



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

TESIS DOCTORAL:

**Regulación del Uniportador de Calcio
Mitocondrial por MICU1 y MICU2**

Presentada por **JESSICA MATESANZ ISABEL** para optar al
grado de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. María Teresa Montero Zoccola

Dr. Javier Alvarez Martín

Dra. Rosalba Fonteriz García

A mis dos tesoros:

Kano y Logan

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han ayudado a lo largo de este periodo de mi vida. Sin ellas no habría sido posible realizar esta tesis. Siento si olvido mencionar a alguien, gracias igualmente.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Javier Álvarez, Rosalba Fonteriz y Maite Montero. Gracias por todo vuestro apoyo, confianza y la excelente dirección.

A los demás miembros del grupo: Sergio de la Fuente, Pablo Montenegro, Pilar Álvarez, Silvia López, Marta Delgado y Jessica Arias. Muchos habéis colaborado activamente en la realización de la tesis y todos me habéis ayudado con vuestra compañía y vuestros sabios consejos.

A todos los estudiantes de prácticas que han pasado por el laboratorio.

A las compañeras y compañeros de la quinta planta: Ana, Teresa, Sara, María, Helena, Paco, Inma, Dani. Gracias por compartir esos momentos de charla en los pasillos que siempre alegran el día.

A M^a Carmen Domínguez y a Alfredo Moreno por todos los consejos y al resto de compañeros del departamento y del IBGM.

También quiero dar las gracias a mis padres Ignacio y Begoña por enseñarme a luchar hasta el final por las cosas que realmente importan y darme ánimo para lograrlo cuando las fuerzas flaquean. Sin ellos nunca hubiera tenido la perseverancia necesaria para realizar esta empresa.

A mi marido, por su paciencia, su confianza ciega y su cariño. Sin él no sería la persona que soy.

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en la siguiente revista:

- de la Fuente S, Matesanz-Isabel J, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J. Dynamics of mitochondrial Ca²⁺ uptake in MICU1-knockdown cells. Biochem J. 2014 Feb 15;458(1):33-40.

Así mismo, se han presentado en un poster en el siguiente congreso:

- **Título:** Effects of MICU1 silencing on mitochondrial Ca²⁺ uptake. Javier Alvarez; Sergio de la Fuente; Jessica Matesanz-Isabel; Rosalba I Fonteriz; Mayte Montero.
- **Congreso:** XIVth Congress of the Spanish Biophysical Society.
- **Ciudad:** Alcalá de Henares, Madrid.
- **Fecha:** del 11 al 13 de Junio de 2014

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]:	<i>Ca²⁺ concentration</i>
[Ca²⁺]_c:	<i>Cytosolic Ca²⁺ concentration</i>
[Ca²⁺]_M:	<i>Mitochondrial Ca²⁺ concentration</i>
[Ca²⁺]_{ER}:	<i>Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ concentration</i>
APS:	<i>Ammonium Persulfate</i>
ATP:	<i>Adenosine triphosphate</i>
BAPTA:	<i>1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
BCA:	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BHQ:	<i>Benzohydroquinone</i>
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CaM:	<i>Calmodulina</i>
CaMKII:	<i>Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II</i>
CaMKIV:	<i>Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase IV</i>
CBP:	<i>CREB Binding Protein</i>
Celent:	<i>Coelenterazine</i>
CGP:	<i>7-Chloro-5-(2-chlorophenyl)-1,5-dihydro-4,1-benzothiazepin-2(3H)-one</i>
CICR:	<i>Calcium induced calcium release</i>
CRAC:	<i>Calcium release activated calcium current</i>
CREB:	<i>cAMP-Response-Element Binding protein</i>

CSQ:	<i>Calsecuestrin</i>
DHPR:	<i>Dihydropyridine Receptor</i>
DMEM:	<i>Dubelcco`s Midified Eagle`s Medium</i>
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA:	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EMRE:	<i>Essential MCU regulator</i>
FADH₂:	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FCCP:	<i>Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>
GECI:	<i>Genetic encoded Ca²⁺ indicator</i>
GMPc:	<i>Guanosine monophosphat ciclic</i>
HEDTA:	<i>Hydroxyethylethylenediaminetriacetic acid</i>
HEPES:	<i>Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid</i>
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i>
His:	<i>Histamine</i>
IP₃:	<i>Inositol trisphosphate</i>
IP₃R:	<i>Inositol trisphosphate receptor</i>
LAmiAEQ:	<i>Double-mutated aequorin targeted to mitochondria</i>
MAM:	<i>Mitochondria-associated ER-membrane</i>
MCU:	<i>Mitochondrial Calcium Uniporter</i>
MCUb:	<i>Mitochondrial Calcium Uniporter b</i>
MICU1:	<i>Mitochondrial Calcium Uptake 1</i>

MICU2: *Mitochondrial calcium Uptake 2*

MitmutAEQ: *Mutated aequorin targeted to mitochondria*

mutAEQ: *Mutated aequorine*

nAChR: *Nicotinic Acetylcholyne receptor*

NADH: *Nicotinamide adenine Dinucleotide*

NF-AT: *Nuclear Factor of Activated T cell*

NF-κB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NMDA: *N-metil-D-aspartate*

NMDAR: *N-metil-D-aspartate receptor*

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

PDHP: *Pyruvate dehydrogenase phosphatase*

PHD: *Pyruvate dehydrogenase*

PLC: *Phospholipase C*

PMSF: *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

PPT: *4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol*

PTP: *Permeability transition pore*

PVDF: *Polyvinylidene fluoride*

RaM: *Rapid mode of calcium uptake*

RE: *Endoplasmic reticulum*

RIPA: *RadiolImmunoPrecipitacion Assay*

RNA: *Ribonucleic acid*

ROC: *Receptor operated channel*

ROS: *Reactive oxygen species*

Ru360:	Rutenio 360
RuRed:	<i>Rutenio Red</i>
RyR:	<i>Ryanodine receptor</i>
SERCA:	<i>Sarco-endo-plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
siRNA:	<i>Small interfering RNA</i>
SDS:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SNARE:	<i>Soluble NSF Attachment Receptor</i>
SOC:	<i>Store operated channel</i>
SOCE:	<i>Store operated calcium entry</i>
TBS:	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T:	<i>Tris-buffered saline tween</i>
TEMED:	<i>N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamida</i>
TMRE:	<i>Tetramethyl rhodamine ethyl ester</i>
TRP:	<i>Transient Receptor Potencial</i>
VDAC:	<i>Voltage Dependent Anion Channel</i>
VitE:	<i>Vitamin E, α-tocoferol</i>
VDAC:	<i>Voltage dependent anion channel</i>
VOC:	<i>Voltage operated channel</i>

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	13
1.1 <i>Calcio como segundo mensajero</i>	15
1.1.1 Funciones celulares	15
1.1.2 La señal de calcio y su organización espacio-temporal	17
1.1.3 Sistemas de tamponamiento de calcio celular	18
1.2 <i>Aumento de la concentración de calcio citosólico</i>	19
1.2.1 Entrada de calcio desde el exterior celular	20
1.2.2 Liberación de calcio desde los depósitos intracelulares	26
1.3 <i>Recuperación de los niveles basales de calcio citosólico</i>	30
1.3.1 ATPasa de membrana plasmática (PMCA)	30
1.3.2 ATPasa de retículo sarco-endoplásmico (SERCA)	31
1.3.3 Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ (NCX)	32
1.4 <i>Las mitocondrias y el calcio</i>	33
1.4.1 Estructura	33
1.4.2 Función	34
1.4.3 Entrada de calcio en la mitocondria	38
1.4.4 Salida de calcio de la mitocondria	42
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1 <i>Cultivos celulares</i>	51
3.2 <i>Mantenimiento de líneas celulares</i>	51
3.2.1 Manipulación de líneas celulares	52
3.3 <i>Biología molecular</i>	55
3.3.1 Plásmidos utilizados	55
3.3.2 Transformación y amplificación de plásmidos	58
3.3.3 Selección de clones	58
3.4 <i>Análisis de proteínas</i>	59
3.4.1 Extracción de proteínas	59
3.4.2 Cuantificación de proteínas	59
3.4.3 Electroforesis de proteínas	60
3.4.4 Materiales de análisis de proteínas	62
3.5 <i>Medida de la concentración de calcio en poblaciones celulares</i>	63
3.5.1 Aequorina	63

3.5.2	Luminómetro	66
3.5.3	Transformación de los datos de luminiscencia en concentración de calcio	67
3.5.4	Medidas de concentración de calcio	68
3.5.5	Análisis estadístico	73
3.5.6	Equipo de imagen	74
3.5.7	Medida del potencial de membrana mitocondrial	75
RESULTADOS		77
4.1	<i>Efecto del silenciamiento de MCU</i>	79
4.1.1	Generación de clones estables con MCU silenciado	79
4.1.2	Efecto del silenciamiento de MCU en la dinámica de calcio mitocondrial y reticular	80
4.2	<i>Efecto del silenciamiento de MICU1</i>	83
4.2.1	Generación de clones estables con MICU1 silenciado	83
4.2.2	Pico de calcio mitocondrial inducido por histamina.	85
4.2.3	Captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas.	88
4.2.4	Efecto del protonóforo FCCP y de los inhibidores del Uniportador de calcio mitocondrial Rojo de Rutenio y Ru360, así como del silenciamiento de MCU.	94
4.2.5	Inhibición dependiente de calcio activada por el silenciamiento de MICU1.	97
4.2.6	Modulación temporal de la autoinhibición de la captación de calcio mitocondrial activada por el silenciamiento de MICU1	100
4.2.7	Efecto de las fosforilaciones y las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la captación transitoria de calcio inducida por el silenciamiento de MICU1	104
4.3	<i>Efecto del silenciamiento de MICU2</i>	106
4.3.1	Generación de clones estables con MICU2 silenciado	106
4.3.2	Pico de calcio citosólico y mitocondrial inducido por histamina	107
4.3.3	Salida de calcio del reticulo endoplásmico inducida por histamina	110
4.3.4	Captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas	112
4.3.5	Efecto del inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial y del activador del Uniportador de calcio mitocondrial kaempherol	117
4.3.6	Efecto del doble silenciamiento de MICU1 y MICU2 en la captación de calcio mitocondrial	120
4.3.7	Efecto del silenciamiento simple o doble de MICU1 y MICU2 en el protocolo de doble perfusión de Ca^{2+} .	124
DISCUSIÓN		127
5.1.	<i>MCU</i>	129

5.2. <i>MICU1</i>	130
5.3. <i>MICU2</i>	133
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	141

INTRODUCCIÓN

1.1 Calcio como segundo mensajero

El ión calcio (Ca^{2+}), es el segundo mensajero intracelular más versátil conocido. Es esencial para las células debido a la gran cantidad de funciones celulares que regula utilizando diferentes modos de acción. Es capaz de controlar la apoptosis o el ciclo celular, procesos que necesitan minutos u horas, o bien, procesos casi instantáneos como la exocitosis y la contracción muscular. Numerosas enfermedades, como el cáncer o el Alzheimer, tienen como origen diversas alteraciones en la señalización por calcio (Berridge, 2012).

1.1.1 Funciones celulares

Las variaciones en la concentración de calcio en los diferentes compartimentos celulares, sobre todo en el citosol, activan y regulan mecanismos biológicos que desencadenan diferentes funciones celulares fundamentales. A continuación se expone cómo está implicado el ión calcio en varias de estas funciones.

Durante la fertilización, el calcio interviene en dos procesos importantes para evitar la polispermia. El primer proceso, que dura segundos, se da cuando el espermatozoide se fusiona con el óvulo. Este hecho genera un aumento rápido de la concentración citosólica de calcio provocando la apertura de canales de cloruro en el ovocito. El cloruro sale inmediatamente de la célula provocando una despolarización de la membrana y generando un bloqueo rápido que impide la fusión de otro espermatozoide. El aumento de la concentración citosólica de calcio no sólo genera una despolarización de la membrana, como se ha comentado, sino que también activa la fusión de los gránulos corticales con la membrana plasmática generando una barrera estable (Nader et al., 2013). Por otro lado, el calcio también está implicado en la salida de la fase MII del ciclo celular y en el inicio de la mitosis (Kono et al., 1996).

En el control de la transcripción, el calcio está presente activando varios factores de transcripción como *cAMP-Response-Element Binding protein* (CREB) en el núcleo y *Nuclear Factor of Activated T cell* (NF-AT) o *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) en el citoplasma. La fosfatasa calcineurina, activada por su

unión a calcio, desfosforila NF-AT permitiendo su entrada en el núcleo para dar comienzo a la transcripción (Oh-hora & Rao, 2008). Por otro lado, el aumento en la concentración citosólica de calcio induce la proteólisis de la subunidad I κ B del factor NF- κ B, permitiendo así su entrada en el núcleo para comenzar la transcripción (Tabary et al., 2008). En el caso de CREB, la activación del factor se produce al ser fosforilado por las proteínas quinasas dependientes de calcio, calmodulina II y IV (CaMKII y CaMKIV); además el calcio estimula la unión de CREB al activador transcripcional *CREB Binding Protein* (CBP) (Hardingham et al., 1999).

En el caso de la contracción muscular, es necesario que la señal neuronal llegue a los músculos generando un potencial de acción que se propague a través del sarcolema. Este potencial de acción se transduce mediante un incremento de calcio en las zonas de unión de los túbulos trasversos T y el retículo sarco-endoplásmico. Los canales de calcio sensibles a dihidropiridinas y dependientes de voltaje (Ca_v1) responden modificando su conformación ante la variación del potencial de acción. Los receptores de rianodina del retículo sarco-endoplásmico, se encuentran estrechamente ligados a los Ca_v1 y el cambio conformacional de estos últimos, produce una activación de los receptores de rianodina que liberaran calcio del retículo sarco-endoplásmico (Endo et al., 1970). El calcio liberado se une a la troponina activándola para permitir la unión de la miosina a la actina y generar la contracción muscular.

El calcio participa en la regulación de varios procesos neuronales como la memoria o el aprendizaje. Los canales de calcio dependientes de voltaje, participan en la liberación de neurotransmisores durante la sinapsis nerviosa. El calcio que entra en la célula neuronal se une a la proteína sinaptotagmina, presente en las vesículas secretoras, que está unida al complejo *Soluble NSF Attachment Receptor* (SNARE) estabilizándolo. Su unión a calcio hace que el complejo se desestabilice permitiendo la apertura del poro y la liberación de los neurotransmisores (Sudhof, 2004).

El calcio también está implicado en la producción de trifosfato de adenosina (ATP). La mitocondria acumula calcio en su interior tanto para modular la señal de calcio citosólica como para regular la producción de ATP. Hay varias deshidrogenasas reguladas por calcio involucradas en la producción de dinucleótido de nicotinamida y

adenina (NADH) y finalmente ATP. El calcio se une directamente a la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDHP) que activa la piruvato deshidrogenasa (PHD) (Denton et al., 1972). Además, el calcio está favoreciendo la unión de la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa a sus sustratos. La muerte celular programada, apoptosis, es otro proceso con un alto grado de regulación donde el calcio se ve implicado. La apoptosis puede ser originada por señales extracelulares o de forma mitocondrial. El calcio actúa como señal preapoptótica cuando se produce una sobrecarga en la concentración de calcio mitocondrial. Esto junto con otros factores como la abolición del potencial de membrana mitocondrial o la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocarían la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP). Factores proapoptóticos como el citocromo c, el complejo Smac/DIABLO, o la procaspasa-9 salen desde la mitocondria al citosol a través del PTP o por mecanismos secundarios a su apertura, desencadenando así el proceso apoptótico (Joza et al., 2001).

1.1.2 La señal de calcio y su organización espacio-temporal

La célula necesita regular de forma muy precisa la concentración de calcio intracelular. Para ello la célula modula las corrientes de entrada y salida de calcio generando señales citosólicas que a su vez desencadenan las diferentes respuestas celulares.

La principal forma de controlar la concentración de calcio es mediante la compartimentalización del ión dentro de la célula. La concentración de calcio en el medio extracelular es de 1-2mM, mientras que en el citosol, en situación de reposo, es de 50-200nM. La regulación de la concentración citosólica de calcio es de suma importancia, puesto que modificaciones en la misma van a generar señales de calcio que desencadenan los diferentes procesos celulares. Para mantener la concentración de calcio citosólico, las ATPasas de membrana bombean el ión en contra de gradiente electroquímico, hacia el exterior celular o hacia el interior de los depósitos de calcio intracelulares como el retículo sarco-endoplásmico. La concentración de calcio en el retículo es de 0.5-2mM (Montero et al., 1997; de la Fuente et al., 2013).

Cada tipo celular en cada fase de desarrollo puede presentar distintos canales de calcio. Estos canales tras ser activados se abren para permitir la entrada de calcio desde el medio extracelular o la salida de calcio desde los depósitos intracelulares, y así generar un aumento en la concentración citosólica de calcio.

La señal de calcio está regulada de forma espacial y temporal, por ello tenemos incrementos en la concentración de calcio de pocos milisegundos o de minutos, distribuidos por todo el citosol o bien en zonas concretas. Cuando el incremento de calcio se produce en una zona concreta de la célula, se denomina microdominio de alto calcio. Este fenómeno es posible por las propiedades de difusión del calcio en el agua, la presencia de amortiguadores, la compartimentalización celular y la agrupación de los canales de calcio. Por lo tanto, se denominan microdominios de alto calcio a las regiones cercanas a las bocas de los canales de calcio, donde la concentración de calcio aumenta de forma rápida (Rizzuto & Pozzan, 2006).

Las características espaciales y temporales de cada microdominio dependerán de la conductancia y selectividad del tipo de canal asociado, de la concentración de calcio del retículo, de la concentración de calcio del medio extracelular, del potencial de membrana y de los amortiguadores intracelulares. Los valores de calcio para estas regiones podrían estar entre 100 y 300 μ M dependiendo del tipo celular (Schneggenburger & Neher, 2000).

Las mitocondrias están implicadas en la regulación espacial y temporal de la señal de calcio ya que son un sistema de tamponamiento rápido del ión. El calcio entra en la mitocondria a través del uniportador de calcio mitocondrial (MCU). La concentración de calcio en la mitocondria puede variar desde 100nM hasta 1mM (Montero et al., 2000). Una vez finalizado el estímulo, el calcio es liberado lentamente al citosol dejando en condiciones óptimas a la mitocondria para poder responder a nuevos estímulos.

1.1.3 Sistemas de tamponamiento de calcio celular

Estos sistemas celulares de tamponamiento de calcio están formados por una familia de proteínas que contienen motivos mano-EF que unen calcio y funcionan como

sensores del ión, cambiando de conformación al unirse a él. Cuando la concentración de estas proteínas es suficientemente alta son capaces de amortiguar la señal de calcio al reducir la concentración del ión libre en el citosol. Estas proteínas son calbindinas, parvalbúminas y calretinina y el ejemplo más estudiado es la calmodulina (CaM).

La calbindina y la calretinina son proteínas con alta afinidad por calcio. Se expresan de forma heterogénea dependiendo del tejido, donde además varía su concentración (Schwaller et al., 2002). La parvalbúmina se expresa en células de músculo esquelético a elevadas concentraciones, mientras que en células cocleares se expresa a bajas concentraciones. Esta proteína tiene baja afinidad por calcio por lo que no es capaz de actuar ante incrementos rápidos de la concentración de calcio pero es muy efectiva en procesos lentos (Cates et al., 2002). La CaM, está unida a multitud de proteínas donde actúa como sensor de calcio. La concentración de calcio no se ve alterada cuando se encuentra a bajas concentraciones, en cambio a concentraciones altas, estos sensores se convierten en amortiguadores de calcio (Chin & Means, 2000)

Dentro de los sistemas de tamponamiento celular, el retículo sarco-endoplásmico requiere una mención especial al ser el depósito de calcio intracelular más importante y participar de forma muy activa en la señalización por calcio. Las proteínas presentes en este orgánulo capaces de unir calcio suelen actuar como chaperonas plegando y transportando proteínas a lo largo del retículo. La más importante es la calreticulina capaz de amortiguar la mitad del calcio presente en el retículo endoplásmico (Szperl & Opas, 2005). En el retículo sarcoplásmico esta función la desempeña la calsecuestrina (CSQ) (Yáñez et al., 2012).

1.2 Aumento de la concentración de calcio citosólico

Ante un estímulo, las células aumentan su concentración citosólica de calcio. Este aumento en la concentración de calcio puede deberse a la entrada de calcio desde el medio extracelular o bien a la salida de calcio desde los depósitos intracelulares, en concreto del retículo sarco-endoplásmico, o a ambas.

1.2.1 Entrada de calcio desde el exterior celular

La membrana plasmática es prácticamente impermeable a calcio, generando un gradiente entre la concentración de calcio extracelular de más de 1mM y la intracelular del orden de 100nM. Esta diferencia de concentración junto con la diferencia de potencial existente en la membrana plasmática, permite la entrada de calcio desde el exterior celular a favor de gradiente a través de diferentes canales de calcio situados en la membrana plasmática. Estos canales de calcio permanecen abiertos durante periodos de tiempo de milisegundos, aunque es suficiente para provocar incrementos significativos en la concentración citosólica de calcio, especialmente en la boca interna de los canales donde se generan microdominios de alto calcio.

