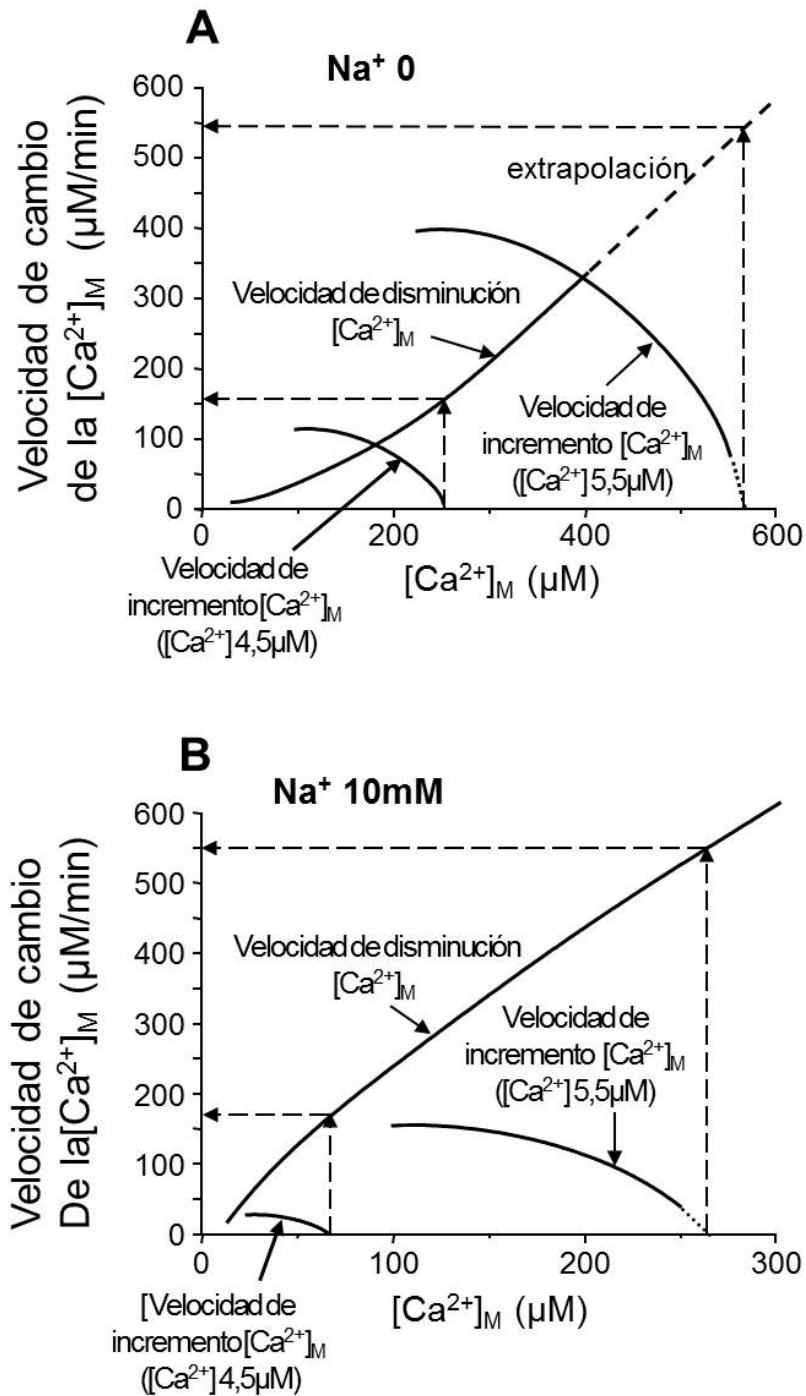


Figura 51: Cálculo de la velocidad de entrada de Ca^{2+} unidireccional. La figura muestra las curvas de la velocidad de incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ para las $[\text{Ca}^{2+}]$ 4,5 y 5,5 μM (balance entre entrada y salida) en ausencia (panel A) o en presencia de Na^+ (Panel B). Junto con ellas se muestran las curvas de velocidad de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$. Cuando las curvas de la velocidad de incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ cortan al eje X, la velocidad del incremento y disminución debería de ser la misma y la entrada neta se puede calcular a partir de la velocidad de disminución para el mismo valor de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ (indicado mediante las flechas punteadas).

RESULTADOS

La velocidad máxima de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ se observó con el tampón de $[Ca^{2+}]$ $10\mu M$. Esta velocidad se encuentra en torno a $1800\mu M/min$ (correspondiente a $1,8nm Ca^{2+}$ libre·mg proteína⁻¹·min⁻¹ si asumimos un valor de 1mg de proteínas por μl de agua en la matriz mitocondrial) obtenida a una $[Ca^{2+}]_M$ de $700\mu M$, y es independiente de la presencia o la ausencia de Na^+ , puesto que la salida dependiente de Na^+ se ve saturada para valores de $[Ca^{2+}]$ superiores a $400\mu M$. Resulta difícil de estimar la entrada unidireccional para el tampón de $[Ca^{2+}]$ $10\mu M$ extrapolando la velocidad de salida al igual que en los casos anteriores, puesto que esta extrapolación sería demasiado grande. Sin embargo se puede obtener una estimación más directa sumando la velocidad máxima de entrada ($1800\mu M/min$) a una $[Ca^{2+}]_M$ de $700\mu M$, con la extrapolación de la velocidad de salida hasta este valor de $[Ca^{2+}]_M$ ($800-1000\mu M/min$) obteniendo un valor total de $2600-2800\mu M/min$ ($2,6-2,8 nmol Ca^{2+}$ libre·mg proteína⁻¹·min⁻¹).

Las concentraciones alcanzadas en el citosol durante estimulaciones fisiológicas se encuentran casi siempre por debajo de $5\mu M$, y como se ha podido comprobar en las figuras anteriores, el incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ debido a la perfusión de los tampones de $[Ca^{2+}]$ iguales o inferiores a esta concentración está muy condicionado por la presencia de Na^+ en el medio. Cambios en la $[Na^+]_{intracelular}$ podrían modular significativamente este incremento de la $[Ca^{2+}]_M$. La figura 52 muestra el efecto de diferentes $[Na^+]_{presentes}$ en el medio sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ inducido por la perfusión de un tampón de $[Ca^{2+}]$ $4,5\mu M$. El panel A de esta figura muestra los incrementos obtenidos a diferentes $[Na^+]_{presentes}$, desde su ausencia hasta $20mM$. En el panel B se pueden observar las curvas pertenecientes a las derivadas de los datos originales, obtenidas de igual modo que en los casos anteriores y representadas frente a los datos de $[Ca^{2+}]_M$. En ambos casos se puede apreciar cómo tanto el nivel estable máximo alcanzado (en los trazados originales) como la velocidad máxima de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ (en las curvas derivadas), es 5 veces mayor en ausencia de Na^+ que en presencia de Na^+ $20mM$. Además, los mayores efectos se producen en torno a $[Na^+]_{presentes}$ de $5mM$, similares a la que existen en el medio intracelular en condiciones fisiológicas. El ajuste sigmoideo de los efectos de la $[Na^+]_{presentes}$ tanto sobre el nivel máximo de $[Ca^{2+}]_M$ como sobre la velocidad de aumento de la $[Ca^{2+}]_M$, proporcionaron valores de la $[Na^+]_{presentes}$ a la que el efecto era del 50% de $4,5 \pm 0,1mM$ y $5,3 \pm 0,4mM$ respectivamente.

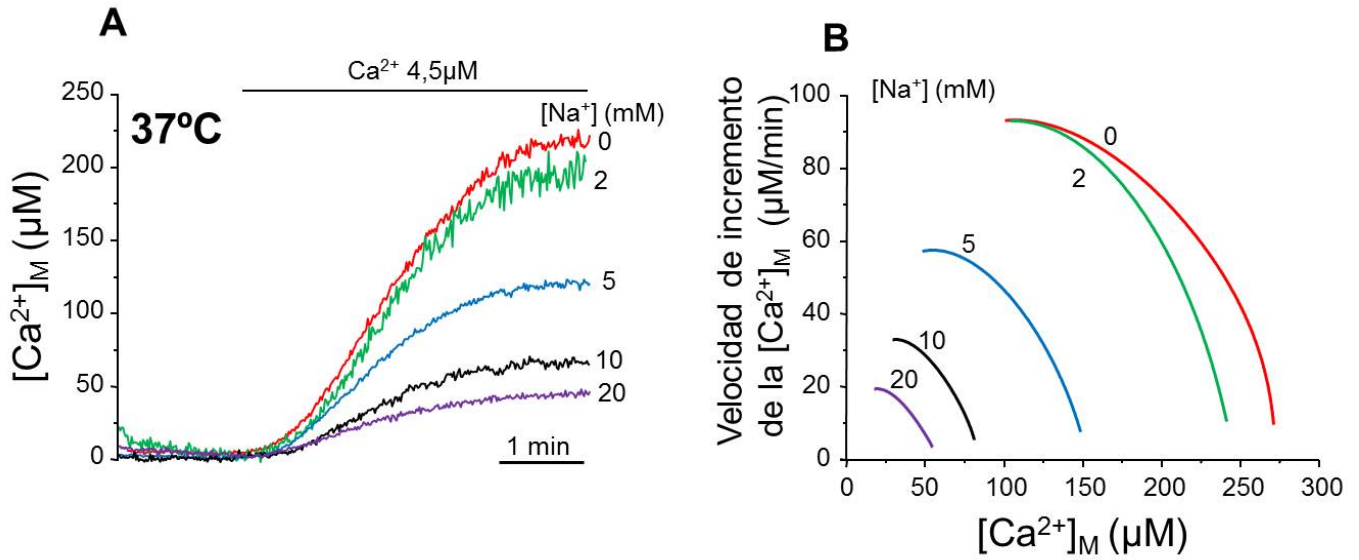


Figura 52: Efecto de diferentes $[Na^+]$ sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ al perfundir un tampón de $[Ca^{2+}]$ 4,5 en células HeLa permeabilizadas que expresaban mitmutAEQ reconstituidas con celenterazina n (panel A). En el panel B la media obtenida de ente 4 y 7 experimentos fue transformada en curvas derivadas del mismo modo que en figuras anteriores. La velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ fue representada en función de la $[Ca^{2+}]_M$.

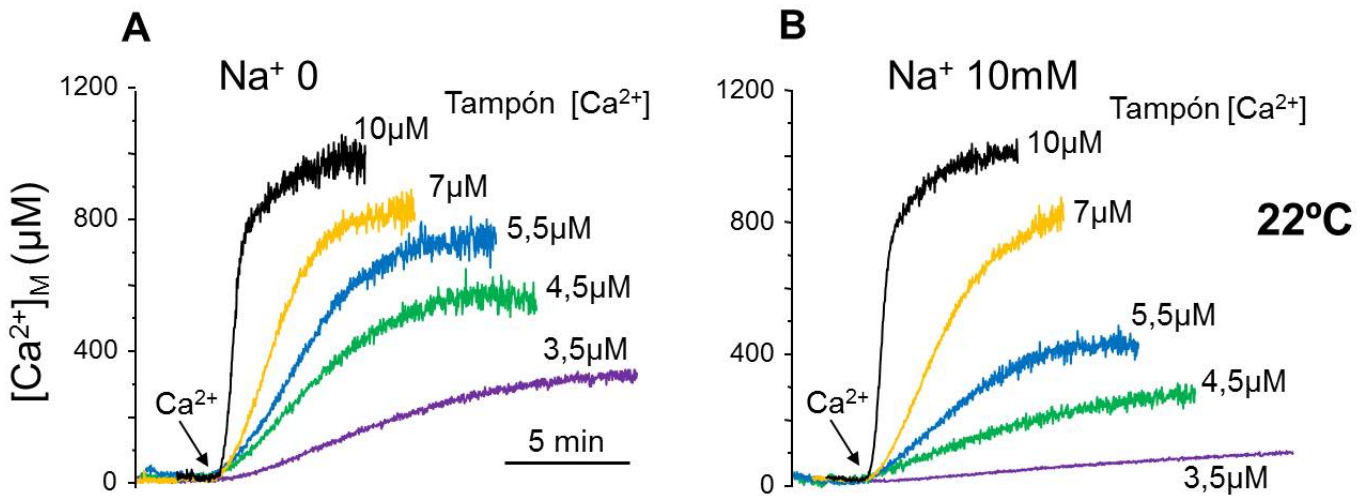


Figura 53: Cinética del incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ a $22^\circ C$ en respuesta a la adición de diferentes tampones de $[Ca^{2+}]$ conocida a células HeLa permeabilizadas que expresaban mitmutAEQ reconstituida con celenterazina n . En el panel A los experimentos se realizaron en ausencia de Na^+ y en el panel B en su presencia. Los datos mostrados se corresponden a la media de 2 experimentos de cada condición.

RESULTADOS

Por último se estudió el incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ a 22°C, inducido por la perfusión de diferentes tampones de $[Ca^{2+}]$ conocidas a células permeabilizadas, tanto en ausencia como en presencia de Na^+ . La figura 53 muestra la cinética del incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ al añadir diferentes tampones de $[Ca^{2+}]$ conocida en medios con o sin Na^+ . En la figura 54 se muestra la relación entre la velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ y la $[Ca^{2+}]_M$ a la que se obtuvo. Los trazos discontinuos representan la velocidad de disminución de la $[Ca^{2+}]_M$ a 22°C en ausencia de Na^+ o en presencia de Na^+ 10mM, obtenidos de la figura 48. Al igual que sucedió a 37°C, la presencia de Na^+ redujo considerablemente las velocidades de incremento obtenidas, sobre todo para los tampones de $[Ca^{2+}]$ inferiores a 7 μ M, apenas afectando al incremento producido por el tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M. Los valores máximos de $[Ca^{2+}]_M$ en el nivel estable a 22°C son mayores que los registrados a 37°C, debido al efecto de la temperatura sobre la velocidad de disminución de la $[Ca^{2+}]_M$, tal y como se mostró en las figuras 47 y 48. Este efecto también es más acusado en tampones de $[Ca^{2+}]$ iguales o inferiores a 7 μ M.

Para calcular la velocidad máxima de entrada neta a 22°C obtenida con el tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M se puede proceder de igual modo que a 37°C. En este caso la velocidad máxima de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ (obtenida a $[Ca^{2+}]_M$ de 200-400 μ M) se suma a la velocidad de salida a esas $[Ca^{2+}]_M$, dando como resultados valores de velocidad de entrada neta de 1100-1200 μ M/min (1,1-1,2nmol Ca^{2+} libre·mg proteína⁻¹·min⁻¹).

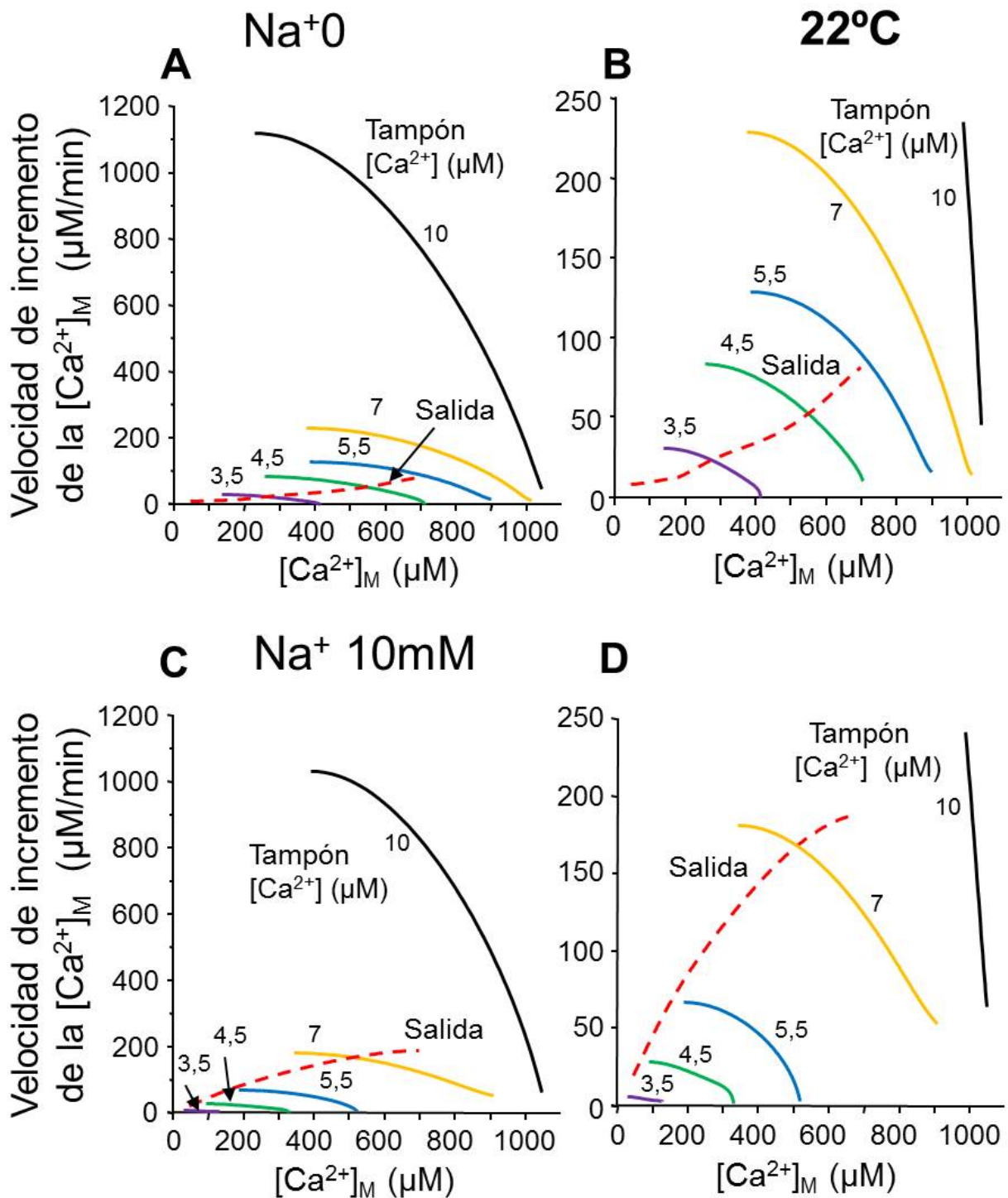


Figura 54: Dependencia de la velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ en función de la $[Ca^{2+}]_M$. Los datos de la figura 53 fueron transformados de igual manera que en las figuras anteriores, para mostrar la velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ (balance entre las velocidades de entrada y salida) en función de la $[Ca^{2+}]_M$ para cada $[Ca^{2+}]$ citosólica, en ausencia (paneles A y B) o en presencia de Na^+ (paneles C y D). Los paneles B y D son ampliaciones de los A y C respectivamente. Las líneas discontinuas representan las velocidades de disminución tomadas de la figura 48.

V. ESTUDIOS DE ENTRADA Y SALIDA DEL Ca^{2+} MITOCONDRIAL CON RHOD-5N

Debido a la baja afinidad del colorante rhod-5N por Ca^{2+} y a su K_d obtenida previamente in situ (en torno a $470\mu\text{M}$), este colorante debería de medir $[\text{Ca}^{2+}]_M$ máximas similares a las registradas con aequorina. Para comprobar esta teoría se perfundieron tampones de $[\text{Ca}^{2+}]$ conocida a células permeabilizadas y se transformaron los datos de fluorescencia obtenidos en datos de $[\text{Ca}^{2+}]$ gracias a la curva de calibración obtenida en el apartado II. En todos los experimentos fue necesario perfundir al final de cada uno de ellos una solución que contenía una $[\text{Ca}^{2+}]$ de 10mM con el fin de obtener la fluorescencia máxima. Para poder calibrar los datos de fluorescencia también fue necesario normalizar todos los registros, tomando como 0% de fluorescencia la fluorescencia basal y como 100% de fluorescencia la obtenida al perfundir el Ca^{2+} 10mM .

En primer lugar se estudió el efecto de la perfusión de tampones de $[\text{Ca}^{2+}]$ conocida en células HeLa permeabilizadas y cargadas con rhod-5N. En la figura 55 se puede apreciar cómo la perfusión de un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $10\mu\text{M}$ induce un aumento en la fluorescencia de aproximadamente un 60% del total, alcanzando un nivel de fluorescencia estable a los 5 minutos. A continuación, cuando se perfundió un medio que contenía una $[\text{Ca}^{2+}]$ de $100\mu\text{M}$, se produjo un nuevo incremento de fluorescencia que alcanzó en este caso un 90% de la fluorescencia máxima. Para finalizar, la perfusión de Ca^{2+} 10mM incrementó otra vez la fluorescencia hasta alcanzar el nivel máximo. Como se ha comentado anteriormente, estos datos fueron transformados en valores de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ gracias a la curva de calibración. Como se puede observar en la figura 56, la adición del tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $10\mu\text{M}$ consigue elevar la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ hasta valores cercanos a $800\mu\text{M}$. Estos valores son similares a los obtenidos previamente con aequorina en las mismas condiciones. El medio que contenía $[\text{Ca}^{2+}]$ $100\mu\text{M}$ incrementó aún más la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ llevándola hasta niveles próximos a 4mM .

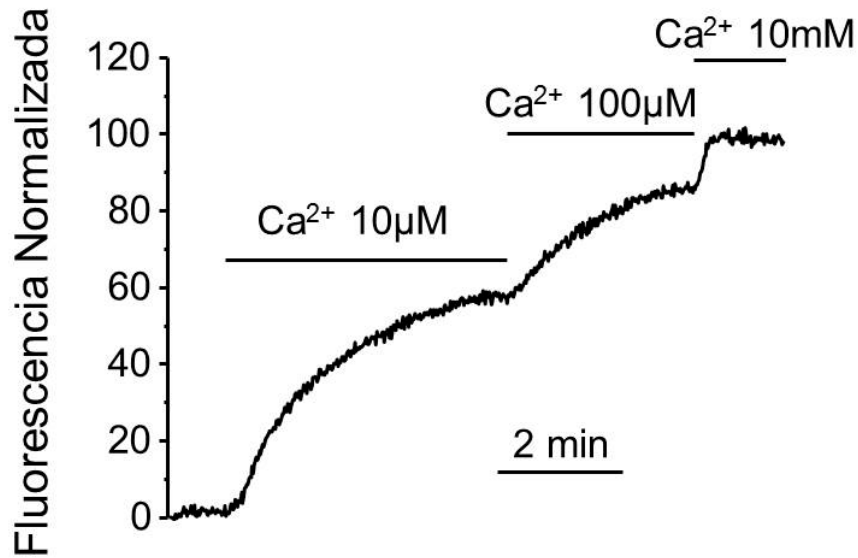


Figura 55: Incremento en la fluorescencia del colorante rhod-5N inducida por la perfusión de tampones de $[Ca^{2+}]$ $10\mu M$, $100\mu M$ y una solución final de $[Ca^{2+}]$ $10mM$. Los experimentos fueron realizados en células HeLa permeabilizadas a $22^{\circ}C$ y cargadas con rhod-5N a una concentración de $2\mu M$.

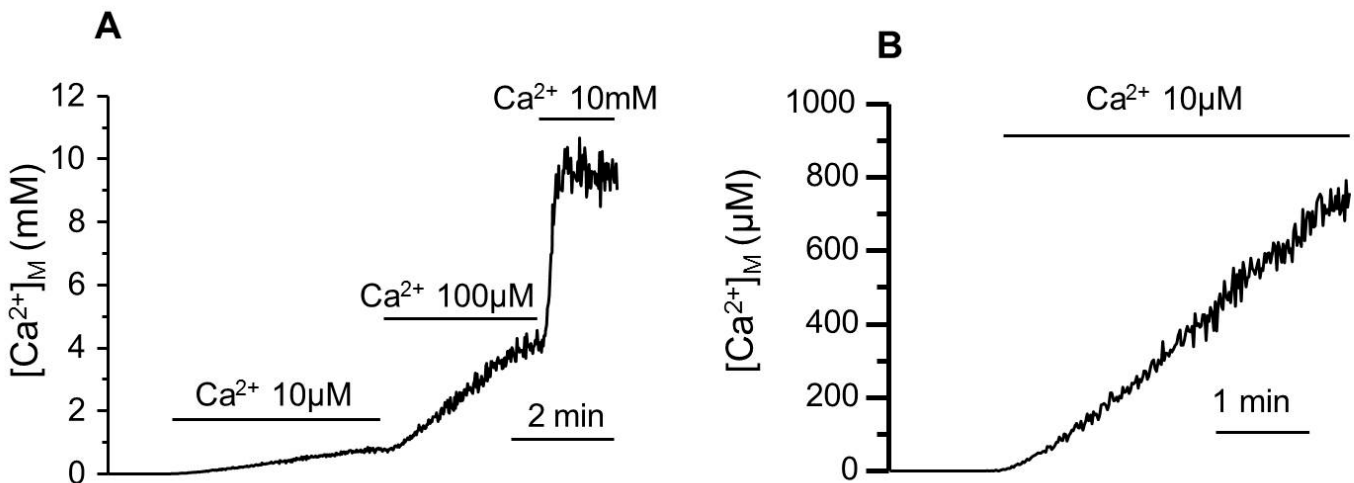


Figura 56: Calibración de los datos de fluorescencia de la figura anterior en datos de $[Ca^{2+}]_M$. El panel B es una ampliación del incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ inducida por el tampón de $[Ca^{2+}]$ $10\mu M$ mostrada en el panel A.

La figura 57 muestra como la velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ depende de la $[Ca^{2+}]$ del tampón perfundido. En las curvas calibradas se puede apreciar la gran diferencia en la $[Ca^{2+}]_M$ alcanzada bajo la perfusión de tampones de $[Ca^{2+}]$ 4.5 , 7 o $10\mu M$.

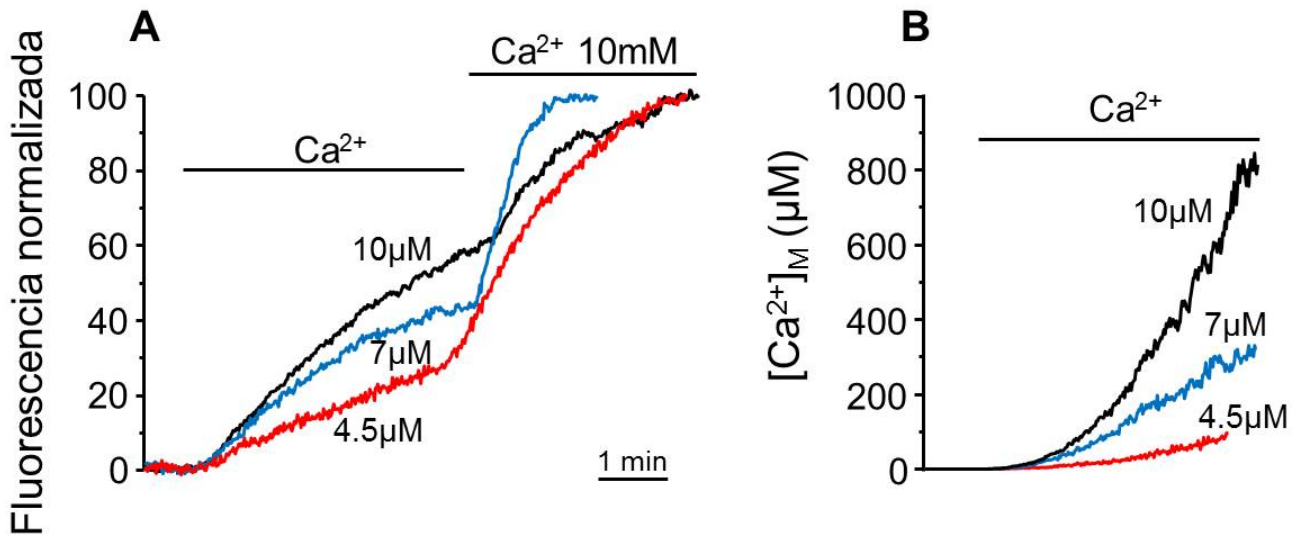


Figura 57: Incrementos en la fluorescencia del colorante rhod-5N cargado a una concentración de 2 μM en células HeLa. Las células fueron permeabilizadas y perfundidas con diferentes tampones de $[Ca^{2+}]_M$ a 22°C según se indica (panel A). En el panel B se muestran las $[Ca^{2+}]_M$ alcanzadas, calibrando los datos de fluorescencia anteriores en datos de $[Ca^{2+}]_M$.

Por último se estudió la velocidad de liberación del Ca^{2+} de la mitocondria en función de la $[Na^+]$ presente en el medio extramitocondrial. Para ello, las células HeLa fueron permeabilizadas y cargadas brevemente de Ca^{2+} mediante la perfusión de un tampón de $[Ca^{2+}]_M$ 10 μM . A continuación se indujo la liberación del Ca^{2+} mitocondrial perfundiendo medio intracelular EGTA. Como se puede observar en la figura 58, la velocidad de salida del Ca^{2+} de la mitocondria es muy dependiente de la $[Na^+]$. Estos datos son consistentes con los obtenidos anteriormente mediante aequorina, poniendo en evidencia la importancia del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en la salida del Ca^{2+} mitocondrial.

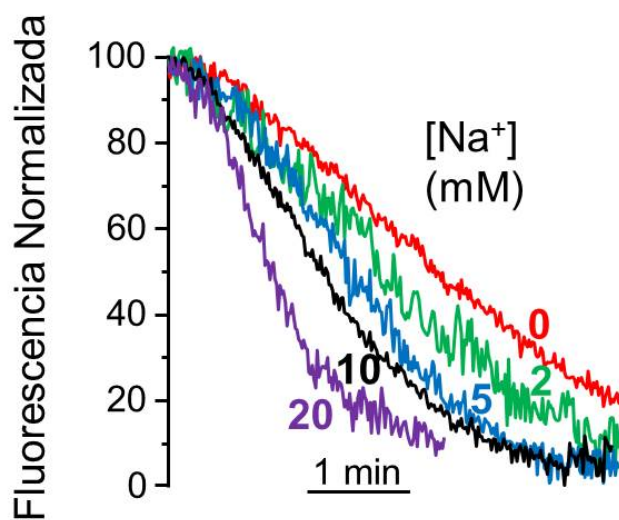


Figura 58: Disminución de la $[Ca^{2+}]_M$ en función de la $[Na^+]$ extramitocondrial. Las medidas se realizaron en células HeLa cargadas con rhod-5N 2 μM y permeabilizadas posteriormente. La salida se produjo después de la carga de las mitocondrias con un tampón de $[Ca^{2+}]_M$ 10 μM . Todos los experimentos se realizaron a 22°C.

VI. EFECTOS DEL FOSFATO EN EL NIVEL DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Se ha descrito que el fosfato es capaz de formar complejos insolubles de alta afinidad con el Ca^{2+} en el interior de las mitocondrias, tales como hidroxapatita o fosfato tricálcico, y que debido a la formación de estos precipitados, la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en el interior de las mitocondrias no puede alcanzar niveles superiores a 2-5 μM (Chalmers and Nicholls, 2003; Nicholls, 2005). En los siguientes experimentos se realizó un estudio detallado de cuál era el efecto que el fosfato presente en el medio tenía sobre la capacidad de acumulación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias.

En primer lugar se estudió cuál era el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ inducida por la adición de diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$, desde 5,5 hasta 200 μM , en células HeLa permeabilizadas, en presencia de diferentes concentraciones de fosfato en el medio citosólico. Como se puede apreciar en la figura 59, la perfusión de tampones de $[\text{Ca}^{2+}]$ 5,5 y 10 μM (paneles A y B) produjo un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ hasta niveles cercanos a 2mM en ausencia de fosfato. Los niveles máximos alcanzados en presencia de fosfato fueron mucho menores. La presencia de 1mM de fosfato en el medio disminuyó esta $[\text{Ca}^{2+}]_M$ hasta niveles de 0,8-1mM y una cantidad de fosfato 3mM en el medio redujo aún más la $[\text{Ca}^{2+}]_M$, alcanzando valores por debajo de 500 μM . La adición de soluciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ de 100 y 200 μM (paneles C y D) no incrementaron sustancialmente los niveles máximos de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ obtenidos, llegando éstos hasta 3mM en ausencia de fosfato, pero sí que incrementaron sustancialmente la velocidad de entrada del Ca^{2+} en la mitocondria. En estos experimentos se puede apreciar una leve disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ máxima alcanzada con el paso de los minutos. La despolarización parcial de la mitocondria podría ser una posible explicación para este decremento. Estos experimentos muestran que aún en presencia de fosfato 1 o 3mM en el medio, las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ máximas alcanzadas en el interior de la mitocondria son siempre superiores a 1mM.

Cabe mencionar que en estas condiciones, la mitocondria es capaz de mantener altas $[\text{Ca}^{2+}]$ en su interior durante un periodo prolongado de tiempo (al menos 10 minutos) sin evidencias de la apertura del poro de transición de permeabilidad. Una apertura del PTP hubiera provocado una salida masiva del Ca^{2+} del interior de la mitocondria, suceso que no se aprecia en ninguna de las gráficas. La

RESULTADOS

realización de estos experimentos a 37°C ha sido posible gracias a la utilización de la nueva aequorina de baja afinidad LAMitAEQ, cuyas características la hacen idónea para medir $[Ca^{2+}]_M$ en el rango milimolar durante periodos prolongados de tiempo a esta temperatura.

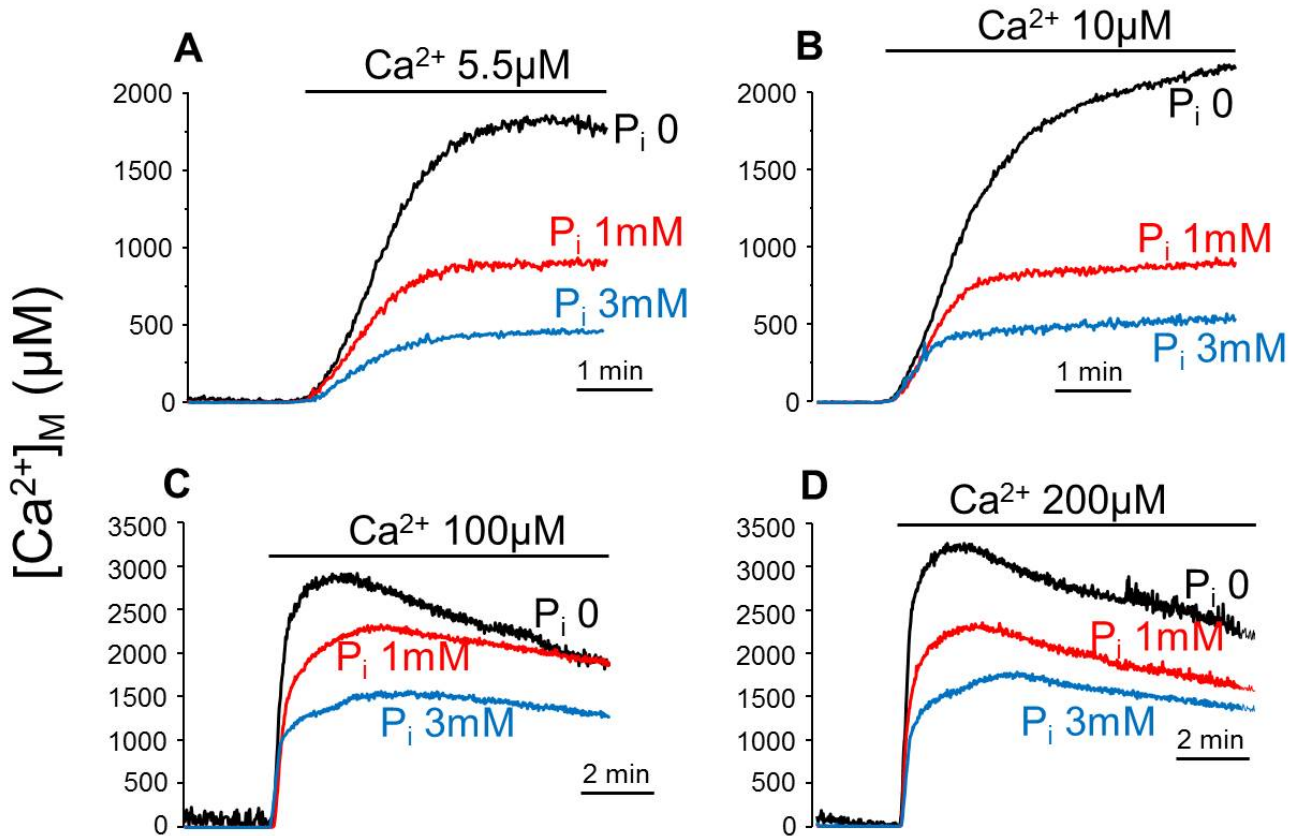


Figura 59: Incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ bajo la adición de tampones de $[Ca^{2+}]$ 5,5 o 10 μM (paneles A y B) o de soluciones no tamponadas de $[Ca^{2+}]$ 100 o 200 μM (paneles C y D). Los experimentos fueron realizados en células HeLa permeabilizadas que expresaban LAMitAEQ reconstituida con celenterazina *i*. Todos ellos fueron realizados a 37°C. Los experimentos son representativos de 3-5 experimentos similares de cada condición.

Tal y como se ha descrito en el apartado IV, la liberación de Ca^{2+} de la mitocondria bajo condiciones fisiológicas se produce principalmente a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . La nueva forma de aequorina doblemente mutada permite monitorizar la dinámica de los flujos de Ca^{2+} bajo estas mismas circunstancias con una mayor claridad. Los paneles de la figura 60 muestran la cinética de captación y liberación del Ca^{2+} mitocondrial en ausencia y presencia de Na^+ en el medio, junto con el efecto de diferentes concentraciones de fosfato citosólico. En ausencia de Na^+ (panel A), las $[Ca^{2+}]_M$ máximas obtenidas tras la perfusión de un tampón de $[Ca^{2+}]$ 5,5 μM fueron siempre mayores que en presencia de Na^+ (panel B), para una misma concentración de fosfato. Cuando se sustituyó este tampón de Ca^{2+} por medio interno EGTA, se produjo una liberación del Ca^{2+} mitocondrial. Esta salida de Ca^{2+} fue

considerablemente más rápida en presencia de Na^+ , alcanzándose los niveles de Ca^{2+} basales en tiempos inferiores a 5 minutos (panel B figura 60). Por el contrario, en ausencia de Na^+ , estos niveles basales de Ca^{2+} no fueron alcanzados hasta después de 15 minutos tras la retirada del tampón de Ca^{2+} (panel A figura 60). La presencia de fosfato produjo una liberación más lenta del Ca^{2+} mitocondrial. Debido a ello, los niveles basales de Ca^{2+} fueron restaurados más rápidamente en ausencia de fosfato, a pesar de que los valores máximos de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ fueran mayores (panel B figura 60).

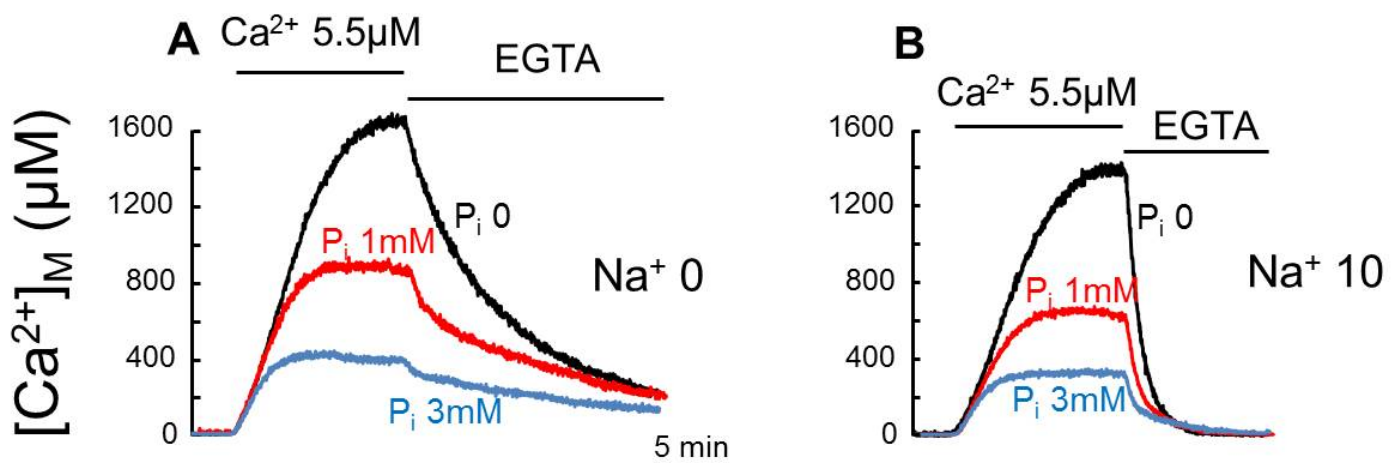


Figura 60: Incremento y disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ bajo la perfusión de un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $5,5\mu\text{M}$ y un medio interno libre de Ca^{2+} con EGTA, en ausencia de Na^+ (panel A) o en presencia de Na^+ a una concentración de 10mM . Los experimentos fueron realizados en células HeLa permeabilizadas que expresaban LAmiteAQ reconstituida con celenterazina *i*. todos los experimentos fueron realizados a 37°C . El medio interno poseía concentraciones variables de fosfato entre 0 y 3mM según se indica. Los experimentos son representativos de entre 3 y 5 similares de cada condición.

En la siguiente figura se muestra el efecto del inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial CGP37157. La inhibición de este intercambiador provoca un claro incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ máxima alcanzada al perfundir un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $7\mu\text{M}$ (panel A). Este efecto es similar al obtenido en los paneles anteriores, cuando los medios carecían de Na^+ . El efecto de este inhibidor es más fuerte a $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólicas bajas. Por ejemplo la adición de un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $3,5\mu\text{M}$ induce solamente un pequeño incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$, sin embargo, bajo estas mismas condiciones, la inhibición del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mediante CGP37157 provoca un aumento muy significativo en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ (panel B). Estos datos sugieren que a $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólicas bajas, existe un balance muy compensado entre las velocidades de entrada y salida de Ca^{2+} en la mitocondria.

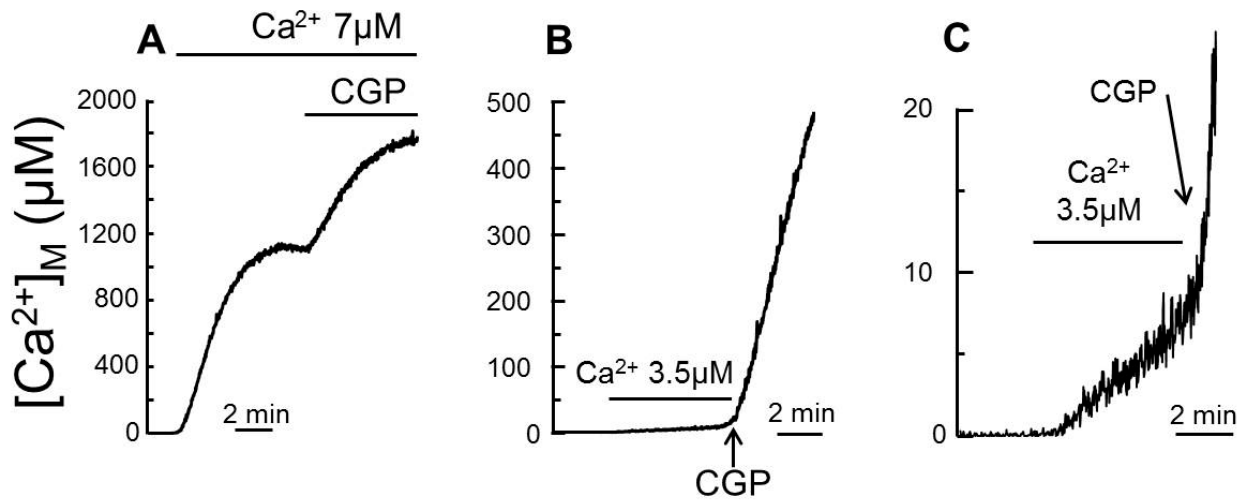


Figura 61: Efecto del inhibidor del intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial CGP37157 sobre la entrada de Ca^{2+} a 37°C. Los experimentos se realizaron en células HeLa permeabilizadas que expresaban LAMitAEQ reconstituida con celenterazina *i*. En el panel A se muestra el efecto del CGP37157 sobre la adición de un tampón de $[Ca^{2+}]$ 7µM. En el panel B se muestra este mismo efecto sobre la adición de un tampón de $[Ca^{2+}]$ 3,5µM. El panel C es una ampliación del panel B. Los experimentos mostrados son representativos de 3 similares de cada condición.

VII. EFECTO DE LA DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL SOBRE LA DINÁMICA DE LA $[Ca^{2+}]_M$.

El siguiente paso fue estudiar los efectos producidos por la despolarización de la membrana mitocondrial sobre la dinámica de la $[Ca^{2+}]_M$. En la figura 62 (paneles A, B y C) se puede observar el incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ inducido por la perfusión de un tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M. Seguidamente, la adición del protonóforo FCCP, en el momento en que la $[Ca^{2+}]_M$ ya es máxima, provoca una rápida liberación del Ca^{2+} mitocondrial a todas las concentraciones de fosfato. Esta cinética de salida es diferente dependiendo de la concentración de fosfato en el medio. Al igual que sucedió en experimentos anteriores, esta $[Ca^{2+}]_M$ máxima fue mayor cuanto menor fuera la concentración de fosfato presente en el medio. Además, en ausencia de fosfato, la liberación del Ca^{2+} mitocondrial fue mucho más rápida y alcanzó antes los niveles basales de Ca^{2+} , a pesar de que el punto de partida de liberación de Ca^{2+} fuera más alto. Tras la retirada del FCCP, la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria se recuperó parcialmente. En presencia de fosfato, la liberación de Ca^{2+} fue mucho más lenta y en ningún caso llegó a los niveles basales de Ca^{2+} originales ni tampoco se recuperó la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria, a pesar de la retirada del FCCP. Este efecto fue mucho más evidente en presencia de fosfato 3mM que de 1mM.

