

Universidad de Valladolid



Facultad de Medicina

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología.
Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

Regulación de la homeostasis del calcio celular por MCU

Memoria del Trabajo Fin de Máster presentada por:

JÉSSICA ARIAS DEL VAL

Directora: Rosalba I Fonteriz García

Valladolid, 2013



ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	2
I. Homeostasis del calcio celular	2
1. Incremento de la concentración de calcio citosólica	2
1.1. Entrada de calcio desde el exterior celular	2
1.2. Liberación de calcio desde los depósitos intracelulares	2
1.2.1. Receptores de Rianodina (RyRs)	3
1.2.2. Receptores de IP ₃ (IP ₃ Rs)	3
2. Recuperación de los niveles basales de calcio	4
2.1. Bombas de calcio	4
2.1.1. Bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA)	4
2.1.2. Bomba de calcio del Retículo Sarco(endo)plásmico (SERCA)	4
2.2. Intercambiadores de calcio	4
2.2.1. Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ de la membrana plasmática (NCX)	5
2.2.2. Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ /K ⁺ de la membrana plasmática (NCKX)	5
II. Homeostasis del calcio mitocondrial	5
1. Estructura y composición de las mitocondrias	6
2. Papel del Calcio en la mitocondria	6
3. Transporte de calcio en la mitocondria	7
3.1. MICU1 (<i>Mitochondrial calcium uptake 1</i>)	7
3.2. Uniportador de calcio mitocondrial (MCU)	8
3.3. MCUR1 (<i>Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1</i>)	8
3.4. Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial (mNCX)	9
3.5. Intercambiador H ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial (<i>Letm1</i>)	9
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
I. Obtención y Amplificación del plásmido SH-MCU-TRPV1	11
II. Cultivos celulares	12
III. Western Blot	12
IV. Siembra y Transfección de células HeLa	13
V. Composición de las soluciones utilizadas	14
VI. Medidas de Ca ²⁺ con indicadores fluorescentes	15
RESULTADOS	17
I. Obtención del plásmido SH-MCU-TRPV1	17
II. Expresión de MCU en células HeLa	18
III. Medidas de Ca ²⁺ mitocondrial en célula única	19
IV. Medidas de Ca ²⁺ citosólico en célula única	21
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

ABREVIATURAS

ADP - Adenosina difosfato.
 ATP – Adenosina trifosfato.
 $[Ca^{2+}]$ - Concentración de calcio.
 Ca^{2+}_{cyt} - Calcio citosólico.
 Ca^{2+}_{mit} - Calcio mitocondrial.
 CICR – Liberación de calcio inducida por calcio.
 DMEM – Dulbecco's modified Eagles's medium.
 DNA – Ácido desoxirribonucleico.
 EGTA – Ácido etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético.
 e.e.m. – error estándar de la media.
 Fura-2 AM – Derivado hidrofóbico del colorante Fura-2 (Fura-2 acetoximetiléster).
 GPCRs – Receptores acoplados a proteínas G.
 HEDTA – Ácido N-(2-hidroxietil)etilenodiamino-N,N',N'-triacético.
 HRP - Peroxidasa de rábano.
 IP_3 – Inositol-1,4,5-trisfosfato.
 IP_3 R - Receptor de inositol-1,4,5-trisfosfato.
 MEC – Medio externo calcio (1mM).
 MCS – Sitio de clonación múltiple.
 MCU – Uniportador de calcio mitocondrial.
 MME – Membrana mitocondrial externa.
 MMI – Membrana mitocondrial interna.
 mHCX - Intercambiador H^+/Ca^{2+} mitocondrial (Letm1).
 mNCX - Intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial.
 NCX - Intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática.
 NCKX - Intercambiador $Na^+/Ca^{2+}/K^+$ de la membrana plasmática.
 NADH – Dinucleótido de nicotina y adenina.
 PLC – Fosfolipasa C.
 PMCA - ATPasa de Calcio de la membrana plasmática.
 PTP – Poro de transición de permeabilidad.
 RE – Retículo endoplásmico.
 RFP - Proteína Fluorescente Roja.
 RNA - Ácido Ribonucleico
 ROC – Canal de calcio operado por receptor.
 RS – Retículo sarcoplásmico.
 RT – Temperatura ambiente.
 RyR – Receptor de rianodina.
 SDS-PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
 SERCA – ATPasa de Calcio del Retículo Sarco(Endo)plásmico.
shRNA - small hairpin RNA
siRNA – small interfering RNA
 SOC – Canal de calcio operado por depósitos intracelulares.
 TRP – Transient Receptor Potencial.
 u.a. – unidades arbitrarias
 VDAC – Canal de aniones dependiente de voltaje.
 VOC – Canal de calcio operado por voltaje.
 $\Delta\phi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial.

INTRODUCCIÓN

I. Homeostasis del calcio celular

El ión calcio es un mensajero intracelular implicado en diversas funciones celulares, desde la contracción o la secreción, hasta la expresión de genes. Ante un estímulo, la entrada de Ca^{2+} en la célula desde el medio extracelular, o la liberación desde los depósitos intracelulares, provoca un aumento rápido de la concentración citosólica de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), desencadenando una respuesta celular en un periodo breve de tiempo. Después del estímulo, gran parte de este Ca^{2+} se une rápidamente a sistemas de tamponamiento citosólicos, o entra en la mitocondria; y el resto del Ca^{2+} , sale del citoplasma al medio extracelular o entra de nuevo al retículo endoplásmico (RE), para restablecer la situación de reposo. De esta manera, las células son capaces de responder adecuadamente ante nuevos estímulos, sin exceder los límites espaciales y temporales que pueden causar la muerte celular.

1. Incremento de la concentración de calcio citosólica

Las células emplean una variedad de canales de calcio, tanto de la membrana plasmática como del RE, para crear señales de Ca^{2+} (Fig. 1). En condiciones de reposo, estos canales están cerrados, pero en respuesta a un estímulo externo, se abren provocando un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$.

1.1. Entrada de calcio desde el exterior celular

En reposo, la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular es del orden de 1-2 mM, mientras que en el interior de las células, la concentración se mantiene alrededor de 100 nM. Esta diferencia de concentración sumada a la diferencia de potencial de la membrana plasmática, impulsa la entrada de Ca^{2+} al interior celular a favor de gradiente electroquímico, en respuesta a un estímulo. La entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática se lleva a cabo por diferentes canales cuyos nombres indican sus propiedades de activación y desactivación: canales de calcio operados por voltaje (VOC) que se activan en respuesta a una despolarización de la células actuando como transductores de las señales eléctricas (Catterall, 2011); canales de calcio operados por receptor (ROC) que se activan directamente por la unión de un ligando a un receptor (como el receptor nicotínico de acetilcolina), o indirectamente, a través de canales asociados a receptores metabotrópicos (como algunos receptores de glutamato); canales de calcio operados por depósitos intracelulares (SOC) que se activan en respuesta a una disminución del nivel de Ca^{2+} de los depósitos (Wu, 2006; Cahalan, 2009); y canales de la superfamilia TRP (*Transient Receptor Potential*) que se activan por una variedad de factores, como el estrés mecánico, la osmolaridad, la temperatura e incluso por el nivel de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Montell, 2005; Nilius y Owsianik, 2011).

1.2. Liberación de calcio desde los depósitos intracelulares

La principal fuente intracelular de Ca^{2+} es el retículo sarcoplásmico (RS) en el músculo estriado y el retículo endoplasmático (RE) en otros tipos de células. Existen dos grandes familias de canales de liberación de Ca^{2+} intracelular localizados en el retículo

sarco(endo)plásmico (RS/RE), los receptores de rianodina (RyRs) y los receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃Rs) (Fig. 1).

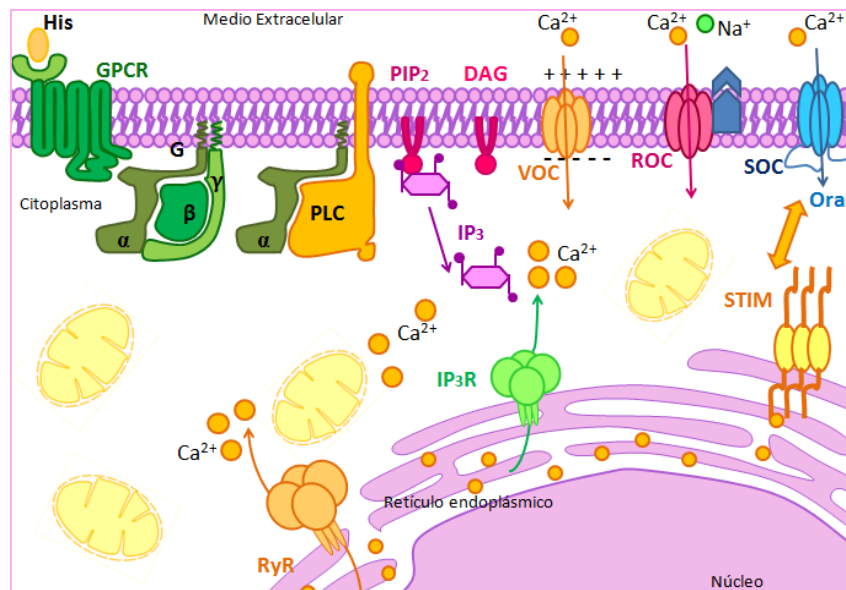


Fig. 1. Estructuras involucradas en la homeostasis celular de calcio. Representación esquemática de los canales de calcio de la membrana plasmática (VOC, ROC, SOC) y de las endomembranas (el receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃R) y el de rianodina (RyR)). PLC (fosfolipasa C), PIP₂ (fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato), DAG (diacilglicerol), GPCR (receptor acoplado a proteína G), G (proteína G), His (histamina).

1.2.1. Receptores de Rianodina (RyRs)

Los RyRs son los canales iónicos más grandes conocidos formados por homotetrámeros que existen como tres isoformas en mamíferos (RyR 1-3). Estas proteínas están reguladas por fosforilación y una variedad de pequeñas proteínas e iones. El Ca²⁺ (citoplásmico y luminal) es un ligando fisiológico que desencadena la apertura de los RyRs, al igual que lo hacen la cafeína, el ATP o la heparina. Los cambios de voltaje a través de la membrana plasmática, también pueden causar la apertura de los RyRs en ausencia de Ca²⁺ extracelular durante el acoplamiento excitación-contracción (Rios y Brum, 1987). En músculo esquelético, los canales Ca_v1.1, interactúan directamente con los RyR1, y en músculo cardíaco, la apertura de los canales Ca_v1.2, da lugar a la entrada de Ca²⁺ al interior celular que activa los RyR2 iniciando la liberación de Ca²⁺ del RS (Lanner *et al.*, 2010) en un proceso que se conoce como *liberación de calcio inducida por calcio* o CICR. Existen una serie de moléculas e iones, como el Mg²⁺, el rojo de rutenio o la rianodina que actúan como inhibidores de estos canales (Meissener, 1986).

1.2.2. Receptores de IP₃ (IP₃Rs)

Los IP₃Rs constituyen una familia de canales de Ca²⁺ localizados predominantemente en el RE de todos los tipos de células, donde permiten la liberación de Ca²⁺ intracelular de los depósitos en respuesta a diversos estímulos que activan la fosfolipasa C (PLC); normalmente a través de receptores acoplados a proteínas G o tirosina quinasa. La PLC hidroliza lípidos de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en la membrana plasmática, generando inositol 1,4,5-

trifosfato (IP₃) (Berridge, 1993). Este segundo mensajero procedente de la cascada de señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) difunde en el citoplasma y se une a su receptor IP₃R modulando la [Ca²⁺]_{cyt} (Fig. 1). El IP₃R no solo está regulado por IP₃, también por otros ligandos, como el Ca²⁺ del citoplasma; así, el IP₃R se induce por IP₃ pero requiere Ca²⁺ como coagonista (Kaftan *et al.*, 1997). Además, el IP₃R integra señales de numerosas moléculas y proteínas incluyendo nucleótidos, quinasas, y fosfatasas, así como proteínas no enzimáticas (Patterson *et al.*, 2004).