La cantidad y tipos de canales que se expresan en la membrana plasmática son específicos del tipo celular y del estado de desarrollo del mismo. Así, la distribución de los canales en la membrana plasmática es inherente al tipo y función de la célula en que se encuentra, siendo no homogénea a lo largo de la membrana plasmática.

Los canales de calcio que podemos encontrar en la membrana plasmática se agrupan en cuatro familias: canales operados por voltaje (VOCs), canales operados por receptor (ROCs), canales operados por depósitos intracelulares (SOCs) y la superfamilia de los TRPs (*Transient Receptor Potencial*).

1.2.1.1 Canales operados por voltaje (VOCs)

Los canales de calcio operados por voltaje se encuentran en células excitables (musculares, endocrinas y nerviosas), donde actúan transduciendo las señales eléctricas a respuestas bioquímicas. Cuando la célula se despolariza en respuesta a un estímulo, los VOCs se abren y permiten la entrada de calcio al interior de la misma desencadenando diferentes procesos como la expresión de genes, la contracción, la secreción o la neurotransmisión. Estos canales están formados por una subunidad principal, $\alpha 1$, que actúa como sensor de voltaje y forma el poro así como por diversas subunidades reguladoras como la subunidad β , las subunidades $\alpha 2$ y δ (glicosiladas y unidas por puentes disulfuro) y la subunidad transmembrana γ (Catterall, 2011).

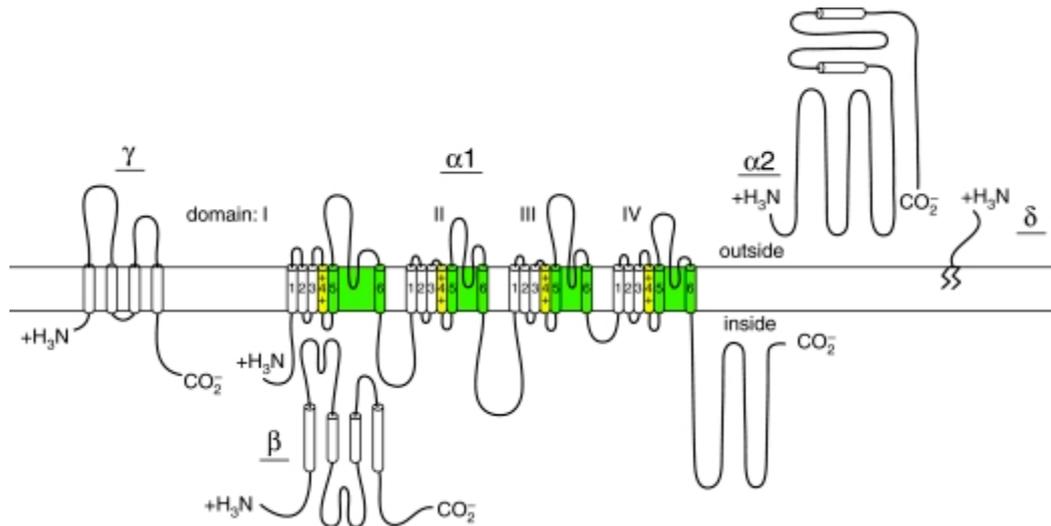


Figura 1: Estructura general de los canales de calcio operados por voltaje donde se visualizan sus diferentes subunidades. (Catterall,2011)

Los canales operados por voltaje se han clasificado atendiendo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas en tres subfamilias Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3 (Ertel et al., 2000):

- **Subfamilia Ca_v1 :** Esta familia está formada por cuatro miembros denominados $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ y $Ca_v1.4$. Estos canales se expresan en músculo esquelético y cardíaco así como en células endocrinas y neuronas. Conducen corrientes de tipo L, que se activan a un voltaje alto (-30mV) y tienen una conductancia e inactivación lenta. Los canales de esta familia son inactivados por dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas (Reuter, 1979).
- **Subfamilia Ca_v2 :** Familia formada por tres miembros. Se expresan generalmente en el sistema nervioso donde se encargan de transmitir la señal sináptica. Conducen corrientes de tipo N, P/Q y R, que necesitan una alta despolarización para ser activadas, al igual que la familia Ca_v1 , aunque en este caso son bloqueados por neurotoxinas peptídicas en lugar de dihidropiridinas. Los canales $Ca_v2.1$ conducen corrientes de tipo P/Q y se inhiben por ω -agatoxina IVA (Llinás et al., 1989). Los canales $Ca_v2.2$ conducen corrientes de tipo N y son inhibidos con ω -conotoxina (Olivera et al., 1994). Los canales $Ca_v2.3$ conducen corrientes tipo R y son inhibidos por una toxina peptídica procedente de tarántulas denominada SNX-428 (Newcomb et al., 1998).

- Subfamilia Ca_v3: Familia formada por tres miembros que conduce corrientes de tipo T caracterizadas por activarse a potenciales de membrana bajos (-60mV), y por tener una inactivación rápida y una baja conductancia. Se expresan en muchos tipos celulares, donde controlan el potencial de acción y los patrones repetitivos. Son inhibidos únicamente por la toxina de escorpión kurtoxina (Chuang et al., 1998).

1.2.1.2 Canales operador por receptor (ROCs)

Los canales de calcio operados por receptor son activados por la unión de agonistas extracelulares a su receptor, que puede ser el propio canal, o bien estar unido a este. El proceso de señalización puede producirse de forma indirecta, a través de una despolarización de la membrana plasmática al permear diferentes iones, o de forma directa permitiendo la entrada de Ca²⁺ a través del canal. En este grupo de canales podemos encontrar el canal de cationes asociado al receptor de ATP P2X, el receptor nicotínico de acetilcolina y los canales asociados a receptores de *N-metil-D-aspartato* (NMDA).

- La familia de canales asociados al receptor de ATP P2X, o receptores purinérgicos, está formada por siete miembros, que se distribuyen en el tejido neuronal, muscular y sanguíneo. Son activados por un incremento de ATP extracelular que provoca la entrada de Ca²⁺ y Na⁺ en la célula que despolariza la membrana plasmática. Está formado por tres subunidades homo o heteroméricas de las que dependen sus características, permitiendo mediar respuestas rápidas como la transmisión sináptica o lentas como la coagulación sanguínea (Vial et al., 2004; Roberts et al., 2006).
- El receptor nicotínico de acetilcolina, activado por nicotina o acetilcolina (nAChRs) es altamente permeable a Ca²⁺. Esta permeabilidad depende en gran medida de las diferentes subunidades que forman el canal, que varían en función del tejido. En el tejido nervioso, se encarga de transmitir señales en las uniones neuromusculares o en la sinapsis, así como de liberar neurotransmisores como acetilcolina, glutamato y noradrenalina (Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004).

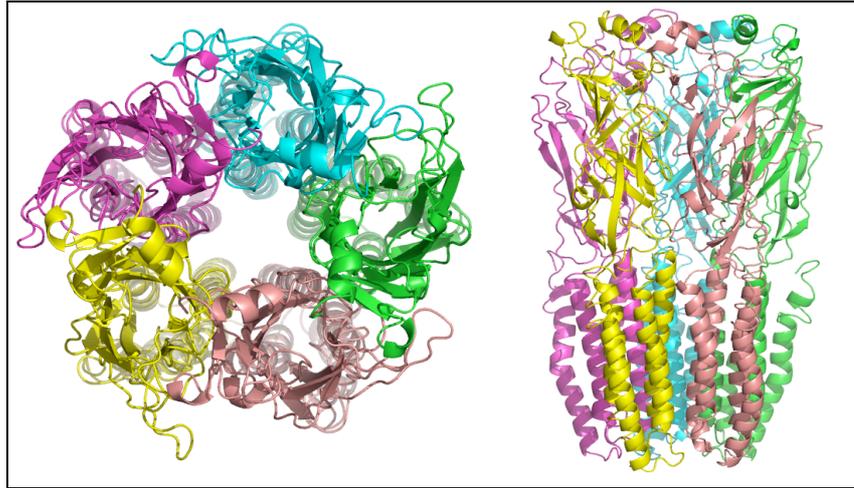


Figura 2: Estructura del receptor nicotínico de acetilcolina. (PDB 2BG9).

- Por último, los canales asociados a receptores NMDA permanecen bloqueados por Mg^{2+} a valores normales de potencial de membrana por lo que su activación por glutamato es dependiente de potencial. El canal está formado por un heterotetramero que contiene dos subunidades GluN1 y dos GluN2. Cuando se activa permite el paso de Ca^{2+} y de Na^+ . El flujo de calcio a través del canal es fundamental en la plasticidad sináptica, implicada en la memoria y el aprendizaje (Traynelis et al., 2010).

1.2.1.3 Canales operados por depósitos intracelulares (SOCs)

Los canales operados por depósitos intracelulares producen la entrada de calcio del medio extracelular en respuesta a una liberación de calcio de los depósitos, principalmente del retículo sarco-endoplásmico. Esta liberación de calcio disminuye su concentración en el retículo y estimula la entrada del catión a través de estos canales con el fin de rellenar dichos depósitos. Esta corriente se denomina I_{CRAC} (*Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current*; Hot & Penner, 1992) y está presente en muchos tipos celulares. La entrada capacitativa de calcio promovida por el vaciado de los depósitos se ha denominado SOCE (*store-operated calcium entry*; Montero et al., 1993) y es activada por la liberación de calcio del retículo sarco-endoplásmico en respuesta a la unión del Inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) a su receptor o a la activación de los receptores de rianodina por el propio calcio citosólico (Parekh & Putney, 2005).

Las proteínas implicadas en SOCE han sido descubiertas en los últimos 10 años mediante el uso de RNA de interferencia. El canal que permite la entrada de calcio, desde el exterior celular, está formado por la proteína Orai1 y el sensor de calcio situado dentro del retículo sarco-endoplásmico conocido como STIM. Cuando el retículo sarco-endoplásmico está lleno de calcio, Orai1 y STIM se encuentran repartidas por las membranas plasmática y del retículo, respectivamente. Si el retículo se vacía, las proteínas STIM se agregan y migran hacia zonas de contacto entre la membrana plasmática y el retículo sarco-endoplásmico donde se unen a Orai1 para permitir la entrada de calcio. Durante la situación de reposo, STIM se encuentra unida a calcio del retículo, lo que impide su agregación y migración hacia la membrana plasmática. Cuando el retículo sarco-endoplásmico se ha depletado, STIM se reorganiza para unirse a Orai1 permitiendo así la entrada de calcio al citosol para posteriormente rellenar de calcio el retículo (Cahalan, 2009; Soboloff et al., 2012).

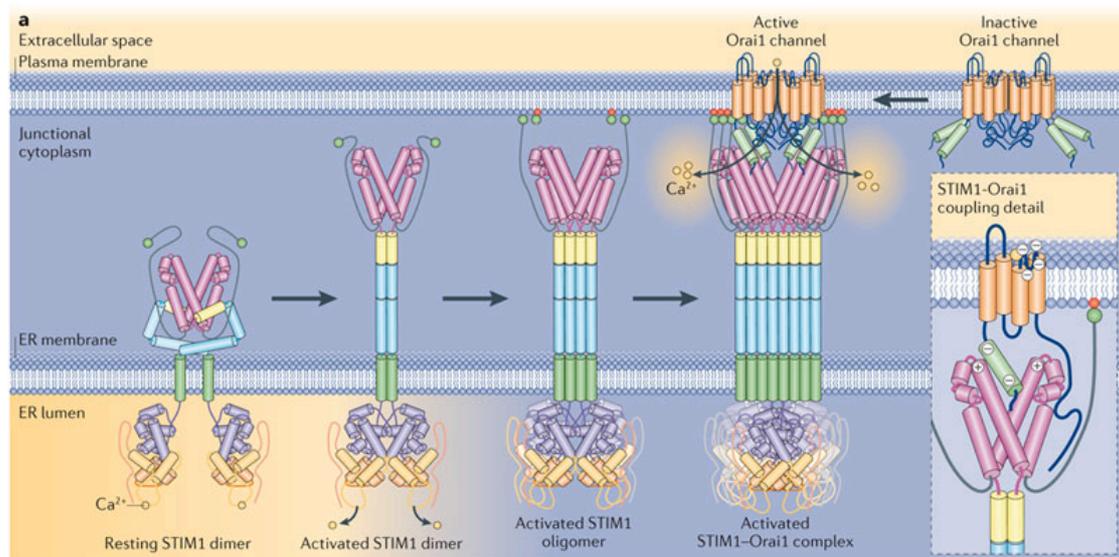


Figura 3: Modelo de la interacción molecular entre STIM1 y Orai1 en respuesta a un vaciado de calcio del retículo endoplásmico (Soboloff et al., 2012)

La proteína TRPC, perteneciente a la familia TRP que veremos a continuación, juega un papel importante en la entrada de calcio capacitativa, pero con una corriente diferente de la originada por las proteínas STIM y Orai1, en este caso la corriente se denomina I_{SOC} (*store operated Ca^{2+} current*) y está caracterizada por su baja o nula selectividad por calcio. Las proteínas TRPC forman combinaciones heteroméricas con Orai1 para

unirse a STIM y generar esas corrientes operadas por depósitos (Smyth et al., 2006; Albarrán et al., 2014).

1.2.1.4 Canales de la superfamilia de los TRP

La superfamilia de los canales TRP está formada por un grupo heterogéneo de 28 miembros. Son activados por una gran variedad de estímulos como temperatura, presión, osmolaridad, sustancias químicas e interacciones proteicas. La estructura general de los miembros de esta familia son seis hélices transmembrana ensambladas para formar homo o heterotetrámeros. También poseen regiones susceptibles a fosforilación, repeticiones de anquirina y/o una región altamente conservada denominada dominio TRP. Esta superfamilia se encuentra dividida en siete familias; TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML y TRPN. Nos centraremos en las tres primeras debido a su mayor selectividad catiónica (Montell et al., 2002a-b).

- Subfamilia TRPC (canónicos), formada por siete isoformas posee el dominio TRP y cuatro repeticiones de anquirina. Están ampliamente expresados en diversos tejidos y su selectividad por calcio es dependiente de la isoforma. El miembro TRPC1 está implicado en la entrada de calcio capacitativa al unirse a STIM para permitir la entrada de calcio en respuesta a un vaciado de los depósitos intracelulares, como se ha descrito anteriormente (Smyth et al., 2006; Albarrán et al., 2014). La entrada de calcio también puede ser activada por la cascada de la fosfolipasa C (PLC) independientemente de las corrientes de calcio intracelular (Nilius et al., 2011).
- Subfamilia TRPV (vainilloides) formada por seis isoformas de las cuales TRPV5 y TRPV6 presentan mayor afinidad por calcio. Estructuralmente, contienen cuatro repeticiones de anquirina pero han perdido el dominio TRP. Se expresan de forma ubicua, especialmente en terminales nerviosos periféricos. Están implicados en la nocicepción activándose por capsaicina, anandamida, temperatura ($T \geq 43^\circ\text{C}$) o acidez ($\text{pH} \leq 5.9$) (Venkatachalam et al., 2007).

- Subfamilia TRPM (melastatina), formada por 8 isoformas han perdido las repeticiones de anquirina pero incluyen proteínas funcionales completas en el extremo C terminal como kinasas o ADP ribosa. La permeabilidad por Ca^{2+} es dependiente de la isoforma llegando a ser completamente impermeable al catión en el caso de TRPM4 y 5 o muy permeable como TRPM6 y 7. Las funciones en las que se encuentran implicados los miembros de esta familia son muy diversas: regulación de las oscilaciones de calcio tras la activación de células T, transducción del sabor o la sensación de frío y regulación de la adhesión celular (Kraft et al., 2005).

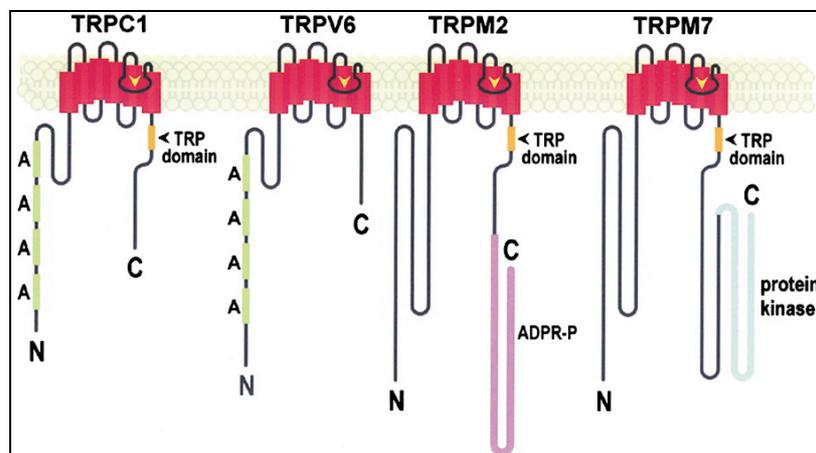


Figura 4: Organización de los diferentes dominios en ciertos miembros de las familias TRPC, TRPV y TRPM (Montell et al., 2002b).

1.2.2 Liberación de calcio desde los depósitos intracelulares

Como se ha mencionado anteriormente, el aumento de la concentración citosólica de calcio, producido ante un estímulo, no solo se debe a la entrada de calcio desde el medio extracelular, sino a que la salida de calcio desde los depósitos intracelulares también promueve este aumento en la concentración citosólica del ión.

El retículo sarco-endoplásmico es el principal depósito de calcio intracelular. La concentración de calcio libre dentro de este orgánulo puede llegar a ser de 500 a 2000 μM , dependiendo del tipo celular. Una parte importante del calcio que se encuentra en el retículo está unido a proteínas como calreticulina o calsecuestrina (Montero et al., 1997, De la Fuente et al., 2013).

La salida de calcio desde el retículo endoplásmico se encuentra regulada por los receptores de IP₃ y de rianodina (RyR).

1.2.2.1 Receptor de IP₃ (IP₃R)

Se conocen tres genes que codifican para el receptor de IP₃ en mamíferos (IP₃R1, IP₃R2, IP₃R3), además de diferentes variantes generadas por procesamiento alternativo. El receptor está formado por tetrámeros de unos 2700 aminoácidos cada subunidad. Este canal catiónico de alta conductancia tiene baja selectividad para calcio que queda compensada al ser el calcio el único catión que se encuentra en el interior del retículo sarco-endoplásmico con un gradiente electroquímico significativo (Mikoshiya et al., 2007).

La fosfolipasa C se activa en presencia de un agonista a través de proteínas G, e hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato generando IP₃ y diacilglicerol en el citosol. Este IP₃ se une a su receptor, situado en la membrana del retículo endoplásmico, provocando la salida de calcio del depósito. Es necesaria la unión de dos moléculas de IP₃ al receptor para activarlo aunque la unión de calcio también es necesaria para que el canal se abra completamente. El calcio tiene una acción bifásica sobre el canal ya que a concentraciones bajas (hasta 1μM) lo activa y a concentraciones mayores lo inhibe. La activación por calcio del IP₃R constituye un mecanismo conocido como CICR (*Ca²⁺-induced Ca²⁺-release*) descrito inicialmente en los receptores de Rianodina (Taylor & Laude, 2002).

Este receptor puede ser modulado por otras vías como la fosforilación de la calmodulina, la proteína quinasa dependiente de monofosfato de guanosina cíclico (GMPC), la proteína quinasa C o la proteína quinasa A. Las sustancias como el 2-aminoetil difenilbonato (2-APB), la heparina y las xestosponginas producen una disminución de su actividad (Worley et al., 1987; Gafni et al., 1997; Maruyama et al., 1997).

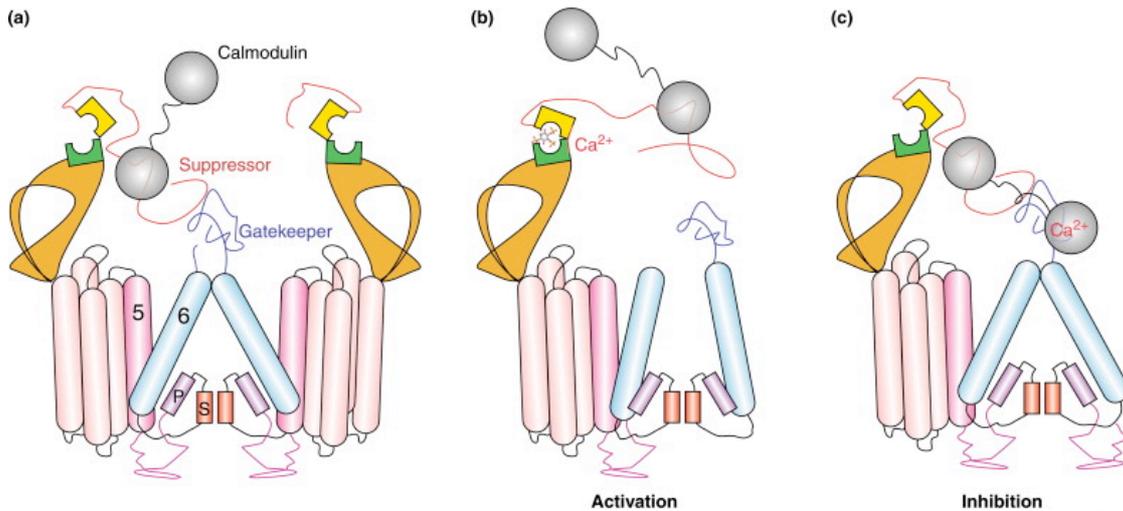


Figura 5: Modelo de activación del IP_3R . Este esquema muestra únicamente dos subunidades del receptor en su estado cerrado (a). La región supresora N-terminal mantiene el poro cerrado al asociarse con el controlador de la subunidad vecina. Cuando el IP_3 se une (b) la asociación entre la subunidad supresora y el controlador se elimina generando un lugar de unión a calcio y dejando el poro libre para el paso del ion. En ausencia de IP_3 (c) la calmodulina unida a calcio impide la apertura del canal al estabilizar la unión entre la región supresora y el controlador (Taylor et al., 2004).