La liberación del Ca^{2+} mitocondrial en presencia de FCCP no solo se produce a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} sino que también se puede producir a través del MCU, cuando éste funciona en reverso. En la figura 62 (paneles D, E y F) los experimentos fueron realizados en ausencia de Na^+ con el propósito de bloquear la salida a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . La ausencia de Na^+ en el medio provocó que los niveles máximos de $[Ca^{2+}]_M$ fueran mayores en todos los casos. La adición del protonóforo FCCP en presencia de un medio interno EGTA, indujo una salida de Ca^{2+} mucho más lenta que en el panel A. Sin embargo, la adición de nuevo del tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M provocó una rápida liberación del Ca^{2+} mitocondrial (panel D). Dicha liberación está mediada por la apertura del MCU, que induce aquí una salida masiva de Ca^{2+} , causada por la ausencia de potencial de membrana mitocondrial. Curiosamente, la adición del FCCP en presencia de 1 o 3 mM de fosfato no produjo una liberación de Ca^{2+} sino un incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ (paneles E y F). Este extraño comportamiento solo se observó en estos experimentos realizados en presencia de fosfato (paneles E y F). Una posible explicación para este incremento puede radicar en

RESULTADOS

la acidificación mitocondrial inducida por el FCCP. Esta acidificación podría disolver parcialmente los complejos de fosfato cálcico formados durante la acumulación de Ca^{2+} previo, por lo que este Ca^{2+} liberado de estos complejos contribuiría a este aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$. En todos los casos se puede observar cómo la adición posterior del tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $10\mu\text{M}$ induce la rápida liberación del Ca^{2+} mitocondrial, al igual que en ausencia de fosfato.

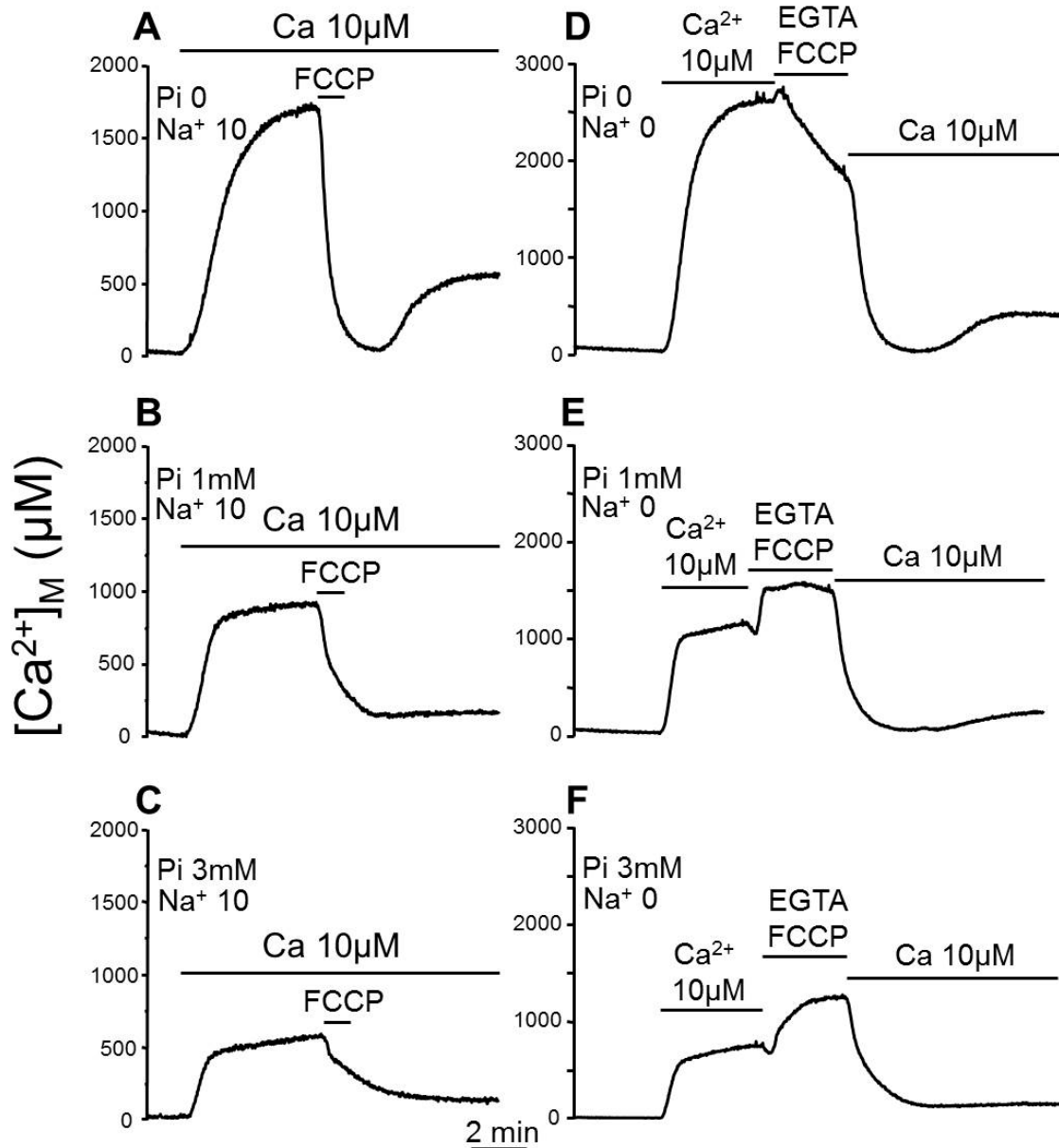


Figura 62: Experimentos realizados en células HeLa permeabilizadas que expresaban LAmitAEQ reconstituidas con celenterazina *i*. Los experimentos fueron realizados a 37°C . En los paneles A, B y C se puede apreciar el efecto de la adición del FCCP $2\mu\text{M}$ durante 1 minuto añadido con el propio tampón de Ca^{2+} . En este caso los experimentos se realizaron en presencia de Na^+ 10mM y con diferentes concentraciones de fosfato entre 0 y 3mM según se indica. En los paneles D, E y F los medios carecían de Na^+ pero se realizaron en presencia de diferentes concentraciones de fosfato. En este caso el FCCP $2\mu\text{M}$ fue perfundido también durante un minuto pero junto con el medio libre de Ca^{2+} EGTA. Los experimentos mostrados son representativos de 6 similares de cada condición.

Para concluir con este apartado, se realizaron experimentos similares a los anteriores, pero en esta ocasión con células HeLa cargadas con rhod-5N. En la figura 63 se puede observar cómo este colorante también puede monitorizar la disminución en la $[Ca^{2+}]_M$ inducida por la adición del protonóforo FCCP. Al igual que en los datos obtenidos con aequorina, la adición del FCCP en presencia de Ca^{2+} indujo también aquí una rápida liberación del Ca^{2+} mitocondrial. Estos experimentos fueron realizados en células permeabilizadas, al igual que los anteriores, pero únicamente en presencia de fosfato 1mM y Na^+ 10mM.

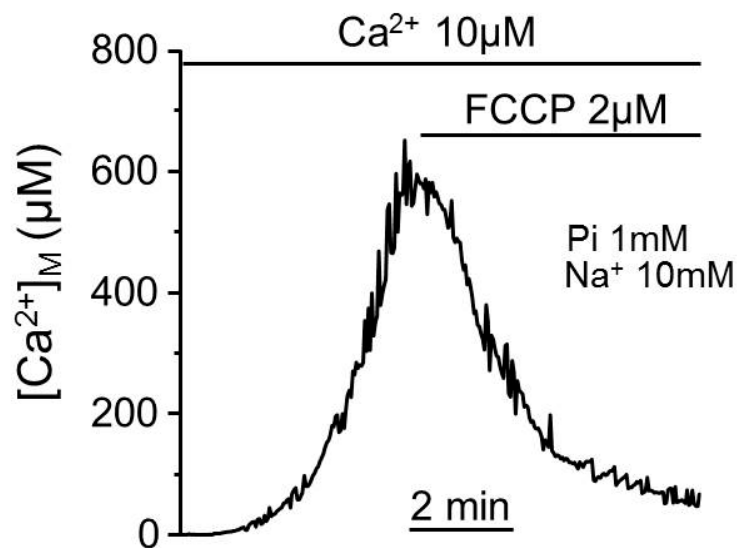


Figura 63: Efecto del protonóforo FCCP sobre la $[Ca^{2+}]_M$. los experimentos fueron llevados a cabo en células HeLa cargadas con rhod-5N 2 μ M y permeabilizadas posteriormente para añadir un tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 μ M según se indica. A continuación se añadió FCCP 2 μ M durante un minuto en el mismo medio que contenía el tampón de Ca^{2+} . La $[Ca^{2+}]_M$ fue obtenida a partir de los datos de fluorescencia y de la curva de calibración descrita anteriormente.

VIII. DEPENDENCIA DE Ca^{2+} DE LA APERTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

A pesar de haber sido estudiado durante años, aún no se conocen cuáles son los factores ni las condiciones exactas bajo las que se produce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. El Ca^{2+} parece jugar un papel fundamental en esta apertura. Una sobrecarga prolongada en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ parece inducir la apertura del PTP, pero no existen datos concluyentes que justifiquen que esta apertura es provocada exclusivamente por la sobrecarga de Ca^{2+} o si por el contrario son necesarios otros factores como pueden ser los ROS.

Para esclarecer alguno de estos puntos se plantearon algunos sencillos experimentos. En primer lugar, se realizaron experimentos en células HeLa permeabilizadas y perfundidas con un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $10\mu\text{M}$ durante un periodo prolongado de tiempo. Bajo estas circunstancias la mitocondria es capaz de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} en su interior. Como se puede observar en la figura 64, la mitocondria es capaz de acumular y mantener en su interior $[\text{Ca}^{2+}]$ cercanas a $800\mu\text{M}$ durante al menos 15 minutos sin que exista ninguna evidencia de la apertura del PTP (en el caso de que se produjese esta apertura, el Ca^{2+} sería liberado rápidamente de la mitocondria). Por lo tanto, una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial en sí misma no es capaz de provocar la apertura del PTP.

Los ROS también ha sido descritos como inductores de la apertura del PTP, por lo que se decidió perfundir junto con el tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ $10\mu\text{M}$ uno de los ROS más activos, el H_2O_2 . En la figura 65 se muestra como la perfusión del H_2O_2 a concentraciones de $200\mu\text{M}$ y 1mM junto con el Ca^{2+} tampoco provocaron una apertura del PTP.

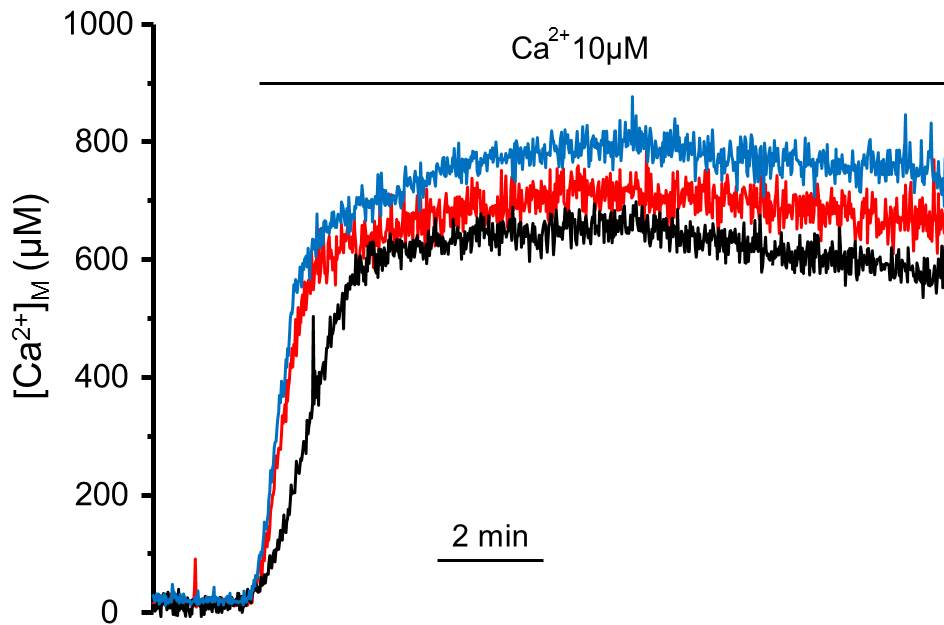


Figura 64: Incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ inducida por la adición de un tampón de $[Ca^{2+}]$ $10\mu M$ a células HeLa permeabilizadas que expresaban LAmitAEQ reconstituida con celenterazina *i*. La $[Ca^{2+}]_M$ máxima alcanzada se mantuvo estable durante al menos 15 minutos sin evidencias de apertura del PTP. Los experimentos fueron realizados a $37^\circ C$. En la figura se muestran los trazados de 3 experimentos similares.

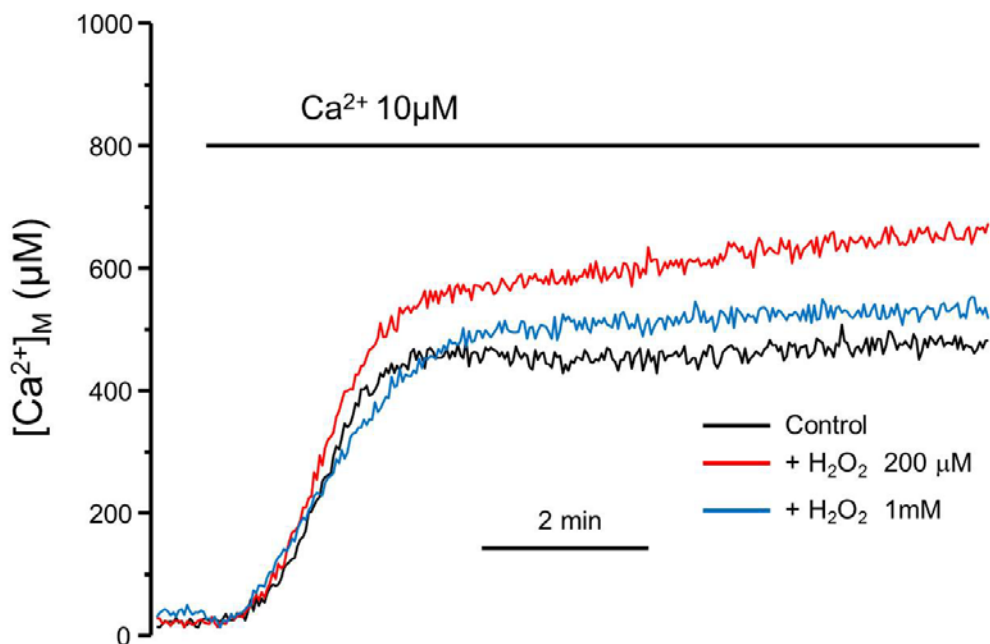


Figura 65: Incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ inducida por la adición de un tampón de $[Ca^{2+}]$ $10\mu M$ junto con H_2O_2 según se indica. Los experimentos se realizaron en células HeLa que expresaban LAmitAEQ reconstituida con celenterazina *i*. La $[Ca^{2+}]_M$ máxima se mantuvo estable durante al menos 10 minutos en todas las condiciones.

IX. DINÁMICA DE LA $[Ca^{2+}]_M$ EN CÉLULAS INTACTAS EN RESPUESTA A DIVERSOS ESTÍMULOS

Después de hacer un estudio en profundidad de la dinámica del Ca^{2+} mitocondrial en células HeLa permeabilizadas, se continuó con el estudio de la dinámica del Ca^{2+} mitocondrial en células HeLa intactas. Las células HeLa fueron estimuladas con diferentes agonistas que provocan un incremento tanto en la $[Ca^{2+}]_C$ como en la $[Ca^{2+}]_M$. También fue evaluado el efecto de diferentes compuestos que modifican la magnitud de la $[Ca^{2+}]_M$ en respuesta a dichos estímulos.

La figura 66 muestra el incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ inducida por la adición del agonista histamina. Como se puede observar los valores obtenidos oscilan entre 30 y 50 μM . Estos valores de $[Ca^{2+}]_M$ ya han sido descritos previamente con el uso de aequorina (Montero et al., 2002), sin embargo discrepan con los obtenidos por otros grupos mediante colorantes fluorescentes de alta afinidad (rhod-2 o fura2-FF), en los que los valores de $[Ca^{2+}]_M$ máximos obtenidos en respuesta a los mismos estímulos no superan 5 μM (Chalmers & Nicholls, 2003). Estas discrepancias pueden ser resueltas con el uso de un colorante de muy baja afinidad como es el rhod-5N.

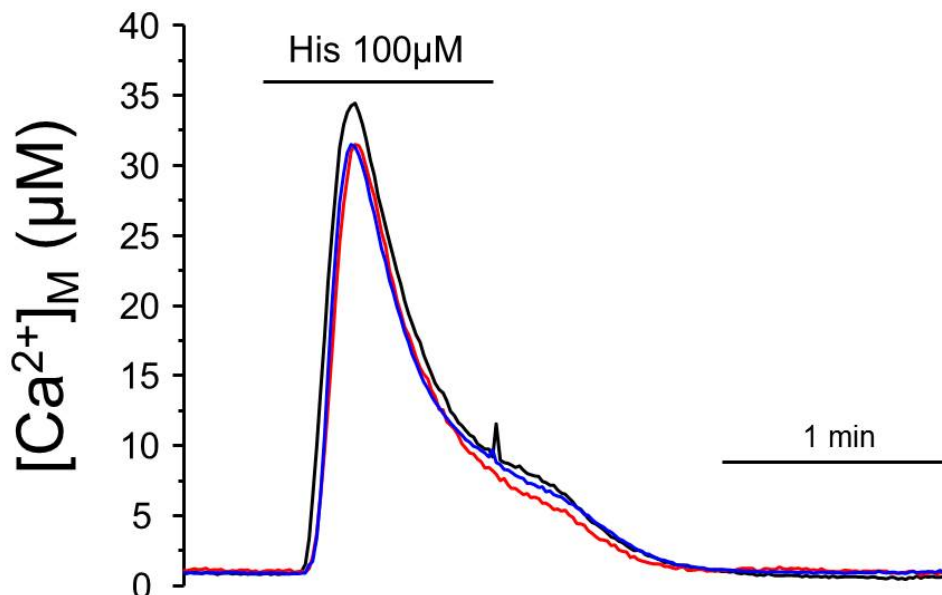


Figura 66: Incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ en respuesta a un estímulo de histamina 100 μM durante 1 minuto. Los experimentos fueron realizados a 37°C en células HeLa que expresaban mitmutAEQ reconstituida con celenterazina w. En la figura se muestran los trazados de 3 experimentos similares.

Para comprobar esta hipótesis, se estudió la respuesta a histamina de la $[Ca^{2+}]_M$ medida con el colorante rhod-5N en células HeLa intactas. La figura 67 muestra estos incrementos en la fluorescencia de células individuales inducidos por la perfusión de histamina (panel A). Con el fin de poder calibrar estos datos de fluorescencia, al término de cada uno de los experimentos se permeabilizaron las células y se perfundió una solución de calibración que contenía una $[Ca^{2+}]$ de 10mM. Todos los experimentos fueron normalizados tomando como 100% de fluorescencia aquella obtenida al perfundir el Ca^{2+} 10mM y como 0% de fluorescencia la fluorescencia basal. La curva de calibración descrita anteriormente para el rhod-5N se aplicó a estos valores para conseguir los datos de $[Ca^{2+}]_M$ (panel B).

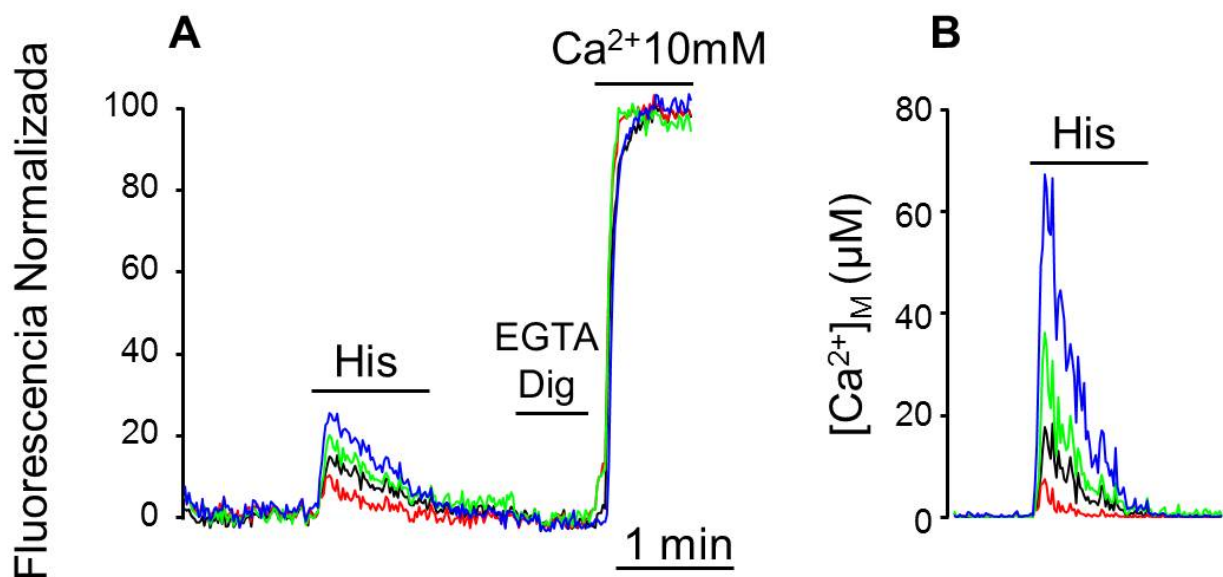


Figura 67: Incremento en la fluorescencia de 4 células HeLa cargadas con rhod-5N 2µM en respuesta a un estímulo de histamina 100µM de 1 minuto de duración (panel A). El panel B muestra la respuesta de las 4 células anteriores en valores de $[Ca^{2+}]_M$ después de aplicar la curva de calibración a los datos de fluorescencia normalizados. Los experimentos fueron realizados a 22°C.

Los paneles A y B de la figura 68 muestran los incrementos en la $[Ca^{2+}]_M$ registrados mediante el colorante rhod-5N en 7 células HeLa individuales presentes en el mismo campo del microscopio. El panel C muestra el incremento medio en la $[Ca^{2+}]_M$ de todas las células de ese mismo experimento. Por último el panel D muestra el incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ medio de 3 experimentos diferentes.

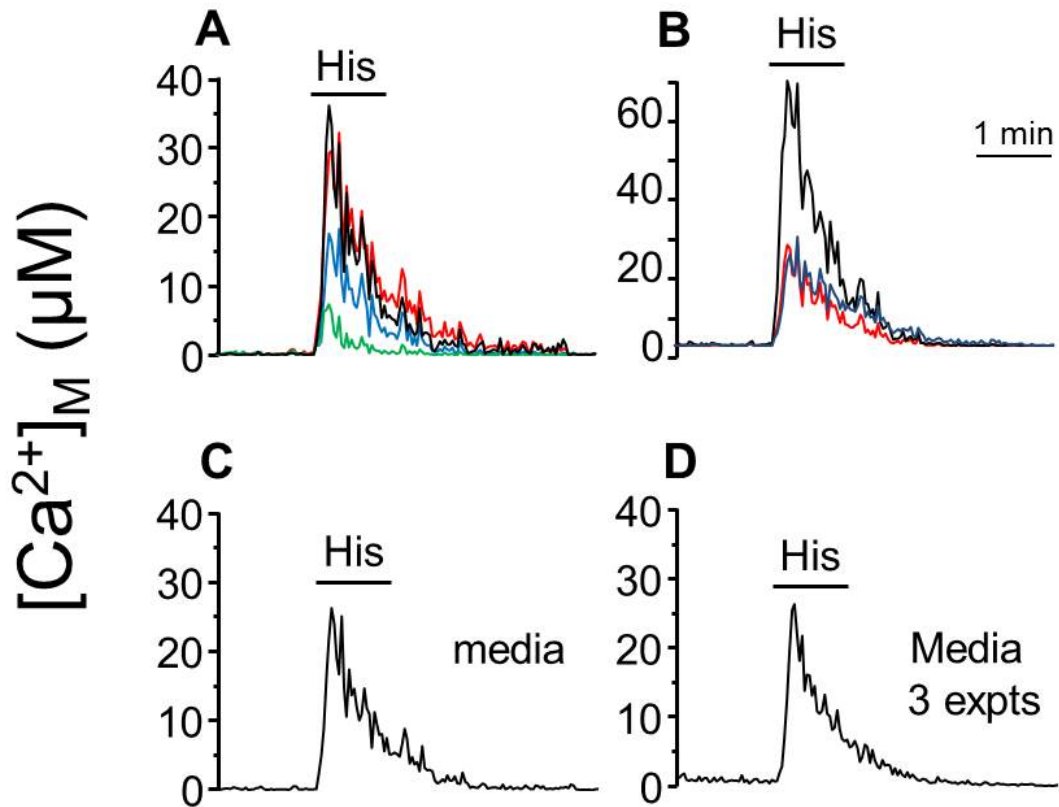


Figura 68: Incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ registrado en células HeLa cargadas con rhod-5N $2\mu M$ tras la estimulación con el agonista histamina a una concentración de $100\mu M$ durante 1 minuto. Los paneles A y B muestran los registros de 7 células individuales. El panel C muestra la media de todas las células presentes un mismo campo del microscopio. El panel D muestra la media de 3 experimentos diferentes. Todos los experimentos fueron realizados a $22^\circ C$.

Como se puede observar, los incrementos en la $[Ca^{2+}]_M$ de las células individuales van desde $10\mu M$ hasta más de $60\mu M$, poniendo en evidencia la variabilidad entre las diferentes células. Sin embargo el valor medio del incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ se encuentra en torno a $30\mu M$. Estos valores son consistentes con los obtenidos anteriormente mediante aequorina.

A continuación se estudió el efecto del flavonoide kaempferol, ya que este flavonoide ha sido descrito como un activador del MCU (Montero et al., 2004). En la figura 69 se puede apreciar como su adición junto con histamina, provoca un incremento mucho más alto en la $[Ca^{2+}]_M$. Al igual que en los experimentos anteriores, los picos de Ca^{2+} mitocondriales son muy variables entre las distintas células de un mismo experimento, pudiendo estar comprendidos entre 30 y $400\mu M$ (paneles A y B). Los valores promedios de todas las células de un mismo experimento, así como de varios experimentos están entorno a $70\mu M$ (paneles C y D). Estos valores, al igual que en el caso anterior son similares a los obtenidos previamente con aequorina (panel E).

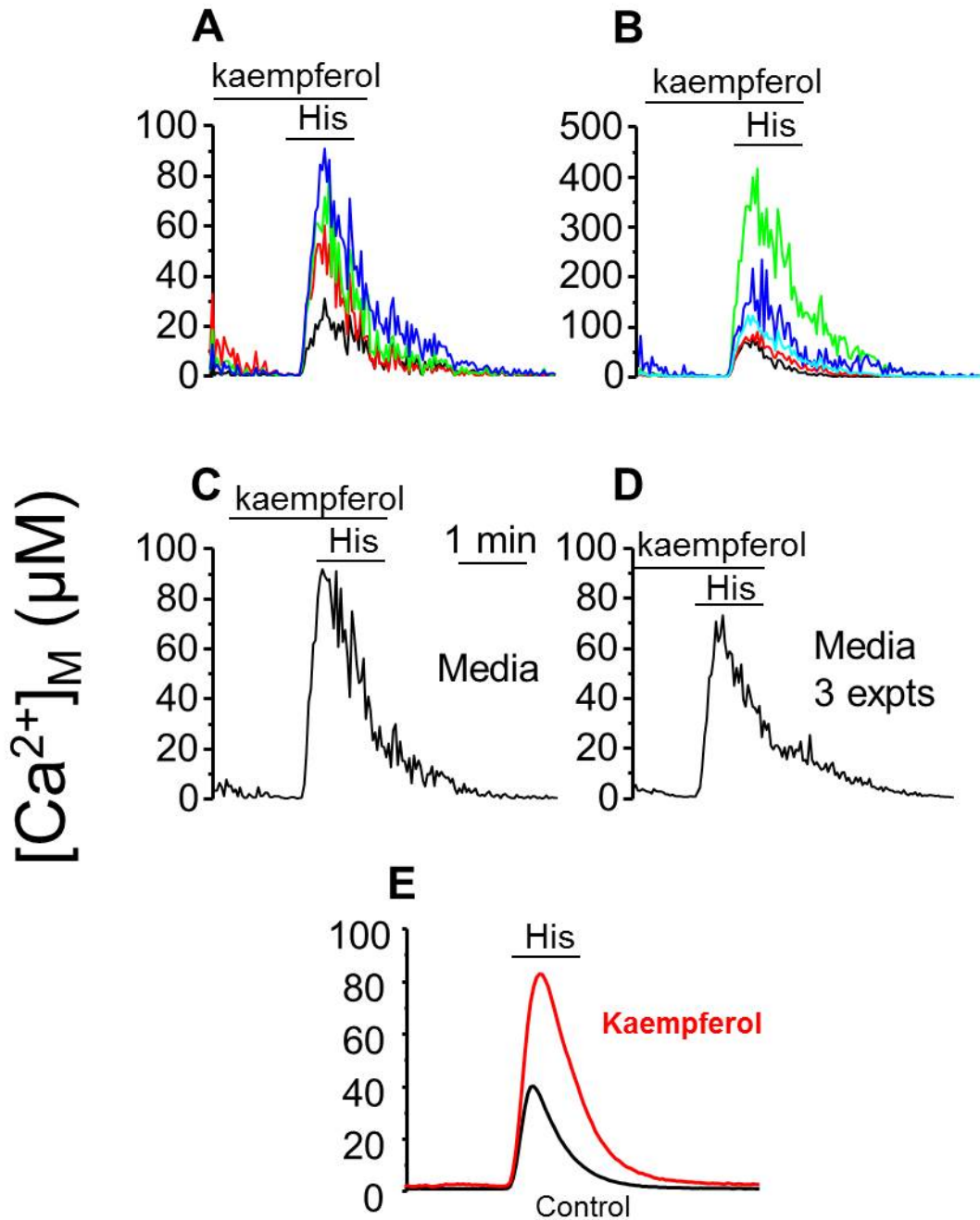


Figura 69: Incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ inducida por el agonista histamina 100 μM durante un minuto en conjunción con el activador del MCU kaempferol, perfundido previamente y durante el estímulo a una concentración de 10 μM . Los paneles A y B muestran este incremento en 9 células HeLa individuales medido mediante rhod-5N cargado en las células a 2 μM . Los paneles C y D muestran las medias obtenidas a partir de todas las células de un mismo experimento y de 3 experimentos diferentes respectivamente. El panel E muestra los resultados obtenidos con células HeLa que expresaban mitmutAEQ reconstituida con celenterazina w. Los experimentos con rhod fueron realizados a 22 $^{\circ}C$ y los de aequorina a 37 $^{\circ}C$.

RESULTADOS

Los incrementos en la $[Ca^{2+}]_C$ siempre van acompañados en mayor o menor medida de un aumento en la $[Ca^{2+}]_M$. Gracias a las propiedades espectrales del rhod-5N, fue posible realizar registros de la fluorescencia emitida por este colorante localizado en las mitocondrias y de la fluorescencia emitida por el fura-2 situado en el citosol. La combinación de estos 2 colorantes permitió realizar medias simultaneas de los aumentos en las $[Ca^{2+}]_C$ y $[Ca^{2+}]_M$ en células individuales, inducidos por estímulos de histamina.

La figura 70 muestra los incrementos simultáneos en la $[Ca^{2+}]_C$ (panel A) y en la $[Ca^{2+}]_M$ (panel B) de una serie de células individuales. En los trazados individuales mostrados sí parece existir una cierta correlación entre la altura del pico citosólico y el pico mitocondrial. Además, como se puede observar en los trazados, el aumento en la $[Ca^{2+}]_M$ está ligeramente retrasado con respecto al incremento citosólico, lo que indica que la señal de Ca^{2+} citosólica tarda unos instantes en ser captada por las mitocondrias. Sin embargo cuando se representa la relación entre la $[Ca^{2+}]$ de los picos citosólicos y mitocondriales, obtenidos a partir de 23 células diferentes, la nube de puntos obtenida muestra una elevada dispersión, sin una clara correlación entre ellos (panel C).

Estos resultados pueden parecer contradictorios, puesto que un incremento más elevado en la $[Ca^{2+}]_C$ debería de verse reflejado en la $[Ca^{2+}]_M$. Sin embargo esta incongruencia puede tener varias explicaciones. En primer lugar el número de células estudiadas es relativamente bajo. Si se incrementara el número experimental, probablemente se obtendría una correlación más ajustada, y la tendencia reflejaría que incrementos elevados en la $[Ca^{2+}]_C$ producirían así mismo aumentos más grandes en la $[Ca^{2+}]_M$. Por otra parte estos resultados a nivel de células individuales reflejan que no solo la $[Ca^{2+}]_C$ afecta al aumento de la $[Ca^{2+}]_M$, sino que este aumento también puede verse afectado por otros factores como podrían ser el potencial de membrana mitocondrial de esa célula en concreto, su correcta funcionalidad fisiológica, el número de contactos entre el RE y la mitocondria, etc...

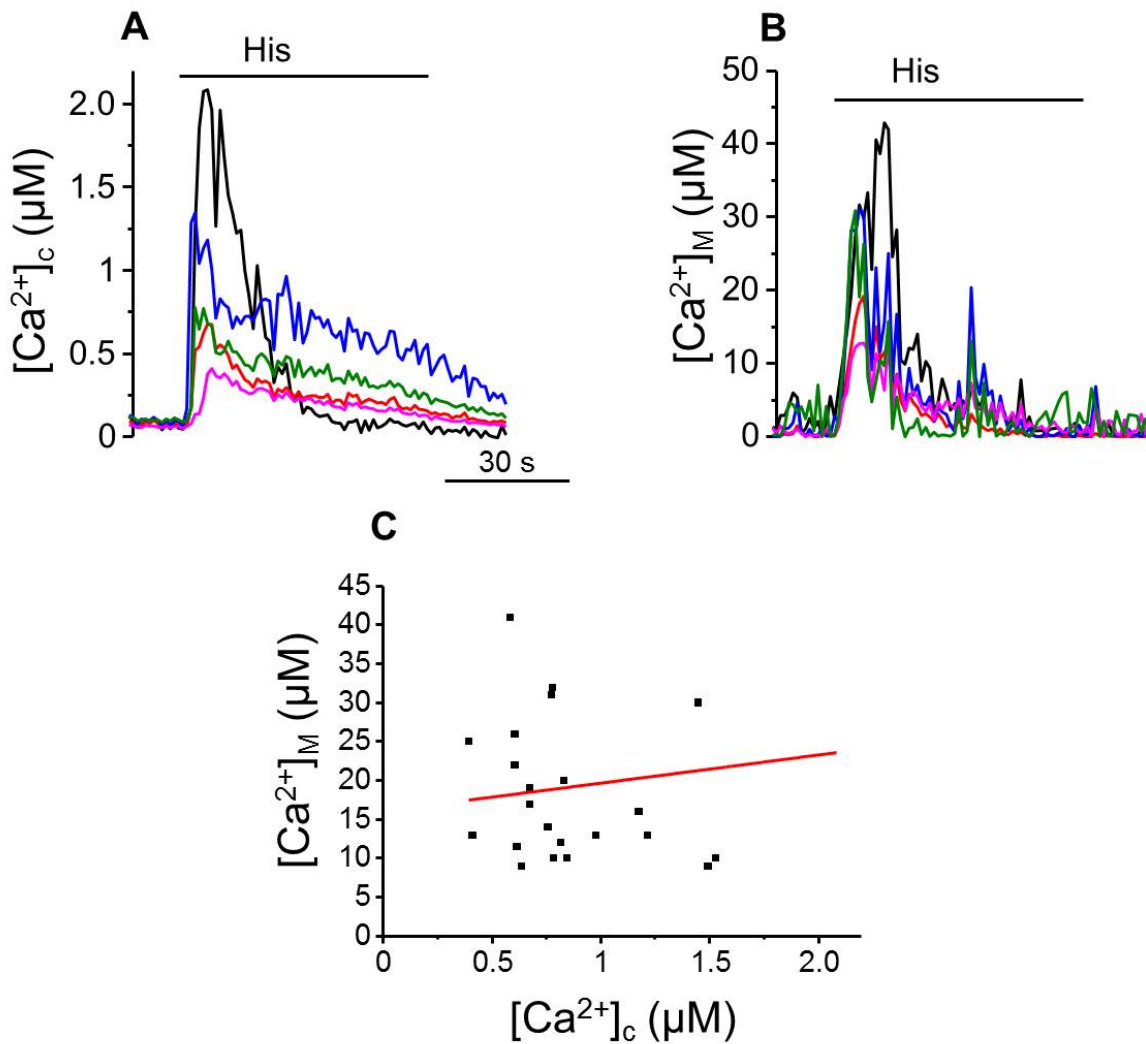


Figura 70: Registros simultáneos de los incrementos en las $[Ca^{2+}]_c$ (panel A) y $[Ca^{2+}]_M$ (panel B) medidos con Fura-2 y rhod-5N respectivamente. Los experimentos fueron realizados en células HeLa estimuladas con histamina $100\mu M$ durante 1 minuto. Los experimentos fueron realizados a $22^\circ C$. El panel C muestra la ausencia de correlación entre el pico citosólico y mitocondrial. En él se representan los datos correspondientes a 23 células individuales obtenidas de 5 experimentos diferentes.

Con el fin de estimular las células HeLa con un agonista diferente a la histamina y más potente, se transfectaron estas células con el gen que codifica para el canal de membrana TRPV1, cuyo principal agonista es la capsaicina. Se realizaron medidas del incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ y $[Ca^{2+}]_M$ inducido por la adición repetida de dicho agonista y como se puede observar en la figura 71, los incrementos en ambos casos son mucho más elevados que los obtenidos bajo la estimulación con histamina. Estos incrementos fueron 3 veces mayores en el caso de la $[Ca^{2+}]_c$ y hasta 10 veces mayores en el caso de la $[Ca^{2+}]_M$. Este efecto puede ser debido a la activación masiva y prolongada del receptor en respuesta al agonista y a una entrada muy elevada de Ca^{2+} desde el exterior celular. Es de destacar que este enorme aumento de la $[Ca^{2+}]_M$

RESULTADOS

tampoco fue capaz aquí de inducir la apertura del poro de transición de permeabilidad, en este caso en células intactas.

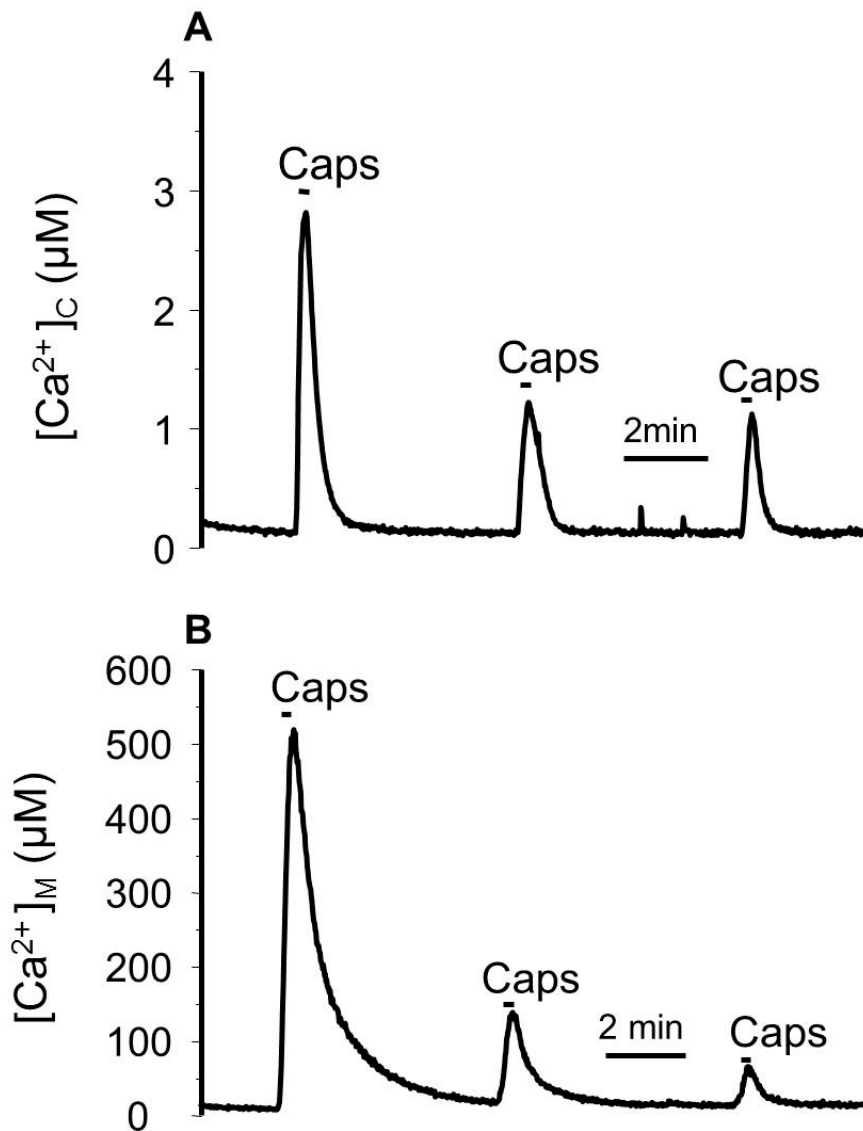


Figura 71: Incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ (panel A) y en la $[Ca^{2+}]_m$ (panel B) registrado en células HeLa intactas que expresaban simultáneamente el canal TRPV1 y cytAEQ o LAmitAEQ. La cytAEQ fue reconstituida con celenterazina *w* mientras que la LAmitAEQ fue reconstituida con celenterazina *i*. Los estímulos se realizaron con capsaicina $1\mu M$ durante 30 segundos en medio externo Ca^{2+} $1mM$ y 5 minutos de lavado entre ellos. Los experimentos fueron realizados a $37^{\circ}C$.

X. MEDIDAS DE $[Ca^{2+}]_M$ MITOCONDRIAL A NIVEL SUBCELULAR

Debido a la capacidad de rhod-5N para monitorizar correctamente cambios en la $[Ca^{2+}]_M$ frente a un estímulo de histamina en células individuales, el siguiente paso fue utilizar este colorante para intentar medir incrementos en la $[Ca^{2+}]_M$ en diferentes zonas de una única célula. Para realizar estos experimentos se seleccionaron aquellas células del campo del microscopio que poseían una morfología más alargada, con el fin de poder distinguir fácilmente las zonas más cercanas de las más alejadas del núcleo.

En la figura 72 se muestran los incrementos en la $[Ca^{2+}]_M$ correspondientes a 5 zonas de una de las células analizadas. Al igual que en los experimentos anteriores realizados con rhod-5N, la $[Ca^{2+}]_M$ se obtuvo a partir de la curva de calibración y perfundiendo al final de cada experimento la solución que contenía una $[Ca^{2+}]$ de 10mM con el fin de obtener la fluorescencia máxima. La limitada cantidad de rhod-5N cargado en las células no permite obtener una buena imagen del pico de Ca^{2+} mitocondrial, por lo que la imagen mostrada corresponde al momento final del experimento, cuando las células están permeabilizadas en presencia de Ca^{2+} 10mM. El aspecto granular de las mitocondrias se debe a la permeabilización.

En la figura se puede observar cómo en las regiones más cercanas al núcleo, el incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ es mayor que en el resto de regiones. Para realizar un estudio más detallado de este fenómeno se analizaron 10 células diferentes comparando el pico mitocondrial obtenido en zonas cercanas al núcleo con el obtenido en las zonas más alejadas de este. El resultado obtenido fue que la media de la $[Ca^{2+}]_M$ máxima en zonas cercanas al núcleo fue aproximadamente 2 veces mayor al de las zonas más alejadas ($2,2 \pm 0,2$, media \pm error estándar, $n = 10$).

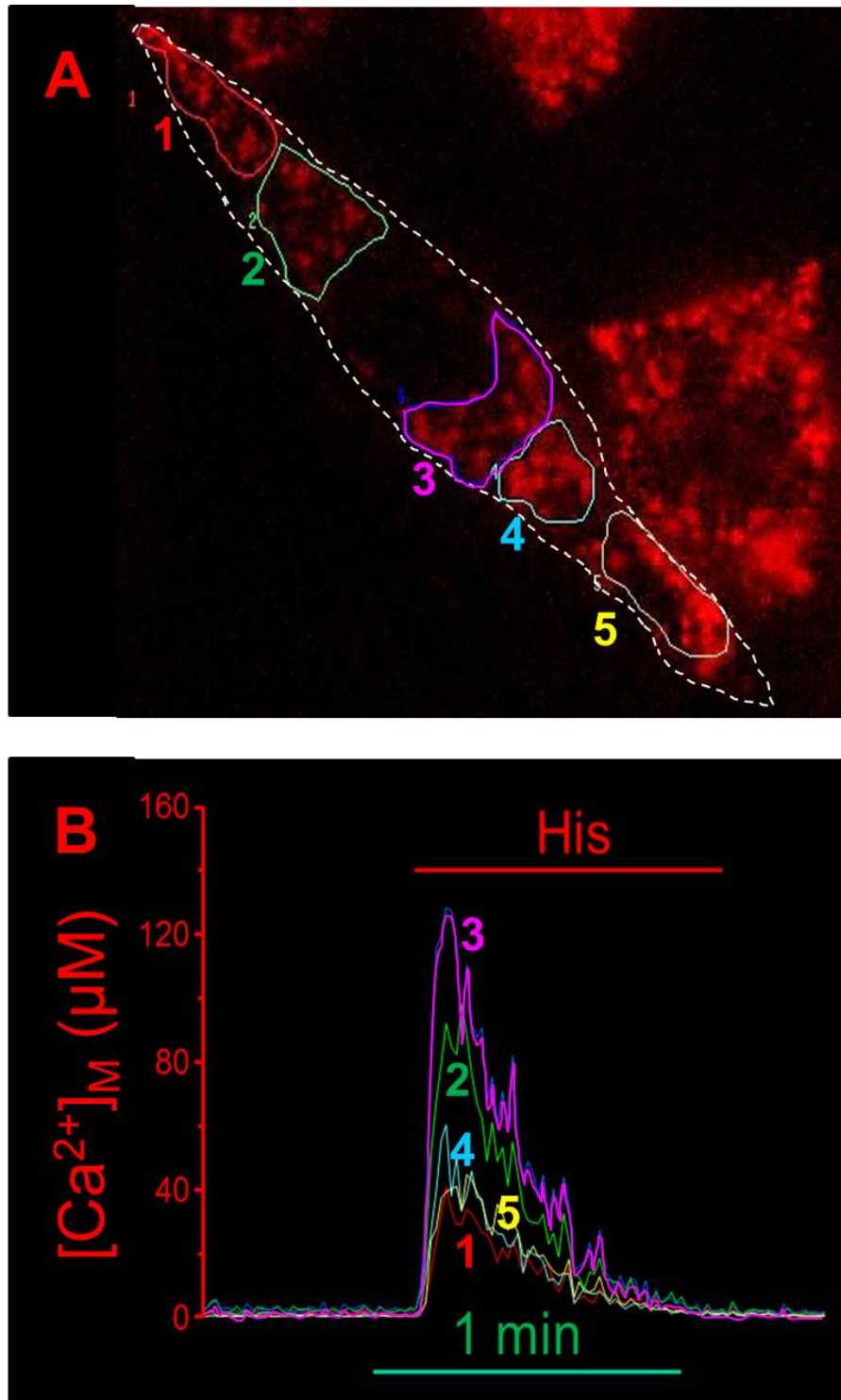


Figura 72: Incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ medido con rhod-5N en diferentes regiones de una célula HeLa a 22°C. El pico de Ca^{2+} mitocondrial fue inducido por la adición del agonista histamina a una concentración de 100 μM durante 1 minuto. El panel A muestra la imagen de la célula al final del experimento y tras la perfusión de la solución de $[Ca^{2+}]$ 10mM, con las regiones seleccionadas. El panel B muestra el incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ en cada una de las regiones de la imagen. Las condiciones experimentales fueron las mismas que en el resto de experimentos con rhod-5N.