2. Recuperación de los niveles basales de calcio

En este proceso participan las ATPasas de Ca²⁺ que bombean Ca²⁺ en contra de gradiente de concentración fuera de la célula o al interior de los depósitos y los intercambiadores que contribuyen con las anteriores a mantener el gradiente de Ca²⁺ (Brini y Carafoli, 2011).

2.1. Bombas de calcio

La energía para sacar Ca²⁺ de la célula, tiene su origen en la hidrólisis de ATP, ya que la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) y la ATPasa de calcio del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) son bombas del transporte activo primario que necesitan estar fosforiladas para transportar Ca²⁺ en contra de gradiente de concentración (Fig. 2). Estas bombas tienen baja capacidad de transporte, pero sus afinidades por Ca²⁺ son altas, por lo que bombean bajos niveles de Ca²⁺ para completar el proceso de recuperación de los niveles de reposo.

2.1.1. Bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA)

La ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática (PMCA) pertenece a la familia de ATPasas de tipo-P y contribuye al mantenimiento de la homeostasis de Ca²⁺ intracelular transportando Ca²⁺ desde el citosol al espacio extracelular. La bomba opera con una estequiometría 1:1; transporta 1 Ca²⁺ por ATP hidrolizado y es electrogénica (intercambia 1 Ca²⁺ por 1 H⁺). Presenta elevada afinidad por calcio, con una K_d de 1 μM en condiciones de máxima activación (Strehler y Treiman, 2004). Existen, además, multitud de agentes que la modulan: se inhibe por vanadato, lantano y caloxina; se activa por fosfolípidos ácidos y calmodulina (Carafoli *et al.*, 1996) y está regulada por quinasas de proteínas y de tirosinas.

2.1.2. Bomba de calcio del Retículo Sarco(Endo)plásmico (SERCA)

La entrada de Ca²⁺ desde el citosol al interior del RE se realiza gracias a una bomba de calcio dependiente de ATP, la SERCA, que al igual que la PMCA, es un miembro de las ATPasas de tipo P. Se localiza en la membrana del RE/RS y bombea Ca²⁺ desde el citosol al interior de los depósitos. Esta bomba es más eficaz que la PMCA, ya que por cada ATP hidrolizado transporta dos iones Ca²⁺ al RE, y es electrogénica (intercambia 2 Ca²⁺ por 2H⁺). Se inhibe por vanadato y lantánidos, pero también, por tapsigargina (Lytton *et al.*, 1991), ácido ciclopiazónico y 2,5-di-tert-butil-benzohidroquinona (siendo reversible en los dos últimos casos); además las proteínas transmembrana, fosfolamban y sarcolipina, son los reguladores mejor estudiados de la SERCA (MacLennan *et al.*, 2003).

2.2. Intercambiadores de calcio

Estas proteínas aprovechan la energía del gradiente electroquímico de Na^+ (generado por la bomba Na^+/K^+ de la membrana plasmática) para sacar Ca^{2+} desde el citosol al medio extracelular (Fig. 2). Los intercambiadores tienen afinidades bajas por Ca^{2+} , pero capacidades de transporte muy altas, lo que les permite eliminar rápidamente grandes cantidades de Ca^{2+} del citosol.

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

Los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX) pertenecen a la familia de proteínas SLC8 y forman parte de una gran superfamilia de proteínas conocidas como transportadores, cuya función principal es controlar los flujos de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Lytton, 2007). En cada ciclo del intercambiador, tres iones Na^+ entran a la célula y un ión Ca^{2+} sale en contra de su gradiente, siendo por tanto, un transporte electrogénico. Estos iones, además de ser transportados, regulan la actividad del intercambiador; por ejemplo, ante una sobrecarga de Na^+ los intercambiadores actúan en reverso, permitiendo la entrada de calcio al citosol (Brini y Carafoli, 2011).

2.2.2. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ de la membrana plasmática (NCKX)

La familia SLC24 de intercambiadores NCKX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$) constituyen la otra familia de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de baja afinidad y elevada capacidad de transporte, descritos originalmente en fotorreceptores; NCKX transporta 1K^+ y 1Ca^{2+} en intercambio por cuatro iones Na^+ (Lytton, 2007; Brini y Carafoli, 2011).

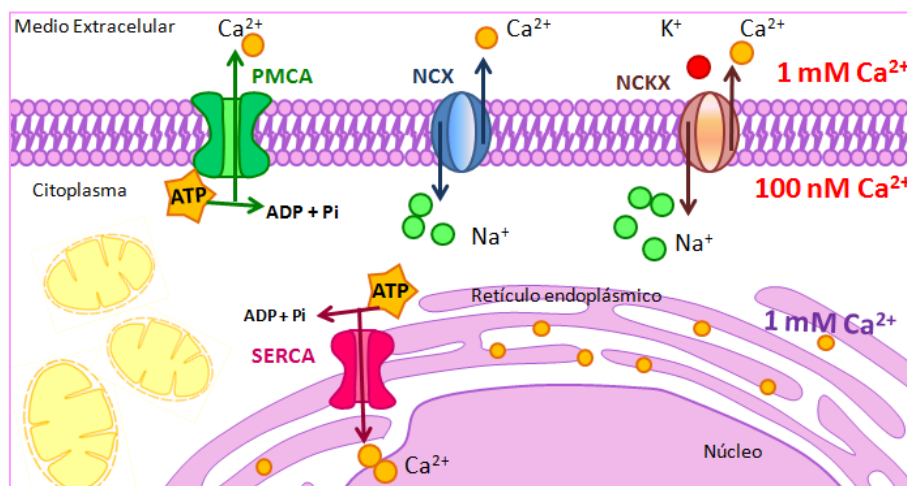


Fig. 2. Estructuras involucradas en la homeostasis celular de calcio. Se representan esquemáticamente las ATPasas de Ca^{2+} (de la membrana plasmática o del retículo (sarco)encoplásmico, PMCA y SERCA) y los intercambiadores (NCX y NCKX).

II. Homeostasis del calcio mitocondrial

En los años 60, Lehninger propuso que las mitocondrias acumulaban grandes cantidades de Ca^{2+} en forma de precipitados de fosfato cálcico, lo que las convertía en el primer orgánulo intracelular identificado como depósito de Ca^{2+} (Lehninger *et al.*, 1963). Sin embargo, dos décadas más tarde se identificó al RE como el principal depósito de Ca^{2+} en la célula. Las

mitocondrias apenas tienen Ca^{2+} en condiciones de reposo; en cambio, durante la estimulación celular, las mitocondrias captan Ca^{2+} desde el citosol llegando a alcanzar niveles de hasta 1 mM en la matriz mitocondrial; cuando la estimulación cesa, liberan el Ca^{2+} acumulado para recuperar los niveles de reposo (de la Fuente *et al.*, 2012).

1. Estructura y composición de las mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos móviles y plásticos, que cambian constantemente de forma, fusionándose unos con otros y formando una red mitocondrial, que se encuentra asociada permanentemente a la membrana del RE mediante conexiones físicas, en las que participan proteínas como IP_3R , Canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), Uniportador de calcio mitocondrial (MCU) o RyR (Rizzuto *et al.*, 1998; Csordás *et al.*, 2010). Las mitocondrias, están limitadas por dos membranas altamente especializadas, que definen dos compartimentos diferentes, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana mitocondrial externa (MME) permite el paso de pequeñas moléculas e iones (< 10 KDa) al espacio intermembrana debido a la abundancia de canales acuosos (porinas) o al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC). Sin embargo, la mayoría de estas moléculas no pueden atravesar la membrana mitocondrial interna (MMI), que es impermeable a los iones. La MMI presenta numerosas invaginaciones o crestas mitocondriales donde se localiza la cadena de transporte de electrones, cuya actividad genera un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$) que, además de conducir el flujo de H^+ a través de la ATP sintasa, permite la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (Rimessi *et al.*, 2008; Rizzuto *et al.*, 2012) (Fig. 3).

2. Papel del Calcio en la mitocondria

La acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria regula funciones intrínsecas en el orgánulo, incluyendo la producción de ATP, por un proceso conocido como fosforilación oxidativa. En la matriz, el Ca^{2+} regula la actividad de la ATP sintasa F_1F_0 y tres deshidrogenasas del ciclo de Krebs. La estimulación de estas últimas, aumenta la disponibilidad de NADH, y por tanto, el flujo de electrones en la cadena respiratoria, ajustando la síntesis de ATP a las necesidades celulares (McCormack y Denton, 1990; Hansford, 1994). Por otro lado, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ junto con la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) favorecen la liberación al citosol de factores mitocondriales, como el citocromo c o el factor inductor de apoptosis (AIF), que forman con las caspasas efectoras una maquinaria macromolecular (apoptosoma) que lleva a las células a la muerte celular apoptótica. La fragmentación e hinchamiento del orgánulo disparan la apertura de un canal mitocondrial de gran conductancia: el poro de transición de permeabilidad (PTP). Esto supone el colapso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\phi_m$) y la muerte celular (Rizzuto *et al.*, 2012; Patron *et al.*, 2013).

Además, las consecuencias de la acumulación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ no están solo limitadas a procesos que ocurren dentro del orgánulo. Las mitocondrias actúan como amortiguadores de microdominios de Ca^{2+} almacenando grandes cantidades del mismo desde el citosol, y evitando la inactivación de los canales que se inhiben por Ca^{2+} en la boca interna del canal (Rizzuto y Pozzan, 2006; Patron *et al.*, 2013).

3. Transporte de calcio en la mitocondria

Bajo condiciones fisiológicas, la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ ocurre por un proceso electrogénico conducido por un potencial eléctrico (-150 a -180mV) a través de la MMI, generado por el bombeo de H^+ de la cadena respiratoria y mediado por un canal iónico selectivo a Ca^{2+} llamado uniportador (Bernardi, 1999) (Fig. 3). En los últimos años, mediante estudios de RNA de interferencia se han identificado componentes integrales de este canal, tales como MICU1 (anteriormente CBARA1), MCU (anteriormente CCDC109A) y MCUR1 (anteriormente CCDC90A). Por otro lado, la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria se contrarresta por los intercambiadores mitocondriales $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) y $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX) (Rimessi *et al.*, 2008; Csordás *et al.*, 2012) (Fig. 3).