1.2.2.2 Receptor de rianodina (RyR)

Existen tres isoformas para el receptor de rianodina (RyR1, RyR2 y RyR3). RyR1 se expresa en músculo esquelético y fue la primera en ser clonada, RyR2 se encuentra principalmente en músculo cardíaco y RyR3 en tejido nervioso. El receptor está formado por homotetrámeros cuyas subunidades poseen 5000 aminoácidos (Petegem, 2012).

En la isoforma muscular (RyR1), la activación se produce por un acoplamiento directo entre el receptor de rianodina y el canal $Ca_v1.1$ de la membrana plasmática. La despolarización de la membrana plasmática se transmite al interior celular a través de los túbulos T. Esto genera un cambio conformacional en los canales $Ca_v1.1$, que induce la activación del RyR1 a través de una interacción física con el mismo (Rios & Brum, 1987; Fill & Copello, 2002).

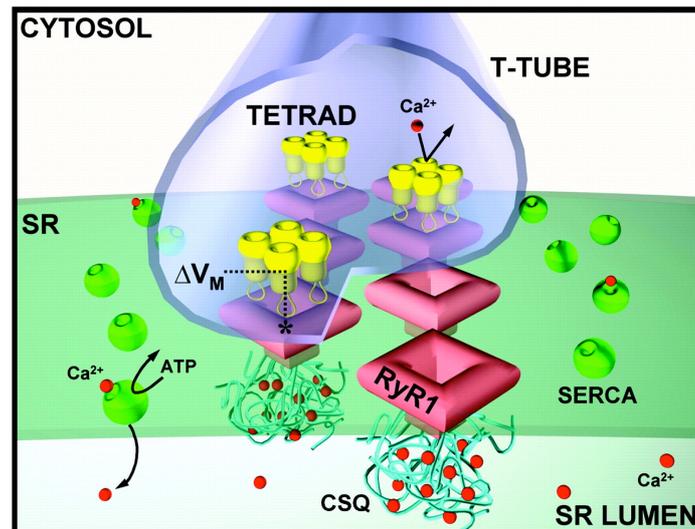


Figura 6: Esquema del entorno del receptor de rianodina en músculo esquelético. El túbulo T (T-TUBE) contiene tétradas del receptor $Ca_v.1.1$ (TETRAD) asociadas al receptor de rianodina (RyR1). Los cambios de voltaje en el túbulo T activan el canal de dihidropiridinas produciendo la entrada de calcio a través del canal y una modificación conformacional que activa el canal de rianodina provocando la salida de calcio del retículo sarcoplásmico (SR). (Fill & Copello, 2002)

La isoforma cardíaca (RyR2) se activa por calcio citosólico mediante el fenómeno CICR mencionado anteriormente. La activación de los canales de Ca^{2+} de los túbulos T produce una entrada de Ca^{2+} al citosol que activa los RyR2. El calcio actúa de forma bifásica activando el canal a bajas concentraciones e inhibiéndolo a concentraciones superiores a $100\mu\text{M}$. Las diferencias de afinidad encontradas en los diferentes sitios de unión a calcio en el RyR2 facilitan este comportamiento bifásico. El receptor también es capaz de detectar la concentración de calcio existente en el interior del retículo sarco-endoplásmico, que promueve la apertura del canal y la salida de calcio cuando es muy elevada (Endo et al., 1970, Palade et al., 1983).

La calmodulina inhibe el RyR1, mientras que la apocalmodulina (forma no unida a calcio) activa todas las isoformas del receptor. La calsequestrina también regula la actividad del receptor al ser el tampón de calcio más importante del lumen del retículo sarcoplásmico (Yamaguchi et al., 2005).

Otros compuestos implicados en la regulación del receptor son el Mg^{2+} y el ATP, que actúan como inhibidor y activador respectivamente. El Mg^{2+} compete con el Ca^{2+} por los sitios de alta afinidad inhibiendo así ciertas isoformas del receptor (Laver DR.,

2007). Por otro lado, la cafeína, la rianodina y la procaína, modulan el receptor de rianodina incrementando la probabilidad de apertura del canal. La rianodina a concentraciones submicromolares promueve el estado abierto mientras que a concentraciones superiores favorece el estado cerrado (Buck et al., 1992). La cafeína incrementa tanto la probabilidad de apertura como el tiempo de la misma potenciando la afinidad del receptor por el ATP y el Ca^{2+} (Rousseau et al., 1988). La procaína inhibe los receptores de rianodina al unirse al receptor en su estado cerrado y estabilizarlo (Zahradníková & Palade, 1993).

1.3 Recuperación de los niveles basales de calcio citosólico

Tras la activación celular es necesario recuperar los niveles basales de calcio citosólico para poder dar respuesta al siguiente estímulo. Para conseguirlo se saca parte del calcio al medio extracelular mediante los sistemas de bombeo de la membrana plasmática y se rellenan los depósitos intracelulares.

La célula cuenta con tres mecanismos de bombeo básicos para poder realizar esta tarea: la ATPasa de membrana plasmática (PMCA), la ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX). Las ATPasas tienen menor tasa de transporte pero mayor afinidad que el intercambiador por lo que son capaces de responder a variaciones pequeñas de calcio manteniendo los niveles de calcio citosólico en torno a 100nM en reposo.

1.3.1 ATPasa de membrana plasmática (PMCA)

La ATPasa de membrana plasmática, descrita por primera vez en 1966 en eritrocitos (Schatzman, 1966), es una ATPasa tipo P capaz de transportar Ca^{2+} desde el citoplasma al exterior celular hidrolizando una molécula de ATP y generando un intermediario fosforilado estable en medio ácido. Este transporte electrogénico tiene una estequiometría 1:1 (Mangialavori et al., 2013). En humanos la proteína está codificada por cuatro genes que a su vez generan diferentes isoformas las cuales se distribuyen en todos los tejidos.

La PMCA está formada por 10 dominios transmembrana, con dos grandes bucles intracelulares, uno con un dominio de unión a fosfolípidos y el otro con un dominio de unión a ATP. El extremo C terminal posee un sitio de unión a calmodulina y zonas sensibles a fosforilación, por lo que esta región actúa como regulador (Brini & Carafoli, 2011; Bruce, 2013).

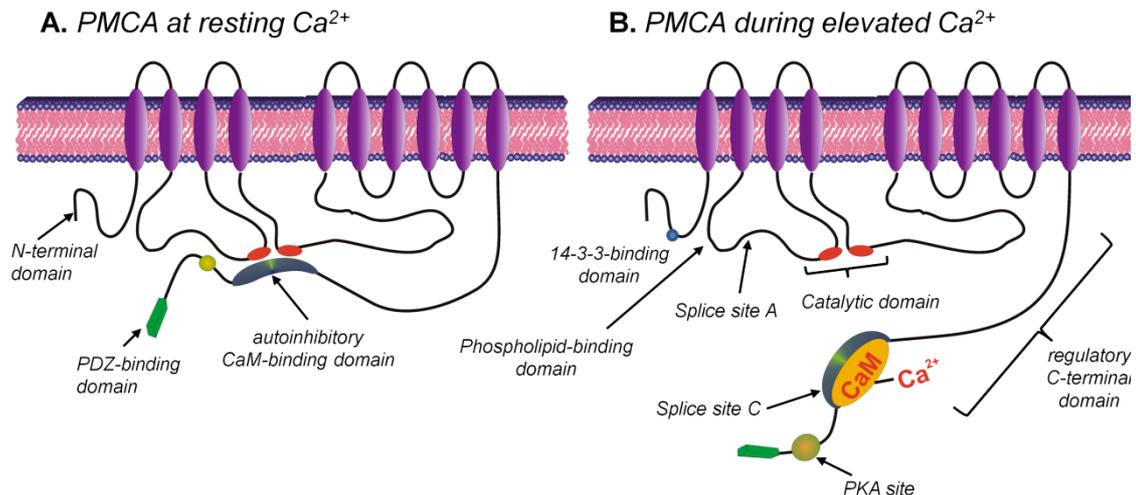


Figura 7: Esquema de las estructuras principales de la PMCA en condiciones de concentración de calcio citosólico basal (A) y alto (B). Cuando la concentración de calcio aumenta la calmodulina unida a calcio se une al dominio autoinhibitorio de unión a calmodulina dejando el dominio catalítico de unión a ATP libre y activando el transporte activo de calcio hacia el exterior celular (Bruce, 2013).

1.3.2 ATPasa de retículo sarco-endoplásmico (SERCA)

La ATPasa de retículo sarco-endoplásmico rellena los depósitos intracelulares de calcio a través de la hidrólisis de ATP. Al igual que la PMCA es una ATPasa de tipo P pero en este caso la estequiometría es 1:2 por cada molécula de ATP hidrolizada transporta dos iones calcio al interior del retículo (Bublitz et al., 2013).

Existen tres genes que codifican para SERCA en humanos, aunque en total se cuenta con diez isoformas generadas por procesamiento alternativo, que se expresan de forma dependiente de tejido. Estructuralmente la ATPasa de retículo posee 10 dominios transmembrana, tres dominios citoplasmáticos (dominio de unión a fosfolípidos, dominio de unión a ATP y dominio susceptible de fosforilación) y un pequeño bucle luminal (Toyoshima, 2008).

La regulación de esta bomba está controlada por dos proteínas, el fosfolamban y la sarcolipina. El fosfolamban inhibe la SERCA disminuyendo su afinidad por el Ca^{2+} citosólico, proceso que se revierte al ser fosforilado por la proteína quinasa II dependiente de calmodulina o por la proteína quinasa A (MacLennan & Kranias, 2003). La sarcolipina actúa de forma similar al fosfolamban y su acción conjunta genera una inhibición superior. Por otro lado, la SERCA puede ser inhibida de forma irreversible por thapsigargina, o de forma reversible por BHQ (2,5-di(terbutil)-1,4-benzohidroquinona) (Moore et al., 1987; Inesi & Sagara, 1992).

1.3.3 Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática es fundamental en las células excitables donde representa el mayor flujo de salida de calcio al medio extracelular. Su alta tasa de transporte hace que esto sea posible a pesar de su baja afinidad por calcio. El transporte se realiza a favor del gradiente electroquímico de Na^+ , donde se introducen tres iones sodio por cada ion calcio extruido. Si los gradientes electroquímicos se invierten, el intercambiador puede funcionar de forma reversa. La activación del intercambiador se produce al unirse iones calcio en el lado citosólico, en cambio si se unen iones Na^+ en este lado, el intercambiador se inhibe (Lytton, 2007).

Se han descrito tres genes responsables de las diferentes isoformas encontradas en humanos, las cuales se expresan de forma diferencial dependiendo del tejido. NCX1 se expresa de forma ubicua, NCX2 se expresa en cerebro y NCX3 en músculo esquelético. La estructura del intercambiador posee 9 dominios transmembrana y un bucle citoplasmático entre ellos, lugar de unión de los iones Na^+ y Ca^{2+} . Aparte de los dos iones, existen otras moléculas que regulan la activación del NCX como el ATP, la calcineurina y la proteína quinasa A o la C (Brini & Carafoli, 2011).

1.4 Las mitocondrias y el calcio

1.4.1 Estructura

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos limitados por una doble membrana. Se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. Son de gran importancia para la célula, ya que se encargan de generar la energía necesaria para su buen funcionamiento. Además, están implicadas en otras funciones como diferenciación celular, señalización, muerte celular, control del ciclo celular y del crecimiento celular.

Su tamaño oscila entre 0,5 y 1 μ m de diámetro y su número en la célula es muy variado dependiendo del organismo, el tejido y el tipo celular, siendo los glóbulos rojos el único tipo celular que no posee mitocondrias. La variabilidad de su forma y tamaño se debe a la gran plasticidad que les otorgan los procesos de fusión y fisión a los que están sometidas para poder responder de forma eficiente a los requerimientos energéticos (Sauvanet et al. 2010). Las mitocondrias no son entidades discretas; de hecho, los orgánulos aislados son transitorios y están en constante comunicación a través de mecanismos de fusión y fisión para formar sincitios localizados o extendidos dentro de las células, constituyendo una red mitocondrial.

Las mitocondrias están limitadas por dos membranas, la membrana externa y la membrana interna. Esta compartimentalización hace posible poder dividir la mitocondria en cuatro partes: la membrana externa, el espacio intermembrana, la membrana interna y la matriz mitocondrial.

La membrana mitocondrial externa rodea toda la mitocondria y la pone en contacto con el citoplasma. Está formada por una bicapa lipídica similar a la envoltura celular. Contiene un gran número de proteínas denominadas VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*), las cuales forman canales que permiten el paso de moléculas solubles, de peso inferior a 5kDa, que pueden ser iones, metabolitos o polipéptidos (Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012). Las proteínas de mayor tamaño pueden entrar en la mitocondria a través de las translocasas, a las que se unen para atravesar la membrana. En la membrana externa también podemos encontrar un gran número de enzimas implicadas en la elongación de los ácidos grasos, la oxidación de la adrenalina

o la degradación del triptófano. Por otro lado, esta membrana se encuentra asociada a la membrana del retículo sarco-endoplásmico a través de moléculas de mitofusina 2. Esta estructura, denominada MAM (*mitochondria-associated ER-membrane*) es esencial en la señalización por calcio además de estar implicada en la transferencia de lípidos entre el retículo sarco-endoplásmico y la mitocondria (Hayashi et al., 2009; Patergnani et al., 2011).

El espacio intermembrana, comprendido entre la membrana externa y la interna, es conocido como espacio perimitocondrial ya que posee la misma concentración de iones y azúcares que el citoplasma. En cambio la composición proteica de este espacio es muy diferente al citosol.

La membrana mitocondrial interna contiene un gran número de proteínas que desempeñan diferentes funciones como la fosforilación oxidativa, la síntesis de ATP, el transporte de proteínas y la fisión y fusión mitocondrial; es prácticamente impermeable y no posee grandes poros como la membrana externa mitocondrial. Por ello, son necesarios transportadores específicos para que los iones y las diferentes moléculas puedan acceder a la matriz mitocondrial. La impermeabilidad a los iones hace que se genere un potencial eléctrico entre el interior y el exterior de esta membrana de unos -130/-180mV, generado por el bombeo de protones de la cadena transportadora de electrones. En la membrana interna mitocondrial se forman unas invaginaciones denominadas crestas mitocondriales, que aumentan la superficie de la misma de forma considerable. En estas crestas se disponen las proteínas que forman la cadena respiratoria. Por ello el número de crestas o su tamaño es mayor en células con mayores requerimientos energéticos como las células musculares (Mannella, 2006)

La matriz mitocondrial contiene la mayor parte de las proteínas mitocondriales y es la responsable del ciclo de Krebs. La matriz posee un gran número de enzimas así como RNA y DNA mitocondrial.

1.4.2 Función

Las mitocondrias son ampliamente conocidas por generar la energía necesaria para el buen funcionamiento celular en forma de ATP, pero está implicada en otras funciones

importantes. Estas funciones son la regulación de ROS (especies reactivas de oxígeno), la termogénesis, la apoptosis y la homeostasis de calcio subcelular.

1.4.2.1 Producción de ATP

Cada molécula de acetil-CoA obtenida en la desaminación oxidativa, la beta oxidación o la glucólisis, es transportada a la mitocondria donde el Ciclo de Krebs genera CO₂, NADH y FADH₂. Posteriormente, el NADH y el FADH₂ ceden sus electrones a la cadena respiratoria. Esta transferencia de electrones genera un gradiente electroquímico por el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana. Este gradiente es aprovechado para reintroducir los protones de vuelta a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa y generar ATP. En concreto se generan 32 moléculas de ATP por cada glucosa metabolizada.

1.4.2.2 ROS

El proceso de fosforilación oxidativa es muy eficiente, pero puede producir reducción incompleta del oxígeno molecular generando especies reactivas de oxígeno. Esto puede causar estrés oxidativo en la mitocondria y contribuir al deterioro de las funciones mitocondriales, lo que también está asociado al proceso de envejecimiento. La generación de ROS produce también señales celulares necesarias para conservar las mitocondrias más activas y degradar las más dañadas (Dröse et al., 2014).

1.4.2.3 Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso complejo que se produce en las células en respuesta a un daño celular. Este daño suele estar señalizado por un aumento sostenido en la concentración de calcio mitocondrial acompañado de estrés oxidativo y producción de ceramidas de cadena corta. Todo ello lleva a la apertura del poro de transición de permeabilidad, que facilita la salida al citoplasma de señales proapoptóticas como SMAC/DIABLO, AIF o el citocromo c. Además, se pierde el potencial de membrana mitocondrial lo que impide la formación de ATP y lleva a la muerte celular (Giorgi et al., 2012).

1.4.2.4 Homeostasis del calcio subcelular

Las mitocondrias son un factor esencial dentro de la homeostasis subcelular del calcio, debido a su implicación en la regulación de la señalización intracelular por calcio. Durante la estimulación celular, cuando se produce un aumento en la concentración citosólica de calcio, la mitocondria capta y acumula grandes cantidades del ión con el fin de modular esta señal de forma espacial y temporal. La captación de calcio por parte de la mitocondria es tal, que la concentración del ión dentro del orgánulo puede llegar a 0.5-1mM (Montero et al., 2000; de la Fuente et al., 2012).

El calcio atraviesa la membrana externa mitocondrial a través de los canales VDAC. El transporte a través de la membrana interna está dirigido por la diferencia de potencial que existe en dicha membrana (-130/-180mV), generada por el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana por la cadena transportadora de electrones. El potencial de membrana se puede disipar con rotenona o cianuro, que inhiben el bombeo de protones o bien con protonóforos como el FCCP (*Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*) que introduce protones en la matriz mitocondrial. En presencia de protonóforos, abolido el potencial de membrana, la ATP sintasa puede funcionar en reverso sacando protones al espacio intermembrana con un gasto de ATP.

Las variaciones en la concentración de calcio de la matriz mitocondrial regulan una de las principales funciones mitocondriales: la fosforilación oxidativa. Este hecho se debe a que tres deshidrogenasas intramitocondriales están reguladas por calcio. Estas enzimas son la isocitrato deshidrogenasa, la oxoglutarato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa. En las dos primeras, implicadas en el ciclo de Krebs, tanto la concentración de calcio como la proporción ADP/ATP producen un aumento en la afinidad por sus sustratos (Denton et al., 1978). En el caso de la piruvato deshidrogenasa, el calcio ejerce una acción indirecta sobre ella ya que se activa por una fosfatasa dependiente de calcio (Denton et al., 1972). Por lo tanto, la captación de calcio mitocondrial potencia la producción de ATP después de un incremento de la concentración de calcio citosólico, transmitiendo así la demanda de un aumento metabólico a través de una señal de calcio (Hajnóczky et al., 1995).

La mitocondria juega un papel crucial en la regulación de la señal de calcio gracias a su capacidad amortiguadora. Una de las características mitocondriales que facilitan su papel en la regulación de la señal de calcio es su plasticidad estructural producida por procesos de fusión y fisión en la red mitocondrial, así como su distribución dentro de la célula.

En primer lugar, las mitocondrias pueden acumularse en determinadas zonas celulares dividiendo la célula en compartimentos con diferente dinámica de calcio. De esta forma la difusión de la señal de calcio tiene un efecto diferente en diferentes compartimentos celulares. Por ejemplo, en las células nerviosas las mitocondrias se localizan en la zona sináptica (Medler & Gleason, 2002), mientras que en las células acinares pancreáticas se localizan en el polo secretor (Voronina et al., 2002). En células T activadas, las mitocondrias se encuentran muy próximas a los canales Orai1 reduciendo el tamaño del microdominio de calcio que previene la inactivación del canal dependiente de calcio. De este modo se mantiene la entrada capacitativa de la sinapsis inmunológica que desencadena la transcripción genética (Hoth et al., 2000).