XI. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL UNIPORTADOR DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

La reciente clonación del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial ha abierto un nuevo campo en el estudio de dinámica del Ca^{2+} mitocondrial. La posibilidad de silenciar este canal mediante shRNA ha permitido la realización de un estudio más detallado del transporte de Ca^{2+} mitocondrial. Para realizar un estudio preliminar de los posibles efectos sobre la dinámica del Ca^{2+} mitocondrial del silenciamiento del MCU, se generaron en primer lugar clones estables de células HeLa que expresaban constitutivamente shRNA para silenciar el MCU. Posteriormente se transfectaron estos clones con LAmitAEQ para realizar estudios con aequorina que evidenciaran los efectos del silenciamiento del MCU sobre la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$

La figura 73 muestra como la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en células permeabilizadas está significativamente reducida en las células silenciadas. Este efecto es más evidente a $[\text{Ca}^{2+}]_C$ bajas (panel A) donde la inhibición de la entrada es de aproximadamente un 80%. A $[\text{Ca}^{2+}]_C$ más altas, la velocidad de entrada se ve disminuida, aunque la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ máxima alcanzada es muy parecida (panel B), probablemente debido a que el silenciamiento del MCU es sólo parcial.

En el caso de células intactas, el pico de Ca^{2+} mitocondrial inducido por histamina también es notablemente más bajo en células silenciadas que en células control (panel C). En presencia del inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial CGP37157, el pico de Ca^{2+} inducido por histamina en células control es más alto y vuelve a la basal más lentamente. En células silenciadas, la presencia del inhibidor también incrementa la altura del pico, pero éste continua siendo más bajo que en las células controles. Por lo tanto, el efecto del silenciamiento del MCU sigue siendo el mismo en ambos casos (panel D).

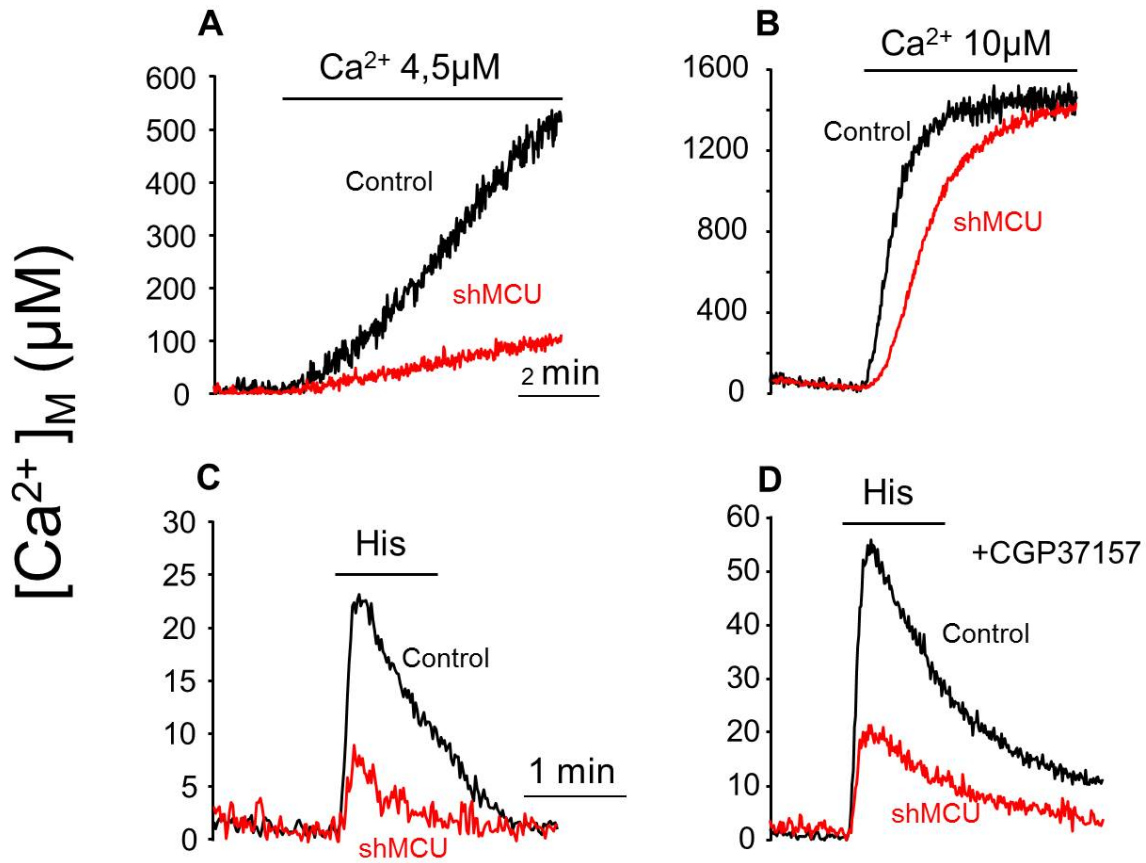



Figura 73: Efecto del silenciamiento del MCU mediante shRNA en células HeLa. Las células fueron co-transfectadas con shRNA o scrambled RNA además de con LAMitAEQ reconstituida con celenterazina *i* (paneles A y B) o *w* (paneles C y D) a 37°C. Los paneles A y B muestran el incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ en células permeabilizadas y en ausencia de fosfato, tras la adición de tampones de $[Ca^{2+}]$ 4,5 y 10 μM respectivamente. Los paneles C y D muestran la respuesta ante un estímulo de histamina 100 μM durante un minuto, en ausencia (panel C) o en presencia del inhibidor CGP37157 a una concentración de 10 μM .



DISCUSIÓN

1. COMPARACIÓN, VALIDACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE NUEVOS MÉTODOS DE MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Las mitocondrias juegan un papel fundamental en la regulación de las señales intracelulares mediadas por Ca^{2+} , sin embargo aún existen discrepancias entre los valores de $[\text{Ca}^{2+}]$ que se pueden alcanzar en el interior de la matriz mitocondrial en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos o bajo diferentes condiciones experimentales. En la primera parte de este trabajo y con el fin de resolver estas discrepancias, se ha realizado una comparación exhaustiva de diferentes métodos de medida de Ca^{2+} en la mitocondria, los colorantes fluorescentes rhod-2 y rhod-FF, la proteína fluorescente pericam dirigida a mitocondria y la proteína bioluminiscente aequorina también dirigida a mitocondria.

Los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ obtenidos con los colorantes fluorescentes de alta afinidad como el rhod-2 o el fura-6F, han sido siempre inferiores a $2\text{-}3\mu\text{M}$ (Collins et al., 2001; Chalmers and Nicholls, 2003; Nicholls, 2005). Por el contrario, los valores registrados con proteínas dirigidas a mitocondria como pericams, camaleones o aequorinas, son mucho mayores, pudiendo aproximarse a valores cercanos a $500\mu\text{M}$ (Montero et al., 2000; Filippin et al., 2003). Estas discrepancias pueden explicarse en parte por las diferentes afinidades por Ca^{2+} de cada una de las sondas. Por ejemplo, se ha demostrado que el rhod-2 posee una K_d mitocondrial “in situ” de $1,3\mu\text{M}$, mientras que la aequorina de baja afinidad mitmutAEQ es capaz de medir fácilmente $[\text{Ca}^{2+}]_M$ en el rango milimolar. Los resultados obtenidos muestran además, que las discrepancias no solo son cuantitativas sino también cualitativas, debido a que, bajo ciertas circunstancias el rhod-2 muestra una evidente pérdida de sensibilidad a Ca^{2+} .

Los datos obtenidos mediante rhod-2 son similares a los datos previos publicados por otros autores. En éstos se muestra cómo la respuesta en términos de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ ante un segundo estímulo con un agonista o ante una segunda adición de un tampón de Ca^{2+} a células permeabilizadas es mucho menor que la primera. Por el contrario, si se reproducen estos mismos experimentos registrando la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ con pericam o aequorina, los resultados son completamente distintos. En el caso de registros realizados con pericam o aequorina, tanto la estimulación repetida con el agonista histamina, como la adición de un tampón de $[\text{Ca}^{2+}]$ conocida a células permeabilizadas, en repetidas ocasiones, provocan sendos incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$

de magnitud similar, no apreciándose una disminución en la segunda respuesta con respecto a la primera.

La explicación para estas discrepancias no se encuentra en la capacidad tampón del rhod-2, puesto que la carga de las células con las concentraciones habituales del colorante (1 o 2 μ M) no modifica la dinámica de Ca^{2+} mitocondrial medida con aequorina. Cuando la carga de rhod-2 o rhod-FF se realiza a concentraciones superiores, de 5 o 10 μ M, los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ provocados por agonistas y medidos con aequorina, disminuyen considerablemente. Sin embargo, aunque esta disminución puede deberse en parte a la capacidad amortiguadora del colorante, hemos observado que la carga con altas concentraciones de colorante provoca importantes cambios morfológicos en las mitocondrias, así como una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, que pueden explicar la menor respuesta a los agonistas en estas condiciones.

Por otra parte, el rhod-2 tampoco es capaz de detectar incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ cuando se perfunden tampones de $[\text{Ca}^{2+}]$ entre 10 y 100 μ M en presencia de un protonóforo como el FCCP. En estas condiciones, el Ca^{2+} entra en la mitocondria por un simple equilibrio de concentraciones, y mientras que el pericam y la aequorina detectan fácilmente estos incrementos, el rhod-2 no monitoriza correctamente este aumento de Ca^{2+} . La explicación para este comportamiento aún no está clara.

Los resultados en células HeLa muestran que algunos colorantes sensibles a Ca^{2+} ampliamente utilizados como el rhod-2 tienen una respuesta a los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ cuantitativa y cualitativamente muy diferentes a los obtenidos con proteínas sensibles a Ca^{2+} dirigidas a mitocondria como pueden ser el pericam y la aequorina. Por lo tanto, los datos obtenidos con estos colorantes deberían de ser comparados con otros métodos para confirmar futuros resultados.

En células HeLa no se ha detectado ningún tipo de inhibición del MCU por Ca^{2+} (tal y como propone Moreau et al., 2006), cuando las medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ se realizan con pericam o aequorina. En cuanto a las medidas que se han realizado con rhod-2, confirman efectivamente los datos de Moreau et al. (2006), pero nuestros datos sugieren que este efecto se debe a una pérdida de sensibilidad a Ca^{2+} del rhod-2 y no a una auténtica inhibición del MCU por Ca^{2+} . Estos datos concuerdan con datos anteriores de nuestro grupo que muestran que una perfusión continua de tampones de

Ca^{2+} en células HeLa permeabilizadas produce un incremento prolongado en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ sin signos de inactivación (Vay et al., 2009).

Aunque el rhod-2 muestra dificultades para monitorizar correctamente la $[\text{Ca}^{2+}]_M$, las discrepancias relativas al tamaño del pico de Ca^{2+} mitocondrial obtenido durante la estimulación con agonistas pueden deberse a la alta afinidad de este colorante. El colorante de baja afinidad rhod-FF ($K_d = 19\mu\text{M}$) ha sido usado en algunos casos para evitar esta saturación con Ca^{2+} y aunque los datos de fluorescencia no han sido calibrados a datos de $[\text{Ca}^{2+}]_M$, su respuesta frente a diversos estímulos es mejor que la obtenida con el rhod-2 (Billups & Forsythe, 2002). Para resolver por completo estas discrepancias, en el presente trabajo se han realizado medidas con el colorante de muy baja afinidad rhod-5N (K_d *in vitro* de $320\mu\text{M}$). La calibración *in situ* realizada para ese colorante, proporcionó un valor de K_d de $470\mu\text{M}$, tomando como fluorescencia máxima la obtenida al perfundir Ca^{2+} a una concentración de 10mM . De hecho, la curva de calibración sugiere que alcanzar la fluorescencia máxima requeriría concentraciones más altas de Ca^{2+} , por lo que su K_d podría ser incluso mayor. Estas altas concentraciones de Ca^{2+} no han sido estudiadas por que se alejan mucho del rango fisiológico. Al igual que sucede con el rhod-2 y con el pericam ratiométrico, esta K_d *in situ* en mitocondria es mayor que la obtenida *in vitro* (Collins et al., 2001; Filippin et al., 2003; 2005). Este colorante ha sido usado previamente para medir $[\text{Ca}^{2+}]_M$ en terminales nerviosas motoras (David et al., 2003). Sin embargo, a pesar de que este trabajo muestra aumentos de fluorescencia de rhod5N muy significativos tras la estimulación de los terminales, la calibración realizada por los autores los transformaba en picos de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ de solamente $1\mu\text{M}$, al usar sistemáticamente cocientes $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}=200$. En nuestras manos, el cociente $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}$ fue de $3,3 \pm 0,4$ (media \pm error estándar, $n=11$), variable en función del ruido de fondo. Por este motivo, en este trabajo se optó por hacer una curva de calibración *in situ* y después normalizarla en cada experimento midiendo la fluorescencia máxima registrada al perfundir una solución con una $[\text{Ca}^{2+}]$ de 10mM .

Como se ha mencionado anteriormente, las mitocondrias son un orgánulo de vital importancia en la regulación de las señales intracelulares por Ca^{2+} y como se ha podido comprobar, contar con métodos de medida fiables para estudiar con detalle la dinámica del Ca^{2+} mitocondrial es fundamental. Las medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ requieren sondas capaces de medir Ca^{2+} en un amplio rango de concentraciones debido a que la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ puede oscilar entre valores de 100nM en situaciones de reposo hasta niveles del orden de milimolar en respuesta a fuertes estimulaciones o incrementos

prolongados de la $[Ca^{2+}]_C$. Por lo tanto, las sondas necesarias para poder medir valores de $[Ca^{2+}]$ en el rango milimolar necesitan tener una muy baja afinidad por Ca^{2+} . A pesar de la existencia de aequorinas de baja afinidad, éstas aún poseen una afinidad por Ca^{2+} demasiado elevada para poder registrar altas $[Ca^{2+}]_M$ durante periodos largos de tiempo, sobre todo a $37^\circ C$.

En este trabajo se ha desarrollado una nueva forma de aequorina, doblemente mutada (28, 119 mutAEQ), con una muy baja afinidad por Ca^{2+} , ideal para medir altas concentraciones de Ca^{2+} durante periodos prolongados de tiempo, en el rango milimolar. Esta nueva forma de aequorina reconstituida con celenterazina *i*, dirigida a mitocondria (LAmitAEQ) posee una afinidad por Ca^{2+} 100 veces menor a la de menor afinidad existente hasta este momento, permitiendo realizar medidas de $[Ca^{2+}]_M$ en el rango milimolar a $37^\circ C$ durante periodos superiores a una hora, con consumos de la sonda que apenas llegan al 40%. Esta nueva sonda ha permitido realizar estudios detallados de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_M$ en células HeLa permeabilizadas en presencia de diferentes tampones de $[Ca^{2+}]$ conocidas, así como investigar el efecto que tienen en esta dinámica diferentes iones intracelulares, como pueden ser el Na^+ o el fosfato. Gracias a esta nueva sonda, también ha sido posible realizar experimentos en células intactas en las que la acción de ciertos estímulos consiguen elevar la $[Ca^{2+}]_M$ hasta valores de cientos de micromolar.

2. DINÁMICA DE LOS FLUJOS DE Ca^{2+} MITOCONDRIALES

A pesar de la importancia de los flujos de Ca^{2+} mitocondriales, hasta este momento no se había realizado un estudio detallado de dichos flujos de Ca^{2+} en base a medidas de $[Ca^{2+}]$ dentro de la mitocondria. En este trabajo se ha realizado un investigación detallada de la cinética de los flujos de Ca^{2+} mitocondriales, realizando medidas de las $[Ca^{2+}]$ mitocondrial mediante aequorina en células HeLa permeabilizadas. Estas entradas y salidas de Ca^{2+} mitocondrial se han investigado en presencia de diferentes $[Ca^{2+}]$ y $[Na^+]$ extramitocondriales y también a diferentes temperaturas.

La máxima actividad del MCU ha sido estimada a partir de mitocondrias de hígado de rata, obteniéndose valores de 1400 y 900 nmol Ca^{2+} total·mg proteína⁻¹·min⁻¹ a 30 y $20^\circ C$ respectivamente y con un potencial de membrana mitocondrial constante (Bragadin et al., 1979). La presencia de Mg^{2+} 1mM debería reducir estos datos un 20-30% hasta valores cercanos a 1000 y 600 nmol Ca^{2+} total·mg proteína⁻¹·min⁻¹. Por otra

parte, los valores de K_m por Ca^{2+} para el MCU se encuentran entre 20 y 50 μM (Vinogradov & Scarpa, 1973) por lo que la máxima velocidad del uniportador debería de ser al menos 4 veces mayor que la que se obtiene a una $[Ca^{2+}]$ de 10 μM (Montero et al., 2000). Datos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron valores de entrada de Ca^{2+} total de 21 nmol Ca^{2+} total \cdot mg proteína⁻¹ \cdot min⁻¹ en presencia de una $[Ca^{2+}]$ extramitocondrial 10 μM . Si se toman en cuenta los datos anteriores, una estimación razonable de la velocidad máxima de entrada en nuestras condiciones sería aproximadamente 80 nmol Ca^{2+} total \cdot mg proteína⁻¹ \cdot min⁻¹ ($\approx 21 \cdot 4$). Si se tiene en cuenta que este valor se ha obtenido con la membrana mitocondrial parcialmente despolarizada debido a la entrada de Ca^{2+} , el valor final sería algo mayor, cercano a 100 nmol Ca^{2+} total \cdot mg proteína⁻¹ \cdot min⁻¹. Esta velocidad es casi 10 veces menor a la obtenida previamente en mitocondrias de hígado de rata.

Mediante los experimentos realizados con aequorina, en este trabajo se han obtenido velocidades de entrada de Ca^{2+} libre, con tampones de $[Ca^{2+}]$ 10 μM de 2,8 y 1,2 nmol Ca^{2+} libre \cdot mg proteína⁻¹ \cdot min⁻¹ a 37 y 22°C respectivamente. Empleando el mismo factor mencionado anteriormente para esta $[Ca^{2+}]$ (4 veces mayor), se obtendrían valores para la máxima velocidad de entrada de Ca^{2+} libre de 10 y 5 nmol Ca^{2+} libre \cdot mg proteína⁻¹ \cdot min⁻¹ a 37 y 22°C respectivamente. Estos valores para la velocidad de entrada de Ca^{2+} libre son entre 10 y 100 veces menores que los mencionados anteriormente para la entrada de Ca^{2+} total. La diferencia debería deberse a la capacidad tampón de Ca^{2+} de la mitocondria, y por tanto, estas cifras serían una buena estimación del cociente Ca^{2+} ligado/ Ca^{2+} libre dentro de la mitocondria durante el proceso de captación de Ca^{2+} .

Estos valores para el cociente Ca^{2+} ligado/ Ca^{2+} libre contrastan con estimaciones previas de este cociente que van desde 4000 (Babcock et al., 1997) hasta 150.000 (Chalmers & Nicholls, 2003). Los datos presentados en este trabajo no muestran la existencia de tampones de alta afinidad por Ca^{2+} en el rango micromolar bajo. Por el contrario, nuestros datos sí concuerdan con datos previos que sugieren la presencia de tampones de baja afinidad y alta capacidad (Coll et al., 1982), permitiendo estos tampones un rápido incremento y liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} mitocondrial, llegando incluso a cientos de micromolar en células cromafines intactas (Montero et al., 2000). Si el ratio Ca^{2+} ligado/ Ca^{2+} libre propuesto por nuestro grupo es correcto (valores entre 10 y 100), para alcanzar una $[Ca^{2+}]_M$ de 1 mM sería necesaria una carga total de calcio en las mitocondrias de unos 100 nmol Ca^{2+} total \cdot mg proteína⁻¹ \cdot min⁻¹. Es interesante destacar que este valor corresponde aproximadamente

a la cantidad total de Ca^{2+} que puede ser acumulada en el interior de la mitocondria sin producir daño alguno (Gunter & Pfeiffer, 1990).

En lo referente a la salida de Ca^{2+} de la mitocondria, la velocidad máxima de salida registrada por nosotros a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es de 0,5 nmol Ca^{2+} libre·mg proteína⁻¹·min⁻¹ a 37°C y 0,12 nmol Ca^{2+} libre· mg proteína⁻¹·min⁻¹ a 22°C. Estos valores son entre 20 y 150 veces inferiores que los que aparecen en la literatura para la velocidad de salida de Ca^{2+} total a 22°C (2,6-18 nmol Ca^{2+} total·mg proteína⁻¹·min⁻¹) (Crompton et al., 1978, Wingrove & Gunter, 1986), una diferencia consistente de nuevo con cocientes Ca^{2+} ligado/ Ca^{2+} libre en ese rango. En el caso de la salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ , la velocidad de salida máxima obtenida es de 0,5 y 0,04 nmol Ca^{2+} libre·mg proteína⁻¹·min⁻¹ para 37 y 22°C respectivamente. Los valores máximos publicados para esta vía de salida son de 1-2 nmol Ca^{2+} total·mg proteína⁻¹·min⁻¹ a 22°C (Wingrove & Gunter, 1986b), nuevamente entre 25-50 veces superior a los aquí registrados para Ca^{2+} libre.

Los resultados de este trabajo muestran que la salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ es muy lenta a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ bajas (inferiores a 200 μM) y que esta vía de salida aumenta su velocidad para $[\text{Ca}^{2+}]_M$ altas. En la literatura, sin embargo, se ha descrito que la salida a través de esta vía se ve saturada a valores de 25 nmol Ca^{2+} total·mg proteína⁻¹·min⁻¹ (Wingrove & Gunter, 1986b). De acuerdo con el ratio de 100 para la relación Ca^{2+} ligado/ Ca^{2+} libre asumido en este trabajo, este sistema de salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ se saturaría a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ de 250 μM . Una posible explicación para esta discrepancia sería la existencia de una nueva vía de salida de Ca^{2+} para $[\text{Ca}^{2+}]_M$ superiores a 200-250 μM , como podría ser por ejemplo una activación reversible o transitoria del PTP.

La salida del Ca^{2+} mitocondrial en células HeLa es altamente dependiente de Na^+ , sobre todo a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ bajas ($\leq 200\mu\text{M}$). De hecho a una $[\text{Ca}^{2+}]_M$ de 100 μM , el 85-90% de la salida de Ca^{2+} es dependiente de Na^+ . La K_m de activación de esta vía de salida se encuentra a $[\text{Na}^+]$ cercanas a 10mM, aunque si lo que se estudia es la inhibición por Na^+ de la entrada de Ca^{2+} , se obtienen valores de K_m más bajos, en torno a 5mM . Esta diferencia puede deberse a la temperatura o incluso al diseño experimental. En cualquier caso estos valores se encuentran en el rango descrito previamente para este sistema de salida de Ca^{2+} (2,6-9,4mM Cox & Matlib, 1993). El punto importante es que estas $[\text{Na}^+]$ se encuentran en el rango fisiológico, y variaciones en la $[\text{Na}^+]$ citosólica pueden producir cambios significativos en la

acumulación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria, como se ha descrito anteriormente (Sedova & Blatter, 2000). Los datos presentados en este trabajo muestran que las velocidades de entrada y de salida de Ca^{2+} en la mitocondria están en rangos comparables cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ global se encuentra por debajo de $7\mu\text{M}$, tal y como sucede tras la mayoría de estímulos fisiológicos, excepto en los microdominios locales de Ca^{2+} . Por lo tanto la modulación de la velocidad de salida del Ca^{2+} mitocondrial mediante cambios en la $[\text{Na}^+]$ citosólica puede ser importante en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial.

Esta serie de datos también muestran la gran dependencia de temperatura que poseen las vías de salida de Ca^{2+} mitocondrial. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ aumenta su actividad 4 veces al pasar de 22 a 37°C mientras que la salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ multiplica su actividad por 10 con este mismo cambio de temperatura. La dependencia de temperatura de la entrada de Ca^{2+} no es tan grande (solamente 2 veces mayor al pasar de 22 a 37°C). Debido a ello, los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ observados al añadir los tampones de Ca^{2+} son mayores a 22°C que a 37°C (excepto a $[\text{Ca}^{2+}] 10\mu\text{M}$ que satura la sonda a concentraciones cercanas a 1mM). Es muy importante tener en cuenta estos datos referentes a la temperatura, ya que la mayoría de los trabajos realizados describiendo la capacidad de acumular y liberar Ca^{2+} de la mitocondria han sido realizados a 22°C (Babcock et al., 1997; Park et al., 1996). Estos trabajos concluyen que las mitocondrias son capaces de acumular rápidamente Ca^{2+} en su interior, pero que su liberación es más lenta, con el fin de prolongar en el tiempo la señal citosólica de Ca^{2+} . Efectivamente, esta liberación sí que es más lenta a 22°C , pero no sucede lo mismo a 37°C , donde la velocidad de salida del Ca^{2+} mitocondrial es mucho más rápida, haciendo que los cursos temporales de los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ y $[\text{Ca}^{2+}]_c$ sean cinéticamente muy similares.

También cabe resaltar que la perfusión de un tampón de $[\text{Ca}^{2+}] 3,5\mu\text{M}$ apenas produce un incremento detectable en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$, debido a que a estas $[\text{Ca}^{2+}]_c$ el balance entre entrada y salida del Ca^{2+} mitocondrial está muy equilibrado. Si se bloquea la salida de Ca^{2+} mitocondrial con el inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ CGP37157, el Ca^{2+} no puede liberarse mediante esta vía, produciéndose un rápido incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$.

Los datos de dinámica del Ca^{2+} mitocondrial obtenidos a partir de células HeLa permeabilizadas cargadas con rhod-5N son muy similares a los obtenidos con aequorina. Todos los datos de fluorescencia registrados mediante este colorante

fueron transformados en datos de $[Ca^{2+}]_M$ gracias a la curva de calibración del rhod-5N. La adición de tampones de $[Ca^{2+}]$ conocida a células HeLa permeabilizadas, provocó un aumento en la $[Ca^{2+}]_M$ hasta valores de cientos de micromolar, muy similares a los obtenidos previamente con aequorina. Por otra parte, los registros obtenidos a partir de rhod-5N también muestran una liberación del Ca^{2+} mitocondrial fuertemente dependiente de la $[Na^+]$ citosólica, mediada por el intercambiador Na^+/Ca^{2+} . Tanto los valores absolutos de $[Ca^{2+}]_M$ como las cinéticas de entrada y salida del Ca^{2+} mitocondrial medidos con el colorante rhod-5N son totalmente consistentes con los mostrados anteriormente registrados mediante aequorina.

3. EFECTO DEL FOSFATO CITOSÓLICO SOBRE LOS NIVELES DE Ca^{2+} MITOCONDRIALES

Los estudios realizados mediante la aequorina mitocondrial de muy baja afinidad doblemente mutada (LAmitAEQ) muestran que la adición de tampones de $[Ca^{2+}]$ superiores a $4\mu M$ a células HeLa permeabilizadas, provoca un rápido incremento en la $[Ca^{2+}]_M$ que puede llegar incluso a valores de 2-3mM en ausencia de fosfato. La velocidad de entrada del Ca^{2+} es proporcional a la $[Ca^{2+}]$ del tampón, pero en ausencia de fosfato, la $[Ca^{2+}]_M$ máxima alcanzada es relativamente similar en todos los casos, ya sea perfundiendo un tampón de $[Ca^{2+}]$ $4,5\mu M$ o $200\mu M$. La única limitación para la entrada de Ca^{2+} podría ser la despolarización de la membrana mitocondrial causada por el propio Ca^{2+} .

En la literatura se pueden encontrar datos que afirman que en presencia de fosfato, las mitocondrias son capaces de acumular entre 10 y 30 veces más cantidad de Ca^{2+} de la considerada como límite para que no se produzcan daños mitocondriales (Gunter & Pfeiffer, 1990). Esta alta acumulación de Ca^{2+} en presencia de fosfato podría causar daños irreversibles a la mitocondria y la formación de precipitados de fosfato cálcico. Los experimentos aquí realizados muestran que la presencia de fosfato disminuye la $[Ca^{2+}]_M$ máxima alcanzada. La adición de tampones de $[Ca^{2+}]$ $5,5$ o $10\mu M$ en presencia de 1mM de fosfato reducen esta $[Ca^{2+}]_M$ máxima hasta valores de 0,8-1mM, y la presencia de 3mM de fosfato hasta valores cercanos a $500\mu M$. Estos datos sugieren que la presencia de fosfato, en cualquier caso, impide que la $[Ca^{2+}]_M$ máxima sea mayor. Si la $[Ca^{2+}]$ perfundida es de 100 o $200\mu M$, la velocidad de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es mucho mayor y alcanza rápidamente niveles cercanos a 1mM, incluso en presencia de 1 o 3 mM de fosfato. A partir de este punto la velocidad de entrada de Ca^{2+} disminuye considerablemente, por lo que es posible que la

precipitación del Ca^{2+} con fosfato empiece repentinamente en estos valores. Estos valores se corresponden con los previamente conocidos para la solubilidad del producto $[\text{HPO}_4^{2-}] \cdot [\text{Ca}^{2+}]$ de aproximadamente 3mM^2 (Fryer et al., 1995). Estos datos sugieren que, contrariamente a estimaciones previas (Chalmers & Nicholls, 2003), la formación de precipitados de fosfato cálcico solo ocurre cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ se aproxima a valores de 1mM .

Como se ha demostrado anteriormente, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es una de las principales vías de salida de Ca^{2+} , y la presencia de Na^+ en el medio acelera la salida de Ca^{2+} para cada una de las concentraciones de fosfato. Sin embargo, en presencia de fosfato, la salida de Ca^{2+} mitocondrial es mucho más lenta, probablemente debido a la progresiva liberación del Ca^{2+} de los precipitados de fosfato cálcico formados durante la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. Estos mismos resultados de liberación más lenta de Ca^{2+} en presencia de fosfato, se obtienen cuando despolarizamos la membrana mitocondrial interna con el protonóforo FCCP.

La despolarización de la membrana mitocondrial provoca una rápida liberación del Ca^{2+} acumulado en el interior de la matriz. En este caso, la salida se produce no solo a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, sino también a través del MCU funcionando en modo reverso. Este funcionamiento reverso del MCU requiere, además de la despolarización de la membrana mitocondrial, la presencia de Ca^{2+} en el lado citosólico para activar el MCU. Si el FCCP se añade junto con un medio interno EGTA (libre de Ca^{2+}), y también en ausencia de Na^+ , ambas vías de salida están bloqueadas, y la salida de Ca^{2+} es muy lenta. La perfusión en estas condiciones de un medio citosólico con Ca^{2+} , causa paradójicamente una rápida liberación del Ca^{2+} mitocondrial acumulado. Otro curioso efecto se obtiene al perfundir FCCP junto con Na^+ y fosfato, en ausencia de Ca^{2+} . En estas condiciones, la perfusión del protonóforo provoca un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$, debido muy probablemente a la acidificación de la matriz mitocondrial y la consecuente liberación de Ca^{2+} causada por la disolución de los precipitados de fosfato cálcico.

4. DEPENDENCIA DE Ca^{2+} DE LA APERTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

A pesar de que la sobrecarga de la mitocondria con Ca^{2+} se ha descrito como uno de los principales factores que activan la apertura del PTP (Jacobson & Duchen.2002; Davidson et al., 2012), aún se desconoce la función exacta del Ca^{2+} en

este mecanismo, y si el Ca^{2+} por si solo es capaz de inducir dicha apertura. En los resultados aquí expuestos, se observa que la exposición de células HeLa permeabilizadas a una sobrecarga de Ca^{2+} durante aproximadamente 15 minutos, no es capaz de inducir por si sola la apertura del PTP. Niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ cercanos a $800\mu\text{M}$ se mantienen estables durante un largo periodo de tiempo sin evidencias de la activación del poro. Los ROS también han sido descritos como uno de los principales inductores de la apertura del PTP junto con el Ca^{2+} (Roy & Hajnoczky, 2008). Los resultados de este trabajo muestran que en células HeLa permeabilizadas, la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, junto con un potente ROS como es el H_2O_2 tampoco es capaz de inducir la apertura del PTP. Grandes incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ en células HeLa intactas inducidos por el agonista capsaicina, tampoco mostraron en ningún caso evidencias de la apertura del PTP. Bajo estas condiciones experimentales concretas, no se ha observado una apertura del PTP evidente, por lo se puede concluir, que en este caso, deben de existir más factores implicados en la apertura del poro de transición de permeabilidad, además del propio Ca^{2+} o los ROS.

5. DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL TRAS DIFERENTES ESTÍMULOS

Algunas discrepancias relativas a las $[\text{Ca}^{2+}]_M$ máximas alcanzadas en el interior de la mitocondria, en respuesta a estímulos fisiológicos, también podrían ser resueltas con el uso del colorante de muy baja afinidad rhod-5N. Tanto los resultados obtenidos con aequorina como los obtenidos a partir de la curva de calibración del rhod-5N, muestran que estímulos fisiológicos con el agonista histamina, producen incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ comprendidos entre 20 y $30\mu\text{M}$, independientemente del método de medida empleado. Los incrementos registrados con ambos métodos en presencia del activador del MCU kaempferol también son muy similares, obteniéndose valores cercanos a $80\mu\text{M}$ en ambos casos.

El rhod-5N posee algunas ventajas sobre la aequorina. Por ejemplo, con este colorante es posible realizar medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ a nivel de célula única o incluso a nivel subcelular. Los datos registrados a nivel de células individuales en respuesta a estímulos de histamina, mostraron una elevada heterogeneidad de respuestas, pudiendo variar el pico de Ca^{2+} mitocondrial desde $10\mu\text{M}$ hasta $70\mu\text{M}$. A pesar de esta enorme variabilidad, los valores promedios se encontraban entre 20 y $30\mu\text{M}$, como se ha descrito anteriormente. En un principio se pensó que esta variabilidad podría estar relacionada con una variabilidad en los picos citosólicos de Ca^{2+} . Sin embargo, los

experimentos diseñados para medir simultáneamente $[Ca^{2+}]$ mitocondrial y citosólica, no reflejaron una clara correlación entre los picos citosólicos y mitocondriales. Algunas posibles explicaciones para este hecho podrían ser las diferentes condiciones en las que se encuentran las mitocondrias para esa célula en concreto, la cantidad de contactos entre RE y mitocondria a nivel de célula individual o la presencia de membranas mitocondriales asociadas con RE (MAMs). De hecho, la transferencia de Ca^{2+} entre mitocondrias y RE depende en gran medida de la conexión entre ambos orgánulos. Si esta hipótesis es correcta, el tamaño del pico mitocondrial no solo dependería del Ca^{2+} liberado del RE, sino también de la arquitectura tridimensional más o menos interconectada en distintas células de ambos orgánulos.

Otra de las ventajas del rhod-5N es que permite realizar medidas de $[Ca^{2+}]_M$ a nivel subcelular. Los resultados obtenidos en una única célula HeLa también muestran una variabilidad significativa en la $[Ca^{2+}]_M$ entre unas zonas y otras de una misma célula. Esta variabilidad ya había sido predicha en los primeros estudios con aequorina, donde la estimulación repetida de células intactas provocaba el consumo de aequorina en una población mitocondrial en concreto (Rizzuto et al., 1994). Los resultados con rhod-5N a nivel subcelular muestran que los incrementos más grandes de la $[Ca^{2+}]_M$ se producen en mitocondrias cercanas al núcleo. Estos datos son consistentes con los obtenidos por Giacomello et al., 2010, que también muestran una gran acumulación de Ca^{2+} por las mitocondrias cercanas al núcleo.

6. EFECTOS DEL SILENCIAMIENTO DEL UNIPORTADOR DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL

Para finalizar, los estudios preliminares realizados con clones de células HeLa cuyo MCU fue silenciado, mostraron claramente una reducción en la velocidad de entrada del Ca^{2+} a la mitocondria. Los niveles máximos de $[Ca^{2+}]_M$ en ausencia de fosfato (2-3mM) no están limitados por una saturación del MCU sino que probablemente sean una consecuencia del equilibrio termodinámico alcanzado después de una despolarización parcial de la membrana mitocondrial, y fruto siempre de la actividad de una pequeña cantidad de MCU no silenciado. Los picos de Ca^{2+} mitocondriales obtenidos en células HeLa intactas silenciadas también sufrieron una disminución significativa.



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Some Ca^{2+} sensitive dyes widely used to measure mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]_M$, such as rhod-2 or rhod-FF, have a response to dynamic $[\text{Ca}^{2+}]_M$ changes which is quantitatively and qualitatively different from that shown by other Ca^{2+} -sensitive probes like aequorin or pericam.
2. In HeLa cells, rhod-2 is unable to monitor correctly mitochondrial Ca^{2+} changes during repetitive increases in the mitochondrial Ca^{2+} concentration. Moreover, if the mitochondrial membrane is depolarized, rhod-2 is also unable to detect the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_M$ induced by Ca^{2+} equilibration in the presence of high $[\text{Ca}^{2+}]_M$.
3. The reason for this behavior is unclear, but it is neither due to the effect of loading the dye nor to the increased buffering, at least at the usual rhod-2-AM concentrations (1-2 μM). Loading with higher concentrations causes irreversible changes in mitochondrial morphology and a significant decrease in the Ca^{2+} response to agonists.
4. A new double-mutated aequorin has been generated (N28L), which has significantly reduced the Ca^{2+} affinity of the probe. This new form of aequorin allows us to make Ca^{2+} measurements in the millimolar range for long times, avoiding the problems caused by aequorin consumption. With this probe, we have also made a more detailed study of the dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_M$ in intact and permeabilized cells.
5. The mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is the main system responsible of extruding Ca^{2+} at low $[\text{Ca}^{2+}]_M$ (<200 μM), whereas at higher concentrations the Ca^{2+} release is also driven by Na^+ -independent pathways such as the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger or other mechanisms.
6. The cytosolic Na^+ concentration can modulate the ability of mitochondria to accumulate Ca^{2+} at cytosolic Ca^{2+} concentrations below 7 μM .
7. The mitochondrial Ca^{2+} entry is less affected than Ca^{2+} extrusion by the increase in the temperature from 22 to 37 $^\circ\text{C}$. In the case of Na^+ -dependent release, the maximum rate observed at 22 $^\circ\text{C}$ was about 4-fold smaller than at 37 $^\circ\text{C}$. For the Na^+ -independent release the difference for the same temperature change was about 10-fold.

CONCLUSIONS

8. Our results suggest that the Ca^{2+} bound/ Ca^{2+} free ratio during Ca^{2+} uptake by mitochondria is between 10 to 100, much lower than previously reported in the literature by other authors.
9. The values of $[\text{Ca}^{2+}]_M$ obtained with the low- Ca^{2+} -affinity fluorescent dye rhod-5N, both in intact and permeabilized HeLa cells, are quite similar to those obtained previously with aequorin.
10. Single-cell fluorescence measurements with rhod-5N show that the magnitude of the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ peaks induced by agonists is very heterogeneous and do not only depend on the cytosolic Ca^{2+} concentration but could also be affected by others factors, such as the mitochondrial functional state or the close contacts between mitochondria-endoplasmic reticulum.
11. At the subcellular level, the results obtained with rhod-5N show that, in response to histamine stimulation, those mitochondria placed closer to the nucleus undergo larger $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increases than those located farther away from the nucleus.
12. Mitochondrial Ca^{2+} overload is not able by itself to induce the opening of the mitochondrial permeability transition pore. Our results suggest that additional factors are required to induce this opening.
13. Formation of calcium phosphate precipitates inside mitochondria directly affects the kinetics of mitochondrial Ca^{2+} increase and release. However, precipitation of calcium phosphate occurs only when the mitochondrial free $[\text{Ca}^{2+}]$ exceeds at least $500\mu\text{M}$. Mitochondrial pH acidification is able to partially re-dissolve this precipitates.
14. Silencing of the mitochondrial calcium uniporter in HeLa cells causes the rate of $[\text{Ca}^{2+}]$ increase to be significantly lower, both in intact and permeabilized cells.



REFERENCIAS

- Abbott AL, Ducibella T.** (2001) Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci.* Jul 1;6:792-806
- Allbritton NL, Meyer T, Stryer L.** (1992) Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science.* Dec 11;258:1812-5.
- Allen DG, Blinks JR, Prendergast FG.** (1977) Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration--a calcium-independent component. *Science.* Mar 11;195:996-8.
- Alvarez J, Montero M.** (2002) Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium.* Nov-Dec;32:251-60.
- Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV Jr, Demaurex N.** (2001) Mitochondria recycle Ca²⁺ to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem.* Aug 3;276:29430-9.
- Asahi M, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH.** (2002) Sarcolipin inhibits polymerization of phospholamban to induce superinhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases (SERCAs). *J Biol Chem.* Jul 26;277:26725-8.
- Aulestia FJ, Redondo PC, Rodríguez-García A, Rosado JA, Salido GM, Alonso MT, García-Sancho J.** (2011) Two distinct calcium pools in the endoplasmic reticulum of HEK-293T cells. *Biochem J.* Apr 1;435:227-35.
- Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B.** (1997) Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J Cell Biol.* Feb 24;136:833-44.
- Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P.** (2003) Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res.* May 2;92:873-80.
- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY.** (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 28;96:11241-6.
- Baker PF, Hodgkin AL, Ridgway EB.** (1971) Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J Physiol.* Nov;218:709-55.
- Barbado M, Fablet K, Ronjat M, De Waard M.** (2009) Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta.* Jun;1793:1096-104.
- Barrero MJ, Montero M, Alvarez J.** (1997) Dynamics of [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. *J Biol Chem.* Oct 31;272:27694-9.
- Baughman JM, Perocchi 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.* Jun 19;476:341-5.
- Baysal K, Brierley GP, Novgorodov S, Jung DW.** (1991) Regulation of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ antiport by matrix pH. *Arch Biochem Biophys.* Dec;291:383-9.
- Beard NA, Wei L, Dulhunty AF.** (2009) Ca²⁺ signaling in striated muscle: the elusive roles of triadin, junctin, and calsequestrin. *Eur Biophys J.* Dec;39:27-36.

REFERENCIAS

- Bernardi P, Paradisi V, Pozzan T, Azzone GF.** (1984) Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: inhibition by ruthenium red. *Biochemistry.* Apr 10;23:1645-51.
- Bernardi P, Petronilli V.** (1996) The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr.* Apr;28:131-8.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL.** (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul;4:517-29.
- Berridge MJ.** (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol.* Mar 1;499:291-306.
- Berridge MJ.** (2012) Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans.* Apr;40:297-309.
- Beutner G, Rück A, Riede B, Brdiczka D.** (1998) Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta.* Jan 5;1368:7-18.
- Billups B, Forsythe ID.** (2002) Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J Neurosci.* Jul 15;22:5840-7.
- Boehning D, Joseph SK.** (2000) Functional properties of recombinant type I and type III inositol 1, 4,5-trisphosphate receptor isoforms expressed in COS-7 cells. *J Biol Chem.* Jul 14;275:21492-9.
- Bollmann JH, Sakmann B.** (2005) Control of synaptic strength and timing by the release-site Ca²⁺ signal. *Nat Neurosci.* Apr;8:426-34.
- Boros S, Bindels RJ, Hoenderop JG.** (2009) Active Ca²⁺ reabsorption in the connecting tubule. *Pflugers Arch.* May;458:99-109.
- Bovolenta S, Foti M, Lohmer S, Corazza S.** (2007) Development of a Ca²⁺-activated photoprotein, Photina, and its application to high-throughput screening. *J Biomol Screen.* Aug;12:694-704.
- Bradley J, Reisert J, Frings S.** (2005) Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol.* Jun;15:343-9.
- Bragadin M, Pozzan T, Azzone GF.** (1979) Kinetics of Ca²⁺ carrier in rat liver mitochondria. *Biochemistry.* Dec 25;18:5972-8.
- Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H, Rosenmann E, Gonzalez-Nilo F, Latorre R.** (2007) Dissection of the components for PIP₂ activation and thermosensation in TRP channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 12;104:10246-51.
- Brini M, Carafoli E.** (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* Oct;89:1341-78.
- Brini M, Carafoli E.** (2011) The plasma membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Feb 1;3.
- Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, Rizzuto R.** (1995) Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i). A critical evaluation. *J Biol Chem.* Apr 28;270:9896-903.