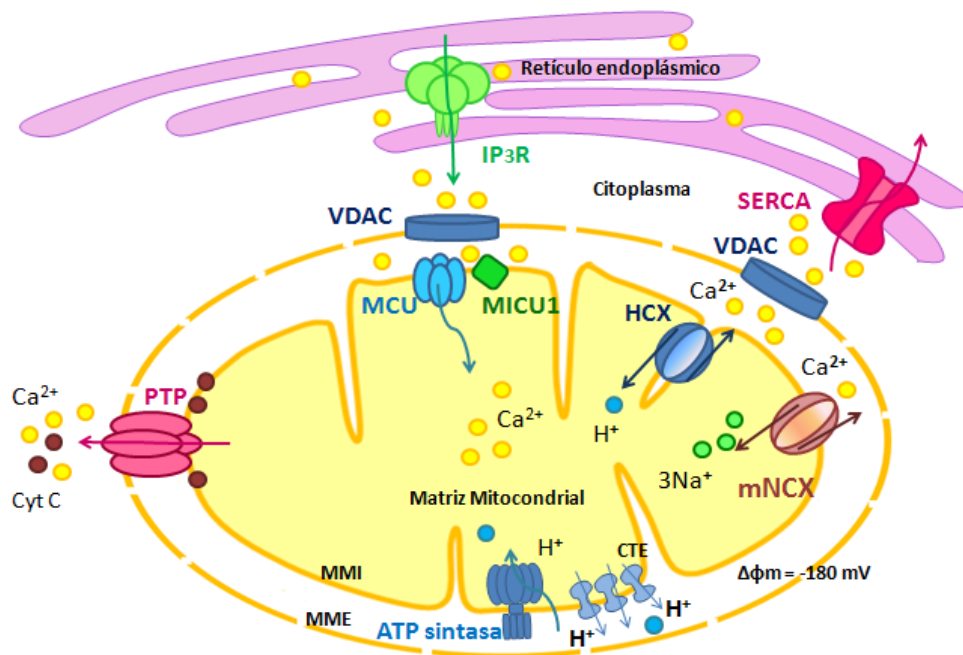


Fig. 3. Captación mitocondrial de calcio. Representación esquemática de los canales y transportadores implicados en la regulación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$. El canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) controla la difusión de Ca^{2+} a través de la MME; a continuación, la acumulación de Ca^{2+} en la matriz, se produce a través del uniportador (MCU), regulado por MICU1. El flujo de salida de Ca^{2+} está mediado por los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) y $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX). El poro de transición de permeabilidad (PTP) permite la liberación de Ca^{2+} , pero su apertura prolongada supone la muerte celular. MME (Membrana mitocondrial externa), MMI (Membrana mitocondrial interna), Cyt C (Citocromo C), CTE (Cadena de transporte de electrones), IP_3R (Receptor de IP_3), RyR (Receptor de rianodina).

3.1. MICU1 (Mitochondrial calcium uptake 1)

MICU1 es una proteína de 54 kDa asociada a la MMI, caracterizada por un único dominio transmembrana y dos manos-EF canónicas que coordinan la unión de Ca^{2+} (Raffaello *et al.*, 2012), y por tanto, son esenciales en la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$. El grupo de Mootha (Perocchi *et al.*, 2010) identificó y purificó dicha proteína, demostrando que mutaciones en los dominios de unión a Ca^{2+} , suponen una importante reducción de la velocidad de captación de Ca^{2+} , de tal manera que MICU1 actúa como un sensor de Ca^{2+} a través de su dos manos-EF. Además, el silenciamiento del gen de MICU1 disminuye la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ sin comprometer la

funcionalidad del orgánulo, puesto que no interfiere con el potencial de membrana o la respiración mitocondrial (Drago *et al.*, 2011).

3.2. Uniportador de calcio mitocondrial (MCU)

En 2004, Kirichok y colaboradores (Kirichok *et al.*, 2004) demostraron mediante *patch clamp* la existencia de un canal iónico altamente selectivo a Ca^{2+} que conduce una corriente rectificadora hacia el interior de la matriz mitocondrial, sensible a los inhibidores de la captación de calcio mitocondrial. Actualmente, se sabe que la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ se realiza a través del uniportador de calcio mitocondrial (MCU) localizado en la MMI.

En 2011 se publicaron dos artículos independientes (Baughman *et al.*, 2011; De Stefani *et al.*, 2011) que identificaban una proteína, el uniportador de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ (MCU), que poseía todas las características propuestas en la década de los 60 para el mecanismo de captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$: baja afinidad por Ca^{2+} , transporte selectivo del catión y sensibilidad al rojo de rutenio. La proteína purificada por ambos grupos tiene un peso molecular de 40 kDa y se expresa de manera ubicua en mamíferos y en la mayoría de eucariotas, presentando una topología subcelular; concretamente se distribuye en la MMI donde oligomeriza formando probablemente multímeros. Además, posee dos hélices transmembrana, TM1 y TM2, que se encuentran unidas por un lazo corto de aminoácidos altamente conservados, denominado motivo 'DIME', implicado en la unión del Ca^{2+} y en la formación del poro del canal. La única discrepancia entre ambos grupos se refiere a la orientación del canal en la membrana mitocondrial: de acuerdo con el grupo de Mootha (Baughman *et al.*, 2011), los dominios C- y N-terminal se encuentran en la matriz mitocondrial y el motivo de unión entre los dos dominios TM, en el espacio intermembrana; según el modelo propuesto por Rizzuto (De Stefani *et al.*, 2011), los dominios C- y N-terminal se orientan hacia el espacio intermembrana y el linker hacia la matriz (Drago *et al.*, 2011; Raffaello *et al.*, 2012).

El grupo de Rizzuto también demostró que la sobreexpresión de MCU incrementa minuciosamente la acumulación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ en células intactas, al mismo tiempo que reduce la amplitud de los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$. Por el contrario, el silenciamiento de MCU reduce la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ tanto en células intactas como permeabilizadas, e incrementa los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$. Mediante ensayos de DNA de rescate, también se comprobó que la transfección con el canal nativo recupera el fenotipo de las células tratadas con *siRNA* y se demostró que la actividad del canal se bloquea por los inhibidores clásicos de MCU, como el rojo de rutenio y La^{3+} . Así mismo, la mitocondria no se ve afectada por el silenciamiento de MCU en cuanto a la forma del orgánulo e interacción con el RE, ni en cuanto a sus funciones (consumo de O_2 o síntesis de ATP) (Baughman *et al.*, 2011; Csordás *et al.*, 2012; Drago *et al.*, 2011).

3.3. MCUR1 (Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1)

Recientemente, se ha identificado una proteína integral de membrana necesaria para la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$, CCDC90A, también denominada MCUR1. Dicha proteína se une a MCU y regula la captación de Ca^{2+} por el uniportador. El silenciamiento de MCUR1 no altera la localización de MCU, pero aminora la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ tanto en células intactas como permeabilizadas, alterando la fosforilación oxidativa. MCUR1 es un componente esencial en la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ y para el mantenimiento de las funciones celulares energéticas (Mallilankaraman *et al.*, 2012).

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

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX), fue identificado por el grupo de Sekler (Palty *et al.*, 2010) mediante técnicas de imagen, demostrando que esta proteína se encuentra en la mitocondria (particularmente en células excitables) y que su sobreexpresión potencia el flujo de Ca^{2+} dependiente de Na^+ , mientras que su silenciamiento bloquea la salida de Ca^{2+} . El transporte estequiométrico de este mecanismo es $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$, pero además, el intercambiador puede sacar Ca^{2+} en ausencia de Na^+ , mediante un intercambio por Li^+ (NCLX) (Palty *et al.*, 2010). Además, mNCX está regulado por varios iones y moléculas como Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} y La^{3+} , por $[\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}]$ del orden de micromolar, así como por un estrecho rango de pH (7.5–7.6). Compuestos análogos de las benzotiazepinas inhiben el flujo de Ca^{2+} dependiente de Na^+ (Hoppe, 2010; Csordás *et al.*, 2012). Sin embargo, el principal inhibidor selectivo del intercambiador es el compuesto CGP-37157, siendo su afinidad al menos 10 veces mayor que la de otros bloqueantes (Palty *et al.*, 2012).

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

El intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, denominado *Letm1*, fue identificado en 2009 por el grupo de Clapham como un homólogo en mamíferos al gen de *Drosophila*, aunque su papel en la regulación del $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ no está claro. *Letm1* (*leucine-zipper-EF hand-containing transmembrane region*) es una proteína localizada en la MMI (principalmente en células no excitables) relacionada previamente con deleciones del brazo corto del cromosoma 4 en un grupo de pacientes con síndrome Wolf–Hirschhorn. *Letm1* cataliza el intercambio electrogénico de Ca^{2+} por H^+ en una estequiometría 1:1 (Santo-Domingo y Demareaux, 2010). Se ha demostrado además, que el silenciamiento de *Letm1* reduce la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$, el bombeo de H^+ y la producción de ATP, y que está regulado por rojo de rutenio y CGP-37157 (Jiang *et al.*, 2009).

OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto consiste en estudiar la modulación por las mitocondrias de la dinámica del calcio celular, determinando cómo afecta el silenciamiento del uniportador de calcio mitocondrial (MCU) a los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ y a los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$, medidos con colorantes o proteínas fluorescentes .

Los objetivos concretos que nos hemos propuesto en este trabajo son los siguientes:

- ✓ Obtener el plásmido que codifica para el *shRNA* de MCU, SH-MCU-TRPV1, como herramienta para silenciar la expresión del uniportador mitocondrial, y con el fin de utilizarlo en estudios de imagen de calcio en célula única.
- ✓ Determinar cómo afecta el silenciamiento del uniportador a los niveles de expresión de la proteína MCU en células HeLa, mediante la transfección transitoria de las mismas con el plásmido previamente obtenido.
- ✓ Estudiar el efecto de silenciar MCU en células HeLa permeabilizadas sobre la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ para ahondar en el mecanismo de captación de Ca^{2+} por las mitocondrias.
- ✓ Estudiar en células HeLa intactas, el efecto de silenciar de forma transitoria MCU, sobre la magnitud de los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ y $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$, inducidos por histamina.
- ✓ Determinar si los mismos efectos se reproducen en clones de células HeLa con MCU silenciado de forma estable.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Obtención y Amplificación del plásmido SH-MCU-TRPV1

El plásmido SH-MCU-TRPV1 se obtiene a partir de los plásmidos RC217653 y pRFP-C-RS MCU Human *shRNA* (OriGene Technologies, Inc) (Fig. 4).

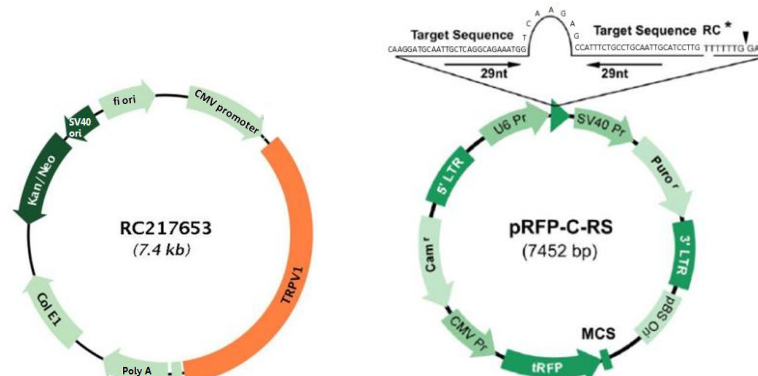


Fig. 4. Plásmidos RC217653 y pRFP-C-RS MCU Human *shRNA*. Esquema representativo de los mapas genómicos de los plásmidos utilizados para la obtención del vector de interés.

El RC217653 es un plásmido de 7,4 kb diseñado para la expresión de proteínas con el extremo carboxílico marcado con Myc-DDK en células de mamíferos, que permite subclonar secuencias de interés desde un vector a otro, mediante digestión, ligación y selección mediante resistencia a ampicilina. El elemento a destacar del vector RC217653, en relación a este trabajo, es *TRPV1* (Fig. 4). La proteína codificada por este último gen, es un receptor de capsaicina y un canal catiónico no selectivo que está relacionado estructuralmente con miembros de la familia TRP. En este caso, *TRPV1* se utiliza como control positivo para seleccionar las células que han incorporado el plásmido de interés.

El plásmido que contiene el *small hairpin RNA (shRNA)* de MCU, pRFP-C-RS *shMCU*, es un plásmido del tipo pRS *shRNA*. Estos vectores de expresión tienen la característica de que permiten tanto transfecciones estables como transitorias, y están diseñados para el estudio de silenciamiento de genes a largo plazo. El plásmido pRFP-C-RS contiene las secuencias 5' y 3' LTRs del virus de la leucemia murina (MMLV) para el empaquetamiento en partículas retrovirales. Estas secuencias flanquean los genes de resistencia a puomicina y el promotor U6 de la polimerasa III para la expresión del *shRNA*. Además, también contiene genes de resistencia a Cloranfenicol para la selección de células transformadas. La secuencia para la expresión de *shRNAs* consta de 29 nucleótidos específicos de un gen diana, y su secuencia reversa complementaria, separadas por un lazo de 7 nucleótidos, todo bajo el control del promotor humano U6. Este plásmido contiene la secuencia CAAGGATGCAATTGCTCAGGCAGAAATGG para la expresión de *shMCU* (Fig. 4). El vector pRFP-C-RS también contiene el promotor de citomegalovirus humano (pCMV) para la expresión del gen *tRFP*, que codifica la proteína fluorescente roja.