En segundo lugar, la asociación de la red mitocondrial con el retículo sarco-endoplásmico en las denominadas MAM, hace posible la regulación de los canales de calcio del retículo sarco-endoplásmico por la captación de calcio mitocondrial. Las mitocondrias captan el ión de los microdominios de alto calcio que se generan en la boca de los canales del retículo sarco-endoplásmico o de la membrana celular. De esta forma se reduce la concentración citosólica de calcio local y se modula la actividad de dichos canales. Como hemos mencionado anteriormente la concentración de calcio puede activar o inhibir dichos canales, por lo que la captación de calcio por parte de la mitocondria se hace fundamental en la regulación de los mismos. El receptor de IP₃ se inhibe por concentraciones muy bajas o muy altas de calcio, haciendo que las mitocondrias cercanas al canal capten rápidamente el calcio liberado, provocando una apertura del receptor más prolongada (Jouaville et al., 1995).

1.4.3 Entrada de calcio en la mitocondria

Como se ha mencionado, para que el calcio entre dentro de la mitocondria, es necesario que atraviese las dos membranas mitocondriales. La membrana mitocondrial externa no opone resistencia ya que los iones difunden a través de los canales VDAC. La membrana mitocondrial interna, en cambio, es altamente selectiva y la entrada de calcio únicamente se produce a través del MCU.

En los últimos años se han hecho grandes avances en el conocimiento de la estructura y función de este uniportador de calcio y se han obtenido resultados interesantes. En primer lugar se ha demostrado que el uniportador tiene una gran complejidad y está formado no solo por la subunidad formadora del poro MCU, sino también por un parólogo con función inhibidora MCUB y al menos 5 subunidades reguladoras: MICU1, MICU2, MICU3, EMRE, MCUR1. Todas estas proteínas forman el complejo del uniportador de calcio mitocondrial.

1.4.3.1 MCU

En los años 70 se aisló una glicoproteína en mitocondrias de hígado capaz de inducir una corriente de calcio en bicapas lipídicas (Sottocasa et al., 1972). Esta corriente de calcio, que recordaba a las características específicas encontradas en la mitocondria cuando se inducía una corriente de calcio, era bloqueada por Rojo de Rutenio y anticuerpos contra dicha proteína (Panfili et al., 1976). En el año 2011, el gen *CCDC109A* se identificó como el gen codificante para el uniportador por dos grupos independientes (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011). Tanto los experimentos de sobreexpresión como de silenciamiento han indicado que esta proteína es la formadora del canal (Patron et al., 2013).

Este gen nuclear, codifica para una proteína de 40kDa cuya forma madura tiene 35kDa al perder la secuencia de direccionamiento. Posee dos dominios transmembrana unidos por un bucle rico en residuos ácidos (EYSWDIMEP), denominado motivo DIME (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011). La orientación de los dominios N y C-terminal ha sido muy discutida pero finalmente se ha demostrado su localización en la matriz mitocondrial (Martell et al., 2012). La existencia de sólo dos dominios transmembrana hace evidente la necesidad de que MCU oligomerice formando

multímeros para formar el canal. La estructura cuaternaria predicha es un tetrámero con 8 hélices formando el poro y una concentración de residuos cargados cerca del mismo generando un potencial electrostático que favorece el flujo del catión (Raffaello et al., 2013). La mutación de dos residuos cargados negativamente del motivo DIME (D261/E264) abole la actividad del MCU (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011).

Una de las principales características del MCU es su baja afinidad por calcio (K_D 20-30 μ M en condiciones fisiológicas), sugiriendo que se necesita una alta concentración de calcio para activar el canal (Kirichok et al. 2004). Los niveles de calcio citosólico que se alcanzan ante estímulos fisiológicos son cercanos a 1 μ M, hecho que puede generar discrepancia por la baja afinidad del canal. Este problema se solucionó al demostrar la importancia de los dominios de alto calcio que se forman en las bocas de los canales de la membrana plasmática y su interacción con las mitocondrias (Szalai et al., 2000; Csordas et al. 2001). En estas zonas de interacción entre las mitocondrias y las bocas de los canales de calcio del retículo o de la membrana plasmática, el MCU detecta la alta concentración de calcio (10 veces mayor que en el resto del citosol, Csordas et al., 2010) y se activa introduciendo grandes cantidades de calcio en el interior de la mitocondria. El propio calcio actúa como modulador del canal por lo que la disminución de calcio citosólico producida por la captación de calcio mitocondrial lleva al uniportador a un estado de reposo, listo para responder ante un nuevo estímulo.

El MCU es inhibido por el Rojo de Rutenio y el Ru360 de forma más específica, así como por lantánidos y por el KB-R7943, que también inhibe el intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática (Mela, 1969; Bernardi et al., 1984; Santo-Domingo et al., 2010). Los activadores del MCU más importantes son la espermina, el PPT (4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol) y el kaempferol (Kröner et al., 1988; Montero et al., 2004; Lobaton et al., 2005).

Los experimentos *in vivo* con ARN de interferencia (siRNA) para eliminar la proteína MCU han demostrado que se produce una gran disminución en la captación de calcio mitocondrial en células de hígado (Baughman et al., 2011) y en cardiomiocitos (Drago et al., 2012). Experimentos realizados en células de corazón (Joiner et al., 2012), en

células β pancreáticas (Tarasov et al., 2012) y en neuronas (Qiu et al., 2013), muestran resultados muy similares. Finalmente, se ha desarrollado un ratón transgénico con MCU eliminado (Pan et al., 2013). Este ratón es viable cuando se mantiene en un fondo genético mixto y muestra un fenotipo suave: los animales son más pequeños y tienen algún defecto en músculo esquelético y en ciertas funciones metabólicas además de tener eliminada la captación rápida de calcio mitocondrial. Estos efectos se podrían explicar con la existencia de al menos dos corrientes de entrada de calcio en la mitocondria, una rápida dependiente de MCU y una lenta independiente de MCU (Bondarenko et al., 2013), aunque estos resultados deben ser estudiados de forma más exhaustiva.

1.4.3.2 MCUB

El gen *CCDC109B*, codifica para una proteína de 33kDa y tiene una homología con MCU del 50%. Su estructura es muy similar a MCU, tiene dos dominios transmembrana y sus extremos C y N-terminales se localizan en la matriz mitocondrial. La sobreexpresión de MCUB produce una reducción en la captación de calcio mitocondrial. Por lo tanto, MCUB podría actuar como una isoforma negativa y su inserción en el tetrámero formador del poro junto con MCU podría alterar la permeabilidad a calcio (Raffaello et al., 2013).

Los niveles de mRNA de MCUB son mucho menores que los de MCU, pero se observa un perfil de expresión diferencial para MCUB. Esta proteína se encuentra en altas concentraciones en corazón y pulmón y en baja concentración en músculo esquelético. Esto podría estar relacionado con las variaciones dependientes de tejido de la captación de calcio mitocondrial (Fieni et al., 2012).

1.4.3.3 MICU1

MICU1 fue descubierto meses antes que MCU y fue usado como trazador para identificar MCU (Perocchi et al., 2010). MICU1 y MCU comparten el mismo patrón evolutivo y se expresan de forma muy similar en diferentes tejidos de ratón (Bick et al., 2012), además de interactuar de forma física entre ellos (Baughman et al., 2011). La proteína tiene 54kDa y un único dominio transmembrana así como dos dominios de unión a calcio de tipo mano-EF.

Su localización dentro de la mitocondria ha sido muy discutida, en un primer momento se pensaba que era una proteína anclada a la membrana interna mitocondrial que daba a la matriz donde medía la concentración de calcio mitocondrial (Hoffman et al., 2013). Estudios recientes usando proteinasa K para digerir las membranas, demostraron que MICU1 se encontraba en el espacio intermembrana (Csordás et al., 2013). Estos resultados han sido confirmados mediante experimentos proteómicos (Hung et al., 2014; Lam et al., 2014).

Los experimentos de silenciamiento de MICU1 han demostrado que esta proteína actúa como sensor que limita la entrada de calcio a través del MCU para evitar una sobrecarga de calcio mitocondrial (Mallilankaraman et al., 2012b). Por lo tanto el silenciamiento de MICU1 disminuiría el nivel de calcio necesario para activar la captación de calcio mitocondrial. Por otro lado MICU1 actuaría como activador del MCU a niveles de calcio citosólico altos (Perocchi et al. 2010; Csordás et al., 2013). Debido a las discrepancias entre los diferentes grupos, es necesario realizar una investigación más exhaustiva.

1.4.3.4 MICU2 y MICU3

MICU1 tiene dos parálogos, con quienes comparte un 27% de homología. Estas proteínas poseen dominios de unión a calcio tipo mano-*EF* y se han denominado MICU2 y MICU3 (Plovanich et al., 2013). MICU3 tiene una expresión predominante en sistema nervioso mientras que MICU2 se expresa de forma ubicua. La funcionalidad de MICU3 está aún por caracterizar mientras que MICU2 está más estudiado.

MICU2 es una proteína de 54kDa que interacciona de forma física con MICU1 formando dímeros. Se encuentra en el espacio intermembrana y está anclada a la membrana interna mitocondrial. Los primeros resultados de silenciamiento muestran a MICU2 como un inhibidor de la captación de calcio mitocondrial (Plovanich et al., 2013). Recientemente se ha demostrado que la presencia de MICU2 en el complejo del uniportador requiere la presencia de MICU1 ya que interacciona con MCU a través de su dimerización con MICU1. Por lo tanto, solo MICU1 podría estar presente y modular la acción de MCU en ausencia de MICU2 pero no al revés (Patron et al., 2014; Kamer & Mootha, 2014).

Existe cierta discrepancia en relación a la función de estos moduladores. Por un lado, se piensa que ambos son reguladores negativos del MCU y que la ausencia de MICU2 facilita la captación de calcio pero sólo la eliminación de ambas proteínas (MICU1 y MICU2) conduciría a una desregulación del uniportador (Kamer & Mootha, 2014). Por otro lado, se ha propuesto que MICU1 y MICU2 presentan efectos opuestos sobre la actividad de MCU, con MICU2 actuando como un inhibidor y MICU1 estimulando la apertura del canal (Patron et al., 2014). Bajo esta perspectiva, la función de sensor de MICU1 a bajas concentraciones de calcio citosólico, podría ser únicamente una consecuencia de la pérdida forzada de MICU2 cuando MICU1 es eliminado. Para poder dilucidar esta hipótesis es necesario realizar más estudios sobre los roles de MICU1 y MICU2 en la regulación del complejo del uniportador de calcio mitocondrial.

1.4.3.5 EMRE

EMRE es una proteína de 10kDa con un único dominio transmembrana y una región C-terminal muy conservada y rica en aspartato. Su función parece ser de puente entre MICU1 y MCU (Sancak et al., 2013). En contraste con esta función esencial, cabe destacar que no hay homólogos de EMRE en plantas, hongos o protozoos, donde MCU y MICU1 están ampliamente conservados. Esta función de puente también se encuentra en conflicto con el claro efecto activador de MICU1 sobre MCU en una bicapa lipídica donde no hay otros componentes presentes.

1.4.3.6 MCUR1

El gen *CCDC90A*, conocido como regulador del uniportador de calcio mitocondrial 1 (MCUR1), es una proteína mitocondrial con su extremo N-terminal hacia el espacio intermembrana (Mallilankaraman et al., 2012a; Rhee et al., 2013). El silenciamiento de MCUR1 provoca una gran disminución en la captación de calcio mitocondrial. Por otro lado se ha demostrado que MCUR1 interacciona con MCU pero no con MICU1 (Mallilankaraman et al., 2012a).

1.4.4 Salida de calcio de la mitocondria

La mitocondria libera el calcio captado a través de dos mecanismos principales, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$.

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

La principal vía de salida de calcio desde la mitocondria se produce a través de este intercambiador cuya función es dependiente de la existencia de Na^+ en el citosol. Tiene una estequiometria de 3 iones Na^+ por cada ión Ca^{2+} (Palty et al., 2006). Su selectividad por calcio frente a Mg^{2+} o Mn^{2+} es elevada, aunque su selectividad por Na^+ es moderada (Carafoli et al., 1974). Hasta 2010 no fué identificado ya que se pensaba que se trataba de una isoforma del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana plasmática. A partir de ese momento se cree que es independiente al poseer características físico-químicas diferentes (Palty et al., 2010).

Su actividad está modulada por un pequeño rango de pH (7.5-7.6) y potenciada por K^+ , alcanoles y albúmina de suero bovino. A su vez, iones como Zn^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} o Ba^{2+} lo inhiben (Liguetti et al., 1981; Lukács & Fonyo, 1986; Baysal et al., 1991;). Hay otros inhibidores como el diltiazem, el verapamil y el amiloride, pero el más selectivo es la benzotiazepina CGP-37157 (Matlib et al., 1983).

1.4.4.2 Intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ de membrana plasmática (Letm1)

La proteína Letm1 ha sido identificada como uno de los componentes del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Jiang et al., 2009). Se encuentra localizada en la membrana mitocondrial interna y cataliza la salida de un ión Ca^{2+} por cada protón introducido en la matriz mitocondrial, siendo por lo tanto un proceso electrogénico. La proteína tiene un dominio transmembrana con el extremo C-terminal hacia el espacio intermembrana con dos dominios de unión a calcio tipo mano-EF. Su extremo N-terminal se encuentra orientado hacia la matriz mitocondrial y posee un motivo susceptible de fosforilación (Endele et al., 1999). Los datos sobre este canal necesitan confirmación ya que podría funcionar únicamente como transportador de K^+/H^+ (Nowikovsky et al., 2012).

OBJETIVOS

La gran importancia de la mitocondria en la regulación de la homeostasis del calcio celular así como el reciente descubrimiento de las proteínas implicadas en la captación de calcio por parte de este orgánulo han generado la necesidad de conocer la función específica de los diferentes miembros que forman el complejo del uniportador de calcio mitocondrial. Para ello hemos estudiado el papel de tres de sus componentes (MCU, MICU1 y MICU2) en la dinámica del calcio mitocondrial y la homeostasis celular de la concentración de calcio. Para llevar a cabo este objetivo principal nos hemos marcado varios objetivos específicos:

1. Estudio del efecto del silenciamiento de **MCU**, en la cinética de captación de calcio mitocondrial en células HeLa.

- Generación de clones estables con MCU silenciado.
- Determinación del grado de silenciamiento a través de Western blot.
- Efecto del silenciamiento de MCU en la dinámica de calcio celular a nivel mitocondrial, de retículo endoplásmico y citosólico.
- Efecto del silenciamiento de MCU en la entrada capacitativa de calcio.

2. Estudio del efecto del silenciamiento de **MICU1**, en la cinética de captación de calcio mitocondrial en células HeLa.

- Generación de clones estables con MICU1 silenciado.
- Determinación del grado de silenciamiento a través de Western blot.
- Efecto del silenciamiento de MICU1 en la dinámica de calcio mitocondrial.

3. Estudio del efecto del silenciamiento de **MICU2**, en la cinética de captación de calcio mitocondrial en células HeLa.

- Generación de clones estables con MICU2 silenciado.
- Determinación del grado de silenciamiento a través de Western blot.

- Efecto del silenciamiento de MICU2 en la dinámica de calcio mitocondrial y de retículo endoplásmico.
- Efecto del silenciamiento de MICU1 y MICU2 en la dinámica de calcio mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

Este trabajo se ha realizado en la línea celular HeLa. Esta línea celular fue establecida en los años 50 por George Grey y ha sido ampliamente utilizada en muchos tipos de experimentos desde entonces. Proviene de un carcinoma cervical y tiene una perdurabilidad y velocidad de crecimiento que la hicieron idónea para su cultivo *in vitro*. De hecho, fue la primera línea celular que se cultivó con éxito. La rápida y continuada proliferación de estas células se debe a la activación de la telomerasa durante la división celular. Por otro lado, la transferencia horizontal de genes del virus papiloma humano 18 (VPH18) ha hecho que el cariotipo de esta línea celular diste mucho del cariotipo humano habitual. A pesar de todo ello, esta línea celular se ha convertido en un modelo de estudio ampliamente utilizado, lo que ha llevado a generar un extenso conocimiento sobre su funcionamiento (Macville et al., 1999). Sobre esta línea celular se han generado clones estables donde se ha silenciado la proteína objetivo de estudio mediante shRNA específicos. Cada clon tiene una proteína silenciada: MCU, MICU1 o MICU2. Como control negativo de silenciamiento se utiliza un clon estable para un shRNA reordenado (scramble).

3.2 Mantenimiento de líneas celulares

Las células son cultivadas en medio DMEN GlutaMAX I (Dabelcco`s Modified Eagle`s Medium, Gibco), suplementado con un 5% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y penicilina/estreptomicina 100UI/ml (Gibco). Los frascos utilizados para el mantenimiento celular son de 25cm² de superficie y tienen tapón con filtro de 0.2µm de tamaño de poro (Nunc). El incubador *Hera cell* (Heraeus) mantiene la temperatura constante a 37°C y la concentración de CO₂ al 10% en un ambiente saturado de humedad.

3.2.1 Manipulación de líneas celulares

3.2.1.1 Siembra

Cuando las células llegan a confluencia son tripsinizadas para mantener el cultivo estable. La tripsinización se realiza eliminando el medio de cultivo y lavando la monocapa celular con PBS (Gibco). Posteriormente se añade 1ml de tripsina-EDTA 0.05% (Gibco) y se incuba a 37°C durante 4 minutos. Una vez que las células se despegan y quedan en suspensión se añaden 6ml de medio suplementado para inactivar la tripsina. Se recogen las células en un tubo de fondo cónico y se centrifugan durante 5 minutos a 1200rpm. Cuando tenemos las células separadas del medio, este es eliminado por decantación y las células se resuspenden en 1ml de medio completo nuevo para proceder a su conteo. Las células son contadas utilizando una cámara de *Neubauer*. Se utilizó el azul tripán para determinar la viabilidad celular.

Para realizar un mantenimiento celular óptimo las células son nuevamente sembradas a 4000 células/cm². Las células se han utilizado entre los pases 3 y 9. Para realizar los diferentes experimentos, las células han de ser sembradas en cubreobjetos de cristal de 12 ó 13mm de diámetro para ser usadas en el equipo de medida de fluorescencia o de luminiscencia respectivamente. Estos cubreobjetos se colocan en una placa de 24 pocillos donde serán sembrados a una densidad de 52631, 42105 u 31578 células/cm² en función del tiempo post transfección necesario para realizar los experimentos, 24, 48 o 72h respectivamente. Por otro lado, para producir clones estables con MCU, MICU1 o MICU2 silenciado, las células son sembradas en placas de *petri* de 60mm a una densidad de 23000 células/cm².

3.2.1.2 Transfección

La transfección es una técnica que permite la inserción de material genético exógeno en células eucariotas utilizando plásmidos o vectores virales. Como vehículos de transferencia se han desarrollado diferentes compuestos como nanopartículas, liposomas o lípidos catiónicos. En este trabajo se ha utilizado la transfección basada en la interacción lípido-catión. Este método ha demostrado tener una elevada eficacia de

transfección en células eucariotas animales al unirse muy bien al DNA, cargado negativamente, y a la membrana celular.

Para llevar a cabo la transfección las células se siembran 24h antes como se ha indicado en el apartado anterior. Una vez que las células han alcanzado el grado de confluencia visual, se procede a realizar la transfección mezclando el DNA de interés con el reactivo de transfección *Metafectene Pro* (Biontex) como indica el fabricante. A continuación, en la tabla 1, se indican las cantidades necesarias para llevar a cabo las diferentes transfecciones.

Para generar líneas estables con la proteína de interés silenciada, se han transfectado los plásmidos TF305607A, TF314182C y TF30483D, con resistencia a Puromicina, para silenciar respectivamente las proteínas MCU, MICU1 y MICU2, en las condiciones indicadas en la tabla 1. El plásmido TF305607S corresponde con el control negativo de silenciamiento. Transcurridas 48h tras la transfección, se suplementa el medio de cultivo con Puromicina 1 $\mu\text{g/ml}$ para seleccionar las células que contienen el plásmido de interés, que les da resistencia a este antibiótico. Además las células transfectadas presentan fluorescencia roja como marcador positivo de transfección. Una vez obtenidas las diferentes líneas estables, con cada proteína silenciada, se obtuvieron diferentes clones de las mismas mediante el método de dilución limitante. Todos los clones generados fueron evaluados funcionalmente y se utilizaron para realizar los experimentos aquellos que ofrecieron mejores características tanto funcionales como de mantenimiento. En la tabla 2, se especifican los clones seleccionados para el silenciamiento de cada proteína más un clon denominado mezcla que se utilizará como control negativo de silenciamiento.

	Transfección*	Co-transfección*	Transfección placa 60mm
Metafectene	2 μ l	2 μ l	18 μ l
DMEM no suplementado	100 μ l	100 μ l	600 μ l
DNA 1	0.5 μ g	0.2 μ g	6 μ g
DNA 2	--	0.8 μ g	--

Tabla 1: Cantidades utilizadas para realizar las diferentes transfecciones. *Los valores son por pocillo de placa de 24 pocillos (1,9cm²).