- Brini M, Murgia M, Pasti L, Picard D, Pozzan T, Rizzuto R.** (1993) Nuclear Ca^{2+} concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J.* Dec;12:4813-9.
- Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR.** (1989) Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem.* May 15;264:7826-30.
- Broekemeier KM, Pfeiffer DR.** (1995) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry.* Dec 19;34:16440-9.
- Buntinas L, Gunter KK, Sparagna GC, Gunter TE.** (2001) The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* Apr 2;1504:248-61.
- Burnashev N, Rozov A.** (2005) Presynaptic Ca^{2+} dynamics, Ca^{2+} buffers and synaptic efficacy. *Cell Calcium.* May;37:489-95.
- Carafoli E, Genazzani A, Guerini D.** (1999) Calcium controls the transcription of its own transporters and channels in developing neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 29;266:624-32.
- Carafoli E, Tiozzo R, Lugli G, Crovetto F, Kratzing C.** (1974) The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J Mol Cell Cardiol.* Aug;6:361-71.
- Carafoli E.** (1965) Active accumulation of sr^{2+} by rat-liver mitochondria. ii. competition between ca^{2+} and sr^{2+} . *Biochim Biophys Acta.* Jan 4;97:99-106.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D.** (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* Apr 14;288:306-13.
- Catterall WA, Few AP.** (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron.* 2008 Sep 25;59:882-901.
- Chalmers S, Nicholls DG.** (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem.* May 23;278:19062-70.
- Chavis P, Fagni L, Lansman JB, Bockaert J.** (1996) Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature.* Aug 22;382:719-22.
- Chiesi M, Schwaller R, Eichenberger K.** (1988) Structural dependency of the inhibitory action of benzodiazepines and related compounds on the mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *Biochem Pharmacol.* Nov 15;37:4399-403.
- Chin D, Means AR.** (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* Aug;10:322-8.
- Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ.** (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci.* Dec;1:668-74.
- Clapham DE.** (2007) Calcium signaling. *Cell.* Dec 14;131:1047-58
- Clapham DE.** (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature.* Dec 4;426:517-24.
- Clarke A, Pörtner HO.** (2010) Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy. *Biol Rev Camb Philos Soc.* Nov;85:703-27.

REFERENCIAS

- Coll KE, Joseph SK, Corkey BE, Williamson JR.** (1982) Determination of the matrix free Ca²⁺ concentration and kinetics of Ca²⁺ efflux in liver and heart mitochondria. *J Biol Chem.* Aug 10;257:8696-704.
- Collins TJ, Lipp P, Berridge MJ, Bootman MD.** (2001) Mitochondrial Ca(2+) uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca(2+) signals. *J Biol Chem.* Jul 13;276:26411-20.
- Colombini M.** (2012) VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochim Biophys Acta.* Jun;1818:1457-65
- Connern CP, Halestrap AP.** (1992) Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J.* Jun 1;284:381-5.
- Cox DA, Matlib MA.** (1993) A role for the mitochondrial Na(+)-Ca²⁺ exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria. *J Biol Chem.* Jan 15;268:938-47.
- Crompton M, Moser R, Lüdi H, Carafoli E.** (1978) The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur J Biochem.* Jan 2;82:25-31.
- Csordás G, Golenár T, Seifert EL, Kamer KJ, Sancak Y, Perocchi F, Moffat C, Weaver D, de la Fuente Perez S, Bogorad R, Koteliensky V, Adjianto J, Mootha VK, Hajnóczky G.** (2013) MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Metab.* Jun 4;17:976-87
- Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnóczky G.** (2006) Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol.* Sep 25;174:915-21.
- Csordás G, Thomas AP, Hajnóczky G.** (2001) Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria in cardiac muscle. *Trends Cardiovasc Med.* Oct;11:269-75.
- Csordás G, Várnai 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.* Jul 9;39:121-32.
- Dagnino-Acosta A, Guerrero-Hernández A.** (2009) Variable luminal sarcoplasmic reticulum Ca(2+) buffer capacity in smooth muscle cells. *Cell Calcium.* Sep;46:188-96.
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S.** (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* Jun;25:317-24.
- Dally S, Bredoux R, Corvazier E, Andersen JP, Clausen JD, Dode L, Fanchaouy M, Gelebart P, Monceau V, Del Monte F, Gwathmey JK, Hajjar R, Chaabane C, Bobe R, Raies A, Enouf J.** (2006) Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem J.* Apr 15;395:249-58.
- Dash RK, Beard DA.** (2008) Analysis of cardiac mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger kinetics with a biophysical model of mitochondrial Ca²⁺ handling suggests a 3:1 stoichiometry. *J Physiol.* Jul 1;586:3267-85.
- David G, Barrett EF.** (2003) Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol.* Apr 15;548:425-38.

- David G, Talbot J, Barrett EF.** (2003) Quantitative estimate of mitochondrial [Ca²⁺] in stimulated motor nerve terminals. *Cell Calcium*. Mar;33:197-206.
- Davidson GA, Varhol RJ.** (1995) Kinetics of thapsigargin-Ca(2+)-ATPase (sarcoplasmic reticulum) interaction reveals a two-step binding mechanism and picomolar inhibition. *J Biol Chem*. May 19;270:11731-4.
- Davidson SM, Yellon DM, Murphy MP, Duchen MR.** (2012) Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation. *Cardiovasc Res*. Mar 1;93:445-53.
- De la Fuente S, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J.** (2013) Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low-Ca²⁺-affinity targeted aequorin. *Cell Calcium*. Jul;54:37-45.
- De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R.** (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. Jun 19;476:336-40.
- Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW.** (1998) Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*. Mar 12;392:198-202.
- Denton RM, Randle PJ, Martin BR.** (1972) Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J*. Jun;128:161-3.
- Denton RM, Richards DA, Chin JG.** (1978) Calcium ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem J*. Dec 15;176:899-906.
- Dolphin AC.** (2012) Calcium channel auxiliary $\alpha 2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci*. Jul 18;13:542-55.
- Drahota Z, Gazzotti P, Carafoli E, Rossi CS.** (1969) A comparison of the effects of different divalent cations on a number of mitochondrial reactions linked to ion translocation. *Arch Biochem Biophys*. Mar;130:267-73.
- Duchen MR, Szabadkai G.** (2010) Roles of mitochondria in human disease. *Essays Biochem*.;47:115-37.
- Dziadek MA, Johnstone LS.** (2007) Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell Calcium*. Aug;42:123-32.
- Endele S, Fuhry M, Pak SJ, Zabel BU, Winterpacht A.** (1999) LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics*. Sep 1;60:218-25.
- Endo M, Tanaka M, Ogawa Y.** (1970) Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature*. Oct 3;228:34-6.
- Feske S, Giltnane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A.** (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol*. Apr;2:316-24.
- Filippin L, Abad MC, Gastaldello S, Magalhães PJ, Sandonà D, Pozzan T.** (2005) Improved strategies for the delivery of GFP-based Ca²⁺ sensors into the mitochondrial matrix. *Cell Calcium*. Feb;37(2):129-36.
- Filippin L, Magalhães PJ, Di Benedetto G, Colella M, Pozzan T.** (2003) Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem*. Oct 3;278:39224-34.

REFERENCIAS

- Flucher BE, Obermair GJ, Tuluc P, Schredelseker J, Kern G, Grabner M.** (2005) The role of auxiliary dihydropyridine receptor subunits in muscle. *J Muscle Res Cell Motil.*;26:1-6.
- Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A** (1998) ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* Oct 2;273:25734-40.
- Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO.** (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol Rev.* Apr;87:593-658.
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L.** (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell.* Jul 14;126:177-89.
- Fryer MW, Owen VJ, Lamb GD, Stephenson DG.** (1995) Effects of creatine phosphate and P(i) on Ca²⁺ movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. *J Physiol.* Jan 1;482:123-40.
- Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K.** (1989) Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature.* Nov 2;342:32-8.
- Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN.** (1997) Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron.* Sep;19:723-33.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, Duchen MR, Abramov AY.** (2009) PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell.* Mar 13;33:627-38.
- Giacomello M, Drago 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.* Apr 23;38:280-90.
- Gincel D, Silberberg SD, Shoshan-Barmatz V.** (2000) Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by glutamate. *J Bioenerg Biomembr.* Dec;32:571-83.
- Glancy B, Balaban RS.** (2012) Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry.* Apr 10;51:2959-73.
- Gorokhovatsky AY, Marchenkov VV, Rudenko NV, Ivashina TV, Ksenzenko VN, Burkhardt N, Semisotnov GV, Vinokurov LM, Alakhov YB.** (2004) Fusion of *Aequorea Victoria* GFP and aequorin provides their Ca²⁺-induced interaction that results in red shift of GFP absorption and efficient bioluminescence energy transfer. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 30;320:703-11.
- Gotti C, Clementi F.** (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* Dec;74:363-96.
- Greer PL, Greenberg ME.** (2008) From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron.* Sep 25;59:846-60.
- Grey RD, Wolf DP,** (1974) Hedrick JL. Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* Jan;36:44-61.

- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.** (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* Mar 25;260:3440-50.
- Guerini D, Coletto L, Carafoli E.** (2005) Exporting calcium from cells. *Cell Calcium.* Sep-Oct;38:281-9
- Guerrero-Hernandez A, Dagnino-Acosta A, Verkhratsky A.** (2010) An intelligent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store: release and leak channels have differential access to a concealed Ca²⁺ pool. *Cell Calcium.* Aug-Sep;48:143-9.
- Gunter TE, Gunter KK.** (2001) Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB Life.* Sep-Nov;52:197-204.
- Gunter TE, Pfeiffer DR.** (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* May;258:C755-86.
- Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R.** (2005) The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci.* Aug 24;25:7867-75.
- Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K.** (1992) Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* Nov 9;312:229-35.
- Halestrap AP, Brenner C.** (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.* Aug;10:1507-25.
- Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP.** (1997) Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem.* Feb 7;272:3346-54.
- Halestrap AP.** (2009) What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* Jun;46:821-31.
- Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y.** (2002) LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell.* Jan;9:163-73.
- He Z, Feng S, Tong Q, Hilgemann DW, Philipson KD.** (2000) Interaction of PIP(2) with the XIP region of the cardiac Na/Ca exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol.* Apr;278:C661-6.
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G.** (1994) Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature.* Oct 6;371:513-5.
- Heizmann CW, Berchtold MW, Rowlerson AM.** (1982) Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;79:7243-7.
- Hoek JB, Farber JL, Thomas AP, Wang X.** (1995) Calcium ion-dependent signalling and mitochondrial dysfunction: mitochondrial calcium uptake during hormonal stimulation in intact liver cells and its implication for the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* May 24;1271:93-102.
- Hunter DR, Haworth RA,** (1976) Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem.* Aug 25;251:5069-77.

REFERENCIAS

- Ichas F, Mazat JP.** (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta.* Aug 10;1366:33-50.
- Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Miyata T, Tsuji FI.** (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May;82:3154-8.
- Inouye S, Sahara Y.** (2009) Expression and purification of the calcium binding photoprotein mitrocomin using ZZ-domain as a soluble partner in *E. coli* cells. *Protein Expr Purif.* Jul;66:52-7.
- Inouye S, Sahara Y.** (2007) Expression, purification and characterization of photoprotein, clytin, from *Clytia grearium*. *Protein Expr Purif.* Jun;53:384-9.
- Iwamoto T, Pan Y, Nakamura TY, Wakabayashi S, Shigekawa M.** (1998) Protein kinase C-dependent regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. *Biochemistry.* Dec 8;37:17230-8.
- Jacobson J, Duchon MR.** (2002) Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes--requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *J Cell Sci.* Mar 15;115:1175-88.
- Jaffe LA, Cross NL, Picheral B.** (1983) Studies of the voltage-dependent polyspermy block using cross-species fertilization of amphibians. *Dev Biol.* Aug;98:319-26
- Jiang D, Zhao L, Clapham DE.** (2009) Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science.* Oct 2;326:144-7
- Jiang D, Zhao L, Clish CB, Clapham DE.** (2013) Letm1, the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11;110:E2249-54.
- Jones RG, Bui T, White C, Madesh M, Krawczyk CM, Lindsten T, Hawkins BJ, Kubek S, Frauwirth KA, Wang YL, Conway SJ, Roderick HL, Bootman MD, Shen H, Foscett JK, Thompson CB.** (2007) The proapoptotic factors Bax and Bak regulate T Cell proliferation through control of endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis. *Immunity.* Aug;27:268-80.
- Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD.** (1995) Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* Oct 5;377:438-41.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM.** (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* Mar 29;410:549-54.
- Karlstad J, Sun Y, Singh BB.** (2012) Ca(2+) signaling: an outlook on the characterization of Ca(2+) channels and their importance in cellular functions. *Adv Exp Med Biol.*;740:143-57.
- Kendall JM, Sala-Newby G, Ghalaut V, Dormer RL, Campbell AK.** (1992) Engineering the CA(2+)-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 16;187:1091-7.
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE.** (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* Jan 22;427:360-4.

- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE.** (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* Aug 15;47:333-43.
- Kowaltowski AJ.** (2000) Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res.* Feb;33:241-50.
- Kremneva E, Kislin M, Kang X, Khiroug L.** (2013) Motility of astrocytic mitochondria is arrested by Ca²⁺-dependent interaction between mitochondria and actin filaments. *Cell Calcium.* Feb;53:85-93.
- Kröner H.** (1988) Spermine, another specific allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* Nov 15;267:205-10.
- Kühlbrandt W.** (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Apr;5:282-95.
- Larsen FJ, Schiffer TA, Weitzberg E, Lundberg JO.** (2012) Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides. *Free Radic Biol Med.* Nov 15;53:1919-28.
- Laver DR, Owen VJ, Junankar PR, Taske NL, Dulhunty AF, Lamb GD.** (1997) Reduced inhibitory effect of Mg²⁺ on ryanodine receptor-Ca²⁺ release channels in malignant hyperthermia. *Biophys J.* Oct;73:1913-24.
- Lawlis VB, Roche TE.** (1981) Regulation of bovine kidney alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by calcium ion and adenine nucleotides. Effects on S0.5 for alpha-ketoglutarate. *Biochemistry.* Apr 28;20:2512-8.
- Li J, Pucéat M, Perez-Terzic C, Mery A, Nakamura K, Michalak M, Krause KH, Jaconi ME.** (2002) Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biol.* Jul 8;158:103-13.
- Ligeti E, Bodnar J, Karoly E, Lindner E.** (1981) Ni²⁺, a new inhibitor of mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta.* Dec 28;656:177-82.
- Liou J, Kim ML, 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.* Jul 12;15:1235-41.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* Jul 12;86:147-57.
- Llinás R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B.** (1989) Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar;86:1689-93.
- Lobatón CD, Vay 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.* Aug;145:862-71.
- Lukács GL, Fonyó A.** (1986) The Ba²⁺ sensitivity of the Na⁺-induced Ca²⁺ efflux in heart mitochondria: the site of inhibitory action. *Biochim Biophys Acta.* Jun 13;858:125-34.
- Lytton J.** (2007) Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J.* Sep 15;406:365-82.
- MacDonald MJ, Brown LJ.** (1996) Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied. *Arch Biochem Biophys.* Feb 1;326:79-84

REFERENCIAS

- MacLennan DH, Kranias EG.** (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul;4:566-77.
- Macville M, Schröck E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N, Ried T.** (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* Jan 1;59:141-50.
- Mallilankaraman K, Cárdenas C, Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golenár T, Csordás G, Madireddi P, Yang J, Müller M, Miller R, Kolesar JE, Molgó J, Kaufman B, Hajnóczky G, Foskett JK, Madesh M.** (2012) MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol.* Dec;14:1336-43.
- Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME.** (1999) Neuronal activity dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science.* Oct 22;286:785-90.
- Markova SV, Vysotski ES, Blinks JR, Burakova LP, Wang BC, Lee J.** (2002) Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca²⁺-regulated photoproteins. *Biochemistry.* Feb 19;41:2227-36.
- Marshall CR, Pan TC, Le HD, Omelchenko A, Hwang PP, Hryshko LV, Tibbits GF.** (2005) cDNA cloning and expression of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger from Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reveal a teleost membrane transporter with mammalian temperature dependence. *J Biol Chem.* Aug 12;280:28903-11.
- Marshall IC, Taylor CW.** (1993) Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Exp Biol.* Nov;184:161-82.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K.** (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem.* Sep;122:498-505.
- Matlib MA, Lee SW, Depover A, Schwartz A.** (1983) A specific inhibitory action of certain benzothiazepines and benzodiazepines on the sodium-calcium exchange process of heart and brain mitochondria. *Eur J Pharmacol.* May 6;89:327-8.
- Matsuoka S, Nicoll DA, He Z, Philipson KD.** (1997) Regulation of cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger by the endogenous XIP region. *J Gen Physiol.* Feb;109:273-86.
- Mela L.** (1969) Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria. Effect of lanthanides and local anesthetic drugs. *Biochemistry.* Jun;8:2481-6.
- Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M.** (2009) Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* Feb 1;417:651-66.
- Minta A, Kao JP, Tsien RY.** (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem.* May 15;264:8171-8.
- Mintz IM, Adams ME, Bean BP.** (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron.* Jul;9:85-95
- Misra RP, Bonni A, Miranti CK, Rivera VM, Sheng M, Greenberg ME.** (1994) L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J Biol Chem.* Oct 14;269:25483-93.

- Mitchell KJ, Tsuboi T, Rutter GA.** (2004) Role for plasma membrane-related Ca²⁺-ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic beta-cell Ca²⁺ homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes*. Feb;53:393-400.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY.** (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. Aug 28;388:882-7.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N.** (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. Jun 26;423:949-55.
- Møller JV, Olesen C, Jensen AM, Nissen P.** (2005) The structural basis for coupling of Ca²⁺ transport to ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*. Dec;37:359-64.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX.** (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell*. Feb;9:229-31.
- Montero M, Alonso MT, 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*. Feb;2:57-61.
- Montero M, Barrero MJ, Alvarez J.** (1997) [Ca²⁺] microdomains control agonist-induced Ca²⁺ release in intact HeLa cells. *FASEB J*. Sep;11:881-5.
- Montero M, Brini M, Marsault R, Alvarez J, Sitia R, Pozzan T, Rizzuto R.** (1995) Monitoring dynamic changes in free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J*. Nov 15;14:5467-75.
- Montero M, Lobatón CD, 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*. Nov 15;384:19-24.
- Montero M, Lobaton CD, 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*. Dec;16:1955-7.
- Moore GA, Kass GE, Duddy SK, Farrell GC, Llopis J, Orrenius S.** (1990) 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone--a novel mobilizer of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ pool. *Free Radic Res Commun*;8:337-45.
- Moreau B, Nelson C, Parekh AB.** (2006) Biphasic regulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake by cytosolic Ca²⁺ concentration. *Curr Biol*. Aug 22;16:1672-7.
- Morin N, Abrieu A, Lorca T, Martin F, Dorée M.** (1994) The proteolysis-dependent metaphase to anaphase transition: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates onset of anaphase in extracts prepared from unfertilized *Xenopus* eggs. *EMBO J*. Sep 15;13:4343-52
- Murphy RM, Larkins NT, Mollica JP, Beard NA, Lamb GD.** (2009) Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. *J Physiol*. Jan 15;587:443-60.
- Nader N, Kulkarni RP, Dib M, Machaca K.** (2013) How to make a good egg!: The need for remodeling of oocyte Ca(2+) signaling to mediate the egg-to-embryo transition. *Cell Calcium*. Jan;53:41-54.

REFERENCIAS

- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A.** (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 13;98:3197-202.
- Nagata S.** (1997) Apoptosis by death factor. *Cell.* Feb 7;88:355-65.
- Nakai J, Imagawa T, Hakamat Y, Shigekawa M, Takeshima H, Numa S.** (1990) Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett.* Oct 1;271:169-77.
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K.** (2001) A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* Feb;19:137-41.
- Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demaurex N, Opas M, Michalak M.** (2001) Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol.* Sep 3;154:961-72
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen Xh, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G.** (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry.* Nov 3;37:15353-62.
- Nicholls DG.** (2005) Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium.* Sep-Oct;38:311-7.
- Niggli V, Adunyah ES, Carafoli E.** (1981) Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca²⁺ - ATPase. *J Biol Chem.* Aug 25;256:8588-92.
- Niggli V, Penniston JT, Carafoli E.** (1979) Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem.* Oct 25;254:9955-8.
- Nowikovsky K, Pozzan T, Rizzuto R, Scorrano L, Bernardi P.** (2012) Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the pathophysiology of LETM1. *J Gen Physiol.* Jun;139:445-54
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW.** (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* Aug 1-7;316:440-3.
- Oh-hora M, Rao A.** (2008) Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* Jun;20:250-8.
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME.** (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem.*;63:823-67.
- Pacher P, Thomas AP, Hajnóczky G.** (2002) Ca²⁺ marks: miniature calcium signals in single mitochondria driven by ryanodine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 19;99:2380-5.
- Palade P, Mitchell RD, Fleischer S.** (1983) Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum. General description and effects of calcium. *J Biol Chem.* Jul 10;258:8098-107.
- Palmer AE, Tsien RY.** (2006) Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc.*;1:1057-65.

- Palmieri L, Pardo B, Lasorsa FM, del Arco A, Kobayashi K, Iijima M, Runswick MJ, Walker JE, Saheki T, Satrústegui J, Palmieri F.** (2001) Citrin and aralar1 are Ca(2+)-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J.* Sep 17;20:5060-9.
- Palty R, Hershinkel M, Yagev O, Saar D, Barkalifa R, Khananshvili D, Peretz A, Grossman Y, Sekler I.** (2006) Single alpha-domain constructs of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCLX, oligomerize to form a functional exchanger. *Biochemistry.* Oct 3;45:11856-66.
- Palty R, Ohana E, Hershinkel M, Volokita M, Elgazar V, Beharier O, Silverman WF, Argaman M, Sekler I.** (2004) Lithium-calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium-calcium exchanger. *J Biol Chem.* Jun 11;279:25234-40.
- Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvili D, Sekler I.** (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 5;107:436-41
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q.** (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* Jun;14:383-400.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD.** (2008) Chemical calcium indicators. *Methods.* Nov;46:143-51.
- Parekh AB, Putney JW Jr.** (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* Apr;85:757-810.
- Parekh AB.** (2003) Mitochondrial regulation of intracellular Ca²⁺ signaling: more than just simple Ca²⁺ buffers. *News Physiol Sci.* Dec;18:252-6.
- Park YB, Herrington J, Babcock DF, Hille B.** (1996) Ca²⁺ clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol.* Apr 15;492:329-46.
- Patton BL.** (2003) Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *J Neurocytol.* Jun-Sep;32:883-903.
- Pérez Koldenkova V, Nagai T.** (2013) Genetically encoded Ca(2+) indicators: properties and evaluation. *Biochim Biophys Acta.* Jul;1833:1787-97.
- Perez-Reyes E, Kim HS, Lacerda AE, Horne W, Wei XY, Rampe D, Campbell KP, Brown AM, Birnbaumer L.** (1989) Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature.* Jul 20;340:233-6
- Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK.** (2010) MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature.* Sep 16;467:291-6.
- Piantadosi CA, Suliman HB.** (2012) Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radic Biol Med.* Dec 1;53:2043-53.
- Pinton P, Ferrari D, Magalhães P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R.** (2000) Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol.* Mar 6;148:857-62.
- Pinton P, Leo S, Wieckowski MR, Di Benedetto G, Rizzuto R.** (2004) Long-term modulation of mitochondrial Ca²⁺ signals by protein kinase C isozymes. *J Cell Biol.* Apr 26;165:223-32.

REFERENCIAS

- Planells-Cases R, García-Sanz N, Morenilla-Palao C, Ferrer-Montiel A.** (2005) Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch.* Oct;451:151-9.
- Plovanich M, Bogorad RL, Sancak Y, Kamer KJ, Strittmatter L, Li AA, Girgis HS, Kuchimanchi S, De Groot J, Speciner L, Taneja N, Oshea J, Koteliansky V, Mootha VK.** (2013) MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS One.*;8:e55785.
- Powell JA, Carrasco MA, Adams DS, Drouet B, Rios J, Müller M, Estrada M, Jaimovich E.** (2001) IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci.* Oct;114:3673-83.
- Prasher D, McCann RO, Cormier MJ.** (1985) Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 15;126:1259-68.
- Prins D, Michalak M.** (2011) Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Mar 1;3.
- Raeymaekers L.** (1998) Modelling of some potential effects of luminal Ca²⁺ binding on the kinetics of Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* Apr;23:261-8.
- Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, Checchetto V, Moro S, Szabò I, Rizzuto R.** (2013) The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *EMBO J.* Aug 28;32:2362-76.
- Rehberg M, Lepier A, Solchenberger B, Osten P, Blum R.** (2008) A new non-disruptive strategy to target calcium indicator dyes to the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* Oct;44:386-99.
- Reuter H.** (1979) Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol.*;41:413-24
- Ridgway EB, Ashley CC.** (1967) Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 26;29:229-34.
- Rimessi A, Marchi S, Fotino C, Romagnoli A, Huebner K, Croce CM, Pinton P, Rizzuto R.** (2009) Intramitochondrial calcium regulation by the FHIT gene product sensitizes to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 4;106:12753-8.
- Rios E, Brum G.** (1987) Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature.* Feb 19-25;325:717-20.
- Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M, Pozzan T.** (1994) Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells. *J Cell Biol.* Sep;126:1183-94.
- Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C.** (2012) Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Sep;13:566-78.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T.** (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science.* Jun 12;280:1763-6.
- Rizzuto R, Pozzan T.** (2006) Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* Jan;86:369-408.

- Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T.** (1992) Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*. Jul 23;358(6384):325-7. Erratum in: *Nature* 1992 Dec 24-31;360:768.
- Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P.** (2000) Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca^{2+} oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol*. Jun 12;149:1235-48.
- Rodney GG, Moore CP, Williams BY, Zhang JZ, Krol J, Pedersen SE, Hamilton SL.** (2001) Calcium binding to calmodulin leads to an N-terminal shift in its binding site on the ryanodine Receptor. *J Biol Chem*. Jan 19;276:2069-74.
- Rodriguez P, Bhogal MS, Colyer J.** (2003) Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol Chem*. Oct 3;278:38593-600.
- Rowland AA, Voeltz GK.** (2012) Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oct;13:607-25.
- Roy SS, Hajnóczky G.** (2008) Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods*. Nov;46:213-23
- Santel A, Fuller MT.** (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*. Mar;114:867-74.
- Santo-Domingo J, Vay L, Hernández-Sanmiguel E, Lobatón CD, Moreno A, Montero M, Alvarez J.** (2007) The plasma membrane $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor KB-R7943 is also a potent inhibitor of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter. *Br J Pharmacol*. Jul;151:647-54.
- Sauvanet C, Duvezin-Caubet S, di Rago JP, Rojo M.** (2010) Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin Cell Dev Biol*. Aug;21:558-65.
- Schatzmann HJ.** (1966) ATP-dependent Ca^{++} -extrusion from human red cells. *Experientia*. Jun 15;22:364-5.
- Schneggenburger R, Neher E.** (2000) Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature*. Aug 24;406:889-93.
- Schneggenburger R, Neher E.** (2005) Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr Opin Neurobiol*. Jun;15:266-74.
- Schwab Y, Mouton J, Chasserot-Golaz S, Marty I, Maulet Y, Jover E.** (2001) Calcium-dependent translocation of synaptotagmin to the plasma membrane in the dendrites of developing neurones. *Brain Res Mol Brain Res*. Nov 30;96:1-13.
- Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S.** (2002) 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum*. Dec;1:241-58
- Sedova M, Blatter LA.** (2000) Intracellular sodium modulates mitochondrial calcium signaling in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. Nov 10;275:35402-7.
- Sharma P, Ishiyama N, Nair U, Li W, Dong A, Miyake T, Wilson A, Ryan T, MacLennan DH, Kislinger T, Ikura M, Dhe-Paganon S, Gramolini AO.** (2012) Structural determination of the phosphorylation domain of the ryanodine receptor. *FEBS J*. Oct;279:3952-64.

REFERENCIAS

- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y.** (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol.* Jun;59:223-39.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y.** (1963) Microdetermination of Calcium by Aequorin Luminescence. *Science.* Jun 21;140:1339-40.
- Shimomura O.** (1995) Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 15;211:359-63.
- Simpson PB, Russell JT.** (1998) Mitochondrial Ca²⁺ uptake and release influence metabotropic and ionotropic cytosolic Ca²⁺ responses in rat oligodendrocyte progenitors. *J Physiol.* Apr 15;508:413-26.
- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N.** (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science.* Sep 27;253:1553-7.
- Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ, Russell JT.** (2000) Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr.* Feb;32:35-46.
- Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Blik AM.** (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol.* Oct 19;143:351-8.
- Smith JS, Coronado R, Meissner G.** (1985) Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels. *Nature.* Aug 1-7;316:446-9.
- Smith LR, Meyer G, Lieber RL.** (2013) Systems analysis of biological networks in skeletal muscle function. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* Jan-Feb;5:55-71.
- Sooy K, Schermerhorn T, Noda M, Surana M, Rhoten WB, Meyer M, Fleischer N, Sharp GW, Christakos S.** (1999) Calbindin-D(28k) controls [Ca(2+)](i) and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem.* Nov 26;274:34343-9.
- Sparagna GC, Gunter KK, Sheu SS, Gunter TE.** (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem.* Nov 17;270:27510-5.
- Stathopoulos PB, Li GY, Plevin MJ, Ames JB, Ikura M.** (2006) Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J Biol Chem.* Nov 24;281:35855-62.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE.** (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science.* Nov 26;286:1700-5.
- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE.** (2003) Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem.* Oct 3;278:39014-9.
- Sudhof TC.** (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.*;27:509-47.
- Sun XH, Protasi F, Takahashi M, Takeshima H, Ferguson DG, Franzini-Armstrong C.** (1995) Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. *J Cell Biol.* May;129:659-71.
- Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R.** (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol.* Dec 18;175:901-11.

- Szalai G, Csordás G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnóczky G.** (2000) Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem.* May 19;275:15305-13.
- Takehima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T, et al.** (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature.* Jun 8;339:439-45.
- Tanabe T, Mikami A, Niidome T, Numa S, Adams BA, Beam KG.** (1993) Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle. *Ann N Y Acad Sci.* Dec 20;707:81-6
- Thompson CB.** (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* Mar 10;267:1456-62
- Toyoshima C.** (2009) How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta.* Jun;1793:941-6.
- Trudeau MC, Zagotta WN.** (2002) Mechanism of calcium/calmodulin inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11;99:8424-9.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP.** (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* Oct;11:431-8
- Tsugorka A, Ríos E, Blatter LA.** (1995) Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science.* Sep 22;269:1723-6.
- Vandecaetsbeek I, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P.** (2009a) Factors controlling the activity of the SERCA2a pump in the normal and failing heart. *Biofactors.* Nov-Dec;35:484-99.
- Vandecaetsbeek I, Trekels M, De Maeyer M, Ceulemans H, Lescrinier E, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P.** (2009b) Structural basis for the high Ca²⁺ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca²⁺ pump. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 3;106:18533-8.
- Vangheluwe P, Sepúlveda MR, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J.** (2009) Intracellular Ca²⁺- and Mn²⁺-transport ATPases. *Chem Rev.*
- Vasington FD, Murphy JV.** (1962) Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J Biol Chem.* Aug;237:2670-7.
- Vay L, Hernández-SanMiguel E, Lobatón CD, Moreno A, Montero M, Alvarez J.** (2009) Mitochondrial free [Ca²⁺] levels and the permeability transition. *Cell Calcium.* Mar;45:243-50..
- Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF.** (1997) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep.* Feb;17:43-52.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL.** (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* Jul 7;102:43-53.
- Vial C, Roberts JA, Evans RJ.** (2004) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* Sep;25:487-93.
- Vinogradov A, Scarpa A.** (1973) The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* Aug 10;248:5527-31.

REFERENCIAS

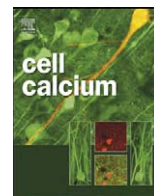
- Völkers M, Rohde D, Goodman C, Most P.** (2010) S100A1: a regulator of striated muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling, sarcomeric, and mitochondrial function. *J Biomed Biotechnol.*;2010:178614.
- Voronina S, Sukhomlin T, Johnson PR, Erdemli G, Petersen OH, Tepikin A.** (2002) Correlation of NADH and Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol.* Feb 15;539:41-52.
- Vyssokikh MY, Brdiczka D.** (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol.*;50:389-404.
- Westermann B.** (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dec;11:872-84.
- Wheeler DG, Barrett CF, Groth RD, Safa P, Tsien RW.** (2008) CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling. *J Cell Biol.* Dec 1;183:849-63.
- Whitaker M.** (2010) Genetically encoded probes for measurement of intracellular calcium. *Methods Cell Biol.*;99:153-82.
- White C, Li C, Yang J, Petrenko NB, Madesh M, Thompson CB, Foskett JK.** (2005) The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol.* Oct;7:1021-8.
- Wingrove DE, Gunter TE.** (1986b) Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria. *J Biol Chem.* Nov 15;261:15159-65.
- Wingrove DE, Gunter TE.** (1986) Kinetics of mitochondrial calcium transport. II. A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium. *J Biol Chem.* Nov 15;261:15166-71.
- Worley PF, Baraban JM, Supattapone S, Wilson VS, Snyder SH.** (1987) Characterization of inositol trisphosphate receptor binding in brain. Regulation by pH and calcium. *J Biol Chem.* Sep 5;262:12132-6.
- Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS.** (2006) Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol.* Sep 11;174:803-13.
- Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SR.** (2006) Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J.* May 15;396:7-16.
- Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Chen SR, Meissner G.** (2005) Calmodulin regulation and identification of calmodulin binding region of type-3 ryanodine receptor calcium release channel. *Biochemistry.* Nov 15;44:15074-81.
- Yang SN, Berggren PO.** (2006) The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev.* Oct;27:621-76
- Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD.** (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature.* Sep 14;443:226-9.

- Yokokura H, Terada O, Naito Y, Hidaka H.** (1997) Isolation and comparison of rat cDNAs encoding Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I isoforms. *Biochim Biophys Acta*. Mar 7;1338:8-12.
- Zaidi M, Shankar VS, Towhidul Alam AS, Moonga BS, Pazianas M, Huang CL.** (1992) Evidence that a ryanodine receptor triggers signal transduction in the osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun*. Nov 16;188:1332-6.
- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ.** (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*. Feb 7;112:293-301.
- Zhu L, Yu Y, Chua BH, Ho YS, Kuo TH.** (2001) Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. Dec;33:2135-44.
- Zoratti M, Szabò I.** (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. Jul 17;1241:139-76.

REFERENCIAS



APPENDIX



Monitoring mitochondrial $[Ca^{2+}]$ dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin

Rosalba I. Fonteriz, Sergio de la Fuente, Alfredo Moreno, Carmen D. Lobatón, Mayte Montero, Javier Alvarez*

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramón y Cajal, 7, E-47005 Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2010

Received in revised form 10 June 2010

Accepted 3 July 2010

Available online 27 July 2010

Keywords:

rhod-2

rhod-FF

Aequorin

Pericam

Mitochondria

Ca^{2+} dynamics

HeLa cells

ABSTRACT

The dynamics of mitochondrial $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_M$) plays a key role in a variety of cellular processes. The most important methods available to monitor $[Ca^{2+}]_M$ are fluorescent dyes such as rhod-2 and specifically targeted proteins such as aequorin and pericam. However, significant discrepancies, both quantitative and qualitative, exist in the literature between the results obtained with different methods. We have made here a systematic comparison of the response of several fluorescent dyes, rhod-2 and rhod-FF, and two Ca^{2+} -sensitive proteins, aequorin and pericam. Our results show that measurements obtained with aequorin and pericam are consistent in terms of dynamic Ca^{2+} changes. Instead, fluorescent dyes failed to follow Ca^{2+} changes adequately, especially during repetitive stimulation. In particular, measures obtained with rhod-2 or rhod-FF evidenced the previously reported Ca^{2+} -dependent inhibition of mitochondrial Ca^{2+} uptake, but data obtained with aequorin or pericam under the same conditions did not. The reason for the loss of response of fluorescent dyes is unclear. Loading with these dyes produced changes in mitochondrial morphology and membrane potential, which were small and reversible at low concentrations (1–2 μ M), but produced large and prolonged damage at higher concentrations. In addition, cells loaded with low concentrations of rhod-2 suffered large changes in mitochondrial morphology after light excitation. Our results suggest that $[Ca^{2+}]_M$ data obtained with these dyes should be taken with care.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The dynamics of $[Ca^{2+}]$ in the mitochondrial matrix has received much attention in the last 20 years because of its importance in a large variety of critical cellular processes, from energy production to apoptosis, going through the regulation of many cytosolic Ca^{2+} -dependent processes [1–5]. Measurements of mitochondrial $[Ca^{2+}]$ have been made using different methods, which can be classified in two categories: fluorescent Ca^{2+} -sensitive dyes such as rhod-2 or similar, and luminescent and fluorescent targeted proteins such as aequorin, pericam and camaleons. Unfortunately, data obtained with each of these approaches are very different, both qualitatively and quantitatively, and the reasons for the discrepancies are still unclear. On the first place, large differences in the maximum free $[Ca^{2+}]$ that can be attained in the mitochondrial matrix have been reported. While studies using fluorescent dyes report maximum $[Ca^{2+}]_M$ values of 2–3 μ M [6–9], data obtained with targeted luminescent and fluorescent proteins indicate that

$[Ca^{2+}]_M$ can reach much higher values, up to tenths or hundreds of micromolar [10–14]. In a recent paper, we discussed this point and provided new evidence in favour of the correctness of the measurements obtained with targeted proteins, particularly aequorin [15].

On the other hand, the discrepancies between the measurements of $[Ca^{2+}]_M$ with dyes or targeted proteins are also qualitative in some cases. This means that the difference is not only a change in scale. Instead, significant changes in the behaviour or kinetics of $[Ca^{2+}]_M$ appear when comparing measurements obtained with both kinds of methods. This kind of comparison has never been made systematically, but some clear discrepancies can be easily found in the literature, particularly regarding the effect of repetitive stimulations. For example, Collins et al. [6] found using rhod-2 to measure $[Ca^{2+}]_M$ that a second application of histamine to HeLa cells produced the same $[Ca^{2+}]$ response in the cytosol, but a much smaller $[Ca^{2+}]_M$ response. However, Filippin et al. [13], using mitochondrially targeted pericam in the same cells, found that both the cytosolic and the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ responses were completely preserved during repetitive stimulation. Similarly, Moreau et al. [16], using permeabilized RBL-1 cells loaded with rhod-2, found that the response to a second stimulation with Ca^{2+} of permeabi-

* Corresponding author. Tel.: +34 983 423085; fax: +34 983 423588.
E-mail address: jalvarez@ibgm.uva.es (J. Alvarez).

lized RBL cells was much smaller than the first one, concluding that Ca^{2+} inactivates the mitochondrial Ca^{2+} uniporter. This finding was consistent with that of Collins et al. (2001) obtained with rhod-2, mentioned above, but not with that of Filippin et al. [13], obtained with pericam. In addition, data obtained with low-affinity targeted aequorin in several types of cells argue against the presence of such inactivation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by Ca^{2+} . In chromaffin cells, repetitive stimulation with high- K^{+} depolarization or caffeine triggered repetitive and similar increases in mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ [10]. Similarly, addition of Ca^{2+} to permeabilized HeLa cells produced a long-lasting increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ with no signs of inactivation [15]. In conclusion, the differential behaviour of fluorescent dyes and targeted proteins when measuring mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ may actually lead to a different description of physiological phenomena and it is therefore necessary to make a more systematic evaluation of the measurements obtained by both methods.

We have made here parallel measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ using rhod-2 and the targeted proteins aequorin and pericam. Our results confirm that aequorin and pericam show qualitatively similar $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ measurements in HeLa cells, but measurements obtained with rhod-2 deviate from the response obtained with the other probes, particularly during repetitive stimulation.

2. Methods

2.1. Cell culture and targeted aequorin expression

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum, 100 i.u. ml^{-1} penicillin and 100 i.u. ml^{-1} streptomycin. The constructs for cytosolic aequorin and for mutated aequorin targeted to mitochondria have been described previously [10,17]. The construct for mitochondrially targeted pericam (2mt8PR, see Ref. [18]) was kindly supplied by Dr. María Cano-Abad, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid. Transfections were carried out using Metafectene (Biontex, Munich, Germany). The construct for mitochondrially targeted EGFP was prepared by inserting the 37 amino acids of the mitochondrial presequence from subunit viii of cytochrome oxidase [19] before the EGFP sequence.

2.2. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ measurements with aequorin

HeLa cells were plated onto 13 mm round coverslips and transfected with the plasmid for either cytosolic aequorin (cytAEQ) or mitochondrially targeted mutated aequorin (mitmutAEQ). For aequorin reconstitution, HeLa cells were incubated for 1–2 h at room temperature in standard medium (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM glucose, and 10 mM HEPES, pH 7.4) with 1 μM of coelenterazine wild type or coelenterazine n, as indicated. After reconstitution, cells were placed in the perfusion chamber of a purpose-built luminometer and perfused with the required solutions. To perform experiments in permeabilized cells, cells were first perfused for 1 min with standard medium containing 0.5 mM EGTA instead of Ca^{2+} , followed by 1 min of intracellular medium (130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM potassium phosphate, 0.5 mM EGTA, 1 mM ATP, 20 μM ADP, 10 mM L-malate, 10 mM glutamate, 10 mM succinate, 20 mM HEPES, pH 7) containing 100 μM digitonin. Then, intracellular medium without digitonin was perfused for 5–10 min, followed by buffers of known $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ prepared in intracellular medium using HEDTA/ Ca^{2+} / Mg^{2+} mixtures. In some experiments, temperature was set at 22 °C in order to reduce aequorin consumption and allow longer measurements at high $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$. Calibration

of the luminescence data into $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ was made using an algorithm as previously described [12,20]. Statistical data are given as mean \pm S.E.M.

2.3. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ measurements with pericam

HeLa cells were plated onto 12 mm round coverslips, transfected with the plasmid for mitochondrially targeted ratiometric pericam (mitRP) and used after 48 h for the experiments. Cells were mounted in a cell chamber in the stage of a Zeiss Axiovert 200 microscope under continuous perfusion. Single cell fluorescence was excited at 415 and 485 nm using a Cairn monochromator (200–300 ms excitation at each wavelength every 2 s, 10 nm bandwidth) and images of the emitted fluorescence obtained with a 60 \times objective were collected using a 505DCXR dichroic mirror and a HQ535/50m emission filter (both from Chroma Technology) and recorded by a Hamamatsu ORCA-ER camera. Single cell fluorescence records were ratioed using the Metafluor program (Universal Imaging). Fig. 1 shows the traces obtained at both wavelengths and the ratio from a typical experiment performed with mitRP. In all the experiments performed, the increase in the ratio was mainly due to the decrease in the fluorescence excited at 415 nm, combined with a small increase at the longer wavelength. These changes are the expected ones for a change in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$, while changes in pH tend to modify the ratio mainly through the increase in the fluorescence obtained at the longer wavelength [13]. It has also been shown before that there is no change in mitochondrial pH during the histamine-induced mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ peak [13]. Experiments were performed at 25 °C using an on-line heater from Harvard Apparatus.

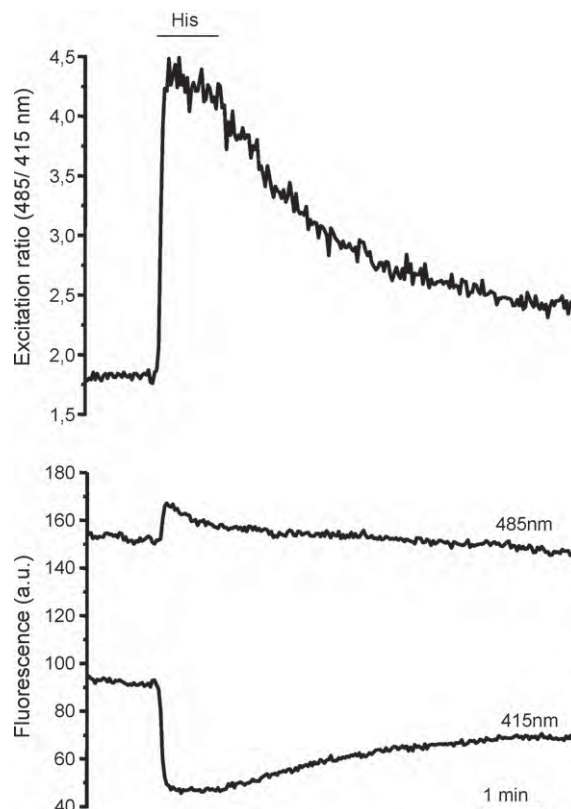


Fig. 1. Monitoring of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ with mitRP. HeLa cells expressing mitRP were stimulated with 100 μM histamine as indicated. The traces show a typical single cell time course of the fluorescence obtained at 415 and 485 nm excitation, as indicated. The higher trace shows the ratio F_{485}/F_{415} nm.

2.4. $[Ca^{2+}]_M$ measurements with rhod-2

HeLa cells were loaded with rhod-2 or rhod-FF by incubation in standard medium containing 1–10 μ M (as indicated) of the acetoxymethyl ester derivative during 30 min at room temperature. Cells were then washed with standard medium for 30 min at room temperature and mounted in the cell chamber of the microscope as above. Single cell fluorescence was excited at 545 nm using a Cairn monochromator (300 ms excitation every 2 s, 10 nm bandwidth) and images of the emitted fluorescence obtained with a 60 \times objective were collected using a 565DCLP dichroic mirror and a E590LPV2 emission filter (both from Chroma Technology) and recorded by a Hamamatsu ORCA-ER camera. Experiments were performed at 37 $^{\circ}$ C using an on-line heater from Harvard Apparatus.

2.5. Confocal studies

Cells were imaged at room temperature on a Leica TCS SP2 confocal spectrophotometer using a 63 \times oil immersion objective. Mitochondrially targeted EGFP (mitEGFP) was excited with the 488 nm line of the argon laser, and the fluorescence emitted between 500 and 600 nm was collected. To monitor mitochondrial membrane potential, cells were loaded with 100 nM TMRE for

30 min at 37 $^{\circ}$ C and then washed 3 times with extracellular medium before the addition of rhod-2AM. Images were taken before and during the rhod-2 loading period using the excitation of the 488 nm line of the Argon laser and measuring the fluorescence emitted between 500 and 700 nm.

2.6. Materials

Wild type coelenterazine, coelenterazine n, TMRE, rhod-2AM and rhod-FF-AM were obtained from Molecular Probes, OR, USA or Biotium Inc., Hayward, CA, USA. Reversan, Ko143 and tempol were from Tocris, Bristol, UK. Other reagents were from Sigma, Madrid or Merck, Darmstadt.