Los plásmidos RC217653 y pRFP-C-RS *shMCU* se digieren utilizando las enzimas de restricción PmeI y SnaBI (BioLabs) en digestiones independientes siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se preparan dos geles de agarosa Low Melt Point (Bio-Rad) al 1% (p/v) en tampón TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA, pH 8,4 de Bio-Rad). Con el objeto de recuperar el DNA del vector y del inserto, de los fragmentos del gel, se

procede a la extracción y purificación de los mismos utilizando el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean Up System” de Promega.

La ligación de ambos fragmentos de DNA se realiza (utilizando la enzima DNA Ligasa T4 de BioLabs) en función de las concentraciones de inserto TRPV1 y vector SH-MCU, medidas en NanoDrop. Se preparan dos ligaciones en proporciones 3:1 y 5:1 siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, el plásmido obtenido se clona en cepas bacterianas competentes de *E. coli DH5α* (tal como se indica en el protocolo proporcionado por Invitrogen). Seguidamente, se escogen 6 colonias individuales que se siembran en medio líquido suplementado con Cloranfenicol (34 µg/ml) (Sigma), de acuerdo a la resistencia que confiere el nuevo plásmido, SH-MCU-TRPV1, y se extrae el DNA del mismo, mediante el kit “Quantum Prep® Plasmid Miniprep” (BioRad).

Se comprueba qué colonias se han transformado con el plásmido de interés (Fig. 5), mediante la digestión del DNA con las enzimas PmeI y SnaBI. Dichas colonias se amplifican en medio líquido, y se extrae el DNA plasmídico mediante el kit comercial “Quantum Prep® Plasmid Midiprep” (BioRad). Una vez obtenido, se mide su concentración en NanoDrop y se mantiene a -20°C hasta su utilización.

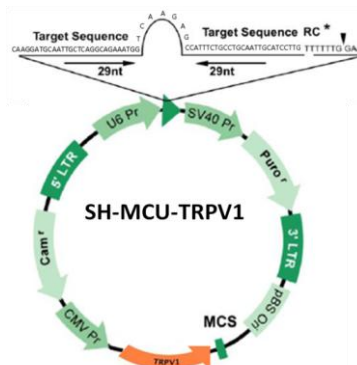


Fig. 5. Plásmido SH-MCU-TRPV1. Esquema del plásmido obtenido por técnicas de biología molecular adecuado para estudios de silenciamiento del uniportador mitocondrial (MCU).

II. Cultivos celulares

Todos los experimentos de este trabajo se realizaron en la línea celular establecida HeLa, disponible en el laboratorio. Las células se cultivan en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de baja glucosa (1mg/ml), suplementado con un 5% de Suero Fetal Bovino (FBS) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (100 UI/ml) (todos los materiales de Gibco). Las células crecen en monocapa adherente sobre frascos de cultivo de 25 cm² en un incubador a 37°C con una atmósfera de 10% de CO₂.

III. Western Blot

Para los experimentos de Western Blot se siembran 1x10⁶ células HeLa sobre frascos de cultivo (25 cm²) y se mantienen en un incubador a 37°C en atmósfera de 10% de CO₂. Transcurridas 24 horas, se transfectan con el plásmido obtenido previamente, SH-MCU-TRPV1, o con el plásmido *Scrambled*, utilizando el método de transfección química, Metafectene® Pro (Biontix Laboratories GmbH). El vector *Scrambled*, obtenido en paralelo en nuestro laboratorio, contiene un *small hairpin RNA* no efectivo frente a MCU, por lo que

se utiliza como control negativo de silenciamiento; además, en dicho vector, también se ha sustituido la RFP por TRPV1. La solución de transfección contiene por cada frasco 600 µl de medio DMEM sin suero ni antibióticos, 18 µl de Metafectene Pro, 6 µg de pRS (*Scrambled* o SH-MCU-TRPV1). A las 72 horas, se extraen las proteínas solubilizadas en tampón de lisis RIPA (Tabla 1) y se congelan a -80°C hasta su utilización.

NaCl	Tris-HCl pH 7.4	SDS	Ác. deoxicólico	Nonidet P-40	Inhibidores de proteasas	
					Proteasa de serina, orto-vanadato sódico	Pepstatina, leupeptina, aprotinina e inhibidor de tripsina
150 mM	10 mM	0,1%	0,5%	1%	100 mM	1mg/ml

Tabla 1. Composición del tampón de lisis RIPA para la extracción de proteínas.

Se cuantifica mediante el método Bradford la concentración de proteínas obtenida de cada frasco y se cargan 50 µg de proteínas por pocillo. La electroforesis SDS-PAGE se realiza a 190 V en geles de poliacrilamida al 10%. A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF (BioRad), mediante el sistema de transferencia en semiseco de BioRad (250 mA durante 30 minutos). Seguidamente, la membrana se incuba con los anticuerpos especificados en la Tabla 2.

Anticuerpo		Dilución	Casa Comercial	Incubación
α-CCDC109A (obtenido en conejo)	primario	1 : 600	Epitomics	1 hora RT
α-IgG de conejo conjugada con HRP	secundario	1 : 4000	Amersham Biosciences	1 hora RT

Anticuerpo (control de carga)		Dilución	Casa Comercial	Incubación
α-actina Ab-5 (obtenido en ratón)	primario	1 : 10000	BD Biosciences	1 hora RT
α-IgG de ratón conjugada con HRP	secundario	1 : 5000	Amersham Biosciences	1 hora RT

Tabla 2. Características de los anticuerpos utilizados en el Western Blot para la detección de MCU. Se muestra el tipo de anticuerpo, la dilución utilizada, la casa comercial de la que se ha obtenido y las condiciones de incubación, en cada caso.

El revelado de la membrana se realiza mediante un sistema de detección por quimioluminiscencia, Pierce®ECL Western Blotting Substrate (BioRad). La densitometría de cada banda se calcula con el programa Quantity One de BioRad, normalizando los valores con sus correspondientes bandas de β-actina. Dichos valores se analizan estadísticamente mediante el test ANOVA utilizando el Software Origin 8.5.

IV. Siembra y Transfección de células HeLa

Para realizar los experimentos de fluorescencia, las células HeLa *Wild Type* se siembran sobre cristales estériles de 12 mm de diámetro a una densidad de 7×10^5 células/pocillo. Las

células se mantienen en medio de cultivo DMEM (5% de FBS y 1% de Penicilina/Estreptomicina) en incubador a 37°C y 10% de CO₂; a las 24 horas, se transfectan con el plásmido obtenido previamente, SH-MCU-TRPV1, o con el plásmido *Scrambled*. Con el fin de obtener una eficiencia óptima de transfección, la relación DNA/Metafectene empleada es, en este caso, de 0.5 µg DNA/2 µl Metafectene y por cristal, tal y como se indica en el Protocolo proporcionado por Biontex.

También se realizan transfecciones dobles (cotransfecciones) de pcDNA3.1 con el constructo 2-mito-pericam que contiene dos señales de direccionamiento a la mitocondria (disponible en el laboratorio) y los plásmidos *Scrambled* o SH-MCU-TRPV1, en células HeLa. La solución de cotransfección contiene por cada pocillo 2 µl de Metafectene, 0,2 µg de pcDNA3.1 y 0,8 µg de pRS con el *shrRNA* correspondiente para cada experimento.

V. Composición de las soluciones utilizadas

Para los experimentos de imagen de calcio, tanto con Fura-2 AM como con Pericam, se necesitan diferentes medios que se especifican a continuación (Tabla 3, 4):

	Medio Externo Ca ²⁺ 1mM	Medio Externo EGTA 0.5 mM
NaCl	145 mM	145 mM
KCl	5 mM	5 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM
Glucosa	10 mM	10 mM
Hepes	10 mM	10 mM
CaCl ₂	1 mM	-
EGTA	-	0.5 mM

Tabla 3. Composición de los medios externos utilizados en los experimentos de imagen de Ca²⁺. El pH de estos medios se ajusta a 7.4 con NaOH.

	Medio Interno EGTA 0.5 mM (permeabilización)	Medio Interno EGTA 0.5 mM	Medio Interno HEDTA 5 mM
KCl	120 mM	120 mM	120 mM
NaCl	10 mM	10 mM	10 mM
H ₂ KPO ₄	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES	20 mM	20 mM	20 mM
succinato	5 mM	5 mM	5 mM
glutamato	5 mM	5 mM	5 mM
malato	5 mM	5 mM	5 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM	6.5 mM
EGTA	0.5 mM	0.5 mM	-
ATP	-	1 mM	1 mM
ADP	-	20 µM	20 µM
HEDTA	-	-	5 mM

Tabla 4. Composición de los medios internos utilizados en los experimentos de imagen de Ca²⁺. El pH de estos medios se ajusta a 7.0 con KOH.

Además, se preparan distintas soluciones, a partir de los medios anteriores:

- Histamina 100 μM en Medio Externo Ca^{2+} 1 mM.
- Capsaicina 1 μM en Medio Externo Ca^{2+} 1 mM.
- Digitonina 100 μM en Medio Interno EGTA de permeabilización.
- Ca^{2+} 4.5 μM : 270 μM CaCl_2 , 0.6 mM MgCl_2 en Medio Interno HEDTA.

Todos los compuestos suministrados por Sigma o Merk.

VI. Medidas de Ca^{2+} con indicadores fluorescentes

Las medidas de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ y $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ se realizan en un microscopio invertido de fluorescencia. Para ello, las células, se montan sobre la cámara del microscopio (Zeiss Axiovert 200) con perfusión continua a la temperatura adecuada en función del experimento (utilizando un calentador "on-line" de Harvard Apparatus), controlando el paso de las soluciones mediante un sistema de electroválvulas.

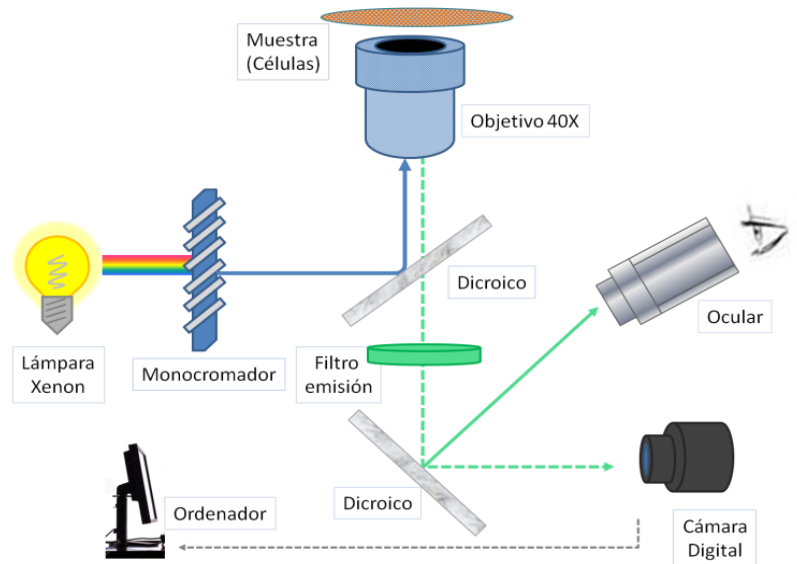


Fig. 6. Equipo de imagen. La luz procedente de la lámpara de Xenón atraviesa el monocromador y se refleja sobre un espejo dicroico excitando la fluorescencia de las células que se encuentran sobre la cámara de perfusión del microscopio. La luz emitida por las células atraviesa el dicroico y el filtro de emisión, y finalmente se graba en una cámara digital. Los registros se procesan mediante el software Imaging Workbench 6.0.