3.3 Biología molecular

3.3.1 Plásmidos utilizados

Para la realización de este trabajo se han utilizado dos tipos de plásmido diferentes. Por un lado, se ha utilizado el plásmido pcDNA3.1 (+), para transfectar las diferentes aequorinas empleadas en la medición de calcio intracelular. Y por otro lado, se ha utilizado el vector de expresión HuH shRNA para silenciar las proteínas MCU, MICU1 y MICU2.

3.3.1.1 pcDNA3.1

El plásmido pcDNA3.1 (Fig. 8), es un vector de expresión de 5,4 kb diseñado para la expresión estable y transitoria en células de mamífero. El vector contiene el promotor de Citomegalovirus (CMV), que proporciona un alto nivel de expresión; el sitio del promotor T7, que permite la transcripción in vitro y la secuenciación del inserto; resistencia a ampicilina, que permite seleccionarlo en organismos procariota y resistencia a neomicina, para la selección de líneas celulares estables. La secuencia de clonación múltiple permite la inserción de diferentes secuencias que codifican en nuestro caso para diferentes aequorinas, en concreto en EcoRI.

Los constructos de aequorinas recombinantes, nativas o mutadas, dirigidas a citosol, mitocondria y retículo endoplásmico se clonaron en este vector.

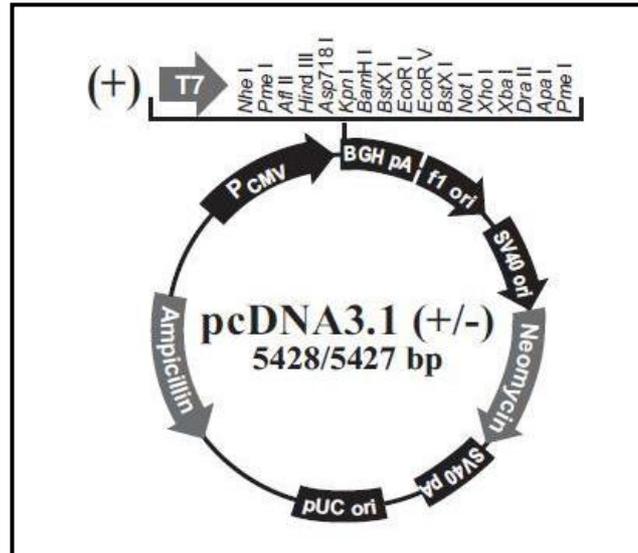


Figura 8: Diagrama de pcDNA3.1 (+).

3.3.1.2 HUSH sh-RNA

El plásmido HUSH sh-RNA, contiene un RNA humano con una pequeña horquilla (sh-RNA). Es de tipo pRFP-C-RS (Origene, Fig. 9) y está diseñado para el estudio del silenciamiento de genes a largo plazo. Este vector de expresión contiene las secuencias LTR 3' y 5' del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV) para su empaquetamiento en partículas virales para ser transfectado en células empaquetadoras y poder infectar otros tipos celulares. También tiene el marcador de Puromicina, con el promotor de SV40 y el sh-RNA con el promotor U6. El sh-RNA está formado por una secuencia específica del gen de interés de 29 nucleótidos y su secuencia reversa complementaria, separadas por 7 nucleótidos que forman una bisagra. Como marcador de transfección el plásmido incorpora el gen de la proteína roja (RFP) bajo el promotor de CMV.

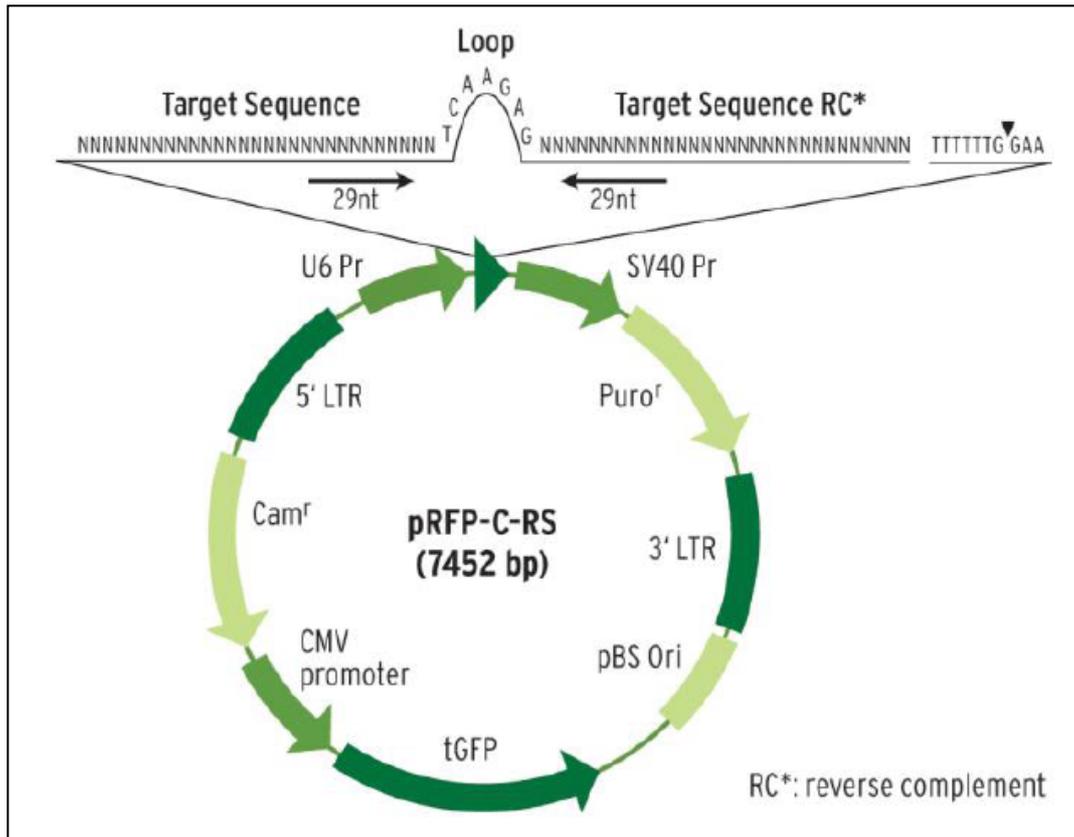


Figura 9: Representación esquemática del plásmido pRFP-C-RS.

Para el desarrollo de este trabajo se han silenciado las proteínas MCU, MICU1 y MICU2, por medio de estos plásmidos. Además como control de silenciamiento negativo se ha utilizado un plásmido denominado *mezcla* o control de silenciamiento, cuya secuencia de RNA es aleatoria y no coincide con ninguna proteína. Los plásmidos utilizados y las secuencias específicas se muestran en la tabla 2.

Proteína	Clon	Plásmido	Secuencia
MCU	SH1-MCU#5	TF305607A	CAAGGATGCAATTGCTCAGGCAGAAATGG
MICU1	SH3-MICU1#3	TF314182C	TGCAGAATCTCCACCATGTGTAGACAACC
MICU2	SH4-MICU2#2	TF304833D	GCTCATCGTCCTGTCAGACTAGCGGAGTT
	SH3-MICU2	TF304833C	ACACAACCTTTCAGATGCGTTTCTTTGGA
mezcla	SH-mezcla#5	TF305607S	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

Tabla 2: Plásmidos y secuencias utilizadas para el silenciamiento de diferentes proteínas.

3.3.2 Transformación y amplificación de plásmidos

Con el fin de amplificar los diferentes plásmidos se han transformado bacterias competentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen) por choque térmico como indica el fabricante. Una vez transformadas, las bacterias se siembran en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina 125 μ g/ml y se incuban a 37°C. Se seleccionan varias colonias y se amplifican en cultivo líquido LB para su posterior comprobación mediante ensayos de restricción. Una vez seleccionadas las colonias que han incluido los plásmidos de interés son congeladas a -80°C en glicerol al 60%.

La extracción del DNA plasmídico se realizó con el kit comercial *Quantum Prep Plasmid Midiprep* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se determinó la pureza y concentración del DNA obtenido usando el *Nanodrop* (Thermo Scientific). El DNA purificado se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.3.3 Selección de clones

De un total de 10 clones generados para cada proteína silenciada se ha seleccionado aquel que presentaba el mayor efecto funcional en la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria. Los clones seleccionados para cada proteína silenciada se encuentran detallados en la Tabla 2.

Antes de generar clones estables con la proteína de estudio silenciada se realizaron silenciamientos transitorios de las mismas con el fin de determinar qué sh-RNA era el más eficiente de los cuatro proporcionados por el fabricante.

Por otro lado, también se ha utilizado el silenciamiento transitorio para generar silenciamientos múltiples, en concreto el silenciamiento transitorio de la proteína MICU1 realizado sobre el clon estable con MICU2 silenciado.

3.4 Análisis de proteínas

Con el fin de determinar el grado de silenciamiento de los diferentes clones generados (SH1-MCU#5, SH3-MICU1#3, SH4-MICU2#2 y SH-mezcla#5), se realizaron estudios de expresión mediante *western blot*.

3.4.1 Extracción de proteínas

Cuando los clones estables con MCU, MICU1 o MICU2 silenciado tienen una confluencia del 80% en dos frascos de 25cm², se realiza la extracción de proteínas totales. Para ello se elimina el medio de cultivo de los frascos y se lavan las células con PBS dos veces antes de ser lisadas. La lisis se realiza añadiendo 500µl de tampón de lisis, que se incuba durante 2 minutos. Después, se desprende la monocapa celular con una espátula hasta despegarla completamente de la superficie del frasco. Se recoge toda la muestra lisada y se pone en el segundo frasco de cultivo, donde se repite el proceso. Una vez recogida la muestra de ambos frascos, en un eppendorf, se agita durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se centrifuga la muestra a 4°C durante 10 minutos a 12000g para recoger el sobrenadante que contiene el extracto proteico total. Todo el proceso debe realizarse a 4°C o en hielo.

3.4.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas del extracto proteico total se cuantifica utilizando el sistema BCA (*Pierce BCA Protein Assay Kit*), en placas de 96 pocillos. Este método combina la reacción de "Biuret", con la alta sensibilidad de la detección colorimétrica del catión cuproso (Cu⁺¹) usando ácido bicinconínico.

Partiendo de 20µl de extracto proteico total, se realizan 5 diluciones seriadas del 50% en PBS. También se genera una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA (albumina de suero bovino). Se añaden 200µl de solución de trabajo de BCA y se incuba la placa durante 30 minutos a 37°C. Se lee la absorbancia a 562nm utilizando el lector de placas *VERSAmax* (Molecular Device) y se determina la concentración de

proteínas de la muestra a partir de la ecuación de la recta correspondiente a la curva patrón de BSA.

3.4.3 Electroforesis de proteínas

3.4.3.1 Geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La técnica SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) consiste en la electroforesis desnaturizante de proteínas en un gel de acrilamida. Con esta técnica conseguimos que las proteínas migren en función de su tamaño, ya que gracias al SDS todas las proteínas adquieren una carga negativa proporcional a su masa. De esta forma la migración depende únicamente del tamaño de la cadena polipeptídica.

La técnica requiere la separación proteica en dos fases, primero en un gel concentrador donde las muestras se concentran en una banda y la segunda correspondiente al gel de resolución donde las muestras se separan en función de su peso molecular. Los dos geles se diferencian en el porcentaje de acrilamida, el pH y la molaridad. El porcentaje de acrilamida del gel de resolución varía en función del peso molecular de las proteínas a separar. Para proteínas de bajo peso molecular se trabaja con porcentajes altos de acrilamida (15%) y para proteínas de alto peso con porcentajes bajos (8%). En nuestro caso las proteínas tienen un peso molecular medio y hemos usado geles del 12%. El gel se preparó en lámina para electroforesis vertical de tipo discontinuo (gel concentrador y gel separador), se utilizaron placas de 10 x 8 cm (ancho X altura) con un espesor de 0.75mm.

En primer lugar se preparan las dos fases del gel de poliacrilamida, el gel concentrador y el gel separador. Cuando los geles han solidificado se procede a su colocación en la cubeta de electroforesis. La cubeta se rellena con tampón de electroforesis y se cargan las muestras. Para preparar las muestras, se diluye el extracto de proteínas total, en tampón de carga para proceder a su desnaturización. Para favorecer el proceso la mezcla se calienta durante 5 minutos a 100°C. La cantidad de proteína cargada varía entre 30 y 50µg. Una vez cargadas las muestras y el patrón de pesos moleculares

(*Precision Plus Protein Western C, Bio-Rad*) se procede a correr el gel a 120V sin superar el amperaje de 60mA durante 90 minutos aproximadamente.

Geles de poliacrilamida:

Gel concentrador (10ml)		Gel separador 12% (30ml)	
Acrilamida 30%	1ml	Acrilamida 30%	12ml
TRIS 0.5M pH6.8	2.5ml	TRIS 1.5M pH8.8	7.4ml
H₂O ultra pura	6.28ml	H₂O ultra pura	10.25ml
SDS 10%	100µl	SDS 10%	300µl
TEMED	20µl	TEMED	30µl
APS 20%	100µl	APS 20%	200µl

Tabla 3: Composición de los geles de poliacrilamida.

3.4.3.2 Detección de proteínas (Western blot)

Cuando la electroforesis ha finalizado se procede a la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride). La transferencia se realiza en semi-seco, siguiendo las instrucciones del fabricante (*Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad*).

Una vez finalizada la transferencia lavamos la membrana con Tampón TBS-T antes de proceder al bloqueo de la misma durante 1h a temperatura ambiente. Después, se realizan tres lavados consecutivos de la membrana con TBS-T. En este momento la membrana está preparada para realizar la inmunodetección con el anticuerpo primario. En función de la proteína que queremos detectar incubamos con el anticuerpo policlonal de ratón anti-MICU1 durante 1h a temperatura ambiente (1:500, Abnova), con el anticuerpo policlonal de conejo anti-MCU toda la noche a 4°C (1:600, Epitomics) o con el anticuerpo policlonal de conejo anti-MICU2 toda la noche a 4°C (1/250, Abcam). Como control de carga se utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina (1:10000, BD Sciences). Una vez realizada la incubación del anticuerpo primario se realizan otros tres lavados con TBS-T para poder realizar la incubación del

anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (1:10000) o de conejo (1:4000), dependiendo del anticuerpo primario utilizado, conjugado con HRP (horseradish peroxidase) (Amersham), esta incubación se realiza en todos los casos durante 1h a temperatura ambiente. La proteína de interés se detecta por quimioluminiscencia (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific) utilizando el lector de geles *Versadoc 5000* (Bio-Rad) y el programa *Quantity One* (Bio-Rad) para capturar la imagen. La cuantificación se realiza con el programa *ImageJ*.

3.4.4 Materiales de análisis de proteínas

Nombre	Componentes
Tampón de lisis	RIPA: Tris-HCl 50mM (pH8), NaCl 150mM, SDS 0.1%, Na-Deoxycholate 0.5%, NP40 1%. Coctel de proteasas: PMSF 1mM, Na-ortofosfato 1mM, Inhibidor de tripsina 1µM, Leupeptina 1µM, Pestatina 1µM, Aprotinina 1µM.
Tampón de carga	Tris-HCl 50mM pH6.8, SDS 2%, Bromofenol 0.02%, 2-â-Mercaptoetanol 1%, 10% Glicerol.
Tampón de electroforesis 10X	TRIS-base 250mM pH8, Glicina 192mM, SDS 1%. Se trabaja a 1X.
Tampón de transferencia 10X	TRIS-base 250mM pH8, Glicina 192mM, Metanol 20%. Se trabaja a 1X. Este tampón se ha de mantener a 4°C.
Tampón de TBS-T 10X	TRIS-base 200mM, NaCl 9%, Tween-20 0.1%. Se trabaja al 1x y se utiliza para realizar los lavados y el bloqueo de la membrana de PVDF y para incubar los anticuerpos.
Solución de bloqueo	Tampón TBS-T con 5% de leche desnatada en polvo.

3.5 Medida de la concentración de calcio en poblaciones celulares

3.5.1 Aequorina

Las medidas de calcio intracelulares se han realizado con aequorina (Fig. 10) que es una fotoproteína sensible a calcio procedente de la medusa *Aequoria Victoria*. La aequorina está constituida por una apoproteína de aproximadamente 21kDa con cuatro dominios de unión a calcio, de los cuales sólo tres son funcionales, y su grupo prostético la celenterazina, con un peso molecular de 423Da (Shimomura et al., 1996).

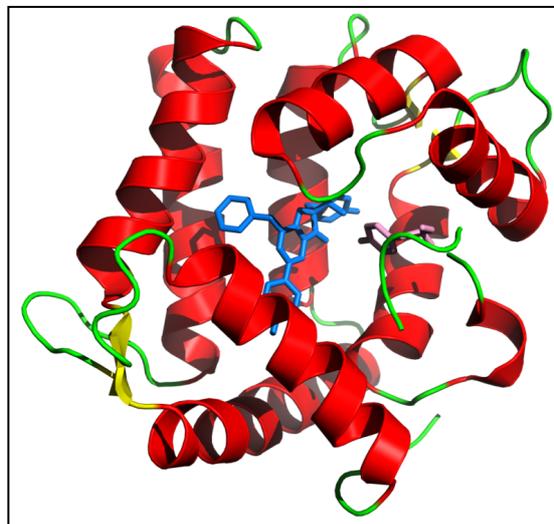


Figura 10: Representación de la proteína aequorina.

Una vez que la apoproteína y la celenterazina se unen, proceso denominado reconstitución, se produce la reacción de bioluminiscencia. Para ello es necesaria la presencia de oxígeno y calcio en el medio, ya que al unirse el calcio a la proteína la celenterazina se oxida y produce celenteramida, CO_2 y un fotón (Figura 11). Cada molécula de aequorina emite un fotón (470nm), por lo que la cantidad de fotones emitidos es proporcional al calcio libre que hay en el medio. Esta reacción se considera irreversible en condiciones experimentales y la sonda se va consumiendo a lo largo del experimento. Este hecho es utilizado para obtener los valores de concentración de calcio a lo largo del experimento como se explica en el apartado *Medida de la concentración de calcio en célula única*.

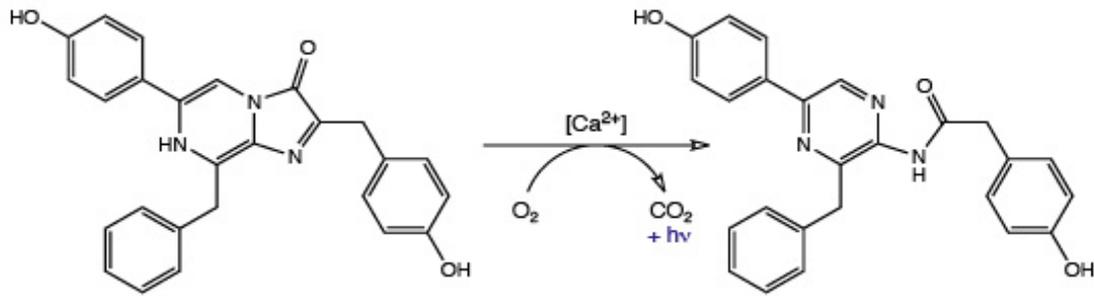


Figura 11: Representación de la reacción llevada a cabo por la celenterazina.

Durante los años 60 y 70, la proteína se purificaba desde la medusa y se microinyectaba en las células para medir concentraciones de calcio citosólicas. Posteriormente, gracias a las técnicas de DNA recombinante, se clonó el cDNA codificante para la proteína permitiendo su expresión en diferentes tipos celulares. Además, se han generado aequorinas recombinantes dirigidas específicamente a diferentes compartimentos subcelulares, donde se realizan medidas de concentración de calcio (gracias a que la aequorina mantiene sus propiedades de luminiscencia y sensibilidad a calcio). En ciertas ocasiones la afinidad de la proteína por calcio resultaba demasiado alta, por lo que a través de mutagénesis dirigida se ha disminuido esta afinidad.

En este trabajo se han utilizado aequorinas dirigidas al citosol, mitocondria y retículo endoplásmico (Fig. 12). Previo a la secuencia de aequorina se han incorporado en el extremo 5' nueve aminoácidos del epítipo derivado de la hemaglutinina (HA1), mediante el cual podemos verificar la localización de la proteína a través de inmunocitoquímica (Brini et al., 1995). Además de esta modificación, la aequorina dirigida a mitocondria incorpora, previamente a la secuencia de aequorina, la presecuencia mitocondrial derivada de una parte de la subunidad VIII de la citocromo c oxidasa humana (COX) (Rizzuto et al., 1992). Para dirigir la proteína al retículo sarco-endoplásmico se ha clonado parte de la cadena pesada de la inmunoglobulina murina IgM, concretamente la secuencia señal L que dirige la proteína al retículo sarco-endoplasmático y los dominios VDJ y CH1, este último se une a chaperona BIP reteniendo la proteína en el retículo sarco-endoplásmico (Montero et al., 1995).