3. Results

We have first addressed the discrepancy among the $[Ca^{2+}]_M$ measurements obtained with rhod-2 and pericam in the second response to histamine of HeLa cells, and we have added new data obtained with low- Ca^{2+} -affinity aequorin. Panel (A) of Fig. 2 shows data obtained with rhod-2 loaded cells, showing that the second response to histamine was clearly decreased with respect to the first one, as previously described by Collins et al. [6]. Panel (B) of Fig. 2 shows instead that using pericam to measure $[Ca^{2+}]_M$, the sec-

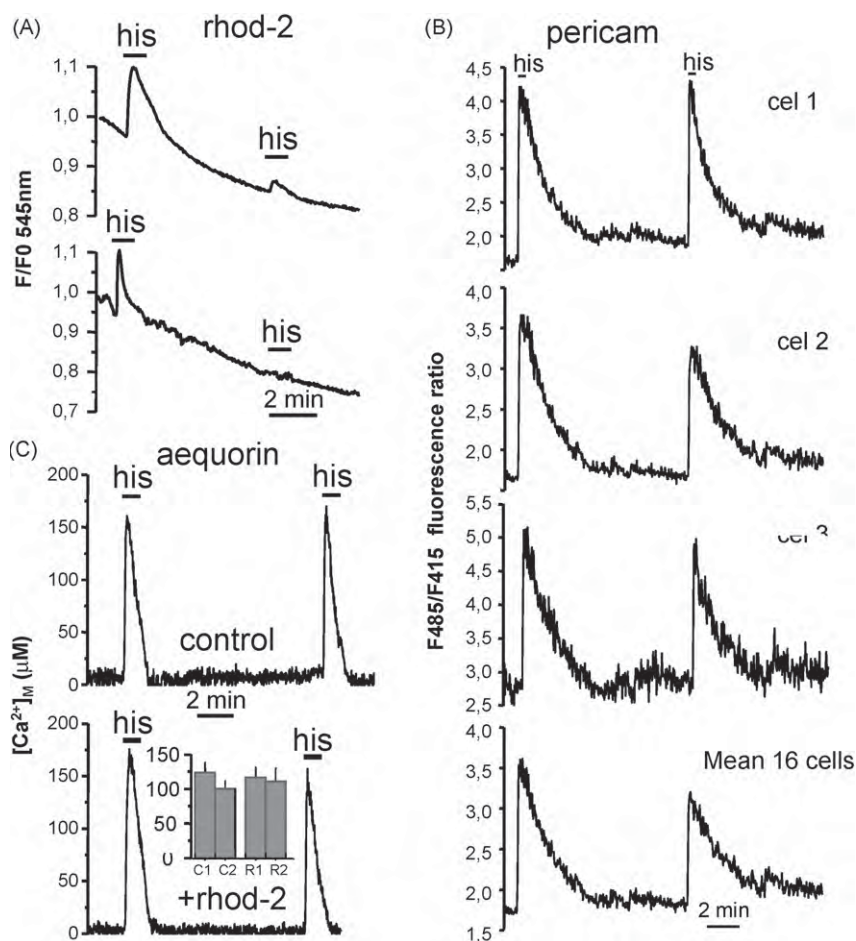


Fig. 2. Effects of two consecutive agonist stimulations on $[Ca^{2+}]_M$ measured with rhod-2, aequorin or pericam. (A) HeLa cells were loaded with 1 μ M rhod-2AM and then stimulated with 100 μ M histamine as indicated. Each trace is the mean of all the cells present in the microscope field (13 and 16) in two different experiments. These traces are representative of the results obtained in 22 similar experiments. (B) HeLa cells expressing mitRP were stimulated with 100 μ M histamine as indicated. The upper traces correspond to measurements obtained in three different single cells. The lower trace is the mean of all the cells present in the microscope field (16 cells). This experiment is representative of 23 similar ones. (C) HeLa cells expressing mitmutAEQ and reconstituted with coelenterazine n were stimulated with 100 μ M histamine as indicated. In the lower trace, cells were loaded with 2 μ M rhod-2AM prior to the experiment. The inset shows statistical data of the mean value of the first and second $[Ca^{2+}]_M$ peak obtained either in control cells (C1 and C2, $n = 11$) or in cells loaded with rhod-2 (R1 and R2, $n = 7$).

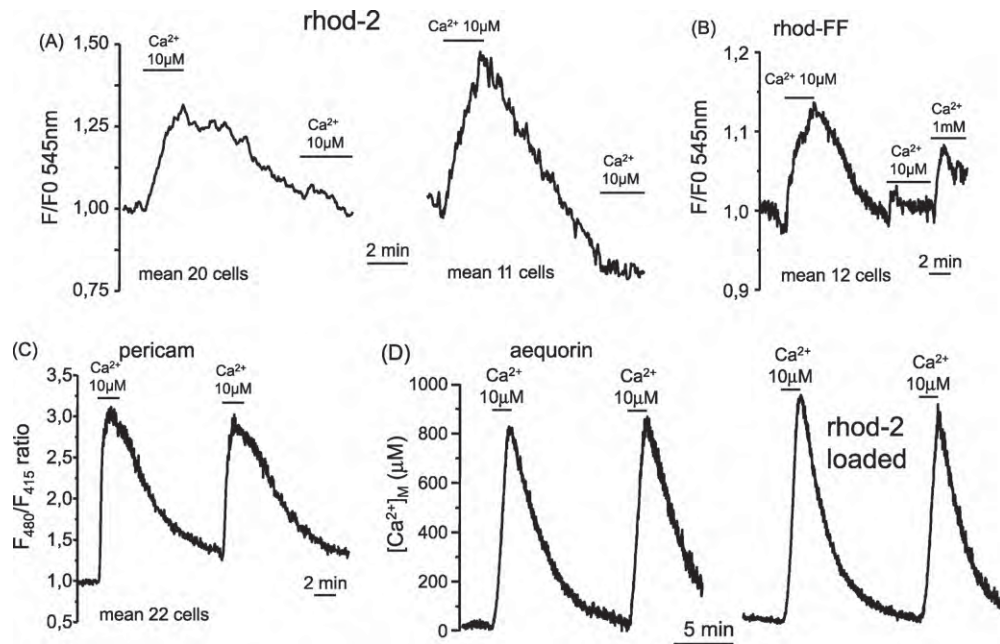


Fig. 3. Effects of two consecutive Ca^{2+} additions in permeabilized cells on $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ measured with rhod-2, rhod-FF, aequorin or pericam. (A) HeLa cells were loaded with $1 \mu\text{M}$ rhod-2-AM and then permeabilized and stimulated twice with a $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer as indicated. As in the rest of the panels of this figure, EGTA-containing intracellular medium was perfused before and in the intervals between Ca^{2+} applications. The trace shown is the mean response of 20 cells present in the microscope field and is representative of 11 similar experiments. (B) HeLa cells were loaded with $2 \mu\text{M}$ rhod-FF-AM and then permeabilized and stimulated twice with a $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer as indicated. The trace shown is the mean response of 12 cells present in the microscope field and is representative of 7 similar experiments. (C) HeLa cells expressing mitRP were permeabilized and stimulated twice with a $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer as indicated. The trace shown is the mean response of 22 cells present in the microscope field and is representative of 10 similar experiments. (D) HeLa cells expressing mitmutAEQ and reconstituted with coelenterazine n were permeabilized and stimulated twice with a $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer as indicated. In the right panel, cells were loaded with $2 \mu\text{M}$ rhod-2-AM prior to the experiment. These experiments are representative of 3 similar ones of each type. Temperature was 22°C .

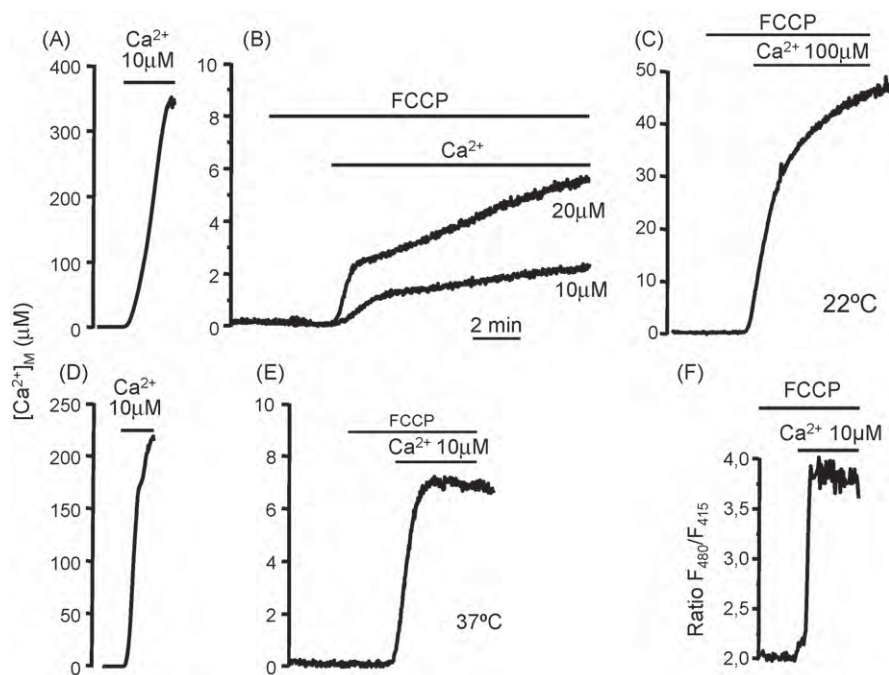


Fig. 4. Effects of Ca^{2+} addition to permeabilized cells after mitochondrial depolarization. HeLa cells expressing mitmutAEQ and reconstituted with coelenterazine were permeabilized and stimulated with 10, 20 or $100 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffers in the presence or in the absence of $2 \mu\text{M}$ FCCP, as indicated. Temperature was 22°C in panels (A, B and C), and 37°C in panels (D and E). The experiments shown are representative of 3–4 similar ones of each type. In panel (F), HeLa cells expressing mitRP were permeabilized and stimulated with a $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer in the presence of $2 \mu\text{M}$ FCCP. The trace shown is the mean response of 15 cells and is representative of 4 similar experiments.

ond peak was very similar to the first one, as previously described by Filippin et al. [13]. Panel (C) of Fig. 2 shows the same experiment performed using low- Ca^{2+} -affinity aequorin. Previous data of double histamine stimulation obtained in HeLa cells have always been obtained with high- Ca^{2+} -affinity aequorin. Under those conditions, the heterogeneity in Ca^{2+} accumulation among different mitochondrial subpopulations induces a rapid consumption of aequorin during the first pulse in about 30% of the mitochondria, those that are apparently coupled to the release sites in the endoplasmic reticulum. Thus, the second pulse produces a much smaller response, but this is mainly due to the consumption of the probe in the high-responding mitochondria during the first pulse [13,21,22]. Now, using low- Ca^{2+} -affinity aequorin, we show that the peak

of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ induced by two consecutive histamine stimulations was identical. For the calculations of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ in these experiments, we have assumed, according to previous data [22], that the relevant mitochondrial space was a 30% of the total. Thus, the traces shown reveal the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ transient only in the mitochondrial population closer to the release sites from the ER. Loading the cells with rhod-2 did not modify the response measured with aequorin. Therefore, measurements with low- Ca^{2+} -affinity aequorin confirm the kinetics of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ changes data obtained with pericam.

Fig. 3 shows the effect on $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ of repetitive addition of a Ca^{2+} buffer to permeabilized HeLa cells. In accordance with the data of Moreau et al. (2006), obtained in permeabilized RBL cells, addi-

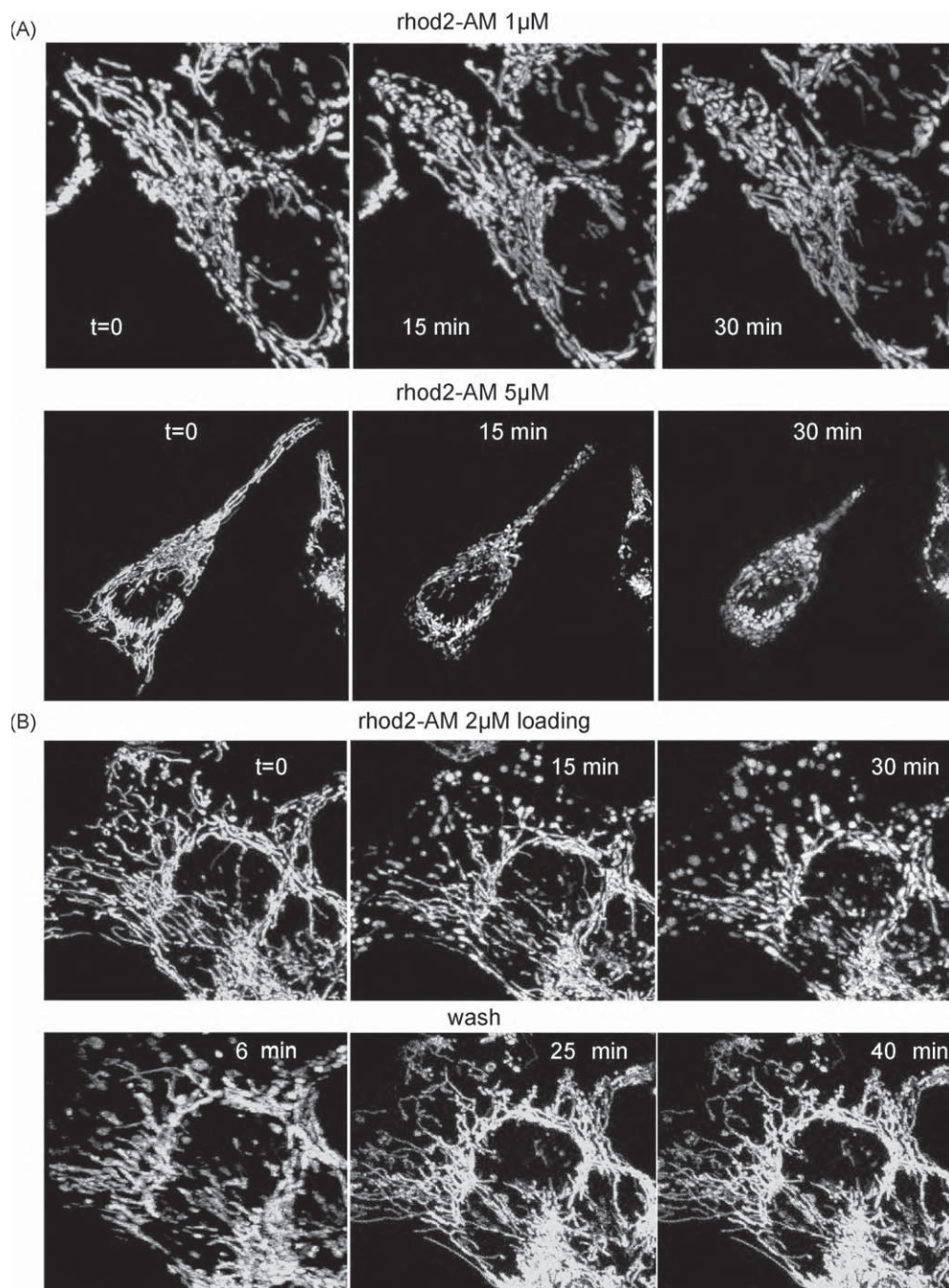


Fig. 5. Changes in mitochondrial morphology induced by rhod-2 loading. HeLa cells expressing mitEGFP were imaged with a confocal microscope before and at different times during rhod-2 loading. In panel (A), the effects of loading with 1 or 5 μM rhod-2AM are shown. In panel (B), cells were loaded with 2 μM rhod-2AM for 30 min and then the dye was washed and further images were taken 6, 25 and 40 min after that. The experiments shown are representative of 7–17 similar experiments of each type.

tion of two consecutive pulses of 10 μM Ca²⁺ triggered also here very different responses when measured with rhod-2, the second being much smaller than the first one. Panel (A) shows two representative experiments. The same results were found when the lower Ca²⁺-affinity rhod-FF was used instead of rhod-2 (panel B). However, when the same experiment was repeated under the same conditions in cells expressing either pericam (panel C) or aequorin (panel D) in their mitochondria, the results were very different. Both targeted proteins reported in fact nearly identical mitochondrial [Ca²⁺] peaks induced by the first and the second [Ca²⁺] pulse. In addition, loading the cells with rhod-2 did not modify the response obtained in the experiments performed with aequorin, showing that the discrepancies are not due to the presence of rhod-2 modifying the Ca²⁺-response, but to an apparent loss of Ca²⁺-sensitivity of rhod-2 along the experiment. To investigate this point further, we have studied the effect of the superoxide scavenger tempol, and of the multidrug transporters inhibitors reversan and Ko143, in experiments of double stimulation with a 10 μM [Ca²⁺] buffer similar to those of Fig. 3, panel (A). The results obtained for the relative height of the second [Ca²⁺] peak with respect to the first one (in mean ± S.E. of the percentage) were the following: control, 7.4 ± 0.6% (n = 40 cells analyzed); reversan, 13 ± 0.5% (n = 37 cells analyzed); Ko143, 10.4 ± 1.2% (n = 27 cells analyzed); tempol, 14.5 ± 1.6% (n = 27 cells analyzed). Therefore, neither reactive oxygen species nor rhod-2 extrusion through multidrug transporters appear to be involved in the lack of response of rhod-2.

The data shown in the above figures point to the presence of problems of rhod-2 to adequately monitor the [Ca²⁺]_M dynamics under some circumstances, particularly during repetitive stimulation. However, the lack of Ca²⁺-sensitivity of rhod-2 may sometimes

appear even in the absence of previous stimulation. Moreau et al. (2006) reported that the protonophore FCCP completely abolishes the increase of mitochondrial [Ca²⁺] induced by 10–100 μM [Ca²⁺] pulses in permeabilized cells. Given the high-Ca²⁺-affinity of rhod-2 (K_d inside mitochondria of 1.3 μM, see Ref. [6]), we found surprising that no Ca²⁺ increase could be detected in mitochondria under these conditions, as simple equilibration of cytosolic and mitochondrial [Ca²⁺] by any pathway would rapidly lead to complete saturation of rhod-2. Fig. 4 shows measurements performed with aequorin indicating that Ca²⁺ enters in fact in mitochondria under these conditions, though slowly, and approaches equilibration with the [Ca²⁺] in the buffer, as could be expected. Panels (A and D) in the figure show that addition of a 10 μM Ca²⁺ buffer to permeabilized cells produces a very fast Ca²⁺ uptake into mitochondria both at 22 °C (panel A) or 37 °C (panel D), reaching [Ca²⁺] of hundreds of micromolar in few seconds. Instead, in the presence of a protonophore, the rate of [Ca²⁺]_M increase was much lower, particularly at 22 °C (see panels (B and C) for the effect of 10, 20 and 100 μM Ca²⁺ at 22 °C and panel (E) for the effect of 10 μM Ca²⁺ at 37 °C), and approached equilibration with the [Ca²⁺] in the buffer. That increase, however, should be enough to saturate mitochondrial rhod-2 with Ca²⁺. Similarly, panel (F) shows that measurements in HeLa cells loaded with pericam and perfused with a 10 μM Ca²⁺ buffer also show an increase in mitochondrial [Ca²⁺] in the presence of FCCP. However, in accordance with the data of Moreau et al. (2006) measurements performed with rhod-2 showed no increase at all in fluorescence under these conditions, even after perfusion of 100 μM Ca²⁺ (data not shown).

To investigate the origin of the discrepancies shown above, we have next studied if loading with rhod-2 produced changes in the

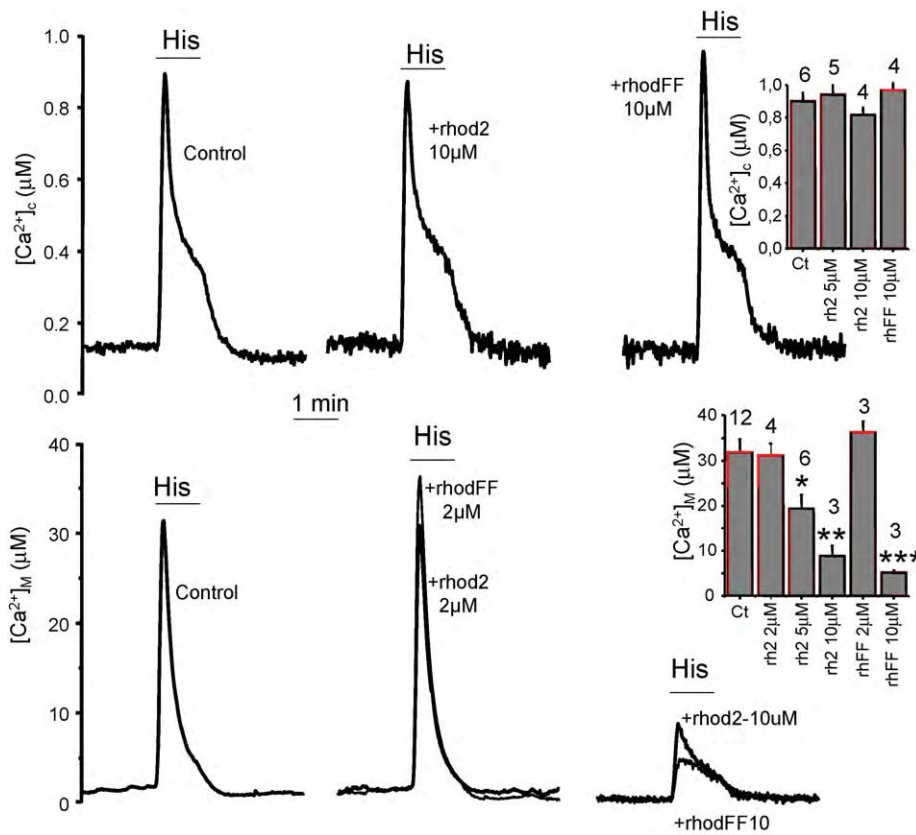


Fig. 6. Effect of loading with rhod-2 or rhod-FF on agonist-induced cytosolic and mitochondrial [Ca²⁺] peaks. In the upper panel, HeLa cells expressing cytAEQ were reconstituted with coelenterazine, loaded with different concentrations of rhod-2-AM or rhod-FF-AM and then stimulated with 100 μM histamine to measure the cytosolic [Ca²⁺] peak. In the lower panel, HeLa cells expressing mitmutAEQ were reconstituted with coelenterazine, loaded with different concentrations of rhod-2-AM or rhod-FF-AM and then stimulated with 100 μM histamine to measure the mitochondrial [Ca²⁺] peak. The insets on the right show statistical data (mean ± S.E.M.) of several similar experiments of each type (number of experiments indicated over each bar). Significance was obtained by the ANOVA test (**p* < 0.05; ***p* < 0.005; ****p* < 0.0005).

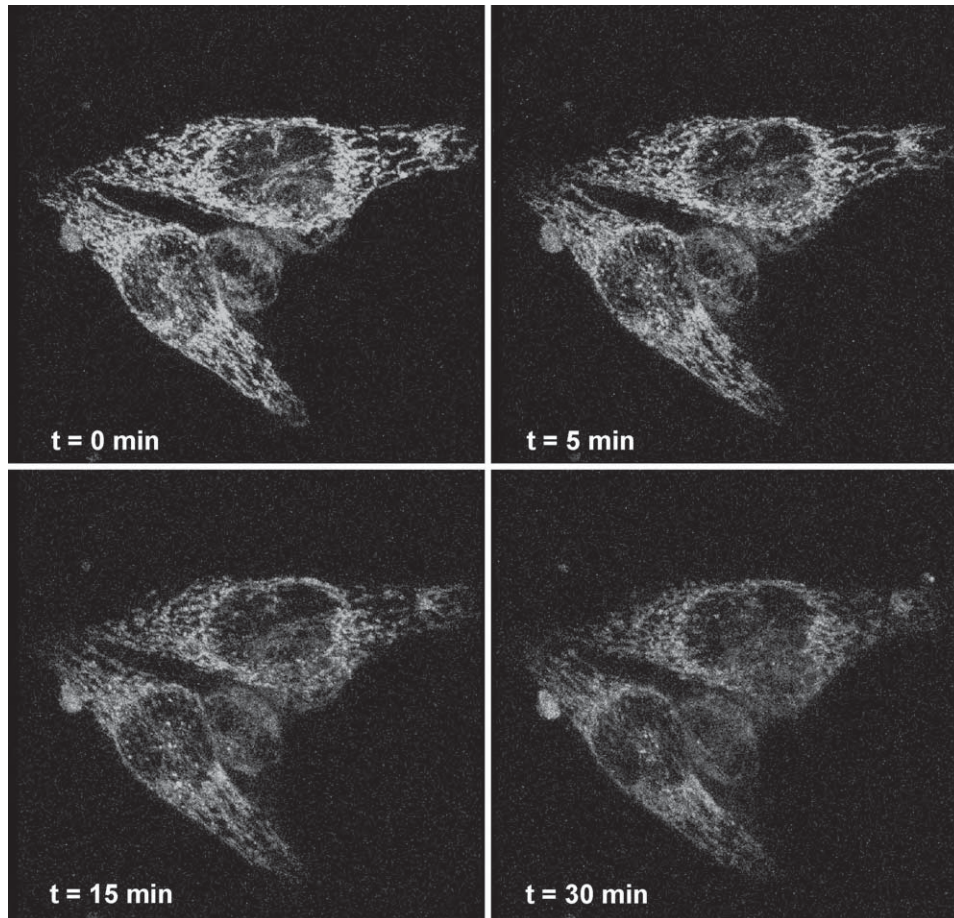


Fig. 7. Effect of rhod-2 loading on mitochondrial membrane potential measured with TMRE. HeLa cells were loaded with 100 nM TMRE and imaged in a confocal microscope. Then, 5 μ M rhod-2AM was added and images were taken 5, 15 and 30 min after that. Mean fluorescence intensity was 78, 58 and 47% of the initial one after 5, 15 and 30 min of rhod-2 loading, respectively. This experiment is representative of 10 similar ones.

mitochondrial morphology or in the responses of cytosolic or mitochondrial $[Ca^{2+}]$ to stimuli. To study the mitochondrial morphology, HeLa cells expressing EGFP targeted to the mitochondria were used. Confocal images were taken before rhod-2 loading and then the dye was added at several concentrations (1–5 μ M) and the EGFP fluorescence was followed on-line during the 30 min loading period and in some cases also during the subsequent dye washing period. Fig. 5 shows that addition of rhod-2AM was followed by a progressive and concentration-dependent fission of mitochondria, with rupture of the characteristic long mitochondrial tubules to generate round small mitochondria. This phenomenon was slow and limited at 1 μ M rhod-2AM, much more evident at 2 μ M and very fast and nearly complete at 5 μ M rhod-2AM (Fig. 5A). In addition, it was partially reversible after dye washing, particularly at low concentrations, as shown in Fig. 5B. Similar results were obtained using rhod-FF (data not shown).

Therefore, rhod-2AM loading clearly affected mitochondrial morphology, particularly at concentrations above 1 μ M. This effect was accompanied by a decrease in the stimulus-induced mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peaks if the rhod-2AM concentrations were above 2 μ M. Fig. 6 shows that loading with rhod-2AM or its low- Ca^{2+} -affinity derivative rhod-FF-AM up to 10 μ M produced no change in the cytosolic $[Ca^{2+}]$ peak induced by histamine. Loading the cells with rhod-2AM or rhod-FF-AM 2 μ M did not change either the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peak induced by histamine. However, when cells were loaded with higher rhod-2AM or rhod-FF-AM concentrations (5–10 μ M), a clear decrease in the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peak induced by histamine was observed. The reason for these effects

of high rhod concentrations could rely in the increased buffering capacity. However, the effects of high rhod concentrations on mitochondrial morphology reported above suggest that the decrease in the Ca^{2+} uptake rate they induce may also be due to mitochondrial damage. In fact, loading with 5 μ M rhod-2AM induced a significant decrease in mitochondrial membrane potential. Fig. 7 shows that loading with 5 μ M rhod-2AM induced a large decrease in TMRE fluorescence measured by confocal microscopy during the 30 min loading period. In the absence of rhod-2AM, no significant changes in fluorescence were observed in similar periods (data not shown).

We have finally investigated if these effects of rhod-2 could be due to changes in the rhod-2 molecule induced by light excitation. We have used the epifluorescence illumination of the confocal microscope to give a brief (1 min) continuous illumination (through a BP 515–560 filter) to HeLa cells expressing mitEGFP and loaded or not with 1 μ M rhod-2AM. We have obtained confocal images of the cells just before and at several times after the illumination, and we have observed that the cells loaded with rhod-2 (but not the controls) underwent a complete granulation of their mitochondria few minutes after illumination. Fig. 8 shows confocal images taken before and 1 or 5 min after the illumination. While no changes were observed in the control cells, those loaded with rhod-2 underwent a progressive mitochondrial granulation which was still not apparent 1 min after illumination but was nearly complete 5 min later. No further changes in morphology were observed during the following 20 min (data not shown). In conclusion, illumination of rhod-2 loaded cells induces important changes in mitochondrial morphol-

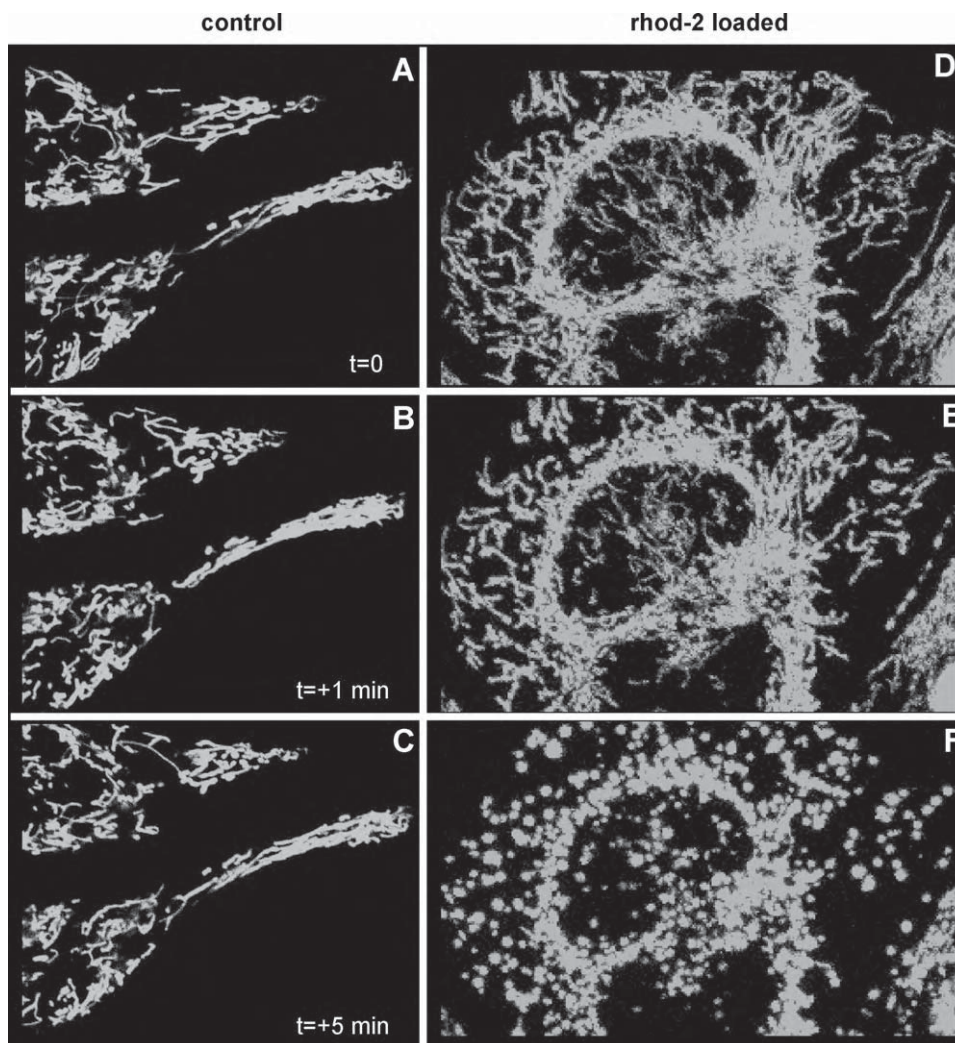


Fig. 8. Effect of illumination and rhod-2 loading on mitochondrial morphology. HeLa cells expressing mitEGFP and loaded or not with 1 μM rhod-2AM were imaged with a confocal microscope. After taking an initial image (panel A, control; panel D, rhod-2 loaded), cells were epi-illuminated for 1 min through a bandpass 515–560 nm filter. Then, two additional images were taken 1 min (panel B, control; panel E, rhod-2 loaded) and 5 min (panel C, control; panel F, rhod-2 loaded) after the end of the illumination period. The images shown are representative of the results obtained in 6 experiments with control cells and 10 experiments with rhod-2 loaded cells.

ogy which may be responsible of the differential behaviour of this probe with respect to aequorin or pericam.

4. Discussion

We have made here a comparison of the ability to monitor the mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ of several fluorescent dyes, including rhod-2, rhod-FF, one fluorescent targeted protein, pericam, and one luminescent targeted protein, aequorin. As mentioned above, large discrepancies have been reported among the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ values measured with rhod-2 or other high- Ca^{2+} -affinity dyes such as furaFF and fura6F [6–9], always below 2–3 μM , and the much higher values measured by low- Ca^{2+} -affinity targeted proteins, either aequorin, pericam or cameleons [10–14]. In part, the discrepancies may be explained by the different Ca^{2+} affinities of the probes, which should lead to much faster saturation with Ca^{2+} of the high-affinity ones. In particular, rhod-2 has been shown to have an “in situ” mitochondrial K_{d} of 1.3 μM [6], while the “in situ” mitochondrial K_{d} of pericam is nearly 10-fold larger, 11 μM [13], and low- Ca^{2+} -affinity aequorin is able to measure $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ reliably up to the millimolar range [15]. However, we show now that the discrepancies are also of a qualitative nature in some cases and reveal

that under some circumstances, rhod-2 may undergo an apparent loss of Ca^{2+} -sensitivity.

Our data are consistent with previous data of other authors using rhod-2 to measure mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$, which showed that either a second stimulation with an agonist in intact HeLa cells or a second perfusion of a Ca^{2+} buffer in permeabilized cells produced always a much smaller increase in mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ than the first one [6,16]. We have also reproduced data obtained with pericam indicating that two consecutive stimulations of HeLa cells with an agonist produce similar $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ peaks [13], and we have confirmed them by obtaining the same results with low- Ca^{2+} -affinity aequorin. In addition, we have shown that both pericam and aequorin measure identical increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ during repetitive perfusions of Ca^{2+} buffers in permeabilized cells. The reason for the discrepancies does not rely in the Ca^{2+} -buffering capacity of rhod-2, as loading with this dye at the usual concentrations (1–2 μM) did not modify mitochondrial Ca^{2+} dynamics measured with aequorin. When the concentration of rhod-2AM or rhod-FF-AM was increased during loading to 5 or 10 μM , the mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ peaks measured with aequorin were in fact decreased. However, although this effect could in part be attributed to the increased buffering in the presence of the chelator, it could also be due to other reasons,

as these concentrations induced important changes in the mitochondrial morphology and a decrease in mitochondrial membrane potential.

It was also very surprising to find that rhod-2 was unable to detect the increase in $[Ca^{2+}]_M$ that occurs when 10–100 μM Ca^{2+} buffers are perfused in the presence of protonophores [16], an experimental condition which leads to equilibration of $[Ca^{2+}]_M$ with the $[Ca^{2+}]$ present in the buffer, as it was easily detected by both aequorin and pericam. In this case the dye is actually missing the first increase in $[Ca^{2+}]_M$. The reason for this differential behaviour of rhod-2 and the other measuring methods is obscure. We have studied the effect of rhod-2 loading on mitochondrial architecture and on the $[Ca^{2+}]_M$ peaks induced by an agonist and we have found that concentrations of 5 μM or more of rhod-2AM during loading produced a large impact on mitochondrial morphology, rupturing the mitochondrial tubules into small vesicles and decreasing the size of the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peaks. Concentrations of 1–2 μM , the ones used by us and many other authors, produced no effect on the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peaks measured with aequorin and smaller and reversible effects on mitochondrial structure. However, large changes in mitochondrial morphology were observed when cells loaded with low rhod-2AM concentrations were subjected to a brief period of illumination. Therefore, rhod-2 appears to be very sensitive to light excitation, generating products which lead to mitochondrial vesiculation.

In summary, our results show that some Ca^{2+} -sensitive dyes widely used to measure mitochondrial $[Ca^{2+}]$, such as rhod-2 and rhod-FF, have a response to dynamic $[Ca^{2+}]$ changes in mitochondria which is qualitatively different to that of aequorin or pericam, at least in HeLa cells. The reason for this behaviour is unclear. It is not due to the effect of loading nor to the increased buffering, at least at the usual concentrations used for loading (1–2 μM), but appears rather to be due to the generation of rhod-2 derivatives during light excitation, which are able to disorganize mitochondrial structure. Therefore, results obtained with these dyes should be taken with care and confirmed with other methods. In particular, we have been unable to detect in HeLa cells any Ca^{2+} -inhibition of mitochondrial Ca^{2+} uptake when using either aequorin or pericam to monitor $[Ca^{2+}]_M$, although experiments performed with rhod-2 confirmed the results reported by Moreau et al. (2006). Our results here are consistent with previous data showing that continuous perfusion of Ca^{2+} buffers in permeabilized HeLa cells produces a prolonged increase in $[Ca^{2+}]_M$ with no signs of inactivation [15], and they are also consistent with data in intact HeLa cells and chromaffin cells showing that consecutive stimulations produce $[Ca^{2+}]_M$ peaks of similar magnitude [10,13].

Conflict of interest statement

Authors have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2008-01871) and from Junta de Castilla y León (VA103A08 and GR105). Sergio de la Fuente holds an FPI (Formación

de Personal Investigador) fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. We thank Pilar Alvarez and Laura González for excellent technical assistance.

References

- [1] G. Szabadkai, M.R. Duchon, Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling, *Physiology* 23 (2008) 84–94.
- [2] R. Rizzuto, S. Marchi, M. Bonora, P. Aguiari, A. Bononi, D. De Stefani, C. Giorgi, S. Leo, A. Rimessi, R. Siviero, E. Zecchini, P. Pinton, Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: when, how and why, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 1342–1351.
- [3] T. Pozzan, R. Rudolf, Measurements of mitochondrial calcium in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 1317–1323.
- [4] T.E. Gunter, S.S. Sheu, Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca^{2+} transport mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 1291–1308.
- [5] C. Walsh, S. Barrow, S. Voronina, M. Chvanov, O.H. Petersen, A. Tepikin, Modulation of calcium signalling by mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 1374–1382.
- [6] T.J. Collins, P. Lipp, M.J. Berridge, M.D. Bootman, Mitochondrial Ca^{2+} uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca^{2+} signals, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 26411–26420.
- [7] T. Kristián, T.M. Weatherby, T.E. Bates, G. Fiskum, Heterogeneity of the calcium-induced permeability transition in isolated non-synaptic brain mitochondria, *J. Neurochem.* 83 (2002) 1297–1308.
- [8] S. Chalmers, D.G. Nicholls, The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 19062–19070.
- [9] D.G. Nicholls, Mitochondria and calcium signalling, *Cell Calcium* 38 (2005) 311–317.
- [10] M. Montero, M.T. Alonso, E. Carnicero, I. Cuchillo-Ibañez, A. Albillos, A.G. Garcia, J. Garcia-Sancho, J. Alvarez, Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 57–61.
- [11] S. Arnaudeau, W.L. Kelley, J.V. Walsh Jr, N. Demaurex, Mitochondria recycle Ca^{2+} to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 29430–29439.
- [12] M. Montero, C.D. Lobatón, A. Moreno, J. Alvarez, A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190, *FASEB J.* 16 (2002) 1955–1957.
- [13] L. Filippin, P.J. Magalhães, G. Di Benedetto, M. Colella, T. Pozzan, Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39224–39234.
- [14] P. Pinton, S. Leo, M.R. Wieckowski, G. Di Benedetto, R. Rizzuto, Long-term modulation of mitochondrial Ca^{2+} signals by protein kinase C isozymes, *J. Cell Biol.* 165 (2004) 223–232.
- [15] L. Vay, E. Hernández-SanMiguel, C.D. Lobatón, A. Moreno, M. Montero, J. Alvarez, Mitochondrial free $[Ca^{2+}]$ levels and the permeability transition, *Cell Calcium* 45 (2009) 243–250.
- [16] B. Moreau, C. Nelson, A.B. Parekh, Biphasic regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake by cytosolic Ca^{2+} concentration, *Curr. Biol.* 16 (2006) 1672–1677.
- [17] M. Brini, R. Marsault, C. Bastianutto, J. Alvarez, T. Pozzan, R. Rizzuto, Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_c$). A critical evaluation, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 9896–9903.
- [18] L. Filippin, M.C. Abad, S. Gastaldello, P.J. Magalhães, D. Sandonà, T. Pozzan, Improved strategies for the delivery of GFP-based Ca^{2+} sensors into the mitochondrial matrix, *Cell Calcium* 37 (2005) 129–136.
- [19] R. Rizzuto, A.W. Simpson, M. Brini, T. Pozzan, Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin, *Nature* 358 (1992) 325–327.
- [20] M.J. Barrero, M. Montero, J. Alvarez, Dynamics of $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27694–27699.
- [21] R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, T. Pozzan, Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses, *Science* 280 (1998) 1763–1766.
- [22] R. Rizzuto, C. Bastianutto, M. Brini, M. Murgia, T. Pozzan, Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells, *J. Cell Biol.* 126 (1994) 1183–1194.



The dynamics of mitochondrial Ca²⁺ fluxes

Sergio de la Fuente, Pablo Montenegro, Rosalba I. Fonteriz, Alfredo Moreno, Carmen D. Lobatón, Mayte Montero, Javier Alvarez*

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramón y Cajal, 7, E-47005 Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2010
Received in revised form 10 June 2010
Accepted 17 June 2010
Available online 25 June 2010

Keywords:

Ca²⁺ fluxes
Ca²⁺ dynamics
Ca²⁺ buffering
Mitochondria
Aequorin

ABSTRACT

We have investigated the kinetics of mitochondrial Ca²⁺ influx and efflux and their dependence on cytosolic [Ca²⁺] and [Na⁺] using low-Ca²⁺-affinity aequorin. The rate of Ca²⁺ release from mitochondria increased linearly with mitochondrial [Ca²⁺] ([Ca²⁺]_M). Na⁺-dependent Ca²⁺ release was predominant at low [Ca²⁺]_M but saturated at [Ca²⁺]_M around 400 μM, while Na⁺-independent Ca²⁺ release was very slow at [Ca²⁺]_M below 200 μM, and then increased at higher [Ca²⁺]_M, perhaps through the opening of a new pathway. Half-maximal activation of Na⁺-dependent Ca²⁺ release occurred at 5–10 mM [Na⁺], within the physiological range of cytosolic [Na⁺]. Ca²⁺ entry rates were comparable in size to Ca²⁺ exit rates at cytosolic [Ca²⁺] ([Ca²⁺]_c) below 7 μM, but the rate of uptake was dramatically accelerated at higher [Ca²⁺]_c. As a consequence, the presence of [Na⁺] considerably reduced the rate of [Ca²⁺]_M increase at [Ca²⁺]_c below 7 μM, but its effect was hardly appreciable at 10 μM [Ca²⁺]_c. Exit rates were more dependent on the temperature than uptake rates, thus making the [Ca²⁺]_M transients to be much more prolonged at lower temperature. Our kinetic data suggest that mitochondria have little high affinity Ca²⁺ buffering, and comparison of our results with data on total mitochondrial Ca²⁺ fluxes indicate that the mitochondrial Ca²⁺ bound/Ca²⁺ free ratio is around 10- to 100-fold for most of the observed [Ca²⁺]_M range and suggest that massive phosphate precipitation can only occur when [Ca²⁺]_M reaches the millimolar range.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondrial Ca²⁺ fluxes play a very important role in cell physiology. The large negative potential of the mitochondrial matrix provides an enormous driving force for Ca²⁺ entry through the inner mitochondrial membrane. However, [Ca²⁺]_M is low under resting conditions because of the very low Ca²⁺ permeability of the inner mitochondrial membrane and the operation of systems able to extrude Ca²⁺ from mitochondria in exchange by Na⁺ or H⁺. During cell activation, the increase in [Ca²⁺]_c triggers the opening of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter, a Ca²⁺ channel of the inner mitochondrial membrane, and large amounts of Ca²⁺ flow through this channel into the mitochondrial matrix. Opening of the uniporter is thus triggered by cytosolic Ca²⁺, but its activation requires relatively high [Ca²⁺]_c, with K_d values for the activation in the range 20–50 μM [1–9].

During physiological cell activation, [Ca²⁺]_c never usually rises above 1–2 μM, except for some small regions close to the Ca²⁺ channels. Nevertheless, because the maximum Ca²⁺ flux through the uniporter is very big, even a small degree of opening of the uniporter is able to induce a significant Ca²⁺ entry into mitochondria. This situation of submaximal

activation of the uniporter is the most frequent under physiological conditions, and balance between influx and efflux pathways should then be critical to determine the final [Ca²⁺]_M. However, there is little direct information on the kinetics of mitochondrial Ca²⁺ fluxes obtained by looking directly at [Ca²⁺]_M. We have investigated here in detail the behaviour of mitochondrial Ca²⁺ fluxes under different conditions of extramitochondrial [Ca²⁺], [Na⁺] and temperature to obtain a clearer picture of mitochondrial [Ca²⁺] homeostasis.

2. Methods

2.1. Cell culture and targeted aequorin expression

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum, 100 i.u.ml⁻¹ penicillin and 100 i.u.ml⁻¹ streptomycin. The construct for mutated aequorin targeted to mitochondria (mitmutAEQ) has been described previously [4]. Transfections were carried out using Metafectene (Biontex, Munich, Germany).

2.2. [Ca²⁺]_M measurements with aequorin

HeLa cells were plated onto 13 mm round coverslips and transfected with the plasmid for mitochondrially targeted mutated

Abbreviations: [Ca²⁺]_c, cytosolic [Ca²⁺]; [Ca²⁺]_M, mitochondrial [Ca²⁺]; mitmutAEQ, mutated aequorin targeted to mitochondria

* Corresponding author. Tel.: +34 983 423085; fax: +34 983 423588.

E-mail address: jalvarez@ibgm.uva.es (J. Alvarez).

aequorin. For aequorin reconstitution, HeLa cells were incubated for 1–2 h at room temperature in standard medium (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, and 10 mM HEPES, pH 7.4) with 1 μM of coelenterazine n. After reconstitution, cells were placed in the perfusion chamber of a purpose-built luminometer. Then, standard medium containing 0.5 mM EGTA instead of Ca²⁺ was perfused for 1 min, followed by 1 min of intracellular medium (130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM potassium phosphate, 0.5 mM EGTA, 1 mM ATP, 20 μM ADP, 10 mM L-malate, 10 mM glutamate, 10 mM succinate, 20 mM Hepes, pH 7) containing 100 μM digitonin. Then, intracellular medium without digitonin was perfused for 5–10 min, followed by buffers of known [Ca²⁺] prepared in intracellular medium using HEDTA/Ca²⁺/Mg²⁺ mixtures. To obtain intracellular mediums with different [Na⁺], the concentration of Na⁺ in the medium was equimolarly replaced by K⁺. Temperature was set either at 22 °C or at 37 °C.