En cuanto a la óptica del equipo (Fig. 6), que se puso a punto para realizar los experimentos de imagen de Ca^{2+} , el microscopio Zeiss Axiovert 200 dispone de una lámpara de Xenón (como fuente de iluminación) cuyo rango de luz emitida se corresponde con el espectro continuo. La muestra se ilumina con una banda específica de longitudes de onda, que incluya aquella que es capaz de excitar la fluorescencia del indicador de Ca^{2+} utilizado. Esto se consigue mediante un monocromador de Cairn Optoscan, que permite además de una iluminación rápida y flexible, el control tanto de la longitud de onda central como del ancho de banda de manera automatizada, con un tiempo de resolución de milisegundos. Las longitudes de onda que atraviesan el monocromador llegan hasta la superficie de un espejo dicroico, que refleja la luz en ángulo recto iluminando las células con una luz muy intensa. La muestra que es excitada solo por su superficie, emite una luz esférica que pasa a través del espejo dicroico y atraviesa un filtro de emisión (específico para cada colorante), que bloquea

las longitudes de onda no deseadas. Finalmente, la luz incide sobre un segundo espejo dicróico, que permite reflejar la luz sobre el ocular, para que llegue hasta los ojos del observador, o hacia una cámara digital donde será capturada. Las imágenes de la fluorescencia emitida se obtienen con un objetivo de 40X y los registros en célula única se realizan con el programa Imaging Workbench 6.0.

Las medidas de Ca^{2+}_{mit} se realizan con la proteína fluorescente Pericam, que es un indicador de calcio codificado genéticamente, que combina una proteína que emite luz, con un elemento de respuesta a Ca^{2+} : la proteína fluorescente verde permutada (cpGFP) fusionada a la calmodulina (CaM) y su péptido diana, M13 (Nagai *et al.*, 2001). Esta proteína quimérica, es fluorescente y sus propiedades espectrales cambian reversiblemente por la unión de Ca^{2+} , probablemente debido a que la interacción entre la CaM y M13 (tras la unión del Ca^{2+} a la CaM) altera el ambiente circundante del cromóforo (Rudolf *et al.*, 2003).

Las células HeLa se siembran sobre cristales de 12 mm de diámetro y se cotransfectan con los plásmidos correspondientes (Pericam dirigido a la mitocondria y los *shRNAs* de MCU); éstas se usan a las 72 horas para realizar los experimentos correspondientes, utilizando un dicróico de 505 nm y un filtro de emisión de 535 nm; y a una temperatura de 22°C (puesto que a temperaturas superiores la fluorescencia del Pericam sufre fluctuaciones). La fluorescencia de la proteína se excita a 415 nm y 485 nm (200-300 ms de excitación cada 2 s) y se registra la fluorescencia emitida a 530 nm.

Para medir Ca^{2+}_{cyt} libre, se utiliza el colorante fluorescente Fura-2, un indicador de Ca^{2+} que se excita con luz UV (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Se utilizan derivados acetoximetil éster del Fura-2 (Fura-2 AM) que permiten la difusión a través de la membrana plasmática y se disipan dentro de la célula. Las esterasas de la célula transforman el derivado AM en Fura-2 ácido adecuado para medir Ca^{2+}_{cyt} . La molécula de Fura-2 es un quelante de alta afinidad para Ca^{2+} que contiene restos aromáticos que le confieren propiedades fluorescentes, de manera que la unión del Ca^{2+} modifica su espectro de excitación.

Las células HeLa transfectadas con los plásmidos de interés (*Scrambled* o SH-MCU-TRPV1) se utilizan a las 72 horas, en los experimentos de imagen de Ca^{2+}_{cyt} . Para ello, se cargan con Fura-2 AM (2 μ M) mediante incubación en medio estándar, MEC, durante 50 minutos a RT, y a continuación, se lavan 10 minutos en MEC, estando disponibles para los experimentos, que en este caso se realizan a una temperatura de 37°C, con un dicróico de 400 nm y un filtro de emisión de 510 nm. La fluorescencia del Fura-2 se excita con luz a 340 y 380 nm y se registra la fluorescencia emitida a 510 nm.

De la misma manera, se utilizan clones de células HeLa que expresan de manera estable los plásmidos disponibles en el laboratorio pRFP-C-RS *shMCU* o su correspondiente control negativo, pRFP-C-RS *Scrambled*, para medir Ca^{2+}_{cyt} libre. Estos clones se siembran 24 horas antes de realizar los experimentos sobre cristales de 12 mm de diámetro a una densidad de 7×10^5 células/pocillo.

En ambos casos, los registros de las medidas de Ca^{2+} obtenidos, se representan mediante el software Origin 8.5, como el cociente (Ratio) entre las fluorescencias emitidas al excitar con dos longitudes de onda (340 y 380 nm, o 485 y 415 nm, para Fura-2 y Pericam, respectivamente).

RESULTADOS

I. Obtención del plásmido SH-MCU-TRPV1

El plásmido comercial pRFP-C-RS *shMCU*, contiene un *shRNA* frente al gen de la proteína MCU adecuado para estudios de silenciamiento génico. Sin embargo, también contiene una proteína fluorescente roja (RFP), cuya fluorescencia solapa con el espectro de emisión del Fura-2, tal como se observa en la Fig. 7.

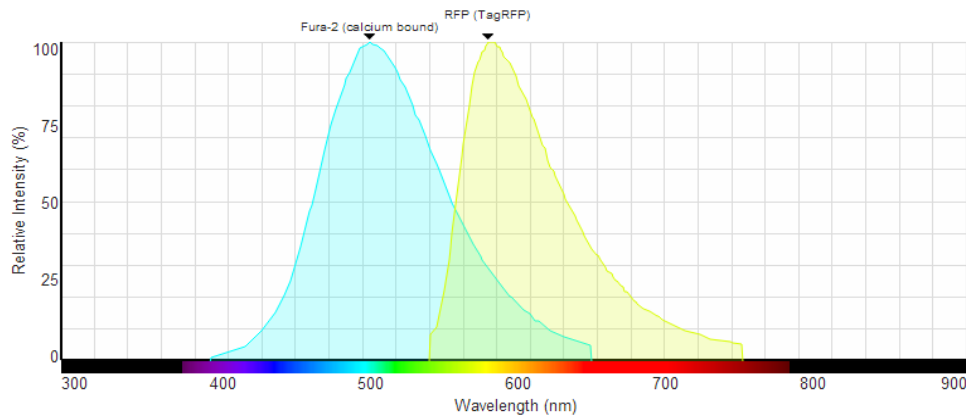


Fig. 7. Espectros de emisión del colorante fluorescente Fura-2 y de la RFP. El espectro de emisión del Fura-2 aparece representado en azul, con un pico máximo de emisión de fluorescencia a 510 nm, mientras que el de la RFP, se muestra en amarillo.

Para que en las medidas de Ca^{2+} realizadas con Fura-2, no interfiera la fluorescencia de dicha proteína, y se pueda asumir que toda la fluorescencia detectada se debe al Fura-2 (y por tanto, al $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ libre), se obtiene dicho plásmido, pRFP-C-RS *shMCU*, libre de RFP. En su lugar se introduce un fragmento del plásmido RC217653 de 2900 pb que contiene el gen del nociceptor y canal iónico *TRPV1* o vaniloide, con el fin de utilizar este nuevo vector para silenciar la expresión de MCU, y además, como control de transfección. Para ello, se procede a la digestión de ambos plásmidos con las enzimas PmeI y SnaBI, incluidas en el MCS de ambos plásmidos. El resultado del gel de electroforesis tras la digestión correspondiente a ambos plásmidos se muestra en la Fig. 8. El primer carril contiene el marcador de peso molecular; los dos siguientes muestran la digestión del plásmido pRFP-C-RS *shMCU*, en los cuales se aprecia una banda de 6350 pb aproximadamente, que se corresponde con el vector SH-MCU, y otra de 1100 pb, correspondiente al fragmento que contiene la RFP, que se descarta. Los dos últimos carriles contienen los fragmentos correspondientes a la digestión del plásmido RC217653, en los que se observan dos fragmentos, de 4500 y 2900 pb correspondientes al vector y al canal TRPV1, respectivamente.

Una vez extraídos y ligados los fragmentos de interés, el vector SH-MCU y el inserto TRPV1, se procede a la transformación y posterior selección de las colonias con el antibiótico cloranfenicol. Las colonias transformadas se siembran en medio líquido, y seguidamente, se procede a la extracción del DNA del plásmido para comprobar cuáles de las colonias, resistentes a cloranfenicol, han incorporado el plásmido SH-MCU-TRPV1. La Fig. 9 muestra la fotografía correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa para el *screening* de dichas colonias procedentes de la ligación 3:1, puesto que las correspondientes a la ligación 5:1 se descartaron. Únicamente, el carril 4 contiene dos fragmentos que se corresponden con la

longitud adecuada: un fragmento de aproximadamente 6300 pb, correspondiente al vector SH-MCU, y otro de unos 2900 pb, correspondiente al inserto TRPV1, de acuerdo con los fragmentos obtenidos en el control positivo (Fig. 9).

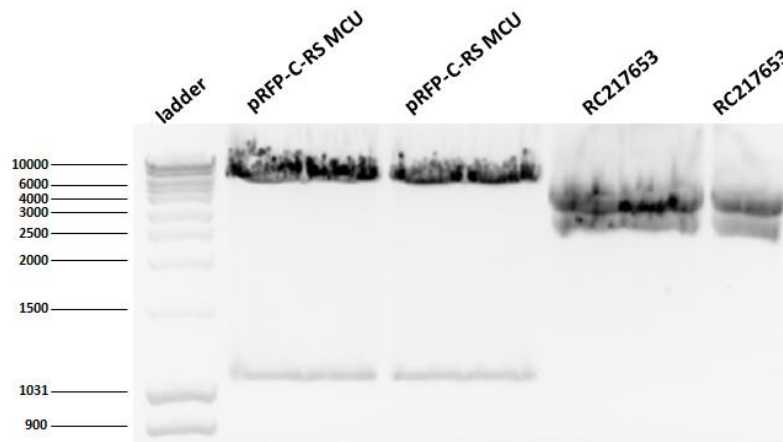


Fig. 8. Digestión de los plásmidos pRFP-C-RS *shMCU* y RC217653 para extracción y purificación de SH-MCU y TRPV1. Se muestran los fragmentos obtenidos en el gel de agarosa tras la digestión de los plásmidos de partida con las enzimas de restricción PmeI y SnaBI. De izquierda a derecha, se observan: marcador de peso molecular, dos carriles con el plásmido pRFP-C-RS *shMCU* y otros dos con el plásmido RC217653.

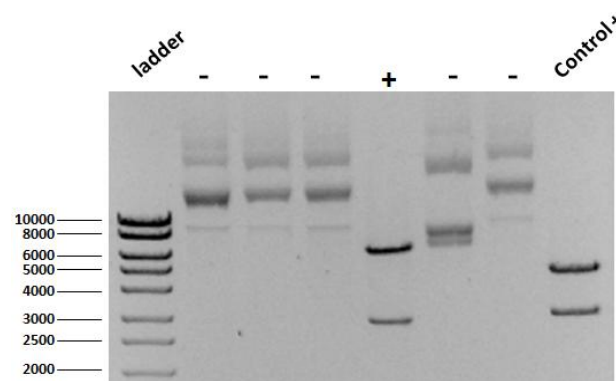


Fig. 9. Screening de colonias transformadas con el plásmido SH-MCU-TRPV1. El carril 1 muestra el marcador de pesos moleculares; de los carriles restantes (2 a 6) cargados con el cultivo de los clones de bacterias correspondientes a la ligación 3:1, solamente el carril 4 contiene el vector de interés. El carril 7 contiene la digestión del vector original RC217653, con las mismas enzimas de restricción PmeI y SnaBI, utilizada como control positivo.