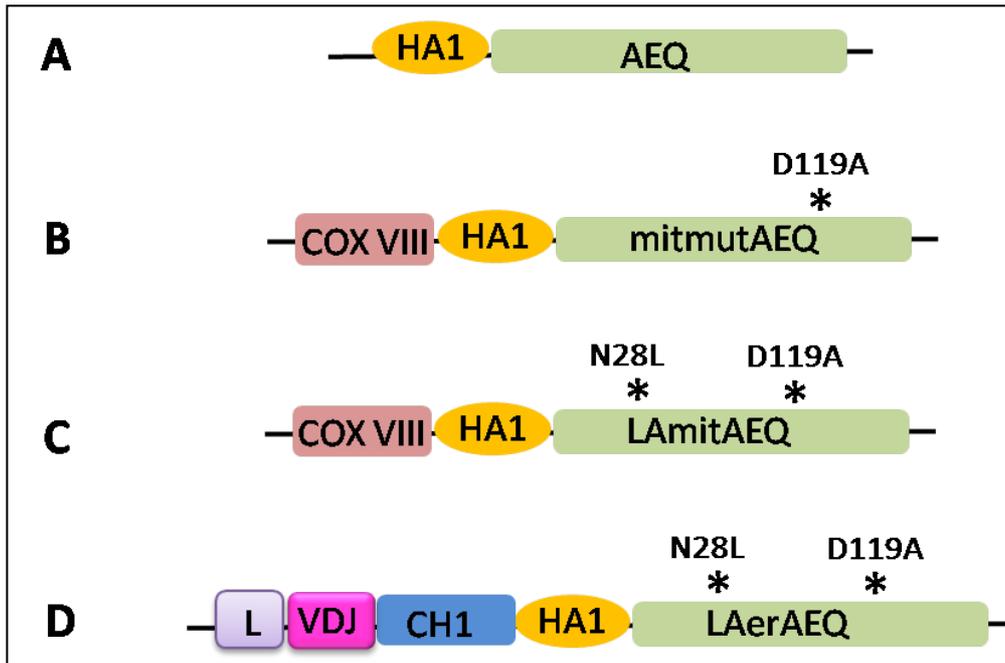


Figura 12: Esquema de las diferentes aequorinas utilizadas. **A:** Secuencia de la aequorina citosólica (Brini et al., 1995). **B:** Secuencia de la aequorina mitocondrial mutada (Rizzuto et al., 1992). **C:** Secuencia de la aequorina mitocondrial doblemente mutada (de la Fuente et al., 2012). **D:** Secuencia de la aequorina dirigida al retículo sarco-endoplásmico doblemente mutada (Montero et al., 1995).

Para medir las concentraciones de calcio presentes en el retículo o la mitocondria es necesario disminuir la afinidad de la aequorina. Para ello se introdujo una mutación puntual en el tercer dominio de unión a calcio, en la posición 119, que cambia aspartato por alanina (119-Asp/Ala). Esta nueva aequorina, denominada mutAEQ, redujo la afinidad de la proteína en un orden de magnitud permitiendo realizar medidas de calcio hasta 100 μ M (Kendall et al., 1992). Para disminuir aun más la afinidad, se ha introducido otra mutación puntual, en este caso en el primer dominio de unión a calcio, en la posición 28, que sustituye un residuo de asparragina por uno de leucina (28-Asn/Leu). La aequorina doblemente mutada (LAAEQ), posee una afinidad 10 veces menor que la aequorina con una sola mutación (de la Fuente et al., 2012). Para conseguir rangos más amplios de medida de calcio, se combinan las aequorinas con celenterazinas semisintéticas (Tabla 4), que disminuyen aún más la afinidad por calcio, en este caso se han utilizado celenterazina nativa (w) y semisintética (i).

	Celenterazina w	Celenterazina i
AEQ wt	0.1-5 μ M	--
mutAEQ	2-100 μ M	--
LAAEQ	20-500 μ M	100 μ M -1mM

Tabla 4: Rangos de medida de concentraciones de calcio para cada una de las combinaciones y celenterazinas.

3.5.2 Luminómetro

Los fotones emitidos por la aequorina durante el experimento son captados por un luminómetro diseñado para esta función (Figura 13). El equipo se encuentra alojado en el interior de un frigorífico a 4°C aislado de la luz, y está formado por una cámara de perfusión de 15mm de diámetro y 2mm de profundidad, termostatzada por una camisa de agua. Está construida en metacrilato negro a excepción de la base, donde se aloja el cobre con las células, que es de aluminio reflectante, de esta manera todos los fotones emitidos por la aequorina son captados por el fotomultiplicador. La cámara posee dos orificios que permiten la entrada y salida de los diferentes medios. Los medios se encuentran atemperados mediante el uso de un baño externo al equipo. Para asegurar que la temperatura de trabajo es de 37°C, se coloca un calentador (*Harvard Apparatus*) cerca de la entrada de la vía de perfusión en la cámara.

Una vez introducido el cobre con las células sembradas en la cámara de medida, ésta se ajusta debajo del fotomultiplicador de alta ganancia (EMI 9789a, Electron tubes) que capta los fotones emitidos por la aequorina mediante un fotocátodo de 10mm situado encima de la cámara de perfusión. La temperatura externa del sistema a 4°C, evita la emisión térmica de fotones reduciendo el ruido basal de la muestra de forma considerable. El fotomultiplicador tiene una fuente de alto voltaje *Thorm EMI* y un discriminador-amplificador EMI AD2 que envía la señal hacia un *CT2 Counter Timer* (Electron Tubes), desde el que se transfieren los datos al ordenador donde el programa *EM6 counter/time* (Electron Tubes) recoge los datos de luminiscencia por segundo. Estos datos son transformados en concentración de calcio por un programa de calibración diseñado previamente (Alvarez et al., 2002).

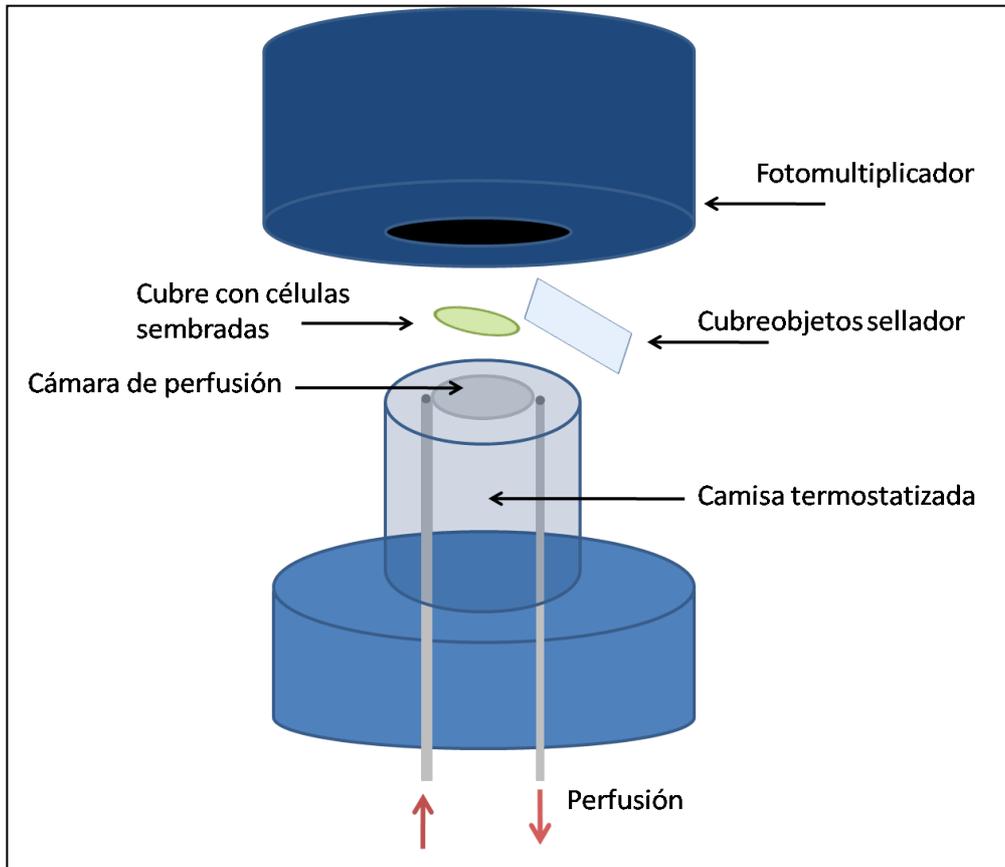


Figura 13: Esquema del equipo de luminiscencia utilizado en los experimentos de aequorina.

3.5.3 Transformación de los datos de luminiscencia en concentración de calcio

Los datos de luminiscencia producidos durante el experimento se transforman en concentración de calcio utilizando un programa informático. Este programa calcula las fracciones L/L_{\max} en cada punto del experimento, donde L es el valor de la luminiscencia (cuentas/segundo) en cada punto del experimento y L_{\max} es la luminiscencia total del experimento, en ambos casos la luminiscencia basal es restada. Los valores de L/L_{\max} obtenidos son transformados en valores de concentración de calcio utilizando el siguiente algoritmo.

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

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

Esta ecuación deriva de un modelo matemático que explica la proporción de emisión de luz de la aequorina en función de la concentración de calcio (Allen et al., 1997). Los valores de los diferentes parámetros para las diferentes combinaciones de aequorinas y celenterazinas usadas en este trabajo se indican en la tabla 5 (Montero et al., 1997, de la Fuente et al., 2012).

	AEQwt Celent w	mitmutAEQ Celent w	LAmitAEQ Celent w	LAmitAEQ Celent i	LAerAEQ Celent i
K_R	4.18×10^7	1.61×10^7	4.922×10^6	56700	56700
K_{TR}	601	22000	250000	31480	31480
n	2,3	1,43	1,08	1,089	1,089
\ddot{e}	1	1	1	0,4	0,4

Tabla 5: Parámetros de calibración de las diferentes aequorinas para 37°C.

3.5.4 Medidas de concentración de calcio

3.5.4.1 Soluciones

Los experimentos de medida de la concentración de calcio en los distintos compartimentos se han realizado utilizando una amplia variedad de medios en función del tipo de experimento a desarrollar. A continuación se detalla la composición de todos ellos en diferentes tablas.

Cuando se realizan experimentos en células intactas (ver tabla 6), se utiliza un Medio Externo con o sin calcio. El medio libre de calcio contiene EGTA que actúa como quelante del ion. Estos medios remedan las condiciones fisiológicas de las células.

	Medio Externo calcio 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 6: Composición de los medios externos utilizados en células intactas. pH7.4 con NaOH.

Cuando los experimentos se realizan en células permeabilizadas, se utilizan medios que recrean las condiciones fisiológicas internas de las células. Estos medios se preparan en condiciones libres de calcio o con concentraciones conocidas del ion y un quelante del mismo. El medio Interno EGTA 0.5mM se utiliza como medio libre de calcio.

	Medio Interno EGTA 0.5mM	Medio Interno EGTA 1mM	Medio Interno EGTA 1mM Ca ²⁺ 1mM	Medio Interno HEDTA 5mM
KCl	130mM	130mM	130mM	130mM
NaCl	10mM	10mM	10mM	10mM
MgCl₂	1mM	1mM	1mM	4.5mM
H₂KPO₄	1mM	1mM	1mM	1mM
HEPES	20mM	20mM	20mM	20mM
Succinato	5mM	5mM	5mM	5mM
Malato	5mM	5mM	5mM	5mM
Glutamato	5mM	5mM	5mM	5mM
ATP K⁺	1mM	1mM	1mM	1mM
ADP	20μM	20μM	20μM	20μM
EGTA	0.5mM	1mM	1mM	1mM
HEDTA	--	--	--	5mM
CaCl₂	--	--	1mM	--

Tabla 7: Composición de los medios internos utilizados en células permeabilizadas. pH7 con KOH.

Para preparar medios con concentraciones de calcio en un rango entre 100nM y 1.5μM, se utilizan los medios Internos EGTA 1mM con y sin calcio, de tal manera que las diferentes proporciones de ambos medios nos generan el rango de concentraciones de calcio indicado. Las concentraciones de calcio que se indican corresponden a calcio libre a 37°C.

	Medio Interno EGTA 1mM Ca ²⁺ 1mM	Medio Interno EGTA 1mM
[Ca ²⁺] 100nM	22.4%	77.6%
[Ca ²⁺] 200nM	36.4%	63.6%
[Ca ²⁺] 300nM	46.3%	53.7%
[Ca ²⁺] 400nM	53.5%	46.5%
[Ca ²⁺] 500nM	59%	41%
[Ca ²⁺] 700nM	66.8%	33.2%
[Ca ²⁺] 1μM	74.4%	25.6%
[Ca ²⁺] 1.5μM	81.2%	18.8%

Tabla 8: Composición de los medios internos de concentraciones de calcio conocidas en un rango de 100nM a 1.5μM, utilizados en células permeabilizadas. pH7 con KOH.

Para concentraciones de calcio entre 2.5 a 10μM, se utiliza el Medio Interno HEDTA 5mM para preparar estos medios de concentración de calcio conocida. A este medio se le añaden las cantidades necesarias de CaCl₂ y MgCl₂ para conseguir las diferentes concentraciones de calcio libre a 37°C.

	CaCl ₂	MgCl ₂
[Ca ²⁺] 2.5μM	80μM	1mM
[Ca ²⁺] 3.5μM	110μM	1mM
[Ca ²⁺] 4.5μM	138μM	1mM
[Ca ²⁺] 5.5μM	165μM	1mM
[Ca ²⁺] 7μM	215μM	0.9mM
[Ca ²⁺] 10μM	303μM	0.82mM

Tabla 9: Composición de los medios internos de concentraciones de calcio conocidas en un rango de 1.5μM a 10 μM, utilizados en células permeabilizadas. pH7 con KOH.

La permeabilización de las células se consigue perfundiendo las mismas durante un minuto con medio Interno EGTA 0.5mM sin ATP ni ADP suplementado con digitonina 100 μ M. Este detergente genera poros en la membrana celular dejando el interior de la célula accesible a todos los medios que se perfunden después.

3.5.4.2 Determinación experimental

Los experimentos de determinación de concentración de calcio en población celular, dentro de los diferentes compartimentos celulares, se realizan a 37°C a las 48-72h tras la cotransfección de las células, sembradas en cristales de 13mm de diámetro, con la aequorina y el SH-RNA de interés. O tras la transfección de la aequorina en los clones estables con la proteína de interés silenciada. En primer lugar es necesario reconstituir la aequorina con la celenterazina (Biotium) correspondiente w o i, incubando las células en medio Externo calcio 1mM con 1 μ M de celenterazina durante 1h para la celenterazina w y 1,5h para la celenterazina i a temperatura ambiente. Una vez reconstituida la aequorina, el cubre con las células sembradas es introducido en la cámara de perfusión del equipo de luminiscencia, y ésta es insertada en el fotomultiplicador.

Al finalizar los experimentos, con el fin de consumir toda la aequorina y poder obtener el valor de luminiscencia total (L_{max}), se perfunde una solución de calcio 10mM acompañada de digitonina 100 μ M (Sigma-Aldrich), en el caso de ser células intactas, que saturará por completo de calcio y asegurará el consumo total de aequorina.

Los experimentos con células intactas se llevaron a cabo perfundiendo las células con medio externo calcio 1mM, al que se añaden los agonistas correspondientes, e.g. Histamina (Sigma-Aldrich).

En el caso de células permeabilizadas, se perfundió medio externo EGTA 0.5mM durante unos minutos para eliminar el calcio existente en el medio de reconstitución. Seguidamente se permeabilizan las células perfundiendo el medio de permeabilización durante un minuto y medio interno EGTA 0.5mM después para estabilizar la señal de luminiscencia basal. Posteriormente se perfunden los diferentes medios de

concentración de calcio conocida. Sobre estos medios, se añadieron diferentes inhibidores del MCU (Rojo de Rutenio, Ru360), el protonoforo FCCP, el antagonista del Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial CGP37157 (Tocris) y el modulador del uniportador de calcio Mitocondrial Kaempferol (Sigma-Aldrich).

3.5.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y gráficos se han realizado con el programa *Origin 8.5* (Origin Lab). Los datos se han calculado a partir de un mínimo de tres experimentos similares como la media \pm el error estándar. Las diferencias entre las poblaciones se han determinado utilizando el análisis de varianza ANOVA. La significación se muestra de forma estándar como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

3.5.6 Equipo de imagen

Los registros de célula única, se han realizado sobre cubres de 12mm donde han sido sembradas las células. Estos cubreobjetos se introducen en una cámara de perfusión conectada a un sistema de válvulas por la que se perfunden los diferentes medios atemperados a 37°C por un calentador (Harvard apparatus) acoplado a la vía. La cámara de perfusión se acopla a un microscopio invertido de fluorescencia (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena; Germany). La fuente de luz es una lámpara de Xenón acoplada a un monocromador (Cairn Optoscan). La luz emitida es capturada por la cámara digital Cool SNAP de Roper Scientific. Las imágenes son procesadas con el programa *Imaging Workbench 6.0* (Figura 14).

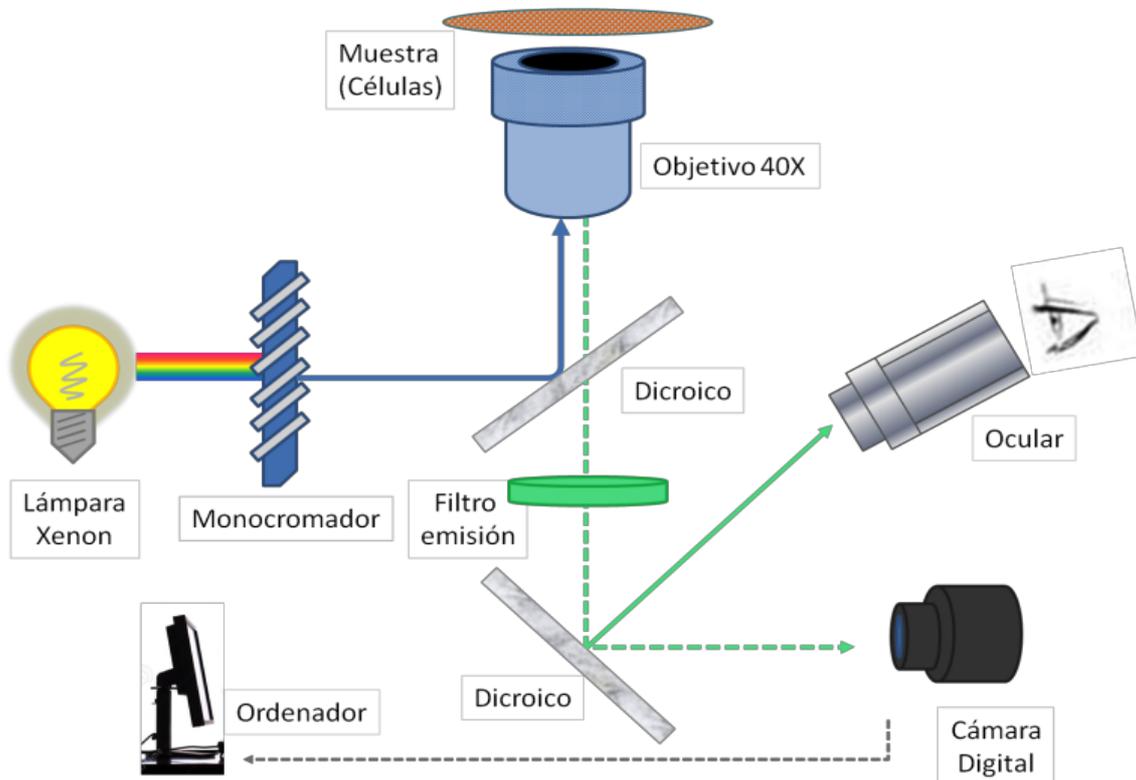


Figura 14: Equipo de imagen. La luz procedente de la lámpara de Xenón atraviesa el monocromador y se refleja sobre un espejo dicróico excitando la muestra que se encuentra en la cámara de perfusión. La luz emitida por la muestra atraviesa el filtro de emisión. Finalmente las imágenes se graban en la cámara digital y son analizadas con el programa *Imaging Workbench 6.0*.

3.5.7 Medida del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial se ha registrado con el indicador fluorescente TMRE (*tetramethyl rhodamine ethyl ester*, Fig. 15). Este se acumula en la mitocondria gracias al potencial negativo de la matriz mitocondrial.

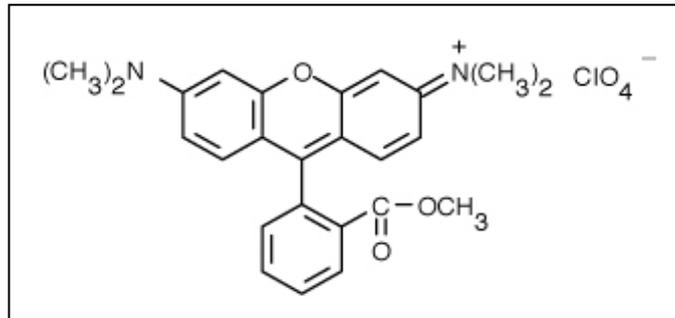


Figura 15: Estructura molecular del TMRE.