Calibration of the luminescence data into [Ca²⁺] was made using an algorithm as previously described [10,11]. Calibration of mutated aequorin reconstituted with coelenterazine n has been previously made at pH 7 under three different conditions: *in vitro* [12], inside the endoplasmic reticulum [10,12] and inside mitochondria [13]. The relationship between relative luminescence and [Ca²⁺] was the same in all the cases, indicating that the response of aequorin to Ca²⁺ was not altered inside any of these organelles. However, given that the resting pH inside mitochondria in HeLa cells is known to be close to 8 [14,15], the values obtained with the pH 7 calibration require a 20% downwards correction, as we have recently described [13]. [Ca²⁺] values in this paper have therefore been obtained using the original pH 7 calibration and applying then this small correction.

2.3. Measurement of total calcium uptake by HeLa cell mitochondria

Isolation of mitochondria from HeLa cell was carried out using the Mitochondria Isolation kit from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Mitochondria were treated with 1 μM thapsigargin to block SERCA pumps and they were finally suspended in intracellular medium containing 5 μM EGTA and assayed for protein concentration using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The yield in terms of mitochondrial protein was approximately 1 mg/10⁸ cells. To measure calcium uptake, 0.1 mg of mitochondrial protein were suspended in 1 ml of intracellular medium containing 5 μM EGTA and 0.3 μM Calcium Green-5 N (Molecular Probes) and incubated at 37 °C under magnetic stirring in the cuvette holder of an Aminco-Bowman series 2 fluorescence spectrophotometer. Fluorescence excited at 506 nm and emitted at 532 nm was monitored and then 20 nmol of calcium was added to start mitochondrial Ca²⁺ uptake. Taking into account the 5 μM EGTA present in the medium, the [Ca²⁺] obtained after calcium addition was 15 μM. The rate of mitochondrial calcium uptake was calculated from the rate of decrease in the extramitochondrial [Ca²⁺] after calcium addition.

3. Results

3.1. Kinetics and Na⁺ dependence of Ca²⁺-release from mitochondria

We have first studied the kinetics of Ca²⁺ release from mitochondria. We have loaded mitochondria with Ca²⁺ by making a short perfusion with a Ca²⁺-containing intracellular medium. After that, Ca²⁺-free medium was perfused to initiate Ca²⁺ release. Panel A of Fig. 1 shows that perfusion of the EGTA-containing medium triggered a very fast Ca²⁺-release, at a rate similar to that seen during the Ca²⁺ entry period in the presence of 7 μM [Ca²⁺]. The right trace in this panel shows the Ca²⁺ release obtained when the EGTA-containing medium was devoid of Na⁺. It can be appreciated that blocking Ca²⁺-release through the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger produced a

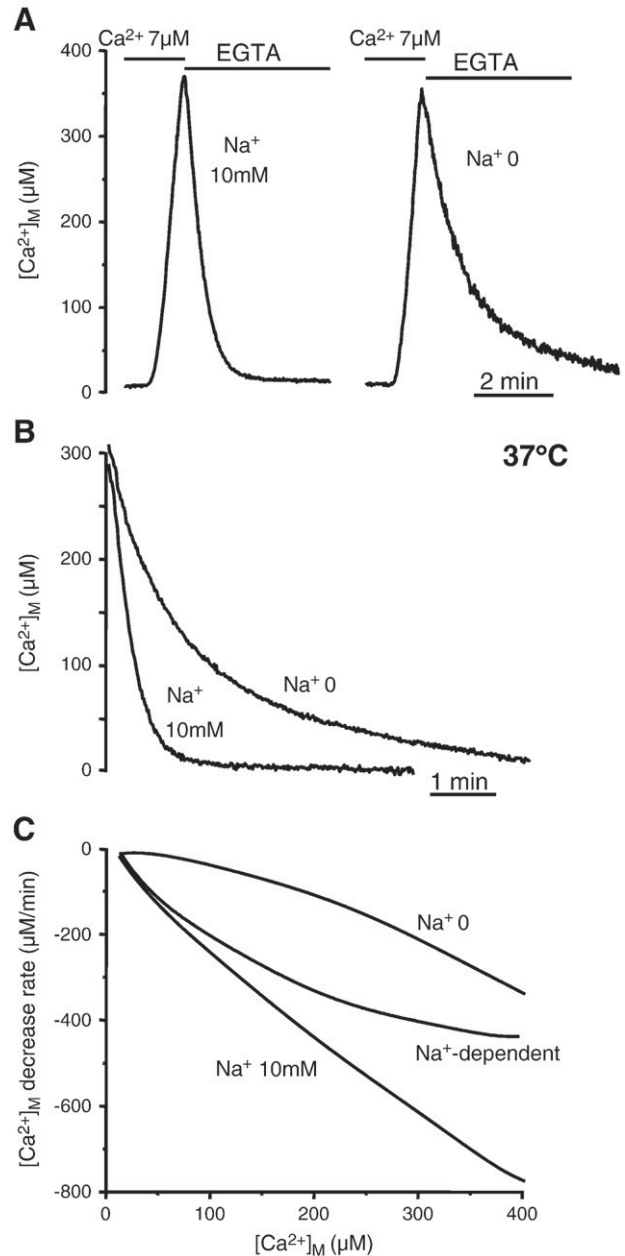


Fig. 1. Kinetics of mitochondrial Ca²⁺ release at 37 °C. HeLa cells expressing mitmutAEQ and reconstituted with coelenterazine n were permeabilized and stimulated briefly with a 7 μM [Ca²⁺] buffer, as indicated in the panel A. Then, an EGTA-containing intracellular medium was perfused to monitor Ca²⁺ release from mitochondria, both in the presence and in the absence of 10 mM [Na⁺]. Panel B shows a superimposition of the release curves in the presence and in the absence of 10 mM [Na⁺] obtained as the mean of 6 different experiments of each kind. Panel C shows the dependence of the rate of Ca²⁺ release on the mitochondrial [Ca²⁺]. The mean data of panel B were polynomial fitted and the first derivative of these curves was plotted against the [Ca²⁺]_M. The curve labelled Na⁺-dependent was obtained by subtracting the Na⁺ 0 curve from the Na⁺ 10 mM curve.

very significant decrease in the rate of Ca²⁺ release. Panel B shows mean data of several similar experiments, showing the effect of the absence of Na⁺ on the kinetics of Ca²⁺ release from mitochondria. Panel C shows the dependence of the rate of Ca²⁺ release on the mitochondrial [Ca²⁺] both in the presence and in the absence of Na⁺. Data in panel B were polynomial fitted to smooth them. Then, Ca²⁺ exit rate data were obtained as the first derivative of the fitted traces, and finally the obtained rates were plotted against the [Ca²⁺]_M corresponding to each measured rate. The figure shows that the rate

of Ca^{2+} release increased linearly with the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ in the presence of Na^+ , reaching rates around $800 \mu\text{M}/\text{min}$ at $400 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$. Instead, in the absence of Na^+ , the rate was very small at $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ below $200 \mu\text{M}$, and then started to increase in a non-linear mode. As a result of that, the rate of Na^+ -dependent Ca^{2+} release, obtained as the subtraction of both curves, saturated at $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ around $400 \mu\text{M}$.

In conclusion, the Na^+ -dependent Ca^{2+} release pathway is clearly predominant at $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ below $200 \mu\text{M}$ and is nearly the only Ca^{2+} -exit pathway at $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ below $100 \mu\text{M}$. In contrast, the Na^+ -independent Ca^{2+} -exit pathway rapidly activates at $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ above $200 \mu\text{M}$ and approaches the rate of the Na^+ -dependent pathway when the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ reaches $400 \mu\text{M}$. Because of aequorin consumption, we could not measure the rates at higher $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$, but the data point to a

further increase in the importance of the Na^+ -independent pathway at higher $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ because of the saturation of the Na^+ -dependent pathway.

Regarding the Ca^{2+} -release rates obtained, values in the literature are usually reported in terms of $\text{nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Taking into account that the relationship between mitochondrial matrix protein concentration and water volume is about $1 \text{ mg protein} \cdot \mu\text{l water}^{-1}$ or $1000 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ [16,17], a good approximation to transform our data ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ or $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) into those units would be just dividing by this protein concentration, so that $1000 \mu\text{M}/\text{min}$ corresponds to a free Ca^{2+} exit rate of $1 \text{ nmol free Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Of course, our data only measure the fluxes of free Ca^{2+} , so that the total calcium flux should be much higher depending on the mitochondrial Ca^{2+} buffering. However, transforming our data into those units ($\text{nmol free Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) is useful because it allows obtaining information about mitochondrial Ca^{2+} buffering by comparing the free Ca^{2+} flux rates obtained here, with the values in the literature for the total calcium fluxes (see the Discussion). Thus, according to our data, the Na^+ -dependent Ca^{2+} efflux pathway saturates below $500 \mu\text{M}/\text{min}$ or $0.5 \text{ nmol free Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, while the Na^+ -independent Ca^{2+} efflux pathway is much slower at low $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ but approaches also those values at $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ above $400 \mu\text{M}$.

3.2. Effect of the temperature on Ca^{2+} release

We have then investigated the effect of the temperature on the rates of Ca^{2+} release from mitochondria. Fig. 2 shows the kinetics of Ca^{2+} release from mitochondria at 22°C and in the presence of several different Na^+ concentrations. Because of the slower consumption of aequorin at low temperature, it is now possible to monitor the release rates at higher $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$. Panel A of Fig. 2 shows that Ca^{2+} release was

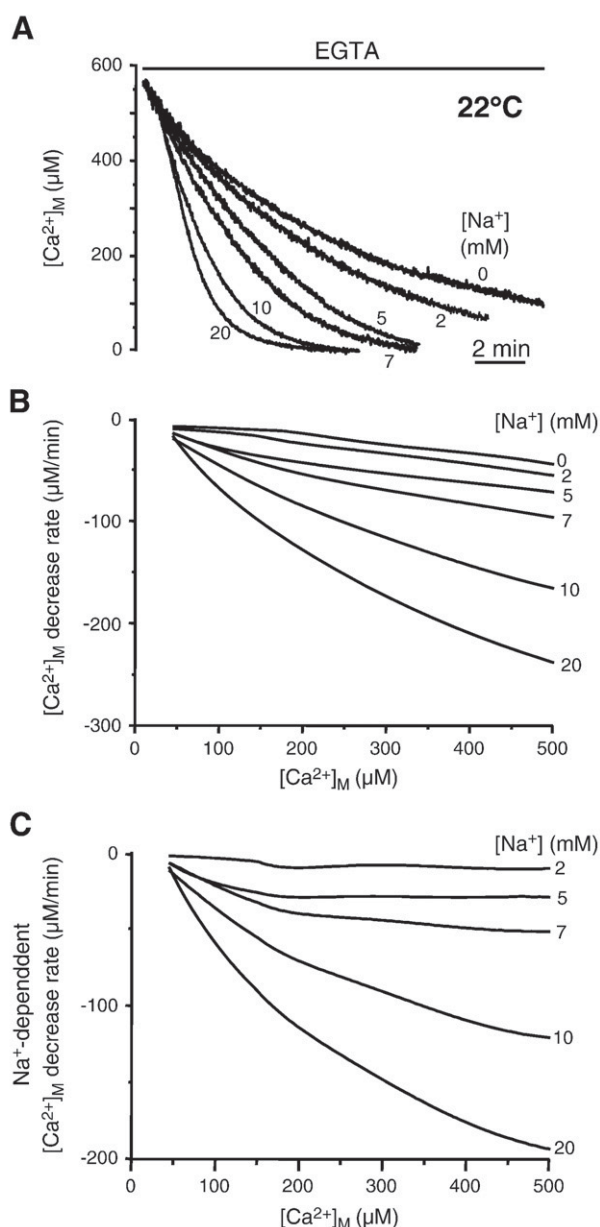


Fig. 2. Kinetics of mitochondrial Ca^{2+} release at 22°C . HeLa cells expressing mitmutAEQ and reconstituted with coelenterazine n were permeabilized, stimulated briefly with a $7 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer and then perfused with an EGTA-containing intracellular medium in the presence of different $[\text{Na}^+]$, as indicated in the figure. Panel A shows the mean Ca^{2+} release curves obtained in 4–8 similar experiments of each kind. Panel B shows the dependence of the rate of Ca^{2+} release on the mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ obtained as in Fig. 1. Panel C shows the Na^+ -dependent Ca^{2+} release obtained by subtracting the Na^+ 0 curve in panel B from each of the other curves.

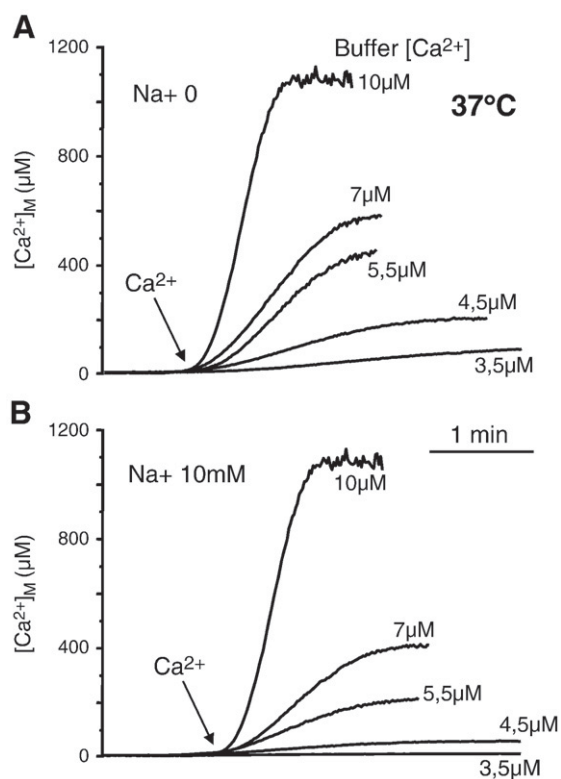


Fig. 3. Kinetics of mitochondrial Ca^{2+} uptake at 37°C and different cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ and $[\text{Na}^+]$. HeLa cells expressing mitmutAEQ and reconstituted with coelenterazine n were permeabilized and then stimulated with $[\text{Ca}^{2+}]$ buffers containing different $[\text{Ca}^{2+}]$, as indicated in the figure. Panel A, intracellular perfusion solutions without sodium. Panel B, solutions containing 10 mM $[\text{Na}^+]$. Data are the mean of 3–5 different experiments of each kind.

much slower here than at 37 °C (compare with Fig. 1) and it was also dramatically dependent on the $[\text{Na}^+]$ in the intracellular medium. In panel B of this figure, data have been transformed to show the dependence of the Ca^{2+} exit rate on $[\text{Ca}^{2+}]_M$, and in panel C the curve obtained in the absence of Na^+ has been subtracted from the rest to show only the Na^+ -dependent Ca^{2+} -exit rate.

Several conclusions can be obtained from these data. First, the Na^+ -independent Ca^{2+} -exit pathway was very small at all the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ values and it hardly reached values of 40 $\mu\text{M}/\text{min}$ ($0.04 \text{ nmol free Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) at 500 μM $[\text{Ca}^{2+}]_M$. Therefore, the exit rates observed through the Na^+ -independent Ca^{2+} -exit pathway decreased by more than 10-fold when the temperature was reduced from 37 °C to 22 °C. Second, the rate of Ca^{2+} release through the Na^+ -dependent Ca^{2+} -exit pathway was also sensitive to the temperature, although the dependence was smaller. For a $[\text{Na}^+]$ of 10 mM, the maximum rate observed at 22 °C was about 4-fold smaller than at 37 °C, that is, about 120 $\mu\text{M}/\text{min}$ or $0.12 \text{ nmol free Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. As a consequence, Ca^{2+} -release from mitochondria at 22 °C in standard Na^+ -containing medium is more than 4-fold slower than at 37 °C and is mainly mediated by the Na^+ -dependent pathway at every $[\text{Ca}^{2+}]_M$. Finally, regarding the Na^+ -dependence of Ca^{2+} release, the data of panel C of Fig. 2 show that the $[\text{Na}^+]$ producing half-maximal activation is about 10 mM. Sigmoidal fitting of the rate values obtained at 400 μM $[\text{Ca}^{2+}]_M$ for each $[\text{Na}^+]$ gave an EC_{50} value of $9.5 \pm 0.6 \text{ mM}$.

3.3. Kinetics of Ca^{2+} uptake by mitochondria

We have now analyzed the kinetics of Ca^{2+} increase in mitochondria in the presence of different $[\text{Ca}^{2+}]$ and at every temperature. Fig. 3 shows Ca^{2+} -entry traces obtained after perfusion of intracellular medium containing different $[\text{Ca}^{2+}]$ to permeabilized cells, both in the absence (panel A) and in the presence (panel B) of 10 mM $[\text{Na}^+]$. The rate of Ca^{2+} entry increased with the $[\text{Ca}^{2+}]$ in the medium, and the increase was dramatically accelerated when medium $[\text{Ca}^{2+}]$ was above 7 μM . In fact, perfusion of 10 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ triggered a very fast increase in $[\text{Ca}^{2+}]_M$ that rapidly reached the millimolar range. The presence of 10 mM $[\text{Na}^+]$ considerably reduced the rate of uptake, but the effect was much stronger at low buffer $[\text{Ca}^{2+}]$, 7 μM or below. In contrast, the rate of Ca^{2+} entry was little dependent on the presence of Na^+ when the medium $[\text{Ca}^{2+}]$ reached 10 μM .

Fig. 4 shows the dependence of the Ca^{2+} increase rate, obtained in experiments as those of Fig. 3, with $[\text{Ca}^{2+}]_M$. Several experiments as those of Fig. 3 were pooled and polynomial fitted, and the first derivative in each case was plotted against $[\text{Ca}^{2+}]_M$. Rate values corresponding to the increasing slope part of the uptake curves (before the maximum rate in each case is reached) were not included for clarity. Panels A and B show data obtained in the absence of Na^+ (panel B is an expansion of panel A in both scales). Panels C and D show data obtained in the presence of 10 mM $[\text{Na}^+]$ (panel D is an

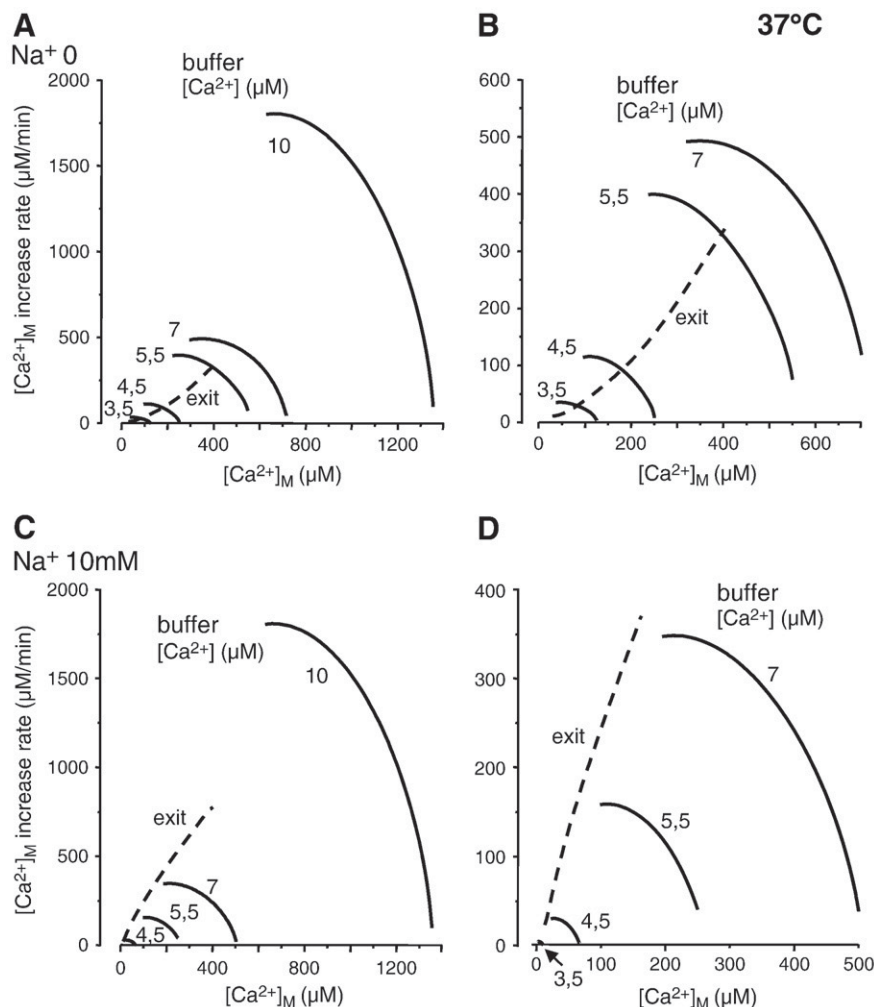


Fig. 4. Dependence of the mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ increase rate at 37 °C on $[\text{Ca}^{2+}]_M$. Data in Fig. 3 were transformed as described in Fig. 1 to plot the rate of mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ increase (balance between influx and efflux rates) against $[\text{Ca}^{2+}]_M$ at every cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ and both in the absence of $[\text{Na}^+]$ (panels A and B, which is an expansion of panel A) and in the presence of 10 mM $[\text{Na}^+]$ (panels C and D, which is an expansion of panel C). The dashed curves represent the rate of Ca^{2+} release in each case, taken from Fig. 1.

expansion of panel C). The dashed lines show for comparison the rates of Ca^{2+} -exit in each case, taken from Fig. 1.

The curves of Fig. 4 do not show unidirectional Ca^{2+} -entry into mitochondria, but the balance between mitochondrial Ca^{2+} influx and Ca^{2+} efflux for each medium $[\text{Ca}^{2+}]$ and intramitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$. The presence of Na^+ in the medium shifts down the curves obtained at low $[\text{Ca}^{2+}]$ (up to $7 \mu\text{M}$), because of the increased Ca^{2+} exit flux through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. However, Ca^{2+} entry through the uniporter should remain the same, and that was the case. To calculate unidirectional Ca^{2+} entry, we can study the steady-state in the Ca^{2+} entry curves, that is, the region where $[\text{Ca}^{2+}]_M$ is stable because Ca^{2+} influx and Ca^{2+} efflux are equal. In the curves of Fig. 4, that region corresponds to the intersection with the X axis, when the rate is 0, and the Ca^{2+} entry rate corresponding to each particular curve should then be equal to the exit rate at the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ in the intersection. Fig. 5 exemplifies the calculation and shows that Ca^{2+} entry is independent of the presence of Na^+ . Extrapolation of the curves for 4.5 and $5.5 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ in the presence and in the absence of Na^+ provides the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ where Ca^{2+} influx and efflux are balanced in each case. At that point, the Ca^{2+} efflux rate should be equal to the Ca^{2+} influx, and can be obtained from the efflux curve. The figure shows that Ca^{2+} influx at $4.5 \mu\text{M}$ medium $[\text{Ca}^{2+}]$ was about $160 \mu\text{M}/\text{min}$, and at $5.5 \mu\text{M}$ medium $[\text{Ca}^{2+}]$ was about $650 \mu\text{M}/\text{min}$, and those values were independent of the presence of Na^+ in the medium, in spite of the large difference in the rate curves in both cases.

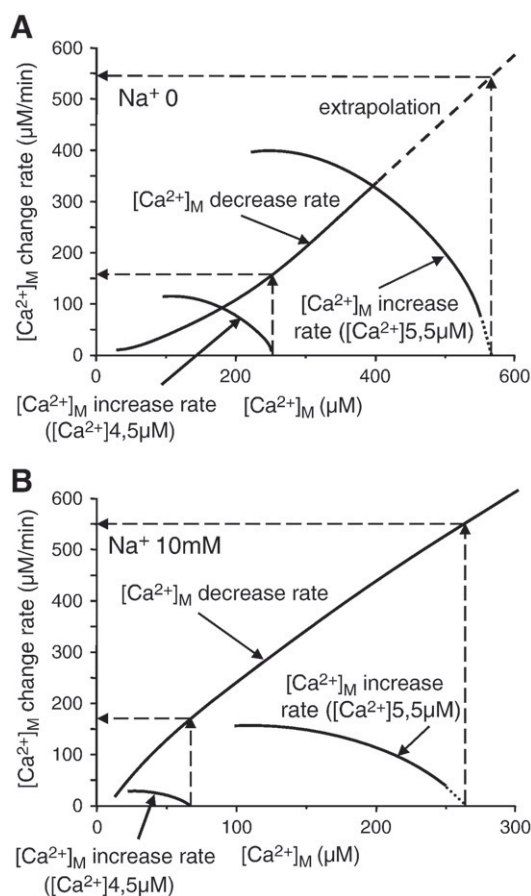


Fig. 5. Calculation of unidirectional Ca^{2+} influx rates. The figure shows data from Fig. 4 corresponding to the curves of $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase rate (balance between influx and efflux rates) at $4.5 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ and $5.5 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ both in the absence (panel A) and in the presence (panel B) of 10 mM $[\text{Na}^+]$, together with the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ decrease rates in both cases. When the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase rate curves reach the X axis, influx and efflux must be equal and the pure influx rate can be calculated from the value of the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ decrease rate curve obtained at the same intramitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ (as indicated by the dashed arrows).

The maximum rate of mitochondrial Ca^{2+} increase observed with the $10 \mu\text{M}$ buffer $[\text{Ca}^{2+}]$ was about $1800 \mu\text{M}/\text{min}$, corresponding to about $1.8 \text{ nmol free Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, and it was independent of the presence of Na^+ . The reason for that may be that, as shown in Fig. 1, the Na^+ -dependent Ca^{2+} exit pathway saturated at $[\text{Ca}^{2+}]_M$ around $400 \mu\text{M}$, and above that concentration the Na^+ -independent Ca^{2+} exit pathway started to be predominant. Thus, at the high $[\text{Ca}^{2+}]_M$ reached in the presence of the $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} buffer, the contribution of the Na^+ -dependent Ca^{2+} exit pathway should be small. It is difficult to estimate the maximum Ca^{2+} entry rate with the $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer as we did in Fig. 5, because we would need to make a very large extrapolation of the Ca^{2+} -exit rate. However, we can obtain a more direct estimation by adding the maximum measured rate value ($1800 \mu\text{M}/\text{min}$), obtained at a $[\text{Ca}^{2+}]_M$ of $700 \mu\text{M}$, with the extrapolation of the Ca^{2+} exit rates up to that point ($800\text{--}1000 \mu\text{M}/\text{min}$), obtaining a total value of about $2600\text{--}2800 \mu\text{M}/\text{min}$ or $2.6\text{--}2.8 \text{ nmol free Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Regarding the lower $[\text{Ca}^{2+}]$ buffers, particularly below $5 \mu\text{M}$, probably the cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ found under most physiological conditions of cell stimulation, the Ca^{2+} -entry rates were much smaller and in the same range as Ca^{2+} -exit rates. Thus, the observed Ca^{2+} increase under those conditions was largely dependent on the presence of Na^+ in the medium and could be significantly modulated by changes in $[\text{Na}^+]$. Fig. 6 shows the effect of the presence of different $[\text{Na}^+]$ in the perfusion medium on the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase induced by a $4.5 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer. Panel A shows the crude uptake curves and panel B shows the dependence of the rate of Ca^{2+} -increase on $[\text{Ca}^{2+}]_M$. Both the maximum rate of $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase and the steady-state

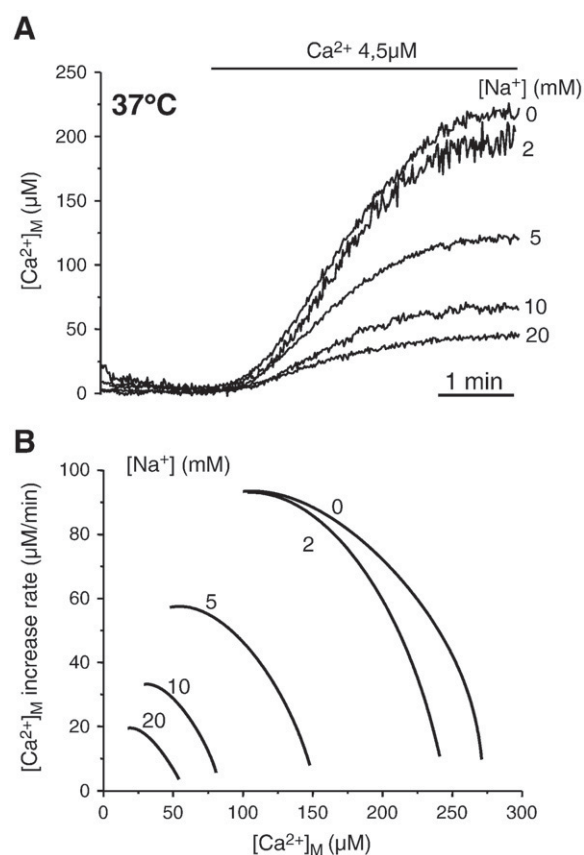


Fig. 6. Effect of $[\text{Na}^+]$ on mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ increase rate at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. HeLa cells expressing mitmutAEQ and reconstituted with coelenterazine n were permeabilized and then stimulated with a $4.5 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer in the presence of different $[\text{Na}^+]$, as indicated in the figure. Panel A shows a typical experiment. In panel B, mean data from 4 to 7 experiments of each kind were transformed as described in Fig. 1 to plot the rate of mitochondrial Ca^{2+} increase against $[\text{Ca}^{2+}]_M$ at every $[\text{Na}^+]$.

$[Ca^{2+}]_M$ obtained in the absence of Na^+ was decreased by 5-fold in the presence of 20 mM $[Na^+]$, and the larger changes occurred in the physiological range of intracellular $[Na^+]$, around 5 mM. Sigmoidal fit of the effects of $[Na^+]$ on either the steady-state $[Ca^{2+}]_M$ values or the maximum rates of Ca^{2+} efflux provided values for the mean effect of $[Na^+]$ of 4.6 ± 0.1 mM and 5.3 ± 0.4 mM, respectively.

3.4. Effect of the temperature on Ca^{2+} uptake

We have then investigated the balance between Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release at 22 °C. Fig. 7 shows the kinetics of the increase in $[Ca^{2+}]_M$ induced by the addition of different buffered $[Ca^{2+}]$ to permeabilized cells, both in the presence and in the absence of Na^+ , and Fig. 8 shows the relationship between the Ca^{2+} increase rate and the $[Ca^{2+}]_M$ in each case. The dashed traces represent the Ca^{2+} exit rates at both 0 and 10 mM Na^+ , taken from Fig. 2. As occurred at 37 °C, the presence of Na^+ reduced the rates obtained at $[Ca^{2+}]$ below 7 μ M, hardly affecting the rate obtained with a 10 μ M $[Ca^{2+}]$ buffer. The maximum rate obtained with a 10 μ M $[Ca^{2+}]$ buffer could be calculated by adding the maximum rate measured (at 200–400 μ M $[Ca^{2+}]_M$) with the exit rate at that $[Ca^{2+}]_M$, obtaining a value of 1100–1200 μ M/min or 1.1–1.2 nmol free $Ca^{2+} \cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, about 2.5-fold smaller than the rate measured at 37 °C for the same $[Ca^{2+}]$. However, because the effect of the temperature on the release rates is larger (more than 4-fold, see Figs. 1 and 2), the final steady-state $[Ca^{2+}]_M$ reached at 22 °C was higher than at 37 °C for the $[Ca^{2+}]$ buffers below 7 μ M (compare Figs. 3 and 7).

3.5. Total mitochondrial Ca^{2+} uptake

We have finally studied the rate of total mitochondrial Ca^{2+} uptake obtained in mitochondria isolated from HeLa cells and stimulated with

a calcium bolus under conditions similar to those of the previous experiments, but using the dye Calcium Green 5 N to measure the decrease in extramitochondrial $[Ca^{2+}]$ induced by mitochondrial Ca^{2+} uptake. We are aware that this method is unable to measure the maximal rate of mitochondrial Ca^{2+} uptake, because of the limitations imposed by the changes in membrane potential occurring during mitochondrial Ca^{2+} uptake, that lead to serious underestimations of the rate of uptake [2,6]. However, the results are useful as a lower estimation for the rate of total calcium uptake by HeLa cell mitochondria.

Fig. 9 shows that addition of a Ca^{2+} bolus of 150 nmol total calcium $\cdot mg \text{ protein}^{-1}$ (15 μ M $[Ca^{2+}]$) produced a sudden increase in the $[Ca^{2+}]$ measured by the extramitochondrial dye, which then progressively decreased in the next few minutes until all the added calcium had been taken up by mitochondria. In several similar experiments, the rate of total calcium uptake measured at an extramitochondrial $[Ca^{2+}]$ of 10 μ M was 21 ± 3 nmol total calcium $\cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (mean \pm s.e., $n = 5$).

4. Discussion

We have made a detailed study of the kinetics of mitochondrial Ca^{2+} fluxes by measuring the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ in permeabilized cells during Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release in the presence of different extramitochondrial $[Ca^{2+}]$ and $[Na^+]$, and different temperatures. Our study provides a view of the dynamics of intramitochondrial $[Ca^{2+}]$ along the activation of mitochondrial Ca^{2+} fluxes and allows making a direct comparative estimation of the balance between Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release fluxes. In addition it provides new information on mitochondrial Ca^{2+} buffering.

4.1. Mitochondrial Ca^{2+} uptake rates and matrix Ca^{2+} buffering

The maximum activity of the Ca^{2+} uniporter has been estimated in rat liver mitochondria to be around 1400 and 900 nmol total $Ca^{2+} \cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at 30 °C and 20 °C, respectively, using conditions of constant membrane potential [2,6,7]. The presence of 1 mM Mg^{2+} should reduce these figures by about 20–30%, to values close to 1000 and 600 nmol total $Ca^{2+} \cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. In our experiments, the measured rate of total calcium uptake was 21 nmol total calcium $\cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in the presence of about 10 μ M extramitochondrial $[Ca^{2+}]$. Reported values for the K_m for Ca^{2+} of the uniporter are in the 20–50 μ M range [1–9], and previous data indicate that the maximum rate should be at least 4-fold higher than that obtained at 10 μ M $[Ca^{2+}]$ [4,5]. Therefore, a reasonable estimation for the maximum rate of uptake in our conditions would be about 80 nmol total calcium $\cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. This rate is about 10-fold smaller than that previously obtained in rat liver mitochondria, although we should remember that it is a lower estimation for the actual rate, because of the changes in membrane potential occurring during mitochondrial Ca^{2+} uptake [2,6]. In conclusion, the rate of total calcium uptake at 37 °C in our cells should be in the range 100–1000 nmol total calcium $\cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Regarding the rates of free Ca^{2+} uptake obtained from the aequorin experiments, we obtain uptake rates with a 10 μ M $[Ca^{2+}]$ buffer of 2.8 and 1.2 nmol free $Ca^{2+} \cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at 37 °C and 22 °C, respectively. Using the same factor as above (4-fold), a reasonable estimation for the maximum uptake rate of free Ca^{2+} in our case would be 10 nmol free $Ca^{2+} \cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at 37 °C and 5 nmol free $Ca^{2+} \cdot mg \text{ protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at 22 °C. These values for the rate of free Ca^{2+} increase in mitochondria are 10- to 100-fold smaller than the above-mentioned rates for total calcium uptake by mitochondria. The difference should be due to the mitochondrial buffering capacity and would therefore represent a good estimation for the Ca^{2+} bound/ Ca^{2+} free relationship in the mitochondrial matrix along the Ca^{2+} uptake process. If this is correct, the Ca^{2+}

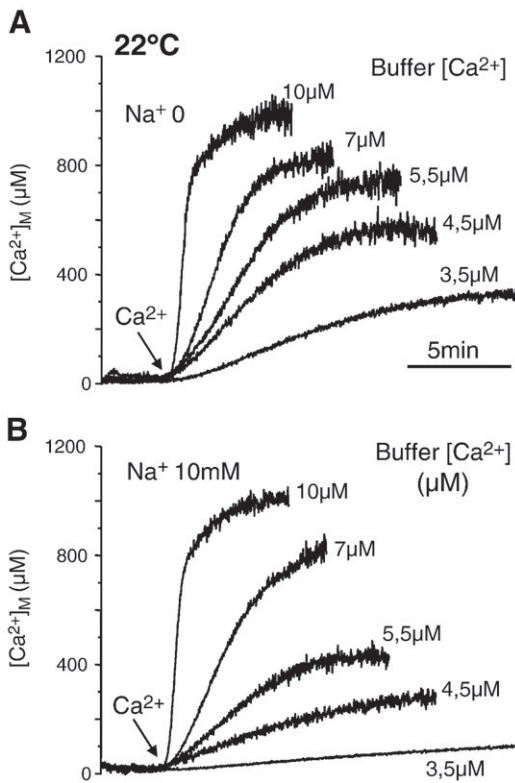


Fig. 7. Kinetics of mitochondrial Ca^{2+} uptake at 22 °C and different cytosolic $[Ca^{2+}]$ and $[Na^+]$. HeLa cells expressing mitmutAEQ and reconstituted with coelenterazine n were permeabilized and then stimulated with $[Ca^{2+}]$ buffers containing different $[Ca^{2+}]$, as indicated in the figure, and either in the absence (panel A) or in the presence (panel B) of 10 mM $[Na^+]$. Data are the mean of 2 different experiments of each kind.

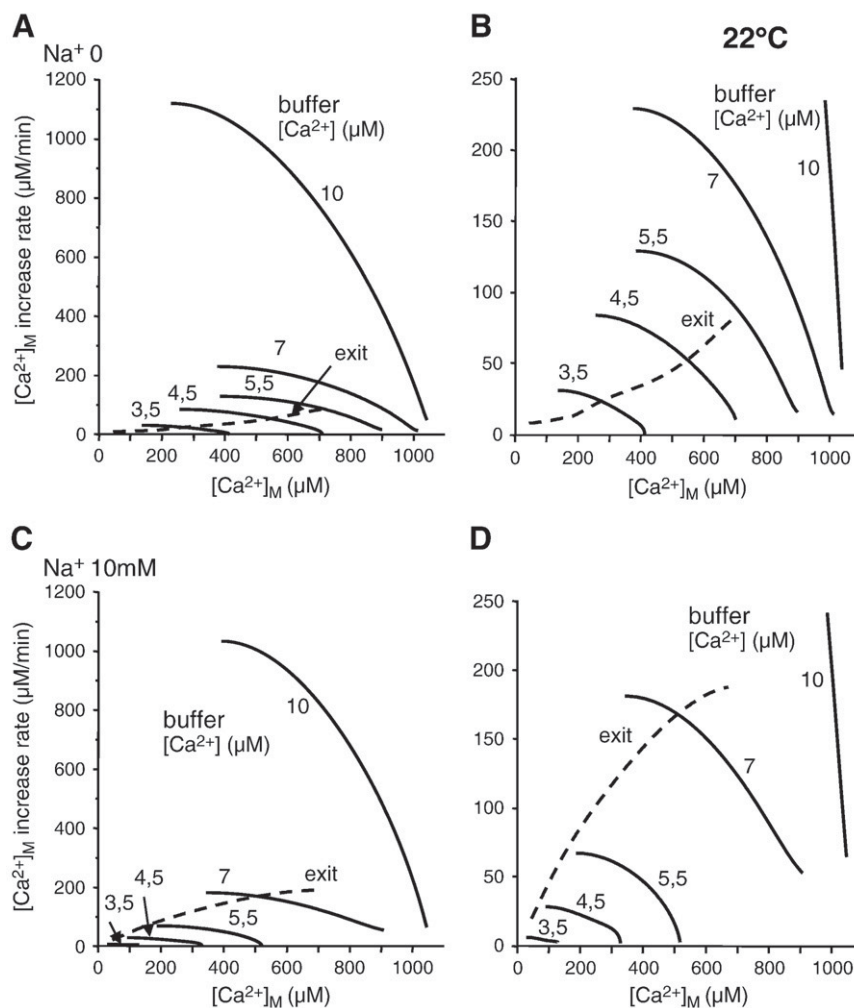


Fig. 8. Dependence of the mitochondrial $[Ca^{2+}]_M$ increase rate at 22 °C on $[Ca^{2+}]_M$. Data in Fig. 3 were transformed as described in Fig. 1 to plot the rate of mitochondrial Ca^{2+} increase (balance between influx and efflux rates) against $[Ca^{2+}]_M$ at every cytosolic $[Ca^{2+}]$ and both in the absence of $[Na^+]$ (panels A and B, which is an expansion of panel A) and in the presence of 10 mM $[Na^+]$ (panels C and D, which is an expansion of panel C). The dashed curves represent the rate of Ca^{2+} release in each case, taken from Fig. 2.

bound/ Ca^{2+} free ratio in the mitochondria would be similar to that measured in the cytosol of many cells [3,18], although this parameter may depend on the cell type [19]. Previous estimations for the Ca^{2+} binding ratio in the mitochondrial matrix range from 4000 [20] to 150,000 [21]. The discrepancy with these figures is mainly due to the

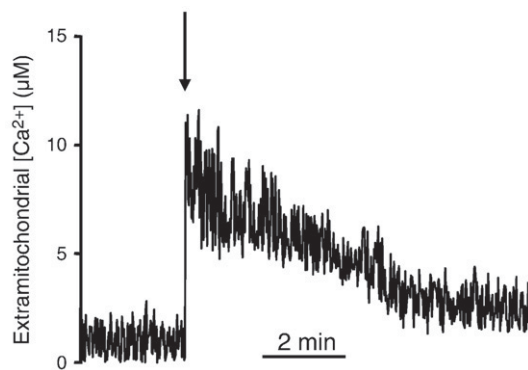


Fig. 9. Total calcium uptake by mitochondria isolated from HeLa cells. 0.1 mg of protein from the HeLa cell mitochondrial preparation were suspended in 1 ml of intracellular medium containing 5 μ M EGTA and 0.3 μ M Calcium Green-5 N at 37 °C. When indicated by the arrow, 20 nmol of calcium (final $[Ca^{2+}]$ 15 μ M) was added to start mitochondrial Ca^{2+} uptake. This experiment is representative of 5 similar ones.

different values obtained for the free $[Ca^{2+}]$ inside mitochondria during Ca^{2+} loading, a problem which has been discussed before [13].

Regarding mitochondrial Ca^{2+} buffering, our data show smooth free Ca^{2+} increase curves up to the millimolar range in mitochondria exposed to a constant rate of Ca^{2+} uptake. Similarly, Ca^{2+} release curves show a nice exponential kinetics from about 500 μ M to resting values. Therefore, our data do not show any evidence for high affinity Ca^{2+} buffering in the low micromolar range in mitochondria. Rather, our data are consistent with previous data [22,23] suggesting the presence of a high-capacity and low affinity Ca^{2+} buffering. This buffering would allow rapid uptake and release of large amounts of Ca^{2+} from mitochondria, with $[Ca^{2+}]_M$ transiently reaching the tens or even hundreds of micromolar range, as we have previously shown in intact chromaffin cells [4]. If the factor of two orders of magnitude for the bound/free calcium relationship is correct, then reaching a $[Ca^{2+}]_M$ of 1 mM would correspond to a net calcium load of 100 nmol total $Ca^{2+} \cdot mg \text{ protein}^{-1}$. Interestingly, this value corresponds approximately to the maximum amount of calcium that can be accumulated by mitochondria within the classically considered limited loading, which is reversible and does not produce damage to mitochondria [8,24]. In the presence of phosphate, mitochondria is known to be able to store 10–30 times more calcium than that [21,24], accompanied by irreversible damage, morphological changes and calcium phosphate precipitation. Our data suggest that, contrarily to previous estimations [21,25], this precipitation only occurs when the free $[Ca^{2+}]_M$ approaches the

millimolar range and thus the limited loading threshold. Then, the free $[Ca^{2+}]_M$ stabilizes around 1 mM (as in Figs. 3 and 7) while calcium phosphate precipitation develops.

4.2. Mitochondrial Ca^{2+} release rates

Regarding Ca^{2+} release from mitochondria, the maximum rate of the Na^+/Ca^{2+} exchange system was $0.5 \text{ nmol free } Ca^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at 37°C and $0.12 \text{ nmol free } Ca^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at 22°C . Values in the literature for the maximum rate of this system range between 2.6 and $18 \text{ nmol total } Ca^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at room temperature [6,7,26,27]. Again here, our values for the rate of free Ca^{2+} release are smaller by a factor of about 20–150 than the published values for total Ca^{2+} release through this system. In the case of the Na^+ -independent Ca^{2+} release flux, our values for the maximum rate of this system are about 0.5 and $0.04 \text{ nmol free } Ca^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at 37°C and 22°C , respectively. The published values for the maximum rate of this system have been obtained at room temperature and are around $1\text{--}2 \text{ nmol total } Ca^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ [6,7,23]. In this case the total flux is 25- to 50-fold larger than the free Ca^{2+} flux measured here. At this respect, it is interesting to note that in our experiments the Na^+ -independent Ca^{2+} efflux was very slow at low $[Ca^{2+}]_M$, below $200 \mu\text{M}$, and its rate increased at higher $[Ca^{2+}]_M$. However, it has been reported that this efflux system saturates at total mitochondrial calcium values around $25 \text{ nmol total } Ca^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ [23], which according to the data in this paper (relationship bound Ca^{2+} /free Ca^{2+} of 100 in the matrix and assuming $1 \mu\text{l}$ water/mg protein) should correspond to a $[Ca^{2+}]_M$ of around $250 \mu\text{M}$. A possible explanation for the discrepancy would be the activation of a new pathway for Ca^{2+} release from mitochondria when $[Ca^{2+}]_M$ rises above these values, perhaps a reversible or transient opening of the mitochondrial permeability transition.