II. Expresión de MCU en células HeLa

Tras la obtención del vector SH-MCU-TRPV1, se estudian en primer lugar los niveles de expresión de la proteína MCU en células HeLa. Para ello se utiliza Western Blot como técnica para cuantificar la cantidad de proteína expresada en las células silenciadas de manera transitoria (SH-MCU), respecto a los controles (*Scrambled*).

En la Fig. 10A, se muestra la densitometría correspondiente a uno de los revelados obtenidos tras el Western Blot de MCU. Se puede observar que la proteína MCU detectada con un anticuerpo específico frente al uniportador de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ (MCU) tiene un peso molecular de 40 kDa. La β -actina se detecta con una banda de 46 kDa utilizada como control de carga.

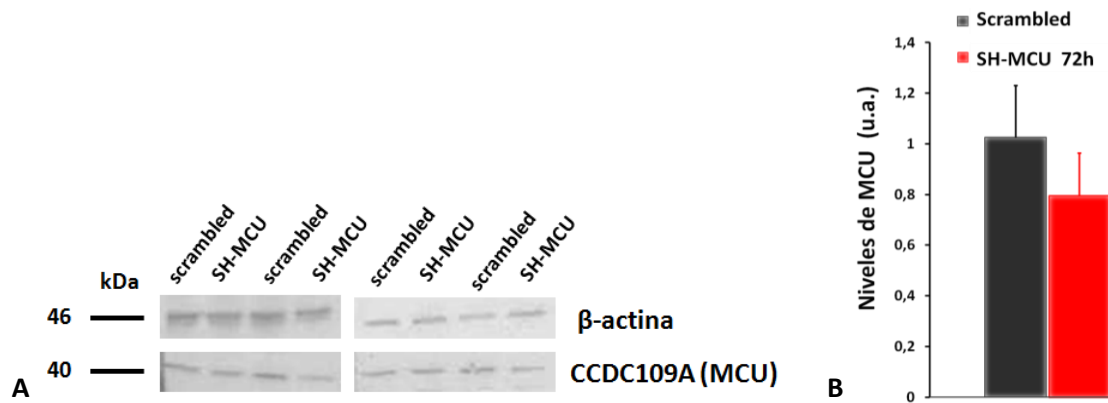


Fig. 10. Efecto del silenciamiento del uniportador sobre los niveles de expresión de MCU en células HeLa. **A.** Densitometría de los Western blot de MCU normalizados con su correspondiente β -actina. **B.** El análisis de la densitometría se muestra como la media \pm e.e.m. de los niveles de MCU de $n=6$ muestras (3 extracciones distintas por duplicado tanto para los controles como los silenciados) expresado en unidades arbitrarias (u.a.).

Los resultados del Western Blot, de tres muestras obtenidas de tres extracciones diferentes y analizadas por duplicado, tanto para las células silenciadas como para sus respectivos controles (Fig. 10B), muestran que, existe una reducción en la expresión de MCU de aproximadamente el 22,3% en células en las que se ha silenciado la expresión del uniportador de manera transitoria (SH-MCU); sin embargo, estos resultados no son significativos, mostrando valores de expresión en unidades arbitrarias de $1,02 \pm 0,15$ (media \pm e.e.m., $n=6$) en los controles, y de $0,79 \pm 0,13$ (media \pm e.e.m., $n=6$) en las células silenciadas.

III. Medidas de Ca^{2+} mitocondrial en célula única

Dado que los resultados obtenidos por Western Blot muestran un silenciamiento de MCU aparentemente bajo, se comprueba a continuación, si existe una correlación entre dicho silenciamiento y la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria. Para ello, se utiliza la proteína fluorescente Pericam, y se mide el nivel de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ tras la estimulación de las células con histamina 100 μM . No obstante, es necesario comprobar qué células han incorporado el vector generado, mediante la estimulación de las mismas con capsaicina 1 μM . Únicamente las células que han sido cotransfectadas con el plásmido *Scrambled* o SH-MCU-TRPV1 y 2-mito-pericam responden ante un estímulo de capsaicina.

En la Fig. 11, se observa que ambos grupos de células, SH-MCU-TRPV1 o *Scrambled*, responden a la estimulación con capsaicina 1 μM , con un incremento de Ca^{2+} hacia el interior de la mitocondria, medido con Pericam por microscopía de fluorescencia. Estos experimentos, permiten comparar la amplitud del pico de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ inducido por histamina, entre las células control (*Scrambled*) y las células en las que se ha silenciado el uniportador (SH-MCU), de manera transitoria con el vector SH-MCU-TRPV1. La histamina actúa en ambos tipos de células sobre los receptores de la membrana plasmática que activan la cascada de la PLC, induciendo la formación del segundo mensajero IP_3 , que al unirse a su receptor (IP_3R) en la membrana del RS/RE, provoca la liberación de Ca^{2+} del mismo, induciendo a su vez, un aumento transitorio del $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$, de manera que las mitocondrias pueden captar Ca^{2+} de los microdominios (Fig. 1).

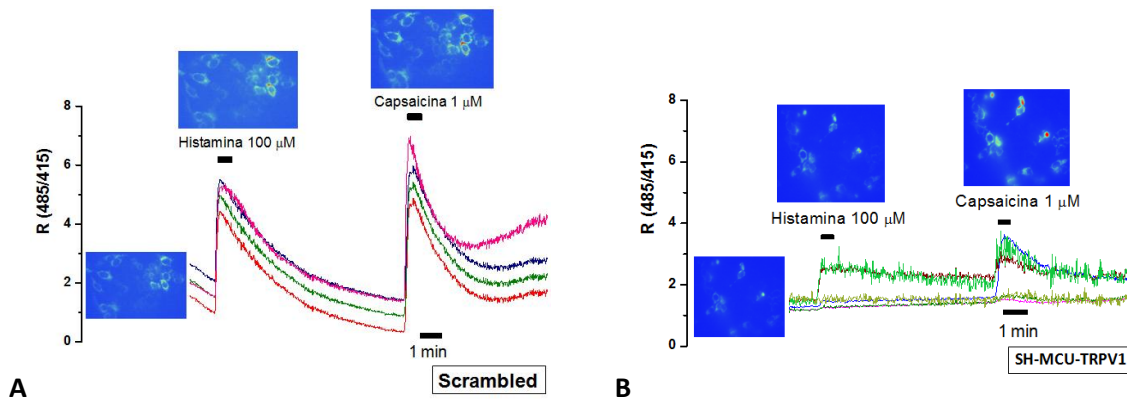


Fig. 11. Incremento de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ en células HeLa frente a la estimulación con Capsaicina $1 \mu\text{M}$. **A.** Células cotransfectadas con el constructo *Scrambled* y 2-mito-pericam. **B.** Células cotransfectadas con el plásmido SH-MCU-TRPV1 y 2-mito-pericam. Ambos grupos de células, se utilizaron 72 horas tras la cotransfección para los experimentos de imagen en los que las células se estimulan con histamina $100 \mu\text{M}$ y capsaicina $1 \mu\text{M}$ durante 30 segundos y entre ambos pulsos se lavan con MEC.

En la Fig. 12, se muestra un experimento representativo de las medidas de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ en células HeLa silenciadas de manera transitoria. Los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ alcanzan valores de $4,4 \pm 0,5$ (u.a.) (media \pm e.e.m., $n=5$) en los controles y $2,63 \pm 0,28$ (u.a.) (media \pm e.e.m., $n=32$) en las células silenciadas (SH-MCU). Estos experimentos muestran que el silenciamiento de MCU mediante *shRNA*, supone una disminución significativa del pico de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ del 40,2% en las células silenciadas, respecto a la altura del pico de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ en las células control (*Scrambled*).

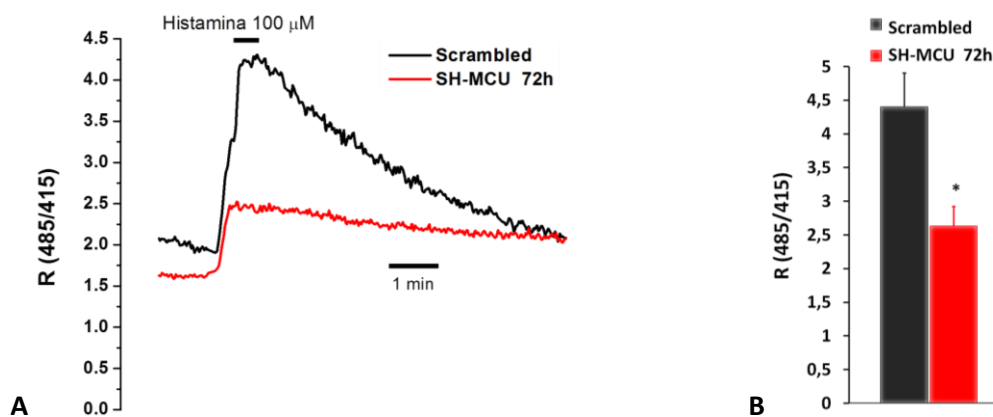


Fig. 12. Inhibición de la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ en células intactas con MCU silenciado. **A.** Datos obtenidos en células HeLa cotransfectadas con 2-mito-pericam y el *Scrambled* de MCU (negro) o el vector SH-MCU-TRPV1 (rojo), y estimuladas con histamina $100 \mu\text{M}$ durante 30 segundos. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos similares de cada tipo. **B.** La figura muestra la significación estadística de los datos representados en A, $*p<0.05$.

Partiendo de los resultados obtenidos en células intactas estimuladas con histamina, se comprueba si en células permeabilizadas, en las que se ha silenciado MCU, se obtienen también cambios en los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$, medidos con la proteína fluorescente Pericam. Cuando las células se permeabilizan, sus mitocondrias son accesibles al medio de perfusión, de tal manera que estos experimentos permiten estudiar la captación de Ca^{2+} mitocondrial al perfundir sistemas tampón de Ca^{2+} de concentración conocida ($4.5 \mu\text{M}$), sin necesidad de estimular las células con histamina previamente. Las células HeLa cotransfectadas se

permeabilizan con digitonina (100 μM) durante 1 minuto; a continuación, se perfunde medio interno EGTA (0.5 mM), y finalmente, el tampón de Ca^{2+} 4,5 μM .

En estas condiciones, la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias, en las células silenciadas, es menor que en los controles, como se observa en la Fig. 13. El nivel de calcio en las mitocondrias, tras la adición del tampón alcanza un valor de 14,63 (u.a.) en las células control (*Scrambled*) y de 8,14 (u.a.) en las células en las que se ha silenciado el uniportador (SH-MCU).

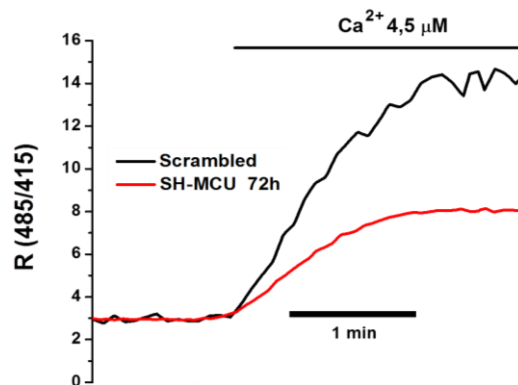


Fig. 13. Efecto del silenciamiento de MCU sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial medida con Pericam en células HeLa permeabilizadas. Células HeLa cotransfectadas con 2-mitopericam y los constructos *Scrambled* (negro) o SH-MCU-TRPV1 (rojo). Ambos grupos de células se permeabilizan con digitonina 100 μM durante 1 minuto seguido de un lavado con medio interno EGTA (0.5 mM) y la perfusión del tampón de Ca^{2+} 4.5 μM (a las 72 horas de transfección). Los datos mostrados son representativos de una media de 3 experimentos preliminares.