Las células HeLa se incuban durante un minuto en agitación con TMRE 100nM (Biotium) en medio externo calcio. Se lavan las células con ese mismo medio y se colocan en la cámara de perfusión del microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiovert 200*. Las células se mantienen en perfusión continua a 37°C. Los experimentos se realizan en células permeabilizadas perfundidas con medios internos con TMRE 20nM hasta alcanzar un estado de fluorescencia estable.

Este colorante se excita a una longitud de onda de 540nm, utilizando un monocromador *Cairn* (200ms de excitación cada 2 segundos) y la emisión de fluorescencia se recoge entre 570 y 630nm con un objetivo *Fluar 40X*. Las imágenes se registran con la cámara digital Cool SNAP de *Roper Scientific* y se analizan con el programa *Imaging Workbench 6.0*.

RESULTADOS

4.1 Efecto del silenciamiento de MCU

4.1.1 Generación de clones estables con MCU silenciado

Para estudiar la función de la proteína MCU, se han realizado transfecciones estables en la línea HeLa con el sh-RNA de MCU y se han seleccionado las poblaciones transfectadas correctamente añadiendo Puromicina 1 μ g/ml al medio de cultivo. Se han elegido varios clones con la proteína silenciada, con los que se han realizado análisis funcionales de captación de calcio mitocondrial para identificar aquellos en los que el silenciamiento fue más efectivo. Finalmente, se ha seleccionado el clon SH1-MCU#5. También se ha generado un clon estable con el sh-RNA mezcla, que se ha utilizado como control negativo de silenciamiento, en concreto el clon SHsc-MCU#5.

Tras la obtención del clon, se estudia el nivel de silenciamiento de la proteína MCU por medio de Western blot. En la figura 16 podemos observar como el nivel de silenciamiento de la proteína MCU en el clon SH1-MCU#5 (sh-clon) es prácticamente total con respecto al clon de control negativo de silenciamiento SHsc-MCU#5 (sc-clon). Los valores se encuentran normalizados en relación a la proteína actina, usada como control de carga. Los resultados son medias \pm e.e.m. de 9 muestras, correspondientes a tres extracciones diferentes por triplicado. La proteína MCU tiene un peso molecular de 40kDa y la actina de 42kDa.

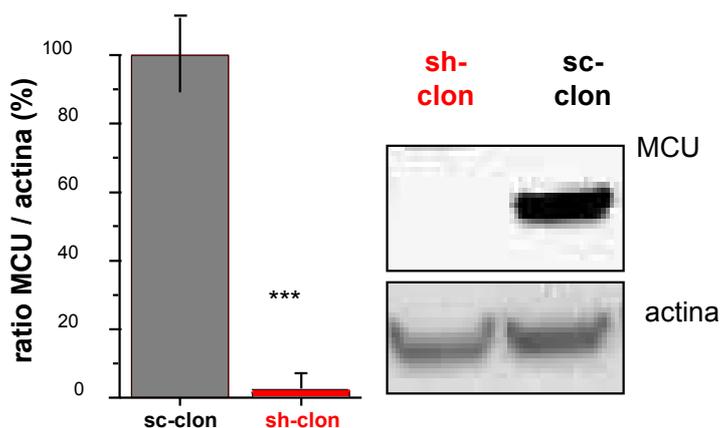


Figura 16: Cuantificación de la expresión de MCU por Western blot. Análisis de la densitometría de los Western blot de MCU normalizados con su correspondiente actina. Los valores se muestran como la media \pm e.e.m. de los niveles de MCU de $n=9$ (tres extracciones diferentes por triplicado de los clones SH1-MCU#5 (sh-clon) y SHsc-MCU#3 (sc-clon)).

4.1.2 Efecto del silenciamiento de MCU en la dinámica de calcio mitocondrial y reticular

Para estudiar el efecto del silenciamiento de MCU sobre la dinámica de calcio en diferentes compartimentos subcelulares como la mitocondria y el retículo endoplásmico, se han transfectado las aequorinas correspondientes en los clones estables de MCU silenciado o control.

Para el estudio de la dinámica de calcio mitocondrial, se han realizado experimentos de captación de calcio mitocondrial inducido por histamina así como ensayos en células permeabilizadas con tampones de calcio de concentración conocida.

Los experimentos llevados a cabo en el retículo endoplásmico se han realizado depletando las células de calcio con BHQ 10 μ M (inhibidor de la SERCA) en medio externo EGTA para permitir la reconstitución con celenterazina, y posteriormente se han rellenado los depósitos con medio externo calcio durante el experimento. Por último se estimulan las células con histamina, provocando una liberación de calcio desde el retículo endoplásmico a través del receptor de IP₃.

El pico de calcio mitocondrial inducido por histamina 100 μ M en las células con el MCU silenciado es muy pequeño, mientras que en las células control el pico de calcio mitocondrial tiene un valor de 40 μ M, un valor similar a los obtenidos en experimentos previos en nuestro laboratorio (Fig. 17a). Los experimentos se han realizado usando aequorina mitocondrial mutada y los resultados son media de tres experimentos diferentes.

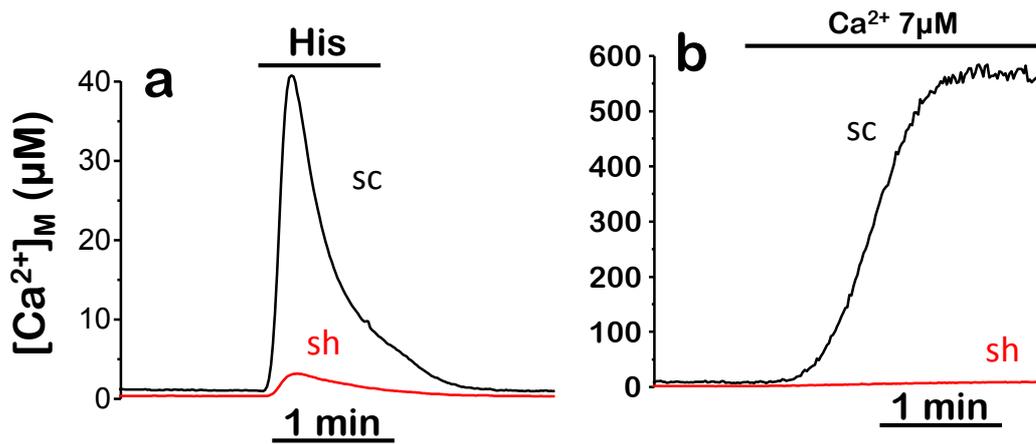


Figura 17: Efecto del silenciamiento de MCU en la dinámica de calcio mitocondrial y del retículo endoplásmico. (a) Picos de calcio mitocondrial inducidos por histamina $100\mu\text{M}$ (His) en clones estables de SH1-MCU#5 (sh, rojo) o de SHsc-MCU#5 (sc, negro). Las células han sido transfectadas con aequorina mutada dirigida a la mitocondria (mitmutAEQ, celenterazina w). Los resultados son medias de tres experimentos diferentes. (b) Perfusión de un tampón de concentración de calcio $7\mu\text{M}$ sobre células permeabilizadas. Los clones estables con MCU silenciado (sh) o control (sc) están transfectados con aequorina mitocondrial doblemente mutada (LAmitAEQ, celenterazina i). Los resultados son medias de tres experimentos diferentes.

Cuando analizamos la captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas, observamos que la captación de calcio en las células con MCU silenciado es prácticamente nula mientras que las células control tienen una captación de calcio hasta niveles de $500\mu\text{M}$, valor similar a los obtenidos previamente en nuestro laboratorio para la concentración de calcio del tampón perfundido ($7\mu\text{M}$, Fig. 17b). Para realizar los experimentos las células han sido transfectadas con aequorina mitocondrial doblemente mutada. Se han utilizado tampones de diferentes concentraciones de calcio con el mismo resultado aunque aquí solo se muestra la gráfica correspondiente al tampón de calcio de concentración $7\mu\text{M}$. Todos los experimentos realizados confirman la abolición casi completa de la captación de calcio mitocondrial cuando el MCU ha sido silenciado.

Los estudios realizados en retículo con células depletadas de calcio se han llevado a cabo usando la aequorina dirigida a retículo endoplásmico doblemente mutada reconstituida con celenterazina i. La figura 18 muestra la concentración de calcio del retículo durante el rellenado de calcio y durante la liberación de calcio inducida por histamina $100\mu\text{M}$. La concentración de calcio del retículo después del rellenado es

mayor en las células con MCU silenciado que en las células control (media \pm e.e.m. de $n=3$) (Fig. 18b). La velocidad de liberación de calcio desde el retículo inducida por histamina es en cambio menor en las células silenciadas para MCU respecto a las células control (media \pm e.e.m. de $n=3$) (Fig. 18c).

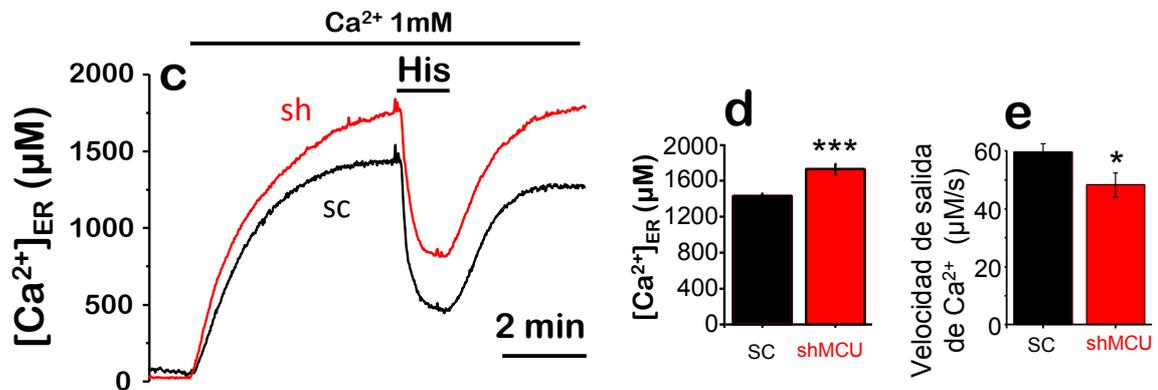


Figura 18: Efecto del silenciamiento de MCU en la dinámica de calcio del retículo endoplásmico. (a) Células transfectadas con LAerAEQ y depletadas con BHQ $10\mu M$. Rellenado de calcio del retículo endoplásmico y liberación de calcio del mismo inducida por histamina $100\mu M$. (b) Concentración de calcio del retículo endoplásmico una vez rellenado, en las células con MCU silenciado (shMCU, rojo) y en el control (SC, negro) (media \pm e.e.m. de $n=3$). (c) Velocidad de liberación de calcio desde el retículo endoplásmico inducido por histamina (media \pm e.e.m. de $n=3$).

4.2 Efecto del silenciamiento de MICU1

Con el fin de estudiar el efecto del silenciamiento de MICU1 en la cinética de captación de Calcio mitocondrial en células HeLa, hemos generado clones estables con la proteína silenciada o bien se ha silenciado de forma transitoria. En estas células modificadas, hemos realizado diferentes experimentos funcionales donde hemos medido las concentraciones de calcio mitocondrial para poder determinar cómo el silenciamiento de MICU1 afecta en la dinámica de calcio mitocondrial normal.

4.2.1 Generación de clones estables con MICU1 silenciado

Para estudiar la función de la proteína MICU1, se han generado clones estables con la proteína silenciada mediante RNA de interferencia como se ha explicado anteriormente en Materiales y métodos. Una vez generados los clones, y seleccionados con Puromicina, se ha escogido el que tenía una mayor respuesta funcional, de acuerdo con los experimentos de silenciamiento transitorio. El clon seleccionado finalmente fue el SH3-MICU1#3.

El nivel de silenciamiento de MICU1 se ha determinado por Western blot. Como vemos en la figura 19, el grado de silenciamiento del clon con MICU1 silenciado (sh, rojo) es del 50% respecto al clon control (sc, negro). Estos valores están normalizados teniendo en cuenta la expresión de la proteína actina usada como control interno de carga. Los resultados son medias \pm el error estándar de la media de 12 muestras, correspondientes a cuatro extracciones de proteínas diferentes por triplicado. MICU1 tiene un peso molecular de 37kDa y la proteína actina de 42kDa.

El grado de silenciamiento de las células transfectadas de forma transitoria fue más difícil de estimar debido a las diferencias en los porcentajes de transfección. Los cambios en la dinámica de captación de calcio mitocondrial observados en los clones estables y en las transfecciones transitorias fueron muy similares. Sin embargo, los efectos obtenidos en los clones estables tuvieron siempre menor magnitud que los obtenidos en transfecciones transitorias, sugiriendo que el grado de silenciamiento en las transfecciones transitorias es mayor. Por otro lado, no se encontraron diferencias

en la captación de calcio mitocondrial de las células transfectadas de forma transitoria durante 48 ó 72h, lo que indica que el recambio de MICU1 es muy alto.

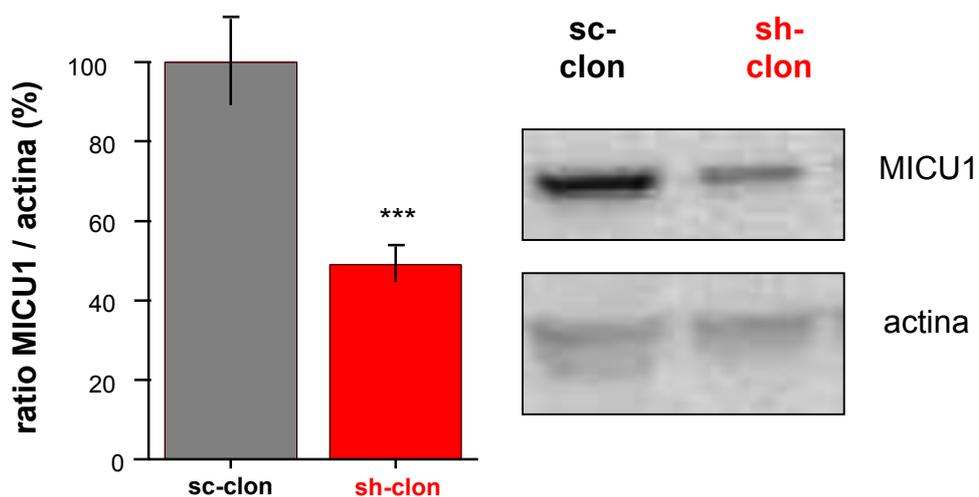


Figura 19: Cuantificación de la expresión de MICU1 por Western blot. Análisis de la densitometría de los Western blot de MICU1 normalizados con su correspondiente actina. Los valores se muestran como la media \pm e.e.m. de los niveles de MICU1 de $n=12$ (cuatro extracciones diferentes por triplicado de los clones SH3-MICU1#3 (sh-clon) y SHsc-MCU#3 (sc-clon)).

4.2.2 Pico de calcio mitocondrial inducido por histamina.

Para determinar cómo afecta el silenciamiento de MICU1 a la dinámica de calcio mitocondrial, en primer lugar estudiamos la captación de calcio mitocondrial inducida por un estímulo de histamina en células intactas. Este estímulo lleva a la producción de IP_3 que al unirse a su receptor en el retículo endoplásmico provoca la liberación de calcio del mismo. Parte de este calcio es captado por la mitocondria para tamponar el aumento de la concentración de calcio citosólica.

En este caso, se ha utilizado la histamina como estímulo para las células, las cuales estaban co-transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA de MICU1 (sh, en rojo) o con el sh-RNA de control (sc, en negro), que se utiliza como control negativo de silenciamiento y con aequorina mutada dirigida a la mitocondria (mitmutAEQ). En estos experimentos la aequorina fue reconstituida con celenterazina w.

El efecto del silenciamiento de MICU1 en el pico de calcio mitocondrial inducido por histamina se muestra en la figura 20. Cuando estimulamos las células con una concentración de histamina de $100\mu\text{M}$, observamos que las células en las que se ha silenciado MICU1 tienen un pico de calcio mitocondrial significativamente menor respecto a las células control, en concreto un 40% menor (Fig. 20a). Al estimular las células con histamina $5\mu\text{M}$, observamos el mismo efecto (Fig. 20b). Sin embargo, cuando las células son estimuladas con histamina $2\mu\text{M}$, el pico de calcio mitocondrial tiene prácticamente la misma amplitud en las células silenciadas y en las células control, aunque la entrada de calcio comienza antes en las células silenciadas (Fig. 20c). Finalmente, cuando se utiliza histamina $0.5\mu\text{M}$ para estimular las células, observamos que el aumento en la concentración de calcio mitocondrial es significativamente mayor en las células silenciadas con respecto a las células control (Fig. 20d). Hay que tener en cuenta que a medida que disminuimos la concentración de histamina, la concentración de calcio mitocondrial máxima que alcanza el pico va disminuyendo, produciendo una notable reducción en la escala de los experimentos. Los resultados se muestran como media de tres experimentos y su cuantificación es la media \pm el error estándar (Fig. 20e).

Los efectos del silenciamiento de MICU1 sobre la concentración de calcio mitocondrial basal no están claros y existen discrepancias entre los resultados de distintos autores. Por un lado, se ha descrito que el silenciamiento de MICU1 aumenta este valor de forma significativa (Csordas, 2013). Por otro lado, datos de Mallilankaraman, 2012 indican que los valores de la basal no sufren ninguna modificación al silenciar la proteína MICU1. Nuestros resultados están más de acuerdo con estos últimos y no muestran diferencias significativas de este valor entre las células control y las células silenciadas. En concreto, la concentración basal de calcio mitocondrial fue $128 \pm 9\text{nM}$ (media \pm e.e.m., $n=7$) en las células control y $127 \pm 12\text{nM}$ (media \pm e.e.m., $n=7$) en las células silenciadas para MICU1.

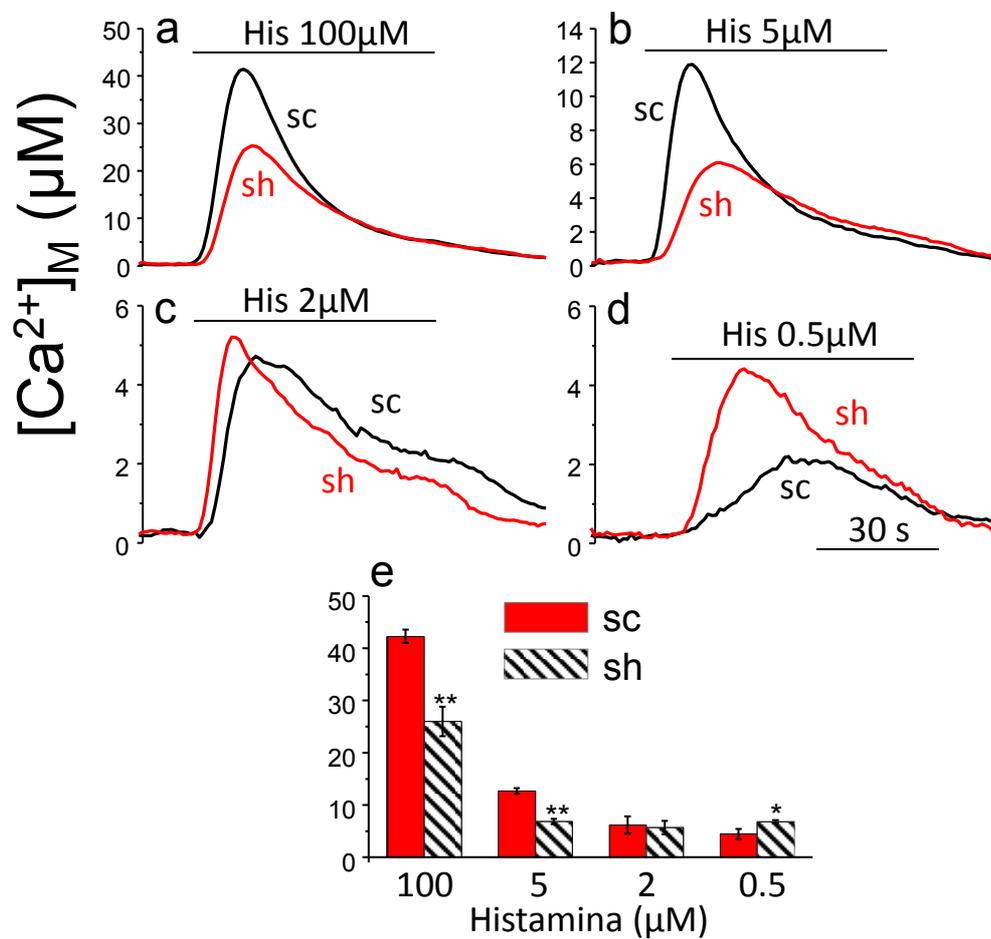


Figura 20: Efecto del silenciamiento de MICU1 en la concentración del pico mitocondrial inducido por diferentes concentraciones de histamina. (a-d) Picos de calcio mitocondrial inducidos por diferentes concentraciones de histamina (His) en células HeLa transfectadas de forma transitoria con Sh-RNA MICU1 (sh, rojo) o con Sh-RNA control (sc, negro). Los resultados son medias de tres experimentos diferentes. (e) Cuantificación de la altura de los picos de calcio mitocondrial inducidos por diferentes concentraciones de histamina (media \pm e.e.m. de $n=3$).