Ca^{2+} -release from mitochondria in HeLa cells was highly dependent on the extramitochondrial $[Na^+]$, particularly at $[Ca^{2+}]_M$ below $100\text{--}200 \mu\text{M}$. In fact, at $100 \mu\text{M } [Ca^{2+}]_M$, 85–90% of Ca^{2+} release was dependent of the presence of Na^+ . The $[Na^+]$ required for half-maximal activation of Ca^{2+} release was about 10 mM (Fig. 2), although the $[Na^+]$ required for half-maximal inhibition of the $[Ca^{2+}]_M$ increase rate (Fig. 6) was smaller, close to 5 mM. The difference may be due to the experimental design or perhaps also to the temperature. In any case, these values are comparable with reported values for the K_m of this system, which are in the range of $2.6\text{ to }9.4 \text{ mM}$ [27–29]. This $[Na^+]$ is in the physiological range, so that physiological variations in the cytosolic $[Na^+]$ may produce significant variations in Ca^{2+} accumulation by mitochondria, as it has been previously proposed [29]. Our data show that the rate of Ca^{2+} release from mitochondria is comparable with the rate of Ca^{2+} entry when the cytosolic $[Ca^{2+}]$ keeps below $7 \mu\text{M}$, which is the case for most physiological cell stimulations, with the possible exception of local high- Ca^{2+} microdomains. Therefore, modulation by cytosolic $[Na^+]$ of the rate of Ca^{2+} release from mitochondria may be physiologically relevant for mitochondrial Ca^{2+} homeostasis.

4.3. Temperature dependence of mitochondrial Ca^{2+} fluxes

Finally, our data show also a very important dependence of mitochondrial Ca^{2+} release with the temperature. Na^+ -dependent Ca^{2+} -release increased its activity by 4-fold when the temperature was increased from 22°C to 37°C , and Na^+ -independent Ca^{2+} -release increased its activity by more than 10-fold in the same interval. This temperature dependence is larger than that of the Ca^{2+} -entry mechanism, which increases its rate only about twice by the same temperature increase. Because of that, the final $[Ca^{2+}]_M$ reached at steady-state was higher at 22°C than at 37°C in the presence of every $[Ca^{2+}]$ buffer, except for the $10 \mu\text{M } [Ca^{2+}]$ one, which leads to saturation of the probe at around 1 mM $[Ca^{2+}]_M$ and also probably to calcium

phosphate precipitation. It is very important to have into account this large temperature dependence of the mitochondrial Ca^{2+} -release mechanisms to interpret previous data in the literature regarding mitochondrial Ca^{2+} storage ability during physiological cell function. In fact, most of the original work on the role of mitochondria in Ca^{2+} homeostasis was made at room temperature [20,30–33]. Those papers grounded the key idea that mitochondria constitute a very important transient Ca^{2+} buffer able to modulate cytosolic $[Ca^{2+}]$ homeostasis. However, regarding the kinetics of that phenomenon, one of their conclusions was that mitochondria was able to take up Ca^{2+} rapidly during cell activation and then release it slowly, thus generating a mitochondrial Ca^{2+} transient much prolonged than the cytosolic one and a sustained Ca^{2+} release from mitochondria well after the original $[Ca^{2+}]_c$ transient had finished. That is in fact the case at room temperature, but the kinetics of this phenomenon under physiological conditions is very different. The rate of mitochondrial Ca^{2+} -release at 37°C is much faster, and the kinetics of the mitochondrial $[Ca^{2+}]$ transient is in fact very similar to that of the cytosolic one, but with very different amplitude [4]. This point is physiologically very important, as the response of mitochondrial $[Ca^{2+}]$ to rapid $[Ca^{2+}]_c$ oscillations, such as those occurring in cardiac cells, either generating $[Ca^{2+}]_M$ oscillations or progressive $[Ca^{2+}]_M$ accumulation [34–36], may critically depend on that.

4.4. Conclusion

In conclusion, our data reveal mitochondria as a highly dynamic compartment in terms of Ca^{2+} homeostasis, able to take up and release Ca^{2+} fast enough to follow the cytosolic Ca^{2+} transients, but undergoing reversible variations in $[Ca^{2+}]_M$ that could span up to four orders of magnitude, from 100 nM to 1 mM . Under physiological conditions, of course, the $[Ca^{2+}]_M$ transients in most of the mitochondria are surely smaller, but the organelle has the capacity to do it and mitochondria close to high Ca^{2+} microdomains may be involved in such a big Ca^{2+} movements.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2008-01871) and from Junta de Castilla y León (VA103A08 and GR105). Sergio de la Fuente holds an FPI (Formación de Personal Investigador) fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and Pablo Montenegro holds a JAE (Junta de Ampliación de Estudios) predoctoral fellowship from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). We thank Pilar Alvarez and Laura González for excellent technical assistance.

References

- [1] A. Vinogradov, A. Scarpa, The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.* **248** (1973) 5527–5531.
- [2] M. Bragadin, T. Pozzan, G.F. Azzone, Kinetics of Ca^{2+} carrier in rat liver mitochondria, *Biochemistry* **18** (1979) 5972–5978.
- [3] T. Xu, M. Naraghi, H. Kang, E. Neher, Kinetic studies of Ca^{2+} binding and Ca^{2+} clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells, *Biophys. J.* **73** (1997) 532–545.
- [4] M. Montero, M.T. Alonso, E. Carnicero, I. Cuchillo-Ibañez, A. Albillos, A.G. Garcia, J. Garcia-Sancho, J. Alvarez, Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion, *Nat. Cell Biol.* **2** (2000) 57–61.
- [5] Y. Kirichok, G. Krapivinsky, D.E. Clapham, The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel, *Nature* **427** (2004) 360–364.
- [6] P. Bernardi, Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition, *Physiol. Rev.* **79** (1999) 1127–1155.
- [7] R. Rizzuto, P. Bernardi, T. Pozzan, Mitochondria as all-round players of the calcium game, *J. Physiol.* **529** (2000) 37–47.
- [8] T.E. Gunter, D.R. Pfeiffer, Mechanisms by which mitochondria transport calcium, *Am. J. Physiol.* **258** (1990) C755–C786.
- [9] T.E. Gunter, S.S. Sheu, Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca^{2+} transport mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta.* **1787** (2009) 1291–1308.
- [10] M.J. Barrero, M. Montero, J. Alvarez, Dynamics of $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 27694–27699.

- [11] M. Montero, C.D. Lobatón, A. Moreno, J. Alvarez, A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190, *FASEB J.* 16 (2002) 1955–1957.
- [12] M. Montero, M.J. Barrero, J. Alvarez, $[\text{Ca}^{2+}]$ microdomains control agonist-induced Ca^{2+} release in intact HeLa cells, *FASEB J.* 11 (1997) 881–885.
- [13] L. Vay, E. Hernández-SanMiguel, C.D. Lobatón, A. Moreno, M. Montero, J. Alvarez, Mitochondrial free $[\text{Ca}^{2+}]$ levels and the permeability transition, *Cell Calcium* 45 (2009) 243–250.
- [14] J. Llopis, J.M. McCaffery, A. Miyawaki, M.G. Farquhar, R.Y. Tsien, Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 6803–6808.
- [15] M.F. Cano-Abad, G. Di Benedetto, P.J. Magalhães, L. Filippin, T. Pozzan, Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 11521–11529.
- [16] C.R. Hackenbrock, Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61 (1968) 598–605.
- [17] A.D. Beavis, R.D. Brannan, K.D. Garlid, Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 13424–13433.
- [18] J.R. Berlin, J.W.M. Bassani, D.M. Bers, Intrinsic cytosolic calcium buffering properties of single rat cardiac myocytes, *Biophys. J.* 67 (1994) 1775–1787.
- [19] H. Mogami, J. Gardner, O.V. Gerasimenko, P. Camello, O.H. Petersen, A.V. Tepikin, Calcium binding capacity of the cytosol and endoplasmic reticulum of mouse pancreatic acinar cells, *J. Physiol. (Lond.)* 518.2 (1999) 463–467.
- [20] D.F. Babcock, J. Herrington, Y.-B. Park, B. Hille, Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network, *J. Cell Biol.* 136 (1997) 833–843.
- [21] S. Chalmers, D.G. Nicholls, The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 19062–19070.
- [22] K.E. Coll, S.K. Joseph, B.E. Corkey, J.R. Williamson, Determination of the matrix free Ca^{2+} concentration and kinetics of Ca^{2+} efflux in liver and heart mitochondria, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 8696–8704.
- [23] D.E. Wingrove, T.E. Gunter, Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 15159–15165.
- [24] A.L. Lehninger, Mitochondria and calcium ion transport, *Biochem. J.* 119 (1970) 129–138.
- [25] D.G. Nicholls, Mitochondria and calcium signalling, *Cell Calcium* 38 (2005) 311–317.
- [26] M. Crompton, R. Moser, H. Lüdi, E. Carafoli, The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues, *Eur. J. Biochem.* 82 (1978) 25–31.
- [27] D.E. Wingrove, T.E. Gunter, Kinetics of mitochondrial calcium transport. II. A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 15166–15171.
- [28] D.A. Cox, M.A. Matlib, A role for the mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 938–947.
- [29] M. Sedova, L.A. Blatter, Intracellular sodium modulates mitochondrial calcium signaling in vascular endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35402–35407.
- [30] S.A. Thayer, R.J. Miller, Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro, *J. Physiol. (Lond.)* 425 (1990) 85–115.
- [31] R.J. White, I.J. Reynolds, Mitochondria accumulate Ca^{2+} following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurons, *J. Physiol. (Lond.)* 498 (1997) 31–47.
- [32] Y.B. Park, J. Herrington, D.F. Babcock, B. Hille, Ca^{2+} clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells, *J. Physiol. (Lond.)* 492 (1996) 329–346.
- [33] J. Herrington, Y.B. Park, D.F. Babcock, B. Hille, Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+} loads from rat adrenal chromaffin cells, *Neuron* 16 (1996) 219–228.
- [34] Z. Zhou, M.A. Matlib, D.M. Bers, Cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} signals in patch clamped mammalian ventricular myocytes, *J. Physiol. (Lond.)* 507 (1998) 379–403.
- [35] V. Robert, P. Gurlini, V. Tosello, T. Nagai, A. Miyawaki, F. Di Lisa, T. Pozzan, Beat-to-beat oscillations of mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ in cardiac cells, *EMBO J.* 20 (2001) 4998–5007.
- [36] E.N. Dedkova, L.A. Blatter, Mitochondrial Ca^{2+} and the heart, *Cell Calcium* 44 (2008) 77–91.



Dynamics of mitochondrial $[Ca^{2+}]$ measured with the low- Ca^{2+} -affinity dye rhod-5N

Sergio de la Fuente, Rosalba I. Fonteriz, Mayte Montero, Javier Alvarez *

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramón y Cajal, 7, E-47005 Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2011
Received in revised form 20 October 2011
Accepted 30 October 2011
Available online 30 November 2011

Keywords:

Rhod-5N
 Ca^{2+}
Mitochondria
HeLa cells
Aequorin

ABSTRACT

Available methods to measure mitochondrial $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_M$) include both targeted proteins and fluorescent dyes. Targeted proteins usually report much higher $[Ca^{2+}]_M$ values than fluorescent dyes, up to two orders of magnitude. However, we show here that the low- Ca^{2+} -affinity dye rhod-5N provides $[Ca^{2+}]_M$ values similar to those reported by targeted aequorin, suggesting that the discrepancies are mainly due to the higher Ca^{2+} -affinity of the fluorescent dyes used. We find rhod-5N has an apparent *in situ* intramitochondrial Kd around 0.5 mM. Addition of Ca^{2+} buffers containing between 4.5 and 10 μ M $[Ca^{2+}]$ to permeabilized cells loaded with rhod-5N induced increases in calibrated $[Ca^{2+}]_M$ up to the 100 μ M–1 mM range, which were dependent on mitochondrial membrane potential. Ca^{2+} release from mitochondria was largely dependent on $[Na^+]$. We have then used rhod-5N loaded cells to investigate the $[Ca^{2+}]_M$ response to agonist stimulation at the single-cell and subcellular level. The $[Ca^{2+}]_M$ peaks induced by histamine varied by nearly 10-fold among different cells, with a mean about 25 μ M. In the presence of the Ca^{2+} uniporter stimulator kaempferol, the $[Ca^{2+}]_M$ peaks induced by histamine were also highly variable, and the mean $[Ca^{2+}]_M$ peak was 3-fold higher. Simultaneous measurement of cytosolic and mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peaks showed little correlation among the heights of the peaks in both compartments. Studying the $[Ca^{2+}]_M$ peaks at the subcellular level, we found significant heterogeneities among regions in the same cell. In particular, the $[Ca^{2+}]_M$ increase in mitochondrial regions close to the nucleus was more than double that of mitochondrial regions far from the nucleus.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Evidence for the multiple roles played by mitochondria in cell Ca^{2+} homeostasis has been continuously growing in the last years. Activation of mitochondrial metabolism, induction of apoptosis, modulation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ through transient Ca^{2+} buffering of cytosolic Ca^{2+} microdomains, modulation of ER- Ca^{2+} release or modulation of Ca^{2+} entry through the plasma membrane, are just some of the roles which have been attributed to the mitochondria in Ca^{2+} homeostasis [1,2]. However, there are still significant discrepancies in the $[Ca^{2+}]_M$ measurements obtained by different procedures, and the low- Ca^{2+} -affinity forms of targeted proteins such as aequorin or camaleon [3–5] report much higher $[Ca^{2+}]_M$ values than fluorescent dyes such as rhod-2 or fura-FF [6,7]. We have studied before this discrepancy and we have shown that the *in situ* intramitochondrial calibration of aequorin does not significantly differ from that obtained *in vitro* or in a different intracellular location [8], suggesting that measurements with this photoprotein

are correct. We have also recently reported that rhod-2 is unable to follow adequately repetitive changes in $[Ca^{2+}]_M$, while measurements obtained with aequorin and the fluorescent protein pericam are consistent [9]. In addition, kinetic studies of mitochondrial Ca^{2+} fluxes indicate that massive calcium phosphate complexes precipitation inside mitochondria only occurs when $[Ca^{2+}]_M$ reaches the millimolar range [10].

However, in spite of these problems, fluorescent dyes such as rhod-2 still have several important advantages over aequorin which favour a much wider use, namely the easy loading even in cells difficult to transfect and also the ability to make single cell or subcellular studies. Thus, we have decided to test if the discrepancies could be solved at least in part by using a fluorescent dye with a much lower Ca^{2+} affinity. In this paper we have used rhod-5N, a very low- Ca^{2+} -affinity derivative of rhod-2 (in vitro Kd for Ca^{2+} binding of 320 μ M), to study Ca^{2+} dynamics in HeLa cells and make a comparison with the previous data obtained with aequorin. Our data demonstrate that the $[Ca^{2+}]_M$ data obtained with rhod-5N are fully consistent, both in terms of kinetics and of absolute $[Ca^{2+}]_M$ values, with those obtained previously with aequorin. Moreover, this dye allows obtaining important new data about $[Ca^{2+}]_M$ dynamics at the single cell and subcellular level.

* Corresponding author. Tel.: +34 983 423085; fax: +34 983 423588.
E-mail address: jalvarez@ibgm.uva.es (J. Alvarez).

2. Methods

2.1. Cell culture and perfusion media

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum, 100 i.u. ml⁻¹ penicillin and 100 i.u. ml⁻¹ streptomycin. Cells were then plated onto 12 mm round coverslips and loaded with rhod-5N by incubation in standard medium containing 2 μM of the acetoxymethyl ester derivative (rhod-5N-AM, Anaspec, CA, USA) during 30 min at room temperature. Cells were then washed with standard medium for 30 min at room temperature and mounted in the cell chamber in the stage of a Zeiss Axiovert 200 microscope under continuous perfusion. Simultaneous loading with rhod-5N and fura-2 was made by incubating cells in standard medium containing 2 μM of both rhod-5N-AM and fura-2-AM during 30 min at room temperature, followed by 30 min wash. Standard extracellular medium contained 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, and 10 mM HEPES, pH 7.4. For experiments with permeabilized cells, standard medium containing 0.5 mM EGTA instead of Ca²⁺ was perfused for 1 min, followed by 1 min of intracellular medium (130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM potassium phosphate, 0.5 mM EGTA, 1 mM ATP, 20 μM ADP, 5 mM L-malate, 5 mM glutamate, 5 mM succinate, 20 mM HEPES, pH 7) containing 100 μM digitonin. Then, intracellular medium without digitonin was perfused for 5 min prior to the experiment. *In situ* calibration of rhod-5N was made in HeLa cells loaded with rhod-5N and permeabilized as above. After permeabilization, cells were perfused with medium containing 130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 4 μM FCCP, 20 mM HEPES, pH 8, and different [Ca²⁺] between 50 μM and 10 mM (see Fig. 1).

2.2. [Ca²⁺]_M measurements with rhod-5N

Single cell fluorescence was excited at 550 nm using a Cairn monochromator (300 ms excitation every 2 s, 10 nm bandwidth) and images of the emitted fluorescence obtained with a 63× objective were collected using a 565DCLP dichroic mirror and a E590LPV2 emission filter (both from Chroma Technology) and recorded by a Hamamatsu ORCA-ER camera. Experiments were performed at room temperature (22 °C). [Ca²⁺]_M was calculated from the calibration as described in Section 3. Simultaneous monitoring of rhod-5N and fura-2 fluorescence was achieved by consecutive excitation at 340, 380 and 550 nm using a Cairn monochromator and a 73100 beamsplitter from Chroma Technology. In these experiments, the fluorescence images were collected with a 40× Fluar objective using a 73101 emission filter from Chroma Technology. To calculate cytosolic [Ca²⁺], single cell fluorescence records obtained at 340 and 380 nm excitation were ratioed and calibrated into [Ca²⁺] values off-line as described before [11], using the Metafluor program (Universal Imaging).

3. Results

Rhod-5N is a very low-Ca²⁺-affinity rhod-2 derivative (in vitro K_d = 320 μM). To estimate the real K_d under physiological conditions inside mitochondria, we have first made an *in situ* intracellular calibration. Cells loaded with the dye were permeabilized and perfused with solutions containing known [Ca²⁺] and FCCP, as described in Section 2, to depolarize mitochondria and equilibrate the [Ca²⁺] in the medium and in the organelle. The upper panel of Fig. 1a shows that addition of each [Ca²⁺] induced a step-like increase in rhod-5N fluorescence, suggesting that under these conditions there is a fast equilibration of the [Ca²⁺] between the medium and the mitochondrial matrix space. Fig. 1b shows a series

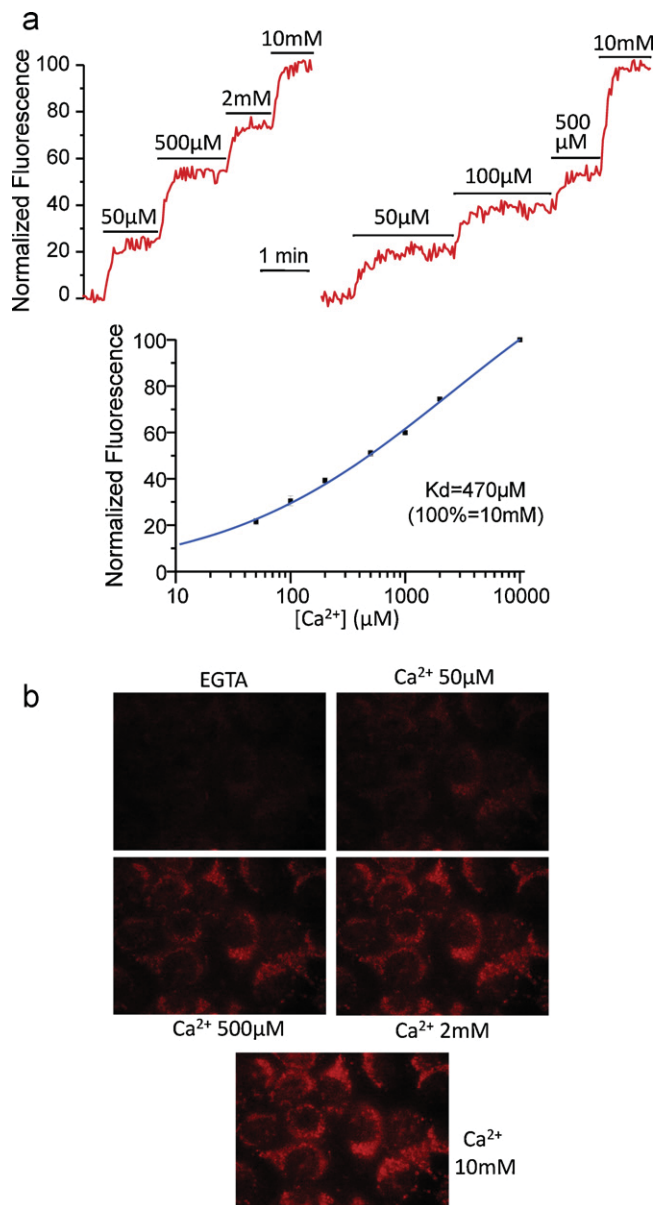


Fig. 1. Intracellular calibration of rhod-5N fluorescence. HeLa cells were loaded with rhod-5N, permeabilized and then perfused with solutions containing 130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 4 μM FCCP, 20 mM HEPES, pH 8, and different [Ca²⁺] between 50 μM and 10 mM, as indicated. (a) Typical normalized records obtained by taking the fluorescence obtained at 10 mM [Ca²⁺] as 100% and the resting fluorescence obtained in EGTA-containing medium as 0%. The mean values obtained at every [Ca²⁺] (from 3 to 6 data at each point) were plotted in the lower panel and the sigmoidal fitting of the data was used to calibrate the rest of the experiments throughout this paper. (b) Images from a typical experiment showing the progressive increase in fluorescence obtained after perfusion of the calibration solutions.

of images corresponding to a typical calibration experiment, to show the changes in fluorescence following perfusion of the calibration solutions. The lower panel of Fig. 1a shows the calibration curve obtained from a series of experiments like those of the upper panel, and the sigmoidal fitting of the data, as corresponds for a typical ligand-binding process. Assuming the fluorescence value obtained at 10 mM [Ca²⁺] as 100%, 50% fluorescence was obtained at 470 μM [Ca²⁺]. In fact, the rhod-5N fluorescence would probably increase still further at [Ca²⁺] above 10 mM, so that the real K_d would be higher, but that range was not considered here. This calibration curve, obtained after sigmoidal fitting of the data, was used throughout the paper to transform fluorescence values into [Ca²⁺],

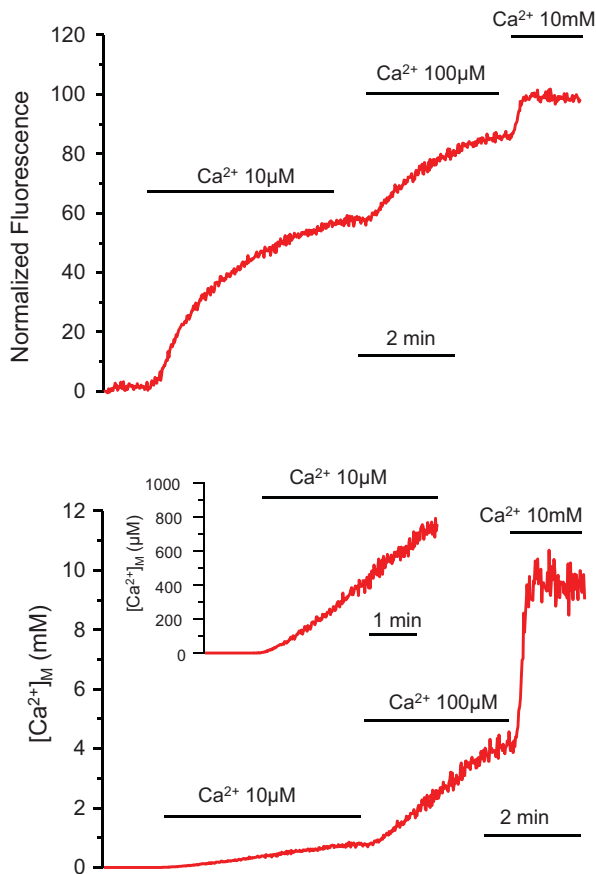


Fig. 2. Calibration of mitochondrial Ca^{2+} uptake in permeabilized cells. HeLa cells were loaded with rhod-5N, permeabilized and then perfused with solutions containing intracellular medium and $10 \mu\text{M}$ or $100 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$, as indicated. At the end of every experiment, a calibration solution containing 10mM $[\text{Ca}^{2+}]$ was always added. The upper panel shows a normalized typical fluorescence record and the lower panel shows the same experiment calibrated into $[\text{Ca}^{2+}]$ values (the inset shows at an expanded scale the effect of the $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer).

after normalization of the fluorescence records using the fluorescence obtained with the 10mM $[\text{Ca}^{2+}]$ medium as 100% and the resting fluorescence as 0%.

We have then studied the effect of perfusing controlled $[\text{Ca}^{2+}]$ in permeabilized HeLa cells on $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ measured with rhod-5N. Fig. 2 shows that perfusion of a $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer containing $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ induced an increase in rhod-5N fluorescence that reached around 60% of the maximum fluorescence within 5 min and stabilized there. Subsequent addition of medium containing $100 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ induced a further increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ reaching nearly 90% of the maximum fluorescence. In the lower panel, the fluorescence data of the upper panel have been calibrated into $[\text{Ca}^{2+}]$ values using the calibration curve of Fig. 1. The inset shows the effect of the perfusion of the $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ buffer at an expanded scale, showing that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ increases up to values close to 1mM , a value consistent with those obtained with low- Ca^{2+} -affinity aequorin under similar conditions [8–10]. Then, the addition of $100 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ to the extramitochondrial space still induced a further increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ up to about 4mM .

Fig. 3a shows that the rate of increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ was dependent on the $[\text{Ca}^{2+}]$ in the perfusion medium. The calibrated values (right panel) show the large difference in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ accumulation obtained at 4, 5, 7 and $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ in the perfusion medium. In panel (B), the rate of Ca^{2+} release from mitochondria was measured by loading first mitochondria with Ca^{2+} and then shifting the perfusion medium to an EGTA-containing Ca^{2+} free medium. Fig. 3b shows

that the rate of Ca^{2+} release from mitochondria was highly dependent on the $[\text{Na}^{+}]$ of the medium. Again this kind of Ca^{2+} -release curves were very similar to those obtained with low- Ca^{2+} -affinity aequorin [10] and show the importance of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger for Ca^{2+} release from mitochondria in HeLa cells. The residual Ca^{2+} release rate observed in Na^{+} -free medium may be attributed to Na^{+} -independent mitochondrial Ca^{2+} -release pathways such as the $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange. Fig. 3c shows that the Ca^{2+} accumulation in mitochondria measured by rhod-5N was also strictly dependent on the presence of a membrane potential in the mitochondria. Addition of the protonophore FCCP after Ca^{2+} -accumulation immediately induced a fast Ca^{2+} release from mitochondria, as previously reported using aequorin [8].

The data above show that rhod-5N is able to measure $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ and provides $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ values and dynamic measurements close to those reported by low- Ca^{2+} -affinity aequorin. We have then used this dye to investigate agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ signaling at the single cell level. Fig. 4 shows the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ transients induced by histamine in single HeLa cells. In order to calibrate the experiments in $[\text{Ca}^{2+}]$, cells were first stimulated with histamine and then permeabilized and perfused with the 10mM Ca^{2+} -containing calibration solution. Experiments were then normalized using that fluorescence value as 100% and the resting fluorescence as 0%, and the calibration curve of Fig. 1 was then applied to obtain absolute values of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$. Fig. 4a shows four single-cell normalized fluorescence traces and the translation into $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ values using the calibration curve, to show the procedure. Fig. 4b, panels A, B, and C, shows the histamine-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ peaks obtained in 11 different cells present in the microscope field. Panel D shows the mean $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ increase of all those cells, and panel E shows the mean of three similar experiments. We can see that there is a significant variability among the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ peak in different cells, ranging between less than $10 \mu\text{M}$ up to more than $60 \mu\text{M}$. The mean value was around $25 \mu\text{M}$, and this value is consistent with our previous data obtained with low- Ca^{2+} -affinity aequorin [12,13]. We have then studied the effect of the stimulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter with the flavonoid kaempferol [13]. Fig. 5 shows that this flavonoid induced a large increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ peaks induced by histamine in single HeLa cells. As in the previous figure, panels A, B and C show single cell data, panel D shows the mean of that experiment and panel E shows the mean of three similar experiments. The single cell data show again a large variability in the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ response among different cells, with the peak ranging between $30 \mu\text{M}$ and $400 \mu\text{M}$. The mean was around $70 \mu\text{M}$, a value again consistent with the previous data we have reported using low- Ca^{2+} -affinity aequorin [13].

We have reported recently that rhod-2 is not able to monitor adequately $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ when repetitive stimulation protocols are used [9]. Unfortunately, the same problem also affects rhod-5N, so that a second stimulation with histamine induced a much smaller response than the first (data not shown). Therefore, this dye should be better used only for short or single-stimulation protocols.

The spectral properties of rhod-2 allow simultaneous recording of its fluorescence and that of fura-2 excited at 340 and 380 nm to monitor cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$. We have used this possibility to compare the cytosolic and mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ peaks at the single cell level. The upper panels of Fig. 6 show a series of single-cell $[\text{Ca}^{2+}]$ peaks obtained in parallel in cytosol and in mitochondria, and the lower panel shows the relationship among the cytosolic and mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ peaks obtained in 23 different cells. The data show that there is considerable dispersion and little correlation among the height of the $[\text{Ca}^{2+}]$ peaks in both compartments. This suggests that the size of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ peak may not only depend on the size of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{C}}$ peak, and additional factors could contribute to modulate mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ uptake.

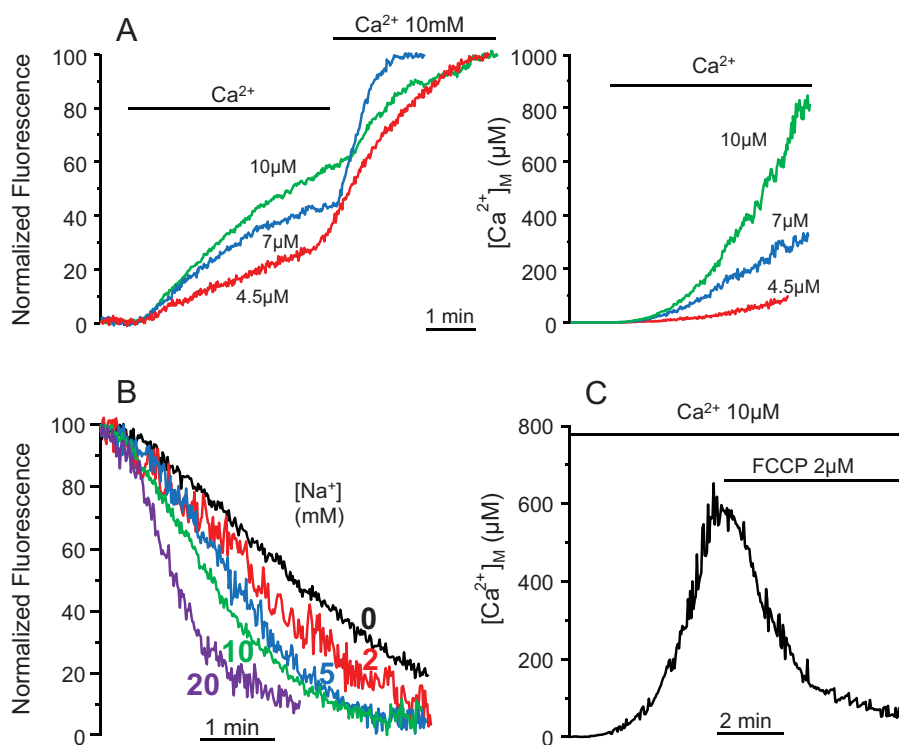


Fig. 3. Dynamics of $[Ca^{2+}]_M$ in mitochondria of permeabilized cells. HeLa cells were loaded with rhod-5N and permeabilized. (a) Cells were then perfused with solutions containing intracellular medium and either 4.5, 7 or 10 μM $[Ca^{2+}]_M$, as indicated. The curves in the left show the normalized fluorescence records and those in the right show the calibrated values. (b) Cells were perfused with a 10 μM $[Ca^{2+}]_M$ buffer and then shifted to an EGTA-containing medium to start Ca^{2+} release in the presence of different $[Na^+]$, as indicated. (c) Cells were perfused with a 10 μM $[Ca^{2+}]_M$ buffer and then 2 μM FCCP was added as indicated.

We have finally studied if rhod-5N could detect subcellular variability in the $[Ca^{2+}]_M$ peaks induced by histamine. For this study we have preferentially used cells with a more elongated shape, so that regions close and far from the nucleus could be easily distinguished. Fig. 7 shows the $[Ca^{2+}]_M$ peaks obtained in 5 subcellular regions of one of the analyzed cells. To maximize fluorescence, the image shown was obtained after perfusion of the 10 mM $[Ca^{2+}]_M$ calibration medium. Unfortunately, the level of rhod-5N loading was not high enough to provide good images of the $[Ca^{2+}]_M$ peak. The non-tubular aspect of mitochondria is due to cell permeabilization and the same images are obtained using cells expressing mitochondrially targeted EGFP (data not shown). It is apparent that the regions close to the nucleus (2 and 3) in this cell generate a higher $[Ca^{2+}]_M$ transient than the rest. We have thus made a more systematic analysis of regions close and far from the nucleus in 10 different cells and we have found that the mean $[Ca^{2+}]_M$ increase in regions close to the nucleus was about twice that obtained in regions far from the nucleus (2.2 ± 0.2 fold, mean \pm S.E., $n = 10$).

4. Discussion

Mitochondrial Ca^{2+} dynamics at the single cell or subcellular level has been mainly studied using high- Ca^{2+} -affinity dyes such as rhod-2 [6,14–16], whose *in situ* Kd for Ca^{2+} binding is around 1 μM , and the maximum $[Ca^{2+}]_M$ values obtained after cell stimulation have been around 2–4 μM . In contrast, the fluorescent protein pericam, which has an apparent intramitochondrial Kd for Ca^{2+} of 11 μM , measured mean $[Ca^{2+}]_M$ values of 10 μM and maximum values well above 50 μM in some subcellular regions [5]. Similarly, a low- Ca^{2+} -affinity cameleon protein provided maximum values of nearly 100 μM for the $[Ca^{2+}]_M$ increase after histamine stimulation of HeLa cells [4], values close to those obtained with the luminescent protein aequorin in cell populations [12,13].

We have recently described that rhod-2 has some difficulties to monitor adequately $[Ca^{2+}]_M$ during repetitive cell stimulation. However, the discrepancy in the size of the initial $[Ca^{2+}]_M$ peak may also be due to the high affinity of the dye. In fact, the lower affinity dye rhod-FF (Kd = 19 μM) has been used in some cases to avoid saturation with Ca^{2+} or to minimize the signal coming from mistargeted cytosolic dye [17,18]. In these papers, although the data were not calibrated in $[Ca^{2+}]_M$ values, it was actually shown that rhod-2 saturated with Ca^{2+} in mitochondria during cell stimulation, while rhod-FF had a better response. The very low Ca^{2+} -affinity dye rhod-5N (in vitro Kd = 320 μM) we use in this paper has been previously used once to study the effect of trains of action potentials on $[Ca^{2+}]_M$ in motor nerve terminals [19]. In that work, cell stimulation induced a very significant increase in rhod-5N fluorescence that nearly doubled the resting fluorescence. However, calibration of the data by the authors led to matrix $[Ca^{2+}]_M$ values of only 1 μM , by using systematically an F_{max}/F_{min} quotient of 200 for rhod-5N fluorescence. In our experiments, the mean F_{max}/F_{min} quotient was 3.3 ± 0.4 (mean \pm S.E., $n = 11$), and was somewhat variable depending on the signal to noise ratio. Thus, we have preferred to calibrate each experiment by measuring the fluorescence of the 10 mM $[Ca^{2+}]_M$ medium at the end of every experiment and then use it to apply the calibration curve of Fig. 1.

In this paper we have investigated the ability of rhod-5N to monitor $[Ca^{2+}]_M$ in intact and permeabilized HeLa cells and we have made an *in situ* calibration of the dye to be able to provide absolute $[Ca^{2+}]_M$ values. According to our *in situ* calibration, the apparent Kd for Ca^{2+} -binding of rhod-5N inside mitochondria was 470 μM taking the fluorescence obtained at 10 mM $[Ca^{2+}]_M$ as the maximum. In fact, the calibration curve suggested that reaching the maximum fluorescence required higher $[Ca^{2+}]_M$, so that the real Kd is probably higher, but that was not further studied because these concentrations are far from the physiological range. The *in situ* Kd obtained

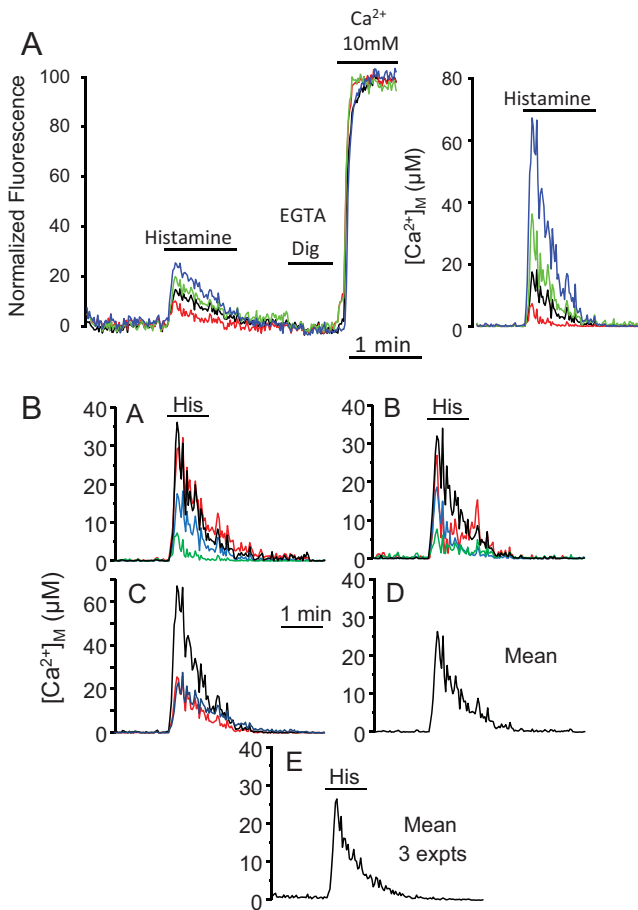


Fig. 4. Histamine-induced $[Ca^{2+}]_M$ peaks in single HeLa cells measured with rhod-5N. 100 μM histamine was added as indicated to rhod-5N loaded HeLa cells. Then, cells were permeabilized and the calibration solution containing 10 mM $[Ca^{2+}]_i$ was added to allow calibration. (a) How the changes in normalized fluorescence translate into $[Ca^{2+}]_M$ values when the calibration curve is applied. (b) A series of calibrated curves obtained in single cells of one experiment (panels A, B and C), the mean of that experiment (panel D) and the mean of 3 similar experiments (panel E).

is therefore higher than the *in vitro* one (320 μM), as occurs also with rhod-2 [6] and with ratiometric pericam [5].

We have then used this calibration to monitor $[Ca^{2+}]_M$ dynamics in experiments performed in intact and permeabilized HeLa cells loaded with rhod-5N. First, in permeabilized cells, the data shown in Figs. 2 and 3 indicate that perfusion of known $[Ca^{2+}]_i$ buffers triggers Ca^{2+} uptake by mitochondria reaching $[Ca^{2+}]_M$ values of hundreds of micromolar, as previously found using low- Ca^{2+} -affinity aequorin [3,8]. Ca^{2+} -release from mitochondria was strongly dependent on the $[Na^+]$ in the medium, as expected for a flux driven mainly by a Na^+/Ca^{2+} exchange mechanism, and collapse of the mitochondrial membrane potential with FCCP induced a rapid release of Ca^{2+} from mitochondria. Both the absolute $[Ca^{2+}]_M$ and the kinetics of all these processes were similar and consistent with those previously found using aequorin [8,10]. Therefore, these experiments show that $[Ca^{2+}]_M$ measurements obtained with low- Ca^{2+} -affinity aequorin and rhod-5N are fully consistent.

The advantage of rhod-5N over aequorin is that it allows making single-cell and subcellular imaging studies. Again here, the magnitude of the histamine-induced $[Ca^{2+}]_M$ peaks was similar on average to those previously measured with aequorin, around 20–30 μM [12,13]. However, the single-cell data showed an important degree of heterogeneity among the peaks obtained in different cells. We initially thought that this variability could be due to a parallel variability in the cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ peaks ($[Ca^{2+}]_c$). However,

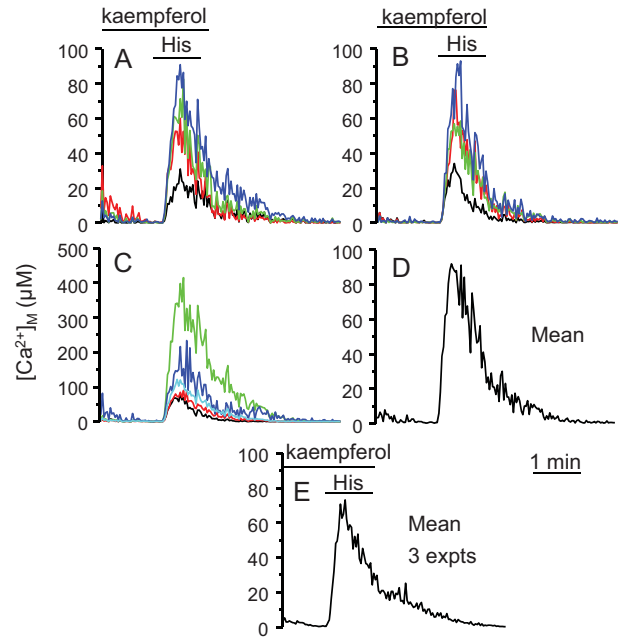


Fig. 5. Histamine-induced $[Ca^{2+}]_M$ peaks in the presence of kaempferol in single HeLa cells measured with rhod-5N. Experimental details as in Fig. 4, but cells were stimulated with histamine in the presence of 10 μM kaempferol, as indicated.

experiments designed to measure simultaneously cytosolic and mitochondrial $[Ca^{2+}]$ (using cells loaded with both fura-2 and rhod-5N) showed that there was little correlation among the cytosolic and mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peaks. There may be several explanations for this finding, either variations in mitochondrial Ca^{2+} uptake ability among different cells or perhaps more probably single-cell variations in the functionality of the close contacts between ER and mitochondria, the mitochondria associated ER membrane or MAM

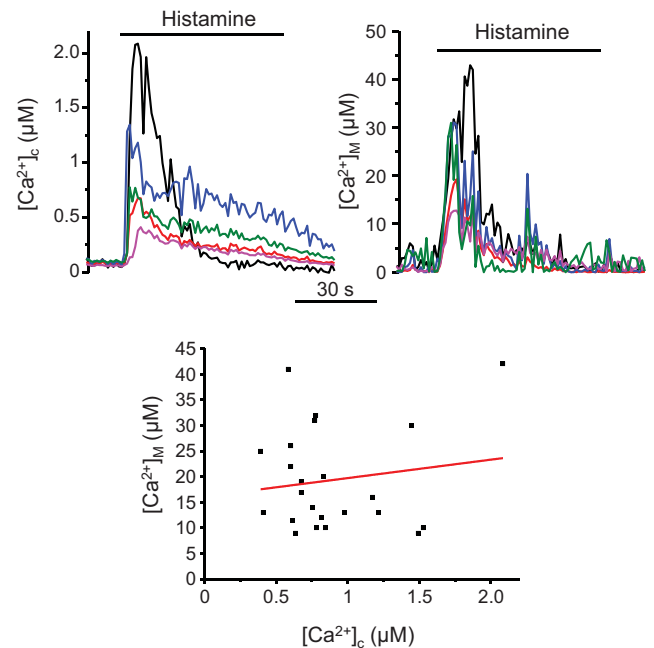


Fig. 6. Parallel measurement of cytosolic and mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peaks in single HeLa cells. HeLa cells loaded with both fura-2 and rhod-5N were imaged as described in Section 2 to monitor both $[Ca^{2+}]_c$ and $[Ca^{2+}]_M$ simultaneously. The upper panel shows the peaks obtained in both compartments in 5 cells from the same experiment. The lower panel shows the relationship among the cytosolic and mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peaks in 23 single cells obtained from 5 similar experiments.

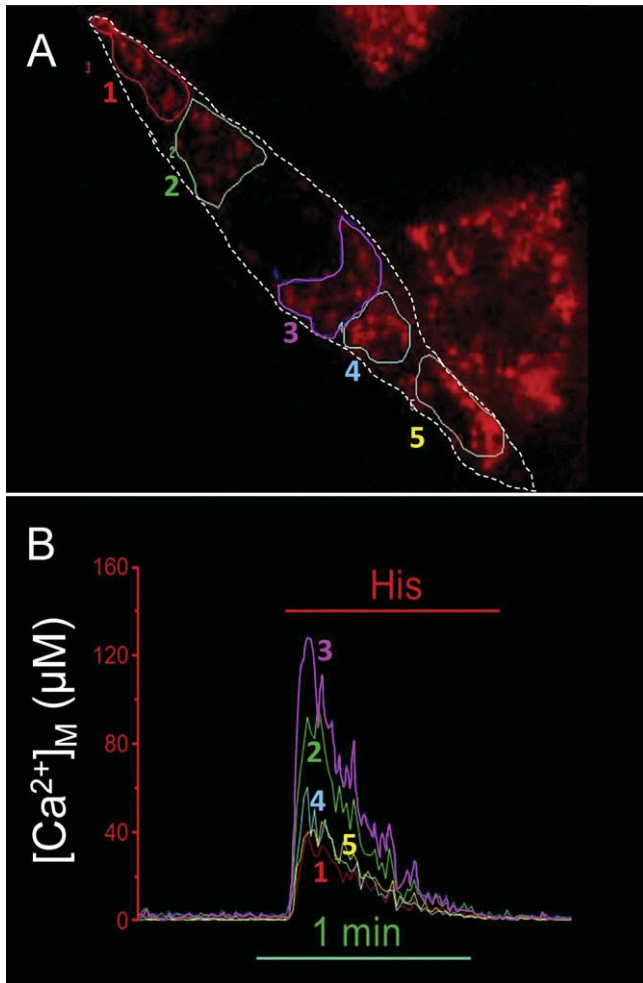


Fig. 7. Histamine-induced $[Ca^{2+}]_M$ peaks in subcellular regions of single HeLa cells measured with rhod-5N. Experiments were performed as indicated in Fig. 4, but monitoring subcellular regions. The upper panel shows the regions studied in a typical cell and the final rhod-5N fluorescence obtained after perfusion of the 10 mM $[Ca^{2+}]_M$ calibration medium. The lower panel shows the histamine-induced $[Ca^{2+}]_M$ peaks obtained in each region of this cell.