De nuevo, se observa que el silenciamiento de MCU, supone una reducción de la captación de Ca^{2+} mitocondrial en células HeLa permeabilizadas, de aproximadamente un 45 %, que es consistente con los resultados obtenidos en células intactas estimuladas con histamina.

IV. Medidas de Ca^{2+} citosólico en célula única

Finalmente, se comprueba si la variación obtenida en los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ al silenciar la expresión del uniportador, tanto en células HeLa intactas como permeabilizadas, también supone cambios en los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$, tras la estimulación de las células con histamina.

Al igual que en los experimentos de imagen de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ solamente se tienen en cuenta las células que responden con un incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ tras la estimulación con capsaicina 1 μM , que son las que han sido transfectadas con el plásmido *Scrambled* o SH-MCU-TRPV1. En ambos casos, un grupo de células responde a la estimulación con capsaicina 1 μM con un aumento en los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$, medido con Fura-2. En ambas condiciones, un porcentaje pequeño de células no responde a capsaicina, puesto que no han incorporado el plásmido obtenido previamente (Fig. 14).

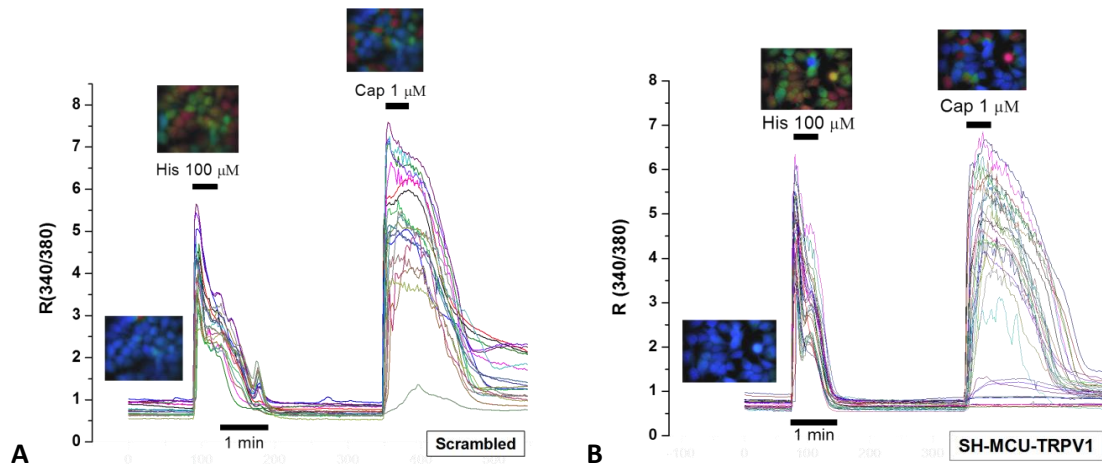


Fig. 14. Incremento de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ en células HeLa en respuesta a la estimulación con Capsaicina 1 μM . **A.** Células transfectadas con el constructo *Scrambled*. **B.** Células transfectadas con el plásmido SH-MCU-TRPV1. Ambos grupos de células, se utilizaron 72 horas tras la transfección y se cargaron con Fura-2 (2 μM) durante 50 minutos para los experimentos de imagen. Las células se estimulan con histamina 100 μM y capsaicina 1 μM durante 30 segundos, con un intervalo entre ambos pulsos de 5 minutos de lavado con MEC.

En la Fig. 15 se muestran los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ obtenidos en células HeLa tras estimular la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares con histamina 100 μM durante 30 segundos. Esta figura muestra la estadística de dicho experimento en relación a la altura del pico de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$. Los resultados obtenidos muestran valores de los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ de $3,69 \pm 0,07$ (u.a.) (media \pm e.e.m., $n=78$) en los controles y $4,01 \pm 0,07$ (u.a.) (media \pm e.e.m., $n=137$) en células silenciadas (SH-MCU). En estas últimas, se produce un pequeño, pero significativo aumento, de aproximadamente el 8%, en el nivel de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ después de la estimulación con Histamina 100 μM , en relación a las células control (*Scrambled*).

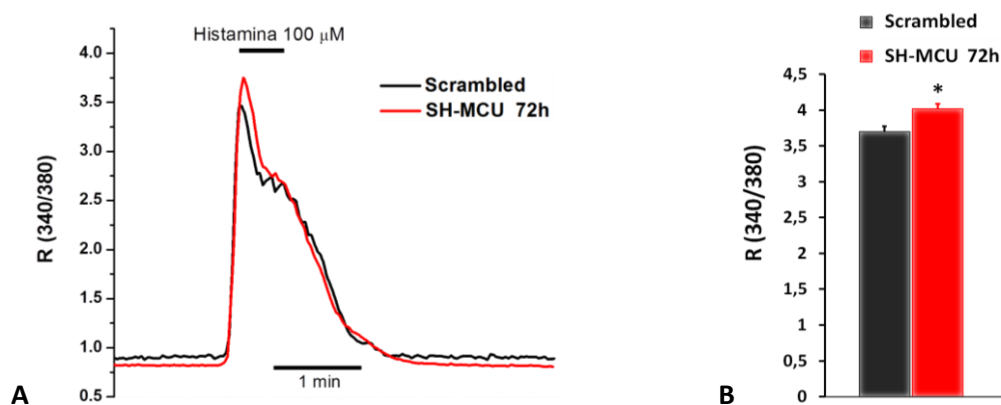


Fig. 15. Efecto del silenciamiento de MCU sobre la magnitud de los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ inducidos por histamina en células HeLa. **A.** Datos obtenidos en células HeLa transfectadas con el plásmido *Scrambled* del MCU (negro) o con el vector SH-MCU-TRPV1 (rojo), cargadas con Fura-2 (2 μM) durante 50 minutos y estimuladas a las 72 horas con histamina 100 μM durante 30 segundos. Los resultados mostrados son representativos de una media de 8 y 10 experimentos similares, respectivamente. **B.** Significación estadística (media \pm e.e.m.) de los datos representados en A, $*p < 0.05$.

De acuerdo a lo observado en los experimentos realizados en paralelo en nuestro laboratorio, utilizando la proteína bioluminiscente Aequorina, se estudia cómo varían los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ en células HeLa que expresan el plásmido pRFP-C-RS *Scrambled* o pRFP-C-RS *shMCU*, de manera estable. En estos clones, se ha comprobado previamente que han perdido la RFP (datos no mostrados), pero expresan el *shMCU* del plásmido original obtenido de Origene, por lo que se puede utilizar Fura-2 como colorante fluorescente para medir $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ libre. Como se observa en la Fig. 16, los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ alcanzan valores de $3,54 \pm 0,04$ (u.a.) (media \pm e.e.m., $n=264$) en los controles y $3,94 \pm 0,03$ (u.a.) (media \pm e.e.m., $n=305$) en células silenciadas (SH-MCU). Los cambios en los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ son significativos al comparar los clones silenciados (SH-MCU #5) respecto a los clones controles (*Scrambled* #3), siendo en este caso, el incremento en el nivel de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ del 10,16 %. Sin embargo, al comparar la altura de los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ obtenidos en clones y en transitorios de células HeLa, se observa que los clones silenciados de manera estable (Fig. 16), muestran niveles similares de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ que los transitorios (Fig. 15) tras la estimulación con histamina.

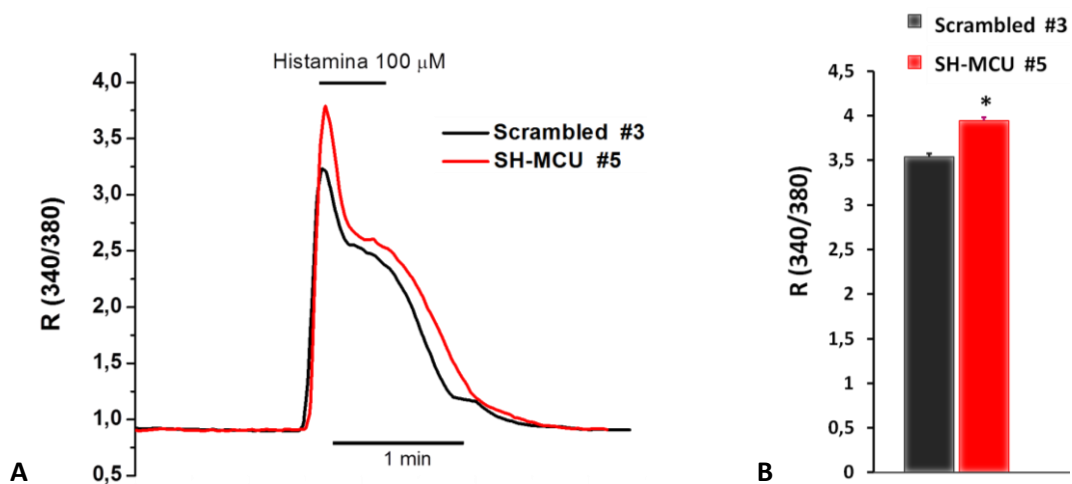


Fig. 16. Efecto del silenciamiento de MCU en clones de células HeLa sobre la magnitud de los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ inducidos por histamina. **A.** Datos obtenidos en células HeLa transfectadas de manera estable con los constructos originales obtenidos de Origene: pRFP-C-RS *Scrambled* (negro) o pRFP-C-RS *shMCU* (rojo). Ambos grupos de clones se cargan con Fura-2 (2 μM) durante 50 minutos y se estimulan con histamina 100 μM durante 30 segundos, 24 horas después de la siembra de los mismos. **B.** Se representa la significación estadística como media \pm e.e.m. de los datos representados en A, obtenidos de 7 experimentos similares de cada tipo, llevados a cabo en paralelo, comparando el efecto de silenciar MCU con el control de silenciamiento (* $p < 0.05$).

El silenciamiento de MCU, estable o transitorio, supone una reducción significativa del pico de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$, que es consistente con los resultados obtenidos en los experimentos de imagen de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ en células HeLa intactas y permeabilizadas.

DISCUSIÓN

Las mitocondrias son capaces de transportar grandes cantidades de Ca^{2+} por un mecanismo sensible al rojo de rutenio dependiente del potencial de membrana mitocondrial, denominado uniportador (Bernardi, 1999; Kirichok *et al.*, 2004). La proteína MCU localizada en la membrana mitocondrial interna es un componente integral del uniportador (Baughman *et al.*, 2011), y las evidencias apuntan a que esta proteína oligomeriza en la membrana formando el poro conductor del canal cuya regulación es bastante compleja.

Recientemente los grupos de Mootha y Rizzuto (Baughman *et al.*, 2011; De Stefani *et al.*, 2011) propusieron que MCU es la proteína encargada de mediar la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ y que el silenciamiento del gen de MCU, lleva consigo una reducción en la captación de Ca^{2+} por la mitocondria, tanto en células intactas tratadas con agonistas, como en células permeabilizadas perfundidas con tampones de Ca^{2+} . Por ello, en este proyecto nos hemos propuesto llevar a cabo experimentos similares con el fin de estudiar cómo el silenciamiento del uniportador de calcio mitocondrial afecta a la regulación del calcio citosólico y profundizar en el estudio de la homeostasis del calcio mitocondrial.

Nuestro primer objetivo es poner a punto los plásmidos necesarios para llevar a cabo este proyecto, inicialmente en células no excitables, pero también en células excitables como PC12 y células cardíacas. Hemos comenzado probando la viabilidad de los plásmidos obtenidos, utilizando para ello, una línea celular sencilla, como la línea HeLa.