[20]. In fact, the Ca^{2+} -transfer between ER and mitochondria has been shown to be critically dependent on the gap between both organelles [16]. If this hypothesis is correct, the size of the $[Ca^{2+}]_M$ peak would depend more on the spatial relationship between mitochondria and endoplasmic reticulum than on the amount of Ca^{2+} actually released.

The variability was still present when the histamine induced $[Ca^{2+}]_M$ peaks were obtained in the presence of the uniporter activator kaempferol, although the mean $[Ca^{2+}]_M$ peak in the presence of kaempferol was about 3–4-fold larger and the range of the peak magnitudes went from 30 to 400 μM . The mean $[Ca^{2+}]_M$ peak values obtained in the presence of kaempferol were again similar to those previously found with aequorin [13]. Finally, the data obtained at the subcellular level show also significant variability in the $[Ca^{2+}]_M$ responses within every single cell. This variability had been already predicted in the initial aequorin studies in HeLa cells, when it was shown that repetitive stimulation induced aequorin consumption only in a selected mitochondrial population [21]. Further evidence for this phenomenon was later obtained in other cells [3] and it has been interpreted on the basis of the presence of local Ca^{2+} microdomains generated in regions of close apposition of mitochondria and ER, or mitochondria and the plasma membrane. Direct evidence for the presence of these cytosolic $[Ca^{2+}]_M$ microdomains

in the vicinity of mitochondria has been recently provided [16,22]. Our data show also that the larger $[Ca^{2+}]_M$ increases occur in cell regions close to the nucleus. This is consistent with the data of Giacomello et al. [22], which also show a larger accumulation of mitochondria-associated Ca^{2+} microdomains close to the nucleus.

In conclusion, we show in this paper that the very low- Ca^{2+} -affinity dye rhod-5N is able to measure the same high $[Ca^{2+}]_M$ values previously obtained using aequorin and provides new data on the behavior of $[Ca^{2+}]_M$ at the single-cell and subcellular level. Therefore, we find that the $[Ca^{2+}]_M$ values obtained with fluorescent dyes and targeted proteins are consistent if the probes have similar Ca^{2+} -affinity. Although rhod-5N still has the same problems reported for rhod-2 during repetitive stimulation [9], it has the advantage of being able to monitor high levels of $[Ca^{2+}]_M$, to obtain single-cell and subcellular resolution, and to allow easy simultaneous measuring of $[Ca^{2+}]_c$ and $[Ca^{2+}]_M$ in single cells.

Conflict of interest

The authors certify that there are no conflicts of interest of any kind regarding the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2008-01871) and from Junta de Castilla y León (GR105). Sergio de la Fuente holds an FPI (Formación de Personal Investigador) fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. We thank Pilar Alvarez for excellent technical assistance.

References

- [1] R. Rizzuto, T. Pozzan, Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences, *Physiol. Rev.* 86 (2006) 369–408.
- [2] G. Szabadkai, M.R. Duchen, Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling, *Physiology* (Bethesda) 23 (2008) 84–94.
- [3] M. Montero, M.T. Alonso, E. Carnicero, I. Cuchillo-Ibañez, A. Albillos, A.G. García, J. García-Sancho, J. Alvarez, Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 57–61.
- [4] S. Arnaudeau, W.L. Kelley, J.V. Walsh Jr, N. Demareux, Mitochondria recycle Ca^{2+} to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 29430–29439.
- [5] L. Filippin, P.J. Magalhaes, G. Di Benedetto, M. Colella, T. Pozzan, Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39224–39234.
- [6] T.J. Collins, P. Lipp, M.J. Berridge, M.D. Bootman, Mitochondrial Ca^{2+} uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca^{2+} signals, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 26411–26420.
- [7] S. Chalmers, D.G. Nicholls, The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 19062–19070.
- [8] L. Vay, E. Hernández-SanMiguel, C.D. Lobatón, A. Moreno, M. Montero, J. Alvarez, Mitochondrial free $[Ca^{2+}]_M$ levels and the permeability transition, *Cell Calcium* 45 (2009) 243–250.
- [9] R.I. Fonteriz, S. de la Fuente, A. Moreno, C.D. Lobatón, M. Montero, J. Alvarez, Monitoring mitochondrial $[Ca^{2+}]_M$ dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin, *Cell Calcium* 48 (2010) 61–69.
- [10] S. de la Fuente, P. Montenegro, R.I. Fonteriz, A. Moreno, C.D. Lobatón, M. Montero, J. Alvarez, The dynamics of mitochondrial Ca^{2+} fluxes, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 1727–1735.
- [11] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [12] M. Montero, C.D. Lobatón, A. Moreno, J. Alvarez, A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190, *FASEB J.* 16 (2002) 1955–1957.
- [13] M. Montero, C.D. Lobatón, E. Hernández-SanMiguel, J. SantoDomingo, L. Vay, A. Moreno, J. Alvarez, Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids, *Biochem. J.* 384 (2004) 19–24.
- [14] E. Boitier, R. Rea, M.R. Duchen, Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca^{2+} waves in rat cortical astrocytes, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 795–808.
- [15] A. Warashina, Mode of mitochondrial Ca^{2+} clearance and its influence on secretory responses in stimulated chromaffin cells, *Cell Calcium* 39 (2006) 35–46.

- [16] G. Csordás, P. Várnai, T. Golenár, S. Roy, G. Purkins, T.G. Schneider, T. Balla, G. Hajnóczky, Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface, *Mol. Cell* 39 (2010) 121–132.
- [17] B. Billups, I.D. Forsythe, Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses, *J. Neurosci.* 22 (2002) 5840–5847.
- [18] J.I.E. Bruce, D.R. Giovannucci, G. Blinder, T.J. Shuttleworth, D.I. Yule, Modulation of $[Ca^{2+}]_i$ signaling dynamics and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12909–12917.
- [19] G. David, J. Talbot, E.F. Barrett, Quantitative estimate of mitochondrial $[Ca^{2+}]$ in stimulated motor nerve terminals, *Cell Calcium* 33 (2003) 197–206.
- [20] T. Hayashi, R. Rizzuto, G. Hajnoczky, T.-P. Su, MAM: more than just a house-keeper, *Trends Cell Biol.* 19 (2009) 81–88.
- [21] R. Rizzuto, C. Bastianutto, M. Brini, M. Murgia, T. Pozzan, Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells, *J. Cell Biol.* 126 (1994) 1183–1194.
- [22] M. Giacomello, I. Drago, M. Bortolozzi, M. Scorzeto, A. Gianelle, P. Pizzo, T. Pozzan, Ca^{2+} hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca^{2+} mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca^{2+} channels, *Mol. Cell* 38 (2010) 280–290.

Mitochondrial free $[Ca^{2+}]$ dynamics measured with a novel low- Ca^{2+} -affinity aequorin probe

Sergio DE LA FUENTE, Rosalba I. FONTERIZ, Pedro J. DE LA CRUZ, Mayte MONTERO and Javier ALVAREZ¹

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramón y Cajal, 7, E-47005 Valladolid, Spain

Mitochondria have a very large capacity to accumulate Ca^{2+} during cell stimulation driven by the mitochondrial membrane potential. Under these conditions, $[Ca^{2+}]_M$ (mitochondrial $[Ca^{2+}]$) may well reach millimolar levels in a few seconds. Measuring the dynamics of $[Ca^{2+}]_M$ during prolonged stimulation has been previously precluded by the high Ca^{2+} affinity of the probes available. We have now developed a mitochondrially targeted double-mutated form of the photoprotein aequorin which is able to measure $[Ca^{2+}]$ in the millimolar range for long periods of time without problems derived from aequorin consumption. We show in the present study that addition of Ca^{2+} to permeabilized HeLa cells triggers an increase in $[Ca^{2+}]_M$ up to a steady state of approximately 2–3 mM in the absence of phosphate and 0.5–

1 mM in the presence of phosphate, suggesting buffering or precipitation of calcium phosphate when the free $[Ca^{2+}]$ reaches 0.5–1 mM. Mitochondrial pH acidification partially re-dissolved these complexes. These millimolar $[Ca^{2+}]_M$ levels were stable for long periods of time provided the mitochondrial membrane potential was not collapsed. Silencing of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter largely reduced the rate of $[Ca^{2+}]_M$ increase, but the final steady-state $[Ca^{2+}]_M$ reached was similar. In intact cells, the new probe allows monitoring of agonist-induced increases of $[Ca^{2+}]_M$ without problems derived from aequorin consumption.

Key words: aequorin, Ca^{2+} , Ca^{2+} affinity, Ca^{2+} dynamics, mitochondrion.

INTRODUCTION

It has already been 20 years since the first measurements of $[Ca^{2+}]_M$ (mitochondrial $[Ca^{2+}]$) were made using targeted recombinant aequorin [1]. The original measurements were made using native aequorin and provided peak $[Ca^{2+}]_M$ values of 2–3 μM during histamine stimulation of HeLa cells [2]. Then, when a mutated form of aequorin (with a lower Ca^{2+} affinity) that was initially developed to measure $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum [3–5] was used to measure $[Ca^{2+}]_M$, we found that the $[Ca^{2+}]_M$ peaks induced by cell stimulation were much higher. In chromaffin cells, stimulation with high K^+ or caffeine triggered transient increases in $[Ca^{2+}]_M$ up to values of approximately 500 μM [6]. In HeLa cells, stimulation with histamine induced $[Ca^{2+}]_M$ peaks of 20–50 μM [7]. Therefore the initial measurements grossly underestimated the real $[Ca^{2+}]_M$ values due to both the Ca^{2+} affinity of the probes used (too high) and the irreversible light emission from aequorin molecules present in high Ca^{2+} locations (too fast aequorin consumption).

The use of mutated aequorin solved these problems only partially, because the Ca^{2+} affinity was still too high, even after reconstitution with synthetic coelenterazine n. The large $[Ca^{2+}]_M$ peaks obtained after stimulation of chromaffin cells could only be measured at room temperature [6], because the Ca^{2+} affinity of the probe at 37 °C was too high to measure such high values. Similarly, studies of $[Ca^{2+}]_M$ dynamics in permeabilized cells [8,9] have shown that perfusion of $[Ca^{2+}]$ buffers triggers increases in $[Ca^{2+}]_M$ in the millimolar range that can hardly be followed using mutated aequorin reconstituted with coelenterazine n, the lowest- Ca^{2+} -affinity aequorin form we presently have. With regard to Ca^{2+} -sensitive dyes, most of the dyes used to measure $[Ca^{2+}]_M$ have a high Ca^{2+} affinity, in the micromolar or submicromolar range. We have previously

described that rhod-5N, a very-low- Ca^{2+} -affinity dye, could be used to monitor $[Ca^{2+}]_M$ in the millimolar range [10]. However, this dye lacks the specificity of targeting, the dynamic range and the sensitivity of aequorin, and has the same problems as rhod-2 in following $[Ca^{2+}]_M$ during repetitive cell stimulations [11]. Therefore we have tried to develop a lower- Ca^{2+} -affinity form of aequorin by introducing a new mutation in the Ca^{2+} -binding sites.

In the present paper we show measurements of $[Ca^{2+}]_M$ in permeabilized HeLa cells obtained with a new double-mutated aequorin form targeted to the mitochondria. This new probe allows prolonged measurements at 37 °C of $[Ca^{2+}]_M$ in the millimolar range, and provides much new information on the dynamics of $[Ca^{2+}]_M$ fluxes.

EXPERIMENTAL

Cell culture and targeted mutated aequorin expression

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin and 100 units/ml streptomycin. The original form of mutated aequorin (119Amut-AEQ) contains an Asp¹¹⁹→Ala mutation in the third EF-hand Ca^{2+} -binding site of aequorin. The double-mutated aequorin used in the present study was obtained by adding an Asn²⁸→Leu mutation in the first EF-hand Ca^{2+} -binding site of aequorin. The mutation was performed using the QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) with the following oligonucleotide: 5'-TTCAATTCCTTGATGTCGACCACCTTGGAAAAATCTCTCTTGACG-3' in a pcDNA 3.1 plasmid containing mitochondrially targeted 119Amut-AEQ (mit-119Amut-AEQ). The mutation also introduces a StyI restriction site which was used for identification. Transfections were carried out using Metafectene (Biontex).

Abbreviations used: BHQ, 2,5-di-(t-butyl)-1,4-hydroquinone; $[Ca^{2+}]_M$, mitochondrial Ca^{2+} ; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazide; MCU, $[Ca^{2+}]_M$ uniporter; RFP, red fluorescent protein; shRNA, short hairpin RNA.

¹ To whom correspondence should be addressed (email jalvarez@ibgm.uva.es).

Generation of an MCU ($[Ca^{2+}]_M$ uniporter)-silenced HeLa cell clone

Human shRNA (short hairpin RNA) constructs made to silence the *CCDC109A* gene (MCU) [12,13] were obtained from Origene (reference TF305607). Constructs also included the RFP (red fluorescent protein) gene to control expression, and were used to make stable silenced clones using puromycin, by following the instructions of the provider. Clones expressing RFP were transfected with mitochondrially targeted aequorin to measure $[Ca^{2+}]_M$ entry and estimate the degree of MCU silencing. Stable clones transfected with a scrambled shRNA cassette were used as a control.

$[Ca^{2+}]_M$ measurements with aequorin

HeLa cells were plated on to 13 mm round coverslips and transfected with the plasmid for the mitochondrially targeted double-mutated aequorin (mit-28,119mut-AEQ). For aequorin reconstitution, HeLa cells were incubated for 1–2 h at room temperature (22°C) in standard medium [145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose and 10 mM Hepes (pH 7.4)] with 2 μ M coelenterazine i. After reconstitution, cells were placed in the perfusion chamber of a purpose-built luminometer. Then standard medium containing 0.5 mM EGTA instead of Ca^{2+} was perfused for 1 min, followed by 1 min of intracellular medium [130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 0–3 mM potassium phosphate, 0.5 mM EGTA, 1 mM ATP, 20 μ M ADP, 5 mM L-malate, 5 mM glutamate, 5 mM succinate and 20 mM Hepes (pH 7)] containing 100 μ M digitonin. Then intracellular medium without digitonin was perfused for 5–10 min, followed by solutions of known $[Ca^{2+}]$, either unbuffered or prepared using HEDTA/ Ca^{2+} / Mg^{2+} mixtures. The temperature was set at 37°C. Calibration of the luminescence data into $[Ca^{2+}]$ was made using an algorithm adjusted to the calibration, as described previously [7,14].

Calibration of mit-28,119mut-AEQ inside mitochondria

HeLa cells expressing mit-28,119mut-AEQ were reconstituted with 2 μ M coelenterazine w or coelenterazine i in the presence of 1 μ M thapsigargin (to avoid any possible interference from the endoplasmic reticulum Ca^{2+} store in the calibration). Then cells were placed in the luminometer, permeabilized as described above and perfused with intracellular medium containing no ATP and no metabolic substrates, 1 mM potassium phosphate, the ionophores ionomycin (1 μ M) and FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazonone) (2 μ M), 5 μ M oligomycin and the SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) inhibitor BHQ [2,5-di-(*t*-butyl)-1,4-hydroquinone] (10 μ M) [pH 8, buffered with Hepes (10 mM)]. In this way, mitochondria become unable to accumulate Ca^{2+} and behave simply as an aequorin container, freely permeable to Ca^{2+} and H^+ , and ready to perform a calibration in the desired conditions. Cells were then perfused under these conditions with the same intracellular medium containing no EGTA and different unbuffered Ca^{2+} concentrations added, from 50 μ M to 10 mM. The relationship between the relative luminescence data (luminescence/total residual luminescence or L/L_{max}) and the corresponding $[Ca^{2+}]$ was then plotted as shown in Figure 1 to obtain the calibration curves. Data were then fitted as shown in the Figure and the curve obtained was then used to calibrate the experiments.

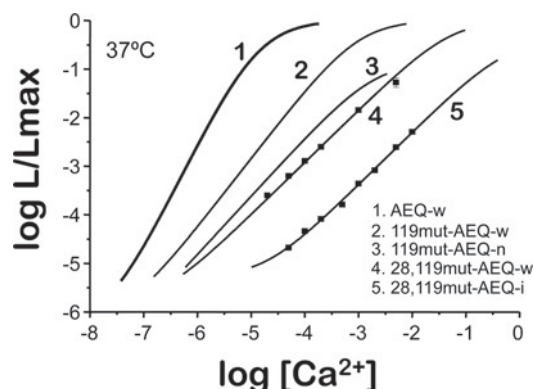


Figure 1 *In situ* calibration of mitochondrially targeted double-mutated aequorin (mit-28,119mut-AEQ)

HeLa cells expressing mit-28,119mut-AEQ were reconstituted with either coelenterazine w (for curve 1) or coelenterazine i (for curve 5) in the presence of 1 μ M thapsigargin. Then, cells were placed in the luminometer, permeabilized with digitonin and perfused with intracellular medium containing no ATP and no metabolic substrates, 1 μ M ionomycin, 2 μ M FCCP, 5 μ M oligomycin and 10 μ M BHQ (pH 8, buffered with Hepes). Cells were then perfused under these conditions with different unbuffered Ca^{2+} concentrations, from 50 μ M to 10 mM. In each experiment, the total amount of luminescence was obtained at the end by allowing full consumption of the probe at 10 mM $[Ca^{2+}]$. Each experimental point was obtained as the ratio between the luminescence obtained at a given $[Ca^{2+}]$ (L) and the total remaining luminescence at that moment (L_{max}). These L/L_{max} values were represented against the $[Ca^{2+}]$. Each point shows the mean \pm S.E.M. ($n = 3-9$). These experimental points were then fitted to the algorithm described previously [7,12]. The Figure also shows for comparison the calibration curves corresponding to native aequorin reconstituted with wild-type coelenterazine (AEQ-w, curve 1 [12]) and 119mut-AEQ reconstituted with either wild-type coelenterazine (119mut-AEQ-w, curve 2 [4]) or coelenterazine n (119mut-AEQ-n, curve 3 [5]). All of the data represented were obtained at 37°C.

MATERIALS

Native coelenterazine and coelenterazine i were obtained from Biotium. CGP37157 was from Tocris. Other reagents were from Sigma or Merck.

RESULTS

The native form of aequorin can measure $[Ca^{2+}]$ levels between 100 nM and approximately 5 μ M (AEQ reconstituted with wild-type coelenterazine, AEQ-w; Figure 1, curve 1). It is therefore the preferred form to measure Ca^{2+} in the cytosol. To measure $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum, a mutation was introduced in the third Ca^{2+} -binding site (Asp¹¹⁹→Ala) [3]. The mutated form reduced the Ca^{2+} affinity by approximately 1 order of magnitude when reconstituted with wild-type coelenterazine (119Amut-AEQ-w; Figure 1, curve 2). That mutation was not enough to measure the high levels of $[Ca^{2+}]$ present in the endoplasmic reticulum, and these measurements required a further reduction in Ca^{2+} affinity, obtained by using the semi-synthetic cofactor coelenterazine n to reconstitute the mutated aequorin (119Amut-AEQ-n [5]; Figure 1, curve 3). This aequorin form has since been used not only to measure $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum, but also to measure the high levels of $[Ca^{2+}]_M$ obtained after cell stimulation or perfusion of Ca^{2+} buffers in permeabilized cells [6,8]. However, even this type of aequorin with low Ca^{2+} affinity was unable to adequately measure the millimolar increases in $[Ca^{2+}]_M$ observed under some circumstances. The problem derives from the irreversible emission of luminescence by aequorin molecules under experimental conditions, that leads to a rapid consumption of the probe when the rate of emission of luminescence goes above certain levels, e.g. above 1 % per s (log

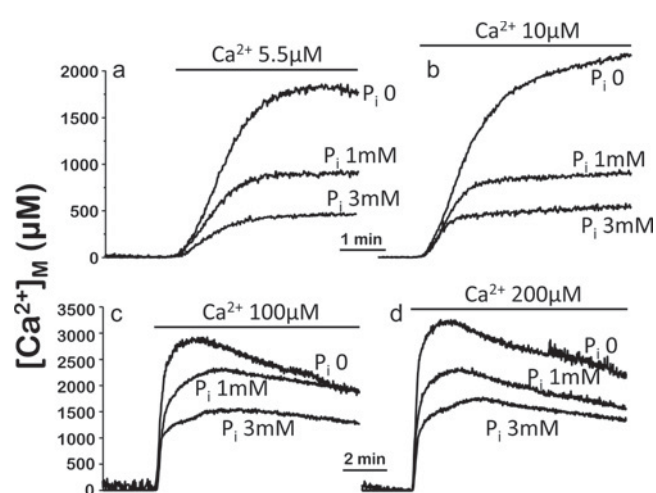


Figure 2 Effect of perfusion of [Ca²⁺] buffers on [Ca²⁺]_M

HeLa cells expressing mit-28,119mut-AEQ were reconstituted with coelenterazine i, permeabilized with digitonin and perfused with intracellular medium containing either 0, 1 or 3 mM phosphate and 4.5–10 μM [Ca²⁺] buffers (as indicated, **a** and **b**) or 100–200 μM unbuffered [Ca²⁺] (**c** and **d**). The experiments shown are representative of three to five similar experiments.

$L/L_{\max} = -2$ in Figure 1). Curve 3 in Figure 1 (119mut-AEQ-n) reaches this level at approximately 200 μM [Ca²⁺], and therefore the measurement of [Ca²⁺] values above that is severely limited. This problem was partially overcome by reducing the temperature to 22°C [15], a manoeuvre that reduces the affinity of aequorin for Ca²⁺, but even in this case the time limitations persist and many physiological phenomena need to be studied at 37°C.

We have now produced a new aequorin type with lower Ca²⁺ affinity by introducing an Asn²⁸→Leu mutation in the first Ca²⁺-binding site of aequorin. This second mutation reduced the Ca²⁺ affinity of aequorin by a further 1 order of magnitude with respect to the single-mutated protein when reconstituted with wild-type coelenterazine (28,119mut-AEQ-w; Figure 1, curve 4). The luminescence yield of this protein was similar to that of the mutated or the native proteins, thus allowing the making of measurements with the same quality. With regard to the Ca²⁺ affinity of this form, it is only slightly lower than that of 119mut-AEQ-n, but could still be reduced further by reconstituting the protein with a semi-synthetic coelenterazine. In this case, reconstitution of 28,119mut-AEQ with coelenterazine n produced an aequorin form with an extremely low Ca²⁺ affinity and poor luminescence yield. However, there is a cofactor with intermediate sensitivity, namely coelenterazine i. Reconstitution of 28,119mut-AEQ with coelenterazine i produced an aequorin form with very good sensitivity in the millimolar range (28,119mut-AEQ-i; Figure 1, curve 5) and good luminescence yield. This aequorin form will be used throughout the present paper to monitor [Ca²⁺]_M at 37°C. Substitution of Asn²⁸ by other amino acids such as isoleucine or histidine also produced active aequorin forms with similar Ca²⁺ affinity (results not shown).

Figure 2 shows the increase in [Ca²⁺]_M induced by the addition of different [Ca²⁺] between 5.5 and 200 μM to permeabilized HeLa cells, and the effect of the level of phosphate in the medium. Phosphate has been described to form insoluble complexes with Ca²⁺ inside mitochondria, thus introducing a significant buffering of mitochondrial free [Ca²⁺] [16]. The experiments performed by perfusing 5.5 and 10 μM [Ca²⁺] buffers show that mitochondria are able to accumulate Ca²⁺ up to levels of approximately 2 mM in the absence of phosphate, but the maximum levels reached

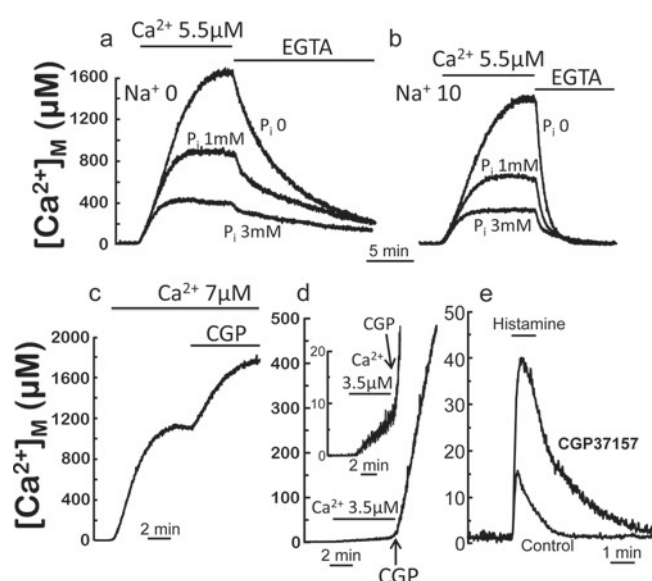


Figure 3 Effect of the activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger on [Ca²⁺]_M dynamics

HeLa cells expressing mit-28,119mut-AEQ were reconstituted with coelenterazine i. In (**a**) and (**b**), cells were permeabilized in the presence of variable phosphate concentrations between 0 and 3 mM and variable [Na⁺] between 0 and 10 mM. In (**c**) and (**d**), cells were permeabilized in the presence of 1 mM phosphate and 10 mM [Na⁺]. Then, 5 min later, [Ca²⁺] buffers at the concentrations indicated in the Figure, or 0.5 mM EGTA where indicated, were perfused in the same medium. In (**e**), HeLa cells expressing mit-28,119mut-AEQ and reconstituted with wild-type coelenterazine were stimulated with 100 μM histamine either in the presence or in the absence of 10 μM CGP37157. The experiments shown are representative of three to five similar experiments.

were much lower in the presence of phosphate. In the presence of 1 mM phosphate, [Ca²⁺]_M stabilized at approximately 800 μM–1 mM, and in the presence of 3 mM phosphate, the steady-state [Ca²⁺]_M reached was below 500 μM. When the [Ca²⁺] in the perfusion solution was increased to 100 or 200 μM, the initial rate of Ca²⁺ increase was much larger, but the maximum level attained was not much higher, approximately 3 mM in the absence of phosphate. In this case, [Ca²⁺]_M started a slow decrease with time after reaching the maximum, perhaps because of partial mitochondrial depolarization. The presence of phosphate also reduced the maximum levels of [Ca²⁺]_M, although it was unable to reduce [Ca²⁺]_M below 1 mM. It is quite striking that mitochondria were able, in all cases, to maintain the high [Ca²⁺]_M levels for long periods of time, with no signs of opening of the permeability transition, which would have rapidly dissipated the Ca²⁺ gradient. This also implies that mitochondria were able to maintain, for a long time, a membrane potential large enough to keep a stable Ca²⁺ gradient of at least 200–400-fold.

Under physiological conditions, Ca²⁺ release from mitochondria in HeLa cells takes place mainly through the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange [9,17]. The new aequorin form allows clear monitoring of the dynamics of this system. The top panels of Figure 3 show the kinetics of Ca²⁺ release from mitochondria in the absence and in the presence of Na⁺. In the absence of Na⁺ (Figure 3a), the steady-state [Ca²⁺]_M reached in the presence of the Ca²⁺ buffer was higher at all of the phosphate concentrations than in the presence of Na⁺ (Figure 3b). When the Ca²⁺ buffer was substituted by Ca²⁺-free medium (EGTA), Ca²⁺ release was much faster in the presence of Na⁺ and reached resting [Ca²⁺]_M values in less than 5 min. Instead, in the absence of Na⁺, [Ca²⁺]_M was still well above resting values after 15 min in Ca²⁺-free medium. The presence of phosphate reduced the rate of Ca²⁺

release, leading to cross-out of the curves obtained at different phosphate concentrations. Thus the curve obtained in the absence of phosphate reached the resting values before the others, in spite of the higher starting point (Figure 3b).

The bottom panels of Figure 3 show the effect of the mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor CGP37157. Figure 3(c) shows that inhibition of this system induced a significant increase in the steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_M$ in the presence of $7 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_M$. This effect is similar to the increase in the steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_M$ obtained in the absence of Na^+ shown in the top panels. Figure 3(d) shows that the effect of this inhibitor was particularly stronger at relatively low cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_M$. In the presence of a $3.5 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_M$ buffer, the rate of $[\text{Ca}^{2+}]_M$ increase was very small or sometimes undetectable (see the inset for a scale expansion). Under these conditions, addition of CGP37157 induced a dramatic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_M$, suggesting that the small rate of increase observed before was due to the balance between two high rates of uptake and release, which nearly compensate. This is confirmed in Figure 3(e), which shows the effect of CGP37157 on the histamine-induced $[\text{Ca}^{2+}]_M$ peak in intact cells. The inhibitor not only reduced the rate of Ca^{2+} release, but it also largely increased the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ peak, indicating that the mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger significantly modulates the height of the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ peaks induced by physiological cell stimulation. The use of the new double-mutated aequorin probe was essential in the present study to obtain these data, as aequorin consumption during the whole $[\text{Ca}^{2+}]_M$ peak was approximately 1% in the absence of the inhibitor and not larger than 5–6% in the presence of CGP37157.

We have then studied the effect of mitochondrial membrane depolarization on $[\text{Ca}^{2+}]_M$. The left-hand panels of Figure 4 show the effect of the addition of the protonophore FCCP when $[\text{Ca}^{2+}]_M$ is at the steady-state in experiments such as those of Figure 2, using a $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_M$ buffer. Treatment with FCCP for 1 min induced a fast release of Ca^{2+} from mitochondria at all of the phosphate concentrations, although the kinetics of the effect was different depending on the phosphate concentration of the medium. The release was much faster and complete in the absence of phosphate, even though the starting $[\text{Ca}^{2+}]_M$ was much higher. In fact, only in the absence of phosphate did $[\text{Ca}^{2+}]_M$ reach the resting levels after FCCP addition, and was then able to partially recover after removal of the protonophore. In the presence of phosphate, instead, Ca^{2+} release was slower, did not reach the original levels and was unable to recover. These effects were also much more evident at 3 mM phosphate than at 1 mM phosphate.

The Ca^{2+} release induced by FCCP takes place not only through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, but also through the Ca^{2+} uniporter working in reverse. In the right-hand panels of Figure 4, the experiments were performed in the absence of Na^+ to block the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. As shown in Figure 3, the steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_M$ reached was higher in all of the cases (note the scale). Then, if FCCP was added in the absence of Ca^{2+} (in the presence of EGTA), Ca^{2+} release was largely inhibited. However, re-addition of the Ca^{2+} buffer paradoxically induced a fast Ca^{2+} release, suggesting that Ca^{2+} activates the Ca^{2+} uniporter and induces Ca^{2+} release due to the collapse of the membrane potential. Figures 4(e) and 4(f) show similar experiments, but performed in the presence of 1 or 3 mM phosphate. It is quite interesting to note that the addition of FCCP in Ca^{2+} -free medium induced a paradoxical increase in $[\text{Ca}^{2+}]_M$, which was not observed in the absence of phosphate. The origin of this increase may rely on the mitochondrial acidification induced by the protonophore FCCP, which could lead to Ca^{2+} release from calcium phosphate complexes. In all of the cases, subsequent addition of a Ca^{2+} buffer induced a fast Ca^{2+} release from the depolarized mitochondria.

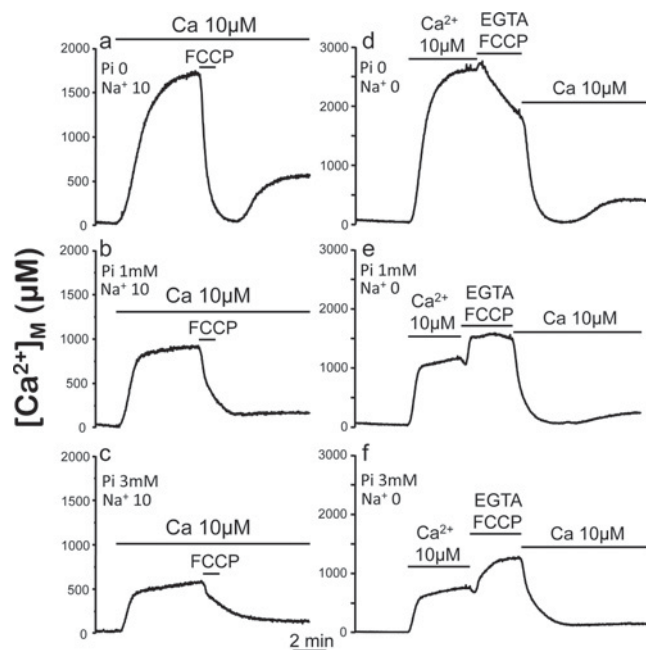


Figure 4 Effect of FCCP on the steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_M$

HeLa cells expressing mit-28,119mut-AEQ were reconstituted with coelenterazine i and permeabilized in the presence of variable phosphate concentrations between 0 and 3 mM and variable $[\text{Na}^+]_M$ between 0 and 10 mM, as indicated. Then, 5 min later, a $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_M$ buffer was perfused to increase $[\text{Ca}^{2+}]_M$. When $[\text{Ca}^{2+}]_M$ was at steady-state, $2 \mu\text{M}$ FCCP was perfused for 1 min either in the same $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_M$ -containing buffer (left-hand panels) or in the presence of 0.5 mM EGTA instead of Ca^{2+} (right-hand panels), as indicated. The experiments shown are representative of four to six similar experiments.

The MCU has been cloned recently [12,13]. In the present study we have used shRNA technology to generate HeLa cell clones with silenced MCU, and we have used the new aequorin form to investigate $[\text{Ca}^{2+}]_M$ dynamics in these cells. Figures 5(a) and 5(b) show that the rate of Ca^{2+} entry into mitochondria was largely reduced. The effect was clearer at relatively low cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_M$ ($4.5 \mu\text{M}$), where the inhibition was approximately 80% and Ca^{2+} entry was very slow in the silenced cells. At higher cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_M$, however, the rate of Ca^{2+} entry into the silenced cells was smaller than in the controls, but enough to reach the same steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_M$. In intact cells, the histamine-induced $[\text{Ca}^{2+}]_M$ peak was also largely reduced in the MCU-silenced cells (Figure 5c). The decreased $[\text{Ca}^{2+}]_M$ entry in the MCU-silenced cells was also clear in the presence of the mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor CGP37157 (Figure 5d). This inhibitor increased the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ peak induced by histamine and slowed the $[\text{Ca}^{2+}]_M$ decay after the peak, but the effect of MCU silencing on Ca^{2+} entry was the same.

DISCUSSION

Measuring $[\text{Ca}^{2+}]_M$ requires probes with a very large dynamic range because $[\text{Ca}^{2+}]_M$ values can go from very low resting values of approximately 100 nM to very high values in the millimolar range during strong cell stimulation or prolonged increases in the cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_M$ [6,8]. In addition, the probes required to measure those high $[\text{Ca}^{2+}]_M$ values need to have very low Ca^{2+} affinity in order to have sensitivity in the millimolar range. In the present study we have developed a new mutated aequorin protein with low Ca^{2+} affinity which is ideal to monitor the dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_M$ in the millimolar range. This probe has allowed us to make a detailed

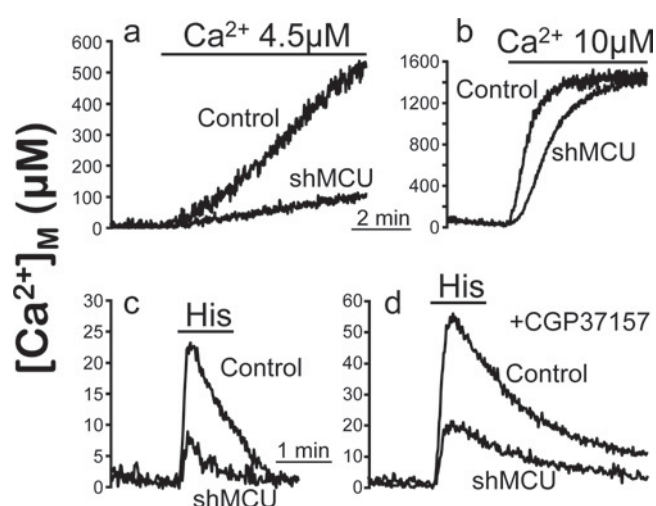


Figure 5 Effect of silencing of the MCU on mitochondrial Ca²⁺ entry

HeLa cell clones expressing either MCU-silencing shRNA (shMCU) or scrambled shRNA (control) were transfected with mit-28,119mut-AEQ and reconstituted with either coelenterazine i (a and b) or wild-type coelenterazine (c and d). In (a) and (b), cells were permeabilized in the absence of phosphate and perfused with Ca²⁺ buffers as indicated. In (c) and (d), cells were stimulated with 100 µM histamine either in the absence (c) or in the presence (d) of 10 µM CGP37157.

study of the dynamics of [Ca²⁺]_M in permeabilized HeLa cells in the presence of [Ca²⁺] buffers and different ionic conditions. The present study raises some questions with regard to the activation of the permeability transition by [Ca²⁺]_M, and also settles some conflicting points with regard to the maximum values of [Ca²⁺]_M and the role of calcium phosphate binding or precipitation to modulate [Ca²⁺]_M values.

The results of the present study show that addition of [Ca²⁺] buffers above 4 µM to mitochondria (in a permeabilized cell preparation) induces an increase in [Ca²⁺]_M that reaches values of 2–3 mM within few minutes when the medium contains no phosphate. The rate of [Ca²⁺]_M increase was proportional to the [Ca²⁺] in the buffer added, but the final steady-state [Ca²⁺]_M reached was only slightly higher for a cytosolic [Ca²⁺] of 200 µM than for one of 4.5 µM. Mitochondrial membrane depolarization induced by Ca²⁺ entry may be responsible for this limitation. We have next investigated the role of phosphate binding in the control of [Ca²⁺]_M. In the presence of phosphate it is known that mitochondria are able to accumulate up to 10–30 times more Ca²⁺ than the classically considered limited loading, which is reversible and does not produce damage to mitochondria [16,18,19]. This large Ca²⁺ accumulation was also accompanied by irreversible damage, morphological changes and calcium phosphate precipitation. In our experiments the steady-state [Ca²⁺]_M reached was smaller in the presence of phosphate. When the [Ca²⁺] in the perfusion buffer was 5.5 or 10 µM, the presence of 1 mM phosphate reduced the steady-state [Ca²⁺]_M reached to 0.8–1 mM, and the presence of 3 mM phosphate reduced it further to below 500 µM (Figure 2, top panels). This suggests that Ca²⁺ binding to phosphate or precipitation of calcium phosphate at these concentrations precludes [Ca²⁺]_M from reaching higher concentrations. When the [Ca²⁺] in the perfusion medium was increased to 100–200 µM, the rate of increase in [Ca²⁺]_M was much higher, and [Ca²⁺]_M increased very rapidly to 1 mM, even in the presence of 1 or 3 mM phosphate (Figure 2, bottom panels). However, from that point the rate of uptake was largely decreased by the presence of phosphate, suggesting that buffering or precipitation started suddenly at

that point. These values are consistent with the reported data on the solubility product of [HPO₄²⁻]_i·[Ca²⁺]_i of approximately 3 mM² [20] and do not require considering more complex calcium phosphate compounds [16,21].

The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger is known to be the main system for Ca²⁺ exit from mitochondria. Our data confirm that Ca²⁺ release was largely accelerated in the presence of Na⁺ at every phosphate concentration. The release, however, was slower in phosphate-containing medium, suggesting that Ca²⁺ may be slowly released from phosphate-binding during [Ca²⁺]_M decrease, thus apparently reducing the rate of release. The same findings were obtained when the Ca²⁺ release was triggered by the protonophore FCCP (Figures 4a–4c). Ca²⁺ release was much faster in the absence of phosphate, and it was slower the higher the phosphate concentration in the medium. It is quite interesting to also note that, when the [Ca²⁺] in the perfusion buffer was 3.5 µM, the rate of [Ca²⁺]_M increase was very small and sometimes undetectable. However, the unidirectional rates of Ca²⁺ entry and release under these conditions were still very high, because inhibition of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger with CGP37157 immediately led to a very fast increase in [Ca²⁺]_M (Figure 3d). Therefore cytosolic [Ca²⁺] between 3 and 4 µM led to a fast turnover of Ca²⁺ in mitochondria which remains mostly undetected because the rates of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ release closely match each other. The importance of this Ca²⁺ release mechanism to shape agonist-induced [Ca²⁺]_M peaks can be appreciated in Figure 3(e).

Mitochondrial membrane depolarization leads to a fast release of the accumulated Ca²⁺ through both the Na⁺/Ca²⁺ exchange system and the Ca²⁺ uniporter working in reverse. As we have described previously [22], this reverse activity of the Ca²⁺ uniporter requires not only mitochondrial depolarization, but also the presence of Ca²⁺ on the cytosolic side of the mitochondria to activate the release. Therefore if the protonophore is added in the absence of Na⁺ (to block Na⁺/Ca²⁺ exchange) and in EGTA-containing medium, both systems are blocked and the release is very slow. This phenomenon generates the paradoxical effect that perfusion of a Ca²⁺-containing medium under these conditions induces a fast Ca²⁺ release from mitochondria. Another paradoxical effect was obtained when FCCP was added in Na⁺- and Ca²⁺-free medium to mitochondria loaded with Ca²⁺ in the presence of phosphate (Figures 4e and 4f). Under these conditions, the protonophore induced a paradoxical increase in [Ca²⁺]_M, which is probably due to the release of Ca²⁺ from the calcium phosphate complexes following mitochondrial acidification.

The use of a HeLa cell clone with silenced MCU has allowed us to test the effect of reducing the rate of Ca²⁺ entry on [Ca²⁺]_M. The results shown in Figure 5 indicate that the maximum levels of 2–3 mM [Ca²⁺] obtained in mitochondria in the absence of phosphate were not limited by MCU saturation, but were most probably consequence of a thermodynamic equilibrium reached after partial mitochondrial membrane depolarization. In intact cells, however, MCU silencing led to a large decrease in the [Ca²⁺]_M peaks induced by histamine stimulation. In this case, the high [Ca²⁺] microdomain induced by Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum is present only for a very short time, so that the reduced Ca²⁺ entry really limits the total amount of Ca²⁺ that can enter into mitochondria.

In summary, the availability of a new double-mutated aequorin form with lower Ca²⁺ affinity allows us to study the dynamics of [Ca²⁺]_M with much greater detail and for much longer experimental times. This has made it possible to obtain novel and detailed information on the levels of [Ca²⁺] reached in mitochondria, the threshold for calcium phosphate binding or

precipitation inside mitochondria, the balance between Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release, or the effect of MCU silencing on $[\text{Ca}^{2+}]_M$ dynamics.

AUTHOR CONTRIBUTION

Sergio de la Fuente was responsible for most of the experimental work. Pedro de la Cruz, Rosalba Fonteriz and Mayte Montero provided additional expertise and laboratory help with most of the experiments. Javier Alvarez directed all of the studies and was primarily responsible for final preparation of the paper before submission, with the assistance of Sergio de la Fuente, Rosalba Fonteriz and Mayte Montero.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pilar Alvarez for excellent technical assistance.

FUNDING

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación [grant numbers BFU2008-01871 and BFU 2011-25763] and from the Junta de Castilla y León [grant numbers VA103A08 and GR105]. Sergio de la Fuente holds an FPI (Formación de Personal Investigador) fellowship from the Spanish Government.

REFERENCES

- Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M. and Pozzan, T. (1992) Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* **358**, 325–327
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T. (1993) Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* **262**, 744–747
- Kendall, J. M., Sala-Newby, G., Ghalaut, V., Dormer, R. L. and Campbell, A. K. (1992) Engineering the Ca^{2+} -activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1091–1097
- Montero, M., Brini, M., Marsault, R., Alvarez, J., Sitia, R., Pozzan, T. and Rizzuto, R. (1995) Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J.* **14**, 5467–5475
- Montero, M., Barrero, M. J. and Alvarez, J. (1997) $[\text{Ca}^{2+}]$ microdomains control agonist-induced Ca^{2+} release in intact HeLa cells. *FASEB J.* **11**, 881–885
- Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibañez, I., Albillos, A., García, A. G., García-Sancho, J. and Alvarez, J. (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nature Cell Biol.* **2**, 57–61
- Montero, M., Lobatón, C. D., Moreno, A. and Alvarez, J. (2002) A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190. *FASEB J.* **16**, 1955–1957
- Vay, L., Hernández-SanMiguel, E., Lobatón, C. D., Moreno, A., Montero, M. and Alvarez, J. (2009) Mitochondrial free $[\text{Ca}^{2+}]$ levels and the permeability transition. *Cell Calcium* **45**, 243–250
- de la Fuente, S., Montenegro, P., Fonteriz, R. I., Moreno, A., Lobatón, C. D., Montero, M. and Alvarez, J. (2010) The dynamics of mitochondrial Ca^{2+} fluxes. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1727–1735
- de la Fuente, S., Fonteriz, R. I., Montero, M. and Alvarez, J. (2012) Dynamics of mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ measured with the low- Ca^{2+} -affinity dye rhod-5N. *Cell Calcium* **51**, 65–71
- Fonteriz, R. I., de la Fuente, S., Moreno, A., Lobatón, C. D., Montero, M. and Alvarez, J. (2010) Monitoring mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium* **48**, 61–69
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I. and Rizzuto, R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 336–340
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L. et al. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341–345
- Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Alvarez, J., Pozzan, T. and Rizzuto, R. (1995) Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). A critical evaluation. *J. Biol. Chem.* **270**, 9896–9903
- Barrero, M. J., Montero, M. and Alvarez, J. (1997) Dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells, a comparative study. *J. Biol. Chem.* **272**, 27694–27699
- Chalmers, S. and Nicholls, D. G. (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**, 19062–19070
- Bernardi, P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79**, 1127–1155
- Lehninger, A. L. (1970) Mitochondria and calcium ion transport. *Biochem. J.* **119**, 129–138
- Gunter, T. E. and Pfeiffer, D. R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* **258**, C755–C786
- Fryer, M. W., Owen, V. J., Lamb, G. D. and Stephenson, D. G. (1995) Effects of creatine phosphate and P_i on Ca^{2+} movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **482**, 123–140
- Nicholls, D. G. (2005) Mitochondria and calcium signalling. *Cell Calcium* **38**, 311–317
- Montero, M., Alonso, M. T., Albillos, A., García-Sancho, J. and Alvarez, J. (2001) Mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mediated by the Ca^{2+} uniporter. *Mol. Biol. Cell* **12**, 63–71

Received 9 March 2012/23 May 2012; accepted 6 June 2012

Published as BJ Immediate Publication 6 June 2012, doi:10.1042/BJ20120423