Para poder realizar los experimentos mostrados en esta memoria tuvimos que obtener, en primer lugar, un nuevo plásmido a partir de dos plásmidos comerciales: el SH-MCU-TRPV1. Este plásmido cumple un doble propósito, por un lado nos permite realizar experimentos de calcio citosólico en célula única con Fura-2 sin la interferencia de la RFP; mientras que por otro lado, tenemos un control eficaz de la transfección: sólo aquellas células que respondan a capsaicina habrán incorporado el plásmido, y por tanto, tendrán silenciada la proteína MCU.

Tras la obtención del plásmido, determinamos si la transfección del mismo en células HeLa producía un silenciamiento de la proteína MCU a las 72 horas. Para ello determinamos los niveles de expresión de la proteína MCU mediante la técnica de Western Blot. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron muy bajos: sólo se observa una reducción de un 22,3% en los niveles de la proteína, lo que contrasta con los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo en paralelo en nuestro laboratorio, con clones de células HeLa que expresan el plásmido original pRFP-C-RS shMCU; en este caso el silenciamiento obtenido es del 85%. Además, los resultados del Western Blot no son estadísticamente significativos. Creemos que esto se debe a la variabilidad existente entre unas extracciones y otras. A pesar de que la siembra y transfección de las células se realiza en las mismas condiciones durante tres semanas sucesivas, es difícil controlar la viabilidad de los cultivos tras añadir el agente de transfección; de hecho, hemos observado repetidamente que la viabilidad en las células silenciadas (SH-MCU) es menor que en las *Scrambled*. Por otro lado, hemos comprobado en los experimentos de imagen de calcio que la eficacia de la transfección es menor en las células transfectadas con el plásmido SH-MCU-TRPV1. En este caso, al haber eliminado la RFP no podemos comprobar la eficacia de la transfección antes de realizar el Western Blot.

Dada la dificultad de cuantificar claramente la expresión de la proteína en las células silenciadas transitoriamente, y que nuestros resultados eran tan diferentes de los obtenidos en el laboratorio con el plásmido original, decidimos comprobar directamente la eficacia de la captación de calcio por la mitocondria en células silenciadas de forma transitoria durante 72 horas con el nuevo plásmido, utilizando como control células transfectadas en paralelo con el plásmido *Scrambled*. Realizamos experimentos de medida de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ con la proteína Pericam en células intactas estimuladas con histamina. Nuestros datos muestran que el silenciamiento de MCU produce una disminución significativa en la altura de los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$, de un 40% con respecto al control. En este caso los resultados se obtienen sólo de las células que han sido transfectadas, ya que sólo contabilizamos los datos de las que responden a capsaicina. Vemos que el silenciamiento obtenido a partir de las medidas de entrada de calcio es significativamente mayor que el obtenido con la determinación directa de la cantidad de proteína expresada por las células.

Para ratificar estos resultados realizamos experimentos en células permeabilizadas. En este caso, las mitocondrias son accesibles desde el medio extracelular y se puede perfundir un tampón de Ca^{2+} de concentración conocida, que activa directamente el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial e induce la entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias. En concreto hemos utilizado una concentración de Ca^{2+} de 4,5 μM , que es una concentración intermedia que nos permite ver posibles diferencias entre las células silenciadas y los controles *Scrambled*. La entrada de calcio medida mediante Pericam en célula única, se encuentra reducida aproximadamente en un 45% lo que confirma los datos anteriores. En este caso el número de experimentos es pequeño debido a la falta de tiempo pero esperamos que nuevos experimentos confirmen los resultados obtenidos.

En cualquier caso, estos datos se aproximan más a los resultados obtenidos en estudios realizados en nuestro laboratorio con Aequorina, en clones estables de células HeLa con MCU silenciado, en los que se obtenían reducciones de más de un 80% de entrada de calcio en células permeabilizadas.

Nuestro interés era también determinar cómo afecta a la dinámica del calcio citosólico, la reducción de la entrada de calcio en la mitocondria al silenciar el uniportador mitocondrial. Los registros obtenidos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ medido con Fura-2, de células transfectadas durante 72 horas, muestran que el silenciamiento de MCU produce un aumento pequeño, pero significativo en la amplitud de los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ de aproximadamente un 8%, que concuerda con lo observado en mitocondria.

Dado que existe una diferencia importante, entre los resultados obtenidos en células silenciadas de forma transitoria y los clones estables silenciados, aprovechamos el hecho de disponer de dos clones que han perdido la proteína fluorescente roja, pero que sin embargo mantienen los niveles de expresión de la proteína MCU y los niveles de entrada de calcio en la mitocondria muy bajos, para realizar algunos experimentos de medida de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ con Fura-2. En este caso los incrementos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ en respuesta a histamina son ligeramente mayores, con un incremento de un 10,16% del control sobre el *Scrambled*, lo que concuerda con el resto de los datos obtenidos. Por tanto, la disminución de la entrada de calcio en la mitocondria es debida al silenciamiento de MCU y no a efectos inespecíficos sobre la liberación de calcio de los depósitos. Esta inhibición de la entrada de calcio en la

mitocondria, hace que los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$, tras la inducción de la liberación mediante histamina, sean ligeramente más elevados.

Los datos publicados hasta el momento por los grupos de Mootha y Rizzuto sugieren la participación íntegra de la proteína MCU en la captación del Ca^{2+} por la mitocondria, pero el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo, y su regulación, no están completamente aceptados. Los experimentos realizados en este proyecto y los resultados obtenidos a partir de los mismos, concuerdan con los resultados obtenidos por dichos grupos, aunque son necesarios más experimentos en células permeabilizadas y nuevos estudios, para desvelar por ejemplo, la existencia de otras posibles isoformas del uniportador y sobre todo la direccionalidad del mismo.

En cuanto a los ensayos de expresión de la proteína, el silenciamiento de MCU muestra una disminución en los niveles de expresión del uniportador que no es significativa. Por ello, pensamos que las células silenciadas de forma transitoria no son adecuadas para experimentos de cuantificación de proteínas, ya que dificultan la interpretación de los resultados. Así mismo, sería interesante realizar de nuevo, ensayos de silenciamiento de MCU en clones estables, y experimentos de sobreexpresión de dicha proteína, para estudiar el efecto opuesto sobre los picos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ y $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$, y sobre la captación de Ca^{2+} por la mitocondria.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que resumen los resultados obtenidos en este proyecto de investigación, son las siguientes:

- El plásmido obtenido por técnicas de biología molecular, es adecuado para estudios de silenciamiento en células HeLa y puede ser utilizado como control de transfección, en los experimentos de imagen de Ca^{2+} .
- Los resultados obtenidos de Western Blot predicen la existencia de una isoforma de 40 kDa del uniportador en células HeLa, aunque no podamos cuantificar el porcentaje de silenciamiento de forma exacta.
- El silenciamiento de estas células de forma transitoria con el plásmido obtenido no es válido para su utilización en experimentos de cuantificación de proteínas por la técnica de Western Blot, debido a la variabilidad tanto del porcentaje de transfección, como de la viabilidad de estos cultivos.
- Los cambios producidos en el nivel de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ medidos con Pericam, tanto en células intactas como permeabilizadas, se deben a una reducción de la captación de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$, y por tanto, al silenciamiento de MCU.
- Las células HeLa en las que se ha silenciado la expresión de MCU mediante el uso de *shRNAs*, tanto de manera transitoria como de forma estable, muestran un aumento del nivel de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ medido con Fura-2, que concuerda con la disminución observada de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria.

BIBLIOGRAFÍA

- 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*. **476** (7360): 341–345.
- Bernardi P (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*. **79** (4): 1127–1155.
- Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*. **361**(6410): 315-325.
- 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*. **3** (2): a004168.
- Cahalan MD (2009). STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nat. Cell Biol*. **11** (6): 669-677.
- Carafoli E, Garcia-Martin E, Guerini D (1996). The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. *Experientia*. **52** (12): 1091-1100.
- Catterall WA (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **3**(8): a003947.
- 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*. **39** (1): 121-132.
- Csordás G, Várnai P, Golenár T, Sheu SS, Hajnóczky G (2012). Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. *Mol Cell Endocrinol*. **353** (1-2): 109-113.
- 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*. **476** (7360): 336–340.
- Drago I, Pizzo P, Pozzan T (2011). After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *EMBO J*. **30** (20): 4119-4125.
- de la Fuente S, Fonteriz RI, de la Cruz PJ, Montero M, Alvarez J (2012). Mitochondrial free [Ca²⁺] dynamics measured with a novel low-Ca²⁺ affinity aequorin probe. *Biochem J*. **445**(3): 371-376.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. **260** (6): 3440-3450.
- Hansford RG (1994). Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J Bioenerg Biomembr*. **26** (5): 495-508
- Hoppe UC (2010). Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett*. **584** (10): 1975-1981.
- Jiang D, Zhao L, Clapham DE (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science*. **326** (5949): 144-147.
- Kaftan EJ, Ehrlich BE, Watras J (1997). Inositol 1,4,5-Trisphosphate (InsP3) and Calcium Interact to Increase the Dynamic Range of InsP3 Receptor-dependent Calcium Signaling. *J Gen Physiol*. **110** (5): 529–538.

- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. **427** (6972): 360–364.
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2** (11): a003996.
- Lehninger AL, Rossi CS, Greenawalt JW (1963). Respiration-dependent accumulation of inorganic phosphate and Ca ions by rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. **10**: 444–448.
- Lytton J (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J*. **406** (3): 365–382.
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*. **266** (26): 17067-17071.
- MacLennan DH, Asahi M, Tupling AR (2003). The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci*. **986**: 472–480.
- 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*. **14** (12) : 1336-1343.
- McCormack JG, Denton RM (1990). The role of mitochondrial Ca²⁺ transport and matrix Ca²⁺ in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*. **1018** (2-3): 287-291.
- Meissner G (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. **261** (14): 6300-6306.
- Montell C (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE*. **2005** (272): re3.
- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci*. **98** (6): 3197-3202.
- Nilius B, Owsianik G (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*. **12** (3): 218.
- Palty R, Hershinkel M, Sekler I (2012). Molecular identity and functional properties of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem*. **287** (38): 31650-31657.
- Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvilii D, Sekler I (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci*. **107** (1): 436-441.
- Patron M, Raffaello A, Granatiero V, Tosatto A, Merli G, De Stefani D, Wright L, Pallafacchina G, Terrin A, Mammucari C, Rizzuto R (2013). The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. *J Biol Chem*. **288** (15): 10750-10758.
- Patterson RL, Boehning D, Snyder SH (2004). Inositol 1,4,5- trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem*. **73**: 437–465.
- Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake. *Nature*. **467** (7313): 291–296.
- Raffaello A, De Stefani D, Rizzuto R (2012). The mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Calcium*. **52** (1): 16-21.

- Rimessi A, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R (2008). The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochim Biophys Acta*. **1777** (7-8): 808-816.
- Rios E, Brum G (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*. **325** (6106): 717-720.
- Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev Mol Cell Biol*. **13** (9): 566-578.
- 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 Ca^{2+} responses. *Science*. **280** (5370): 1763–1766.
- Rizzuto R, Pozzan T (2006). Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*. **86** (1): 369–408.
- Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R, Pozzan T (2003). Looking forward to seeing calcium. *Nat. Rev Mol Cell Biol*. **4** (7): 579-586.
- Santo-Domingo J, Demareaux N (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. **1797** (6-7): 907-912.
- Strehler EE, Treiman M (2004). Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med*. **4** (3): 323–335.
- Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS (2006). Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol*. **174** (6): 803–813.
- Recursos on line: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Labeling-Chemistry/Fluorescence-SpectraViewer.html> (acceso: 1/9/2013).