Además, para confirmar este hecho, hemos estudiado el efecto del tampón de calcio 100nM en las células silenciadas para MICU1 ya que en la figura 22a, se observa que este tampón produce un aumento en la concentración de calcio mitocondrial en este tipo celular. Esta concentración de calcio se considera basal en el citosol y por ello no genera un aumento de la concentración de calcio mitocondrial en las células control, aunque sí lo hace en las silenciadas (Fig. 21). Sin embargo, como vemos en la figura 21, cuando mantenemos la perfusión del tampón de calcio 100nM durante 10-15 minutos en las células silenciadas, observamos que tras un aumento inicial en la concentración de calcio mitocondrial, ésta lentamente vuelve al estado basal inicial. Este valor basal es igual para las células control y las células silenciadas. De este modo confirmamos que el nivel de calcio basal en estado estacionario no se ve alterado por el silenciamiento de MICU1, aunque el uniportador en las células silenciadas es más susceptible a pequeños aumentos de Ca^{2+} .

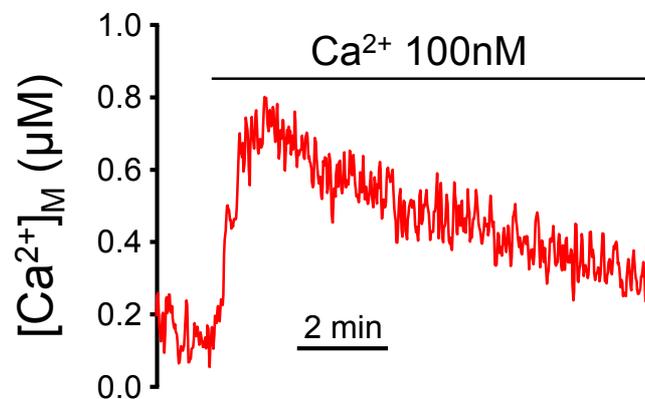


Figura 21: Concentración de calcio mitocondrial basal. El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ inducido por la perfusión de un tampón con una concentración de calcio 100nM, es transitorio y regresa al estado basal inicial tras 10 minutos de perfusión. Los resultados son medias de seis experimentos diferentes. Células HeLa transfectadas de forma transitoria con Sh-RNA MICU1 y aequorina mitocondrial mutada.

4.2.3 Captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas.

Para estudiar la captación de calcio mitocondrial más en detalle, se permeabilizaron las células. De este modo la captación de calcio por parte de la mitocondria es dependiente de la cantidad de calcio que tenga el tampón de concentración de calcio conocida perfundido. Así, podemos estudiar directamente la captación de calcio por parte de la mitocondria en presencia de concentraciones de calcio citosólicas definidas. Las células HeLa se co-transfectan de forma transitoria con el sh-RNA de MICU1 (sh, en rojo) o con el control negativo de silenciamiento (sc, en negro), así como con la aequorina dirigida a la mitocondria correspondiente. Dependiendo de la concentración de calcio perfundida, se utilizan aequorinas de diferente afinidad: hasta 3.5 μ M de calcio se utiliza la aequorina mutada (mitmutAEQ) y a partir de este valor la aequorina doblemente mutada (LAmitAEQ). Esta última aequorina se reconstituye con celenterazina i para tampones de calcio 10 μ M y con celenterazina w para tampones de 4.5 μ M, mientras que la mitmutAEQ lo hace con celenterazina w.

Una vez permeabilizadas las células, se mantienen durante diez minutos en medio interno EGTA para asegurar una concentración de calcio menor de 10nM generando un estado basal, y posteriormente se perfunde con tampones de concentración conocida de calcio.

Como vemos en la figura 22, la perfusión del tampón de concentración de calcio 100nM, produce un aumento en la concentración de calcio mitocondrial de las células silenciadas, pero no en las células control. Como ya hemos mencionado más arriba, si se mantiene la perfusión del tampón durante 10-15 minutos, los niveles de Ca²⁺ vuelven a bajar hasta el nivel basal (Fig. 21).

Al perfundir con una concentración de calcio de 200nM, se produce una pequeña respuesta de las células control, mientras que en las células silenciadas el aumento de la concentración de calcio mitocondrial muestra un pico transitorio más alto, que va disminuyendo hasta llegar a un estado estacionario mayor que el alcanzado al perfundir calcio 100nM (Fig. 22b).

La perfusión con una concentración de calcio de 500nM, también produce un pequeño incremento en la concentración de calcio mitocondrial de las células control y un aumento mucho mayor en las células silenciadas. En este caso, el pico transitorio de calcio alcanza dos veces el valor del estado estacionario final (Fig. 22c).

Al perfundir el tampón de calcio de 1.5 μ M, se produce una lenta pero persistente respuesta en las células control. En cambio, en las células silenciadas el aumento es muy rápido y transitorio, lo que sugiere que se está produciendo una inhibición de la entrada de Ca^{2+} dependiente de la propia entrada de calcio (Fig. 22d).

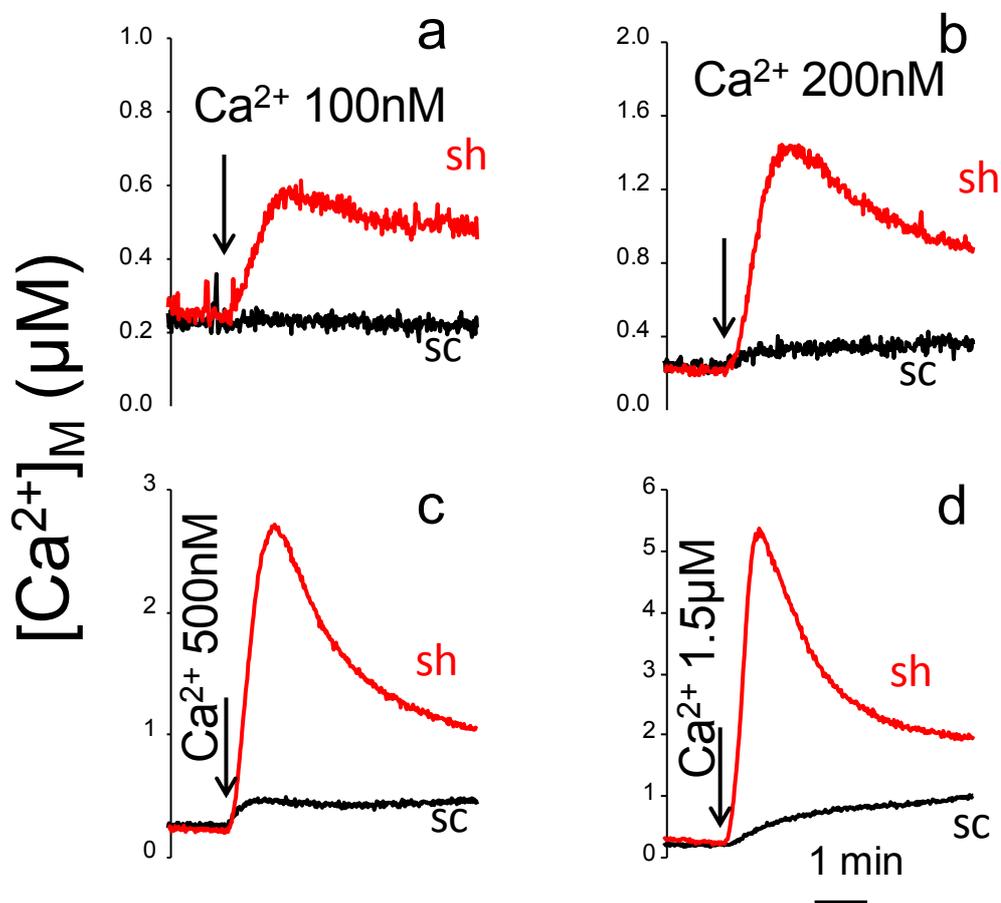


Figura 22: Efecto del silenciamiento de MICU1 en la captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas en presencia de bajas concentraciones de calcio. Las células HeLa transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA de MICU1 (sh) o con el sh-RNA control (sc) permeabilizadas y perfundidas con tampones de diferentes concentraciones de calcio usando aequorina mutada (mitmutAEQ). Los resultados son medias de 3 experimentos diferentes.

Cuando la concentración de calcio del tampón de perfusión es de $2.5\mu\text{M}$, el aumento inicial de calcio mitocondrial observado en las células silenciadas es más rápido que en las células control, aunque dura menos tiempo. Por el contrario, las células control muestran un aumento de la concentración de calcio mitocondrial más lento y continuo, que lleva a un valor final más alto. También se muestra, en la gráfica, el trazo de las células control perfundidas con calcio $2\mu\text{M}$ (línea punteada). En estas condiciones, se produce un aumento en la concentración de calcio mitocondrial de las células control de la misma magnitud al que se produce en las células silenciadas perfundidas con calcio $1.5\mu\text{M}$. Sin embargo, en este caso no se observa la inhibición dependiente de calcio, sugiriendo que para que se produzca este efecto, es necesario el silenciamiento de MICU1 (Fig. 23a).

Para una concentración de calcio de $3.5\mu\text{M}$, se observa que el aumento de la concentración de calcio mitocondrial comienza antes en las células silenciadas. En cambio, en las células control el aumento de la concentración de calcio mitocondrial comienza más tarde, pero aumenta a una velocidad mayor, llegando a superar rápidamente los niveles de las células silenciadas (Fig. 23b).

Para concentraciones de calcio de $4.5\mu\text{M}$ (Fig. 23c) y $10\mu\text{M}$ (Fig.23d), la velocidad de captación de calcio mitocondrial es ahora menor en las células silenciadas respecto a las células control.

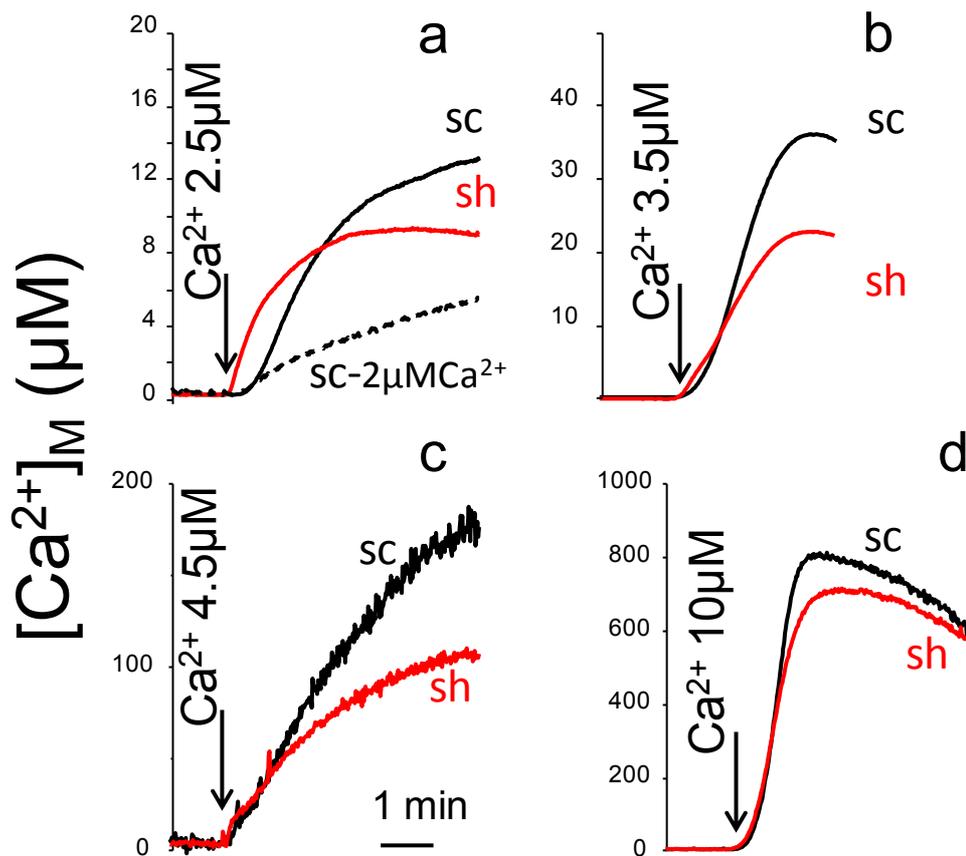


Figura 23: Efecto del silenciamiento de MICU1 en la captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas en presencia de altas concentraciones de calcio. Las células HeLa transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA de MICU1 (*sh*) o con el sh-RNA control (*sc*) permeabilizadas y perfundidas con tampones de diferentes concentraciones de calcio usando aequorina mutada (*mitmutAEQ*) en los paneles a y b y aequorina doblemente mutada (*LAMitAEQ*) en los paneles c y d. El elevado consumo de aequorina impidió medidas de más duración en el experimento (b). Los resultados son medias de 3 experimentos diferentes.

Cuando estudiamos en detalle los resultados de captación de calcio mitocondrial con diferentes tampones de concentración de calcio conocida, tal como se ha hecho en los experimentos mostrados en las Fig. 22 y 23, podemos observar directamente cómo afecta el silenciamiento de MICU1 a la velocidad de captación de calcio mitocondrial. De este modo podemos decir que el silenciamiento de MICU1 aumenta la velocidad de captación de calcio mitocondrial sólo para valores de concentración de calcio citosólico menores de $2.5\mu\text{M}$. Además, el aumento de velocidad es transitorio y sufre un fenómeno de inactivación en pocos minutos. Para valores mayores de Ca^{2+} citosólico, la velocidad de captación disminuye en las células silenciadas respecto a las células

control. La Figura 24a muestra un resumen de los efectos del silenciamiento de MICU1 en todo el rango de concentraciones de Ca^{2+} citosólico.

Cuando estudiamos el retraso en el aumento de la concentración de calcio mitocondrial, observamos que las células silenciadas responden más rápido a la adición de calcio para concentraciones de calcio citosólicas menores de $2.5\mu\text{M}$. Este retraso en el aumento de la concentración de calcio mitocondrial, representa el tiempo que transcurre desde la apertura de la vía de perfusión hasta el comienzo del aumento de la concentración de calcio mitocondrial. Además, se corresponde con el tiempo necesario para que la solución tampón de concentración de calcio conocida llegue a las células. Aunque se usó la misma vía de perfusión y la misma electroválvula, el retraso fue significativamente menor en las células silenciadas comparadas con las células control para concentraciones de calcio citosólico menores de $2.5\mu\text{M}$ (Fig. 24b). Por lo que podemos decir que las células silenciadas responden antes que las células control a esas concentraciones de calcio.

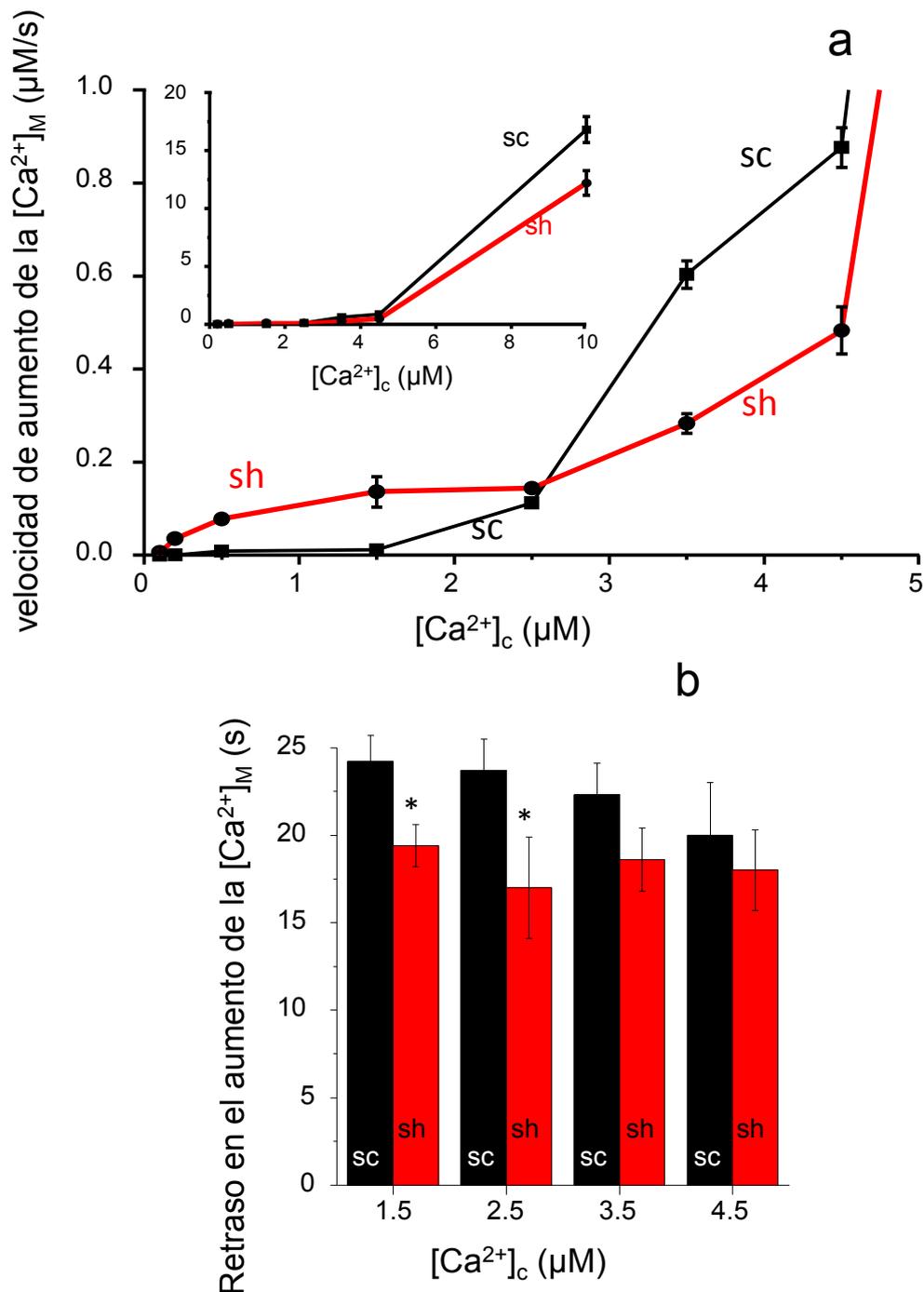


Figura 24: Efecto del silenciamiento de MICU1 en la captación de calcio mitocondrial con respecto a la $[Ca^{2+}]_c$. Los valores mostrados en esta figura están calculados a partir de los experimentos de las figuras 22-23. (a) La velocidad de aumento de la $[Ca^{2+}]_M$ se muestran como la media \pm e.e.m. Se ha ampliado la escala de la gráfica para poder ver en detalle los valores correspondientes a $[Ca^{2+}]_c$ bajas. (b) El retraso en el incremento de la $[Ca^{2+}]_M$ se ha medido desde que se abre la electroválvula de la perfusión y teniendo en cuenta el tiempo necesario para que la solución llegue a la cámara de perfusión donde se encuentran las células. Los resultados son medias \pm e.e.m.

4.2.4 Efecto del protonóforo FCCP y de los inhibidores del Uniportador de calcio mitocondrial Rojo de Rutenio y Ru360, así como del silenciamiento de MCU.

Para asegurar que la captación de calcio que estamos midiendo se produce en la mitocondria a través del Uniportador, hemos analizado el efecto del protonóforo FCCP y de los inhibidores del MCU Rojo de Rutenio y Ru360, así como el propio silenciamiento de MCU.

Las células con MICU1 silenciado de forma transitoria (sh, rojo), o transfectadas con el control negativo de silenciamiento (sc, negro) se permeabilizan para perfundirlas con tampones de calcio 0.5, 1.5 o 10 μ M. Sobre estos tampones de calcio se añaden los compuestos a estudiar: FCCP, Rojo de Rutenio y Ru360. Para estudiar la dinámica de calcio mitocondrial debida a tampones de calcio 10 μ M, se ha utilizado la aequorina doblemente mutada LAmitAEQ reconstituida con celenterazina i, y para los tampones de calcio bajos (500nM y 1.5 μ M), se ha utilizado la mitmutAEQ reconstituida con celenterazina w.

En la figura 25 a y b, observamos como el FCCP, a una concentración 2 μ M, abole completamente la captación de calcio mitocondrial tanto en células silenciadas (azul) como en células control (verde), indicando que el potencial de membrana es necesario para el aumento de la concentración de calcio mitocondrial.

La inhibición producida por el Rojo de Rutenio (4 μ M) y el Ru360 (500nM) se ha estudiado también a concentraciones de calcio altas (10 μ M) y bajas (1.5 ó 0.5 μ M), para poner en evidencia que ambas captaciones ocurren por la misma vía. Los resultados muestran que ambos inhibidores bloquean la captación de calcio mitocondrial de igual forma sin importar la concentración de calcio perfundida tanto en células control (verde) como en células silenciadas (azul) (Fig. 25 c-f).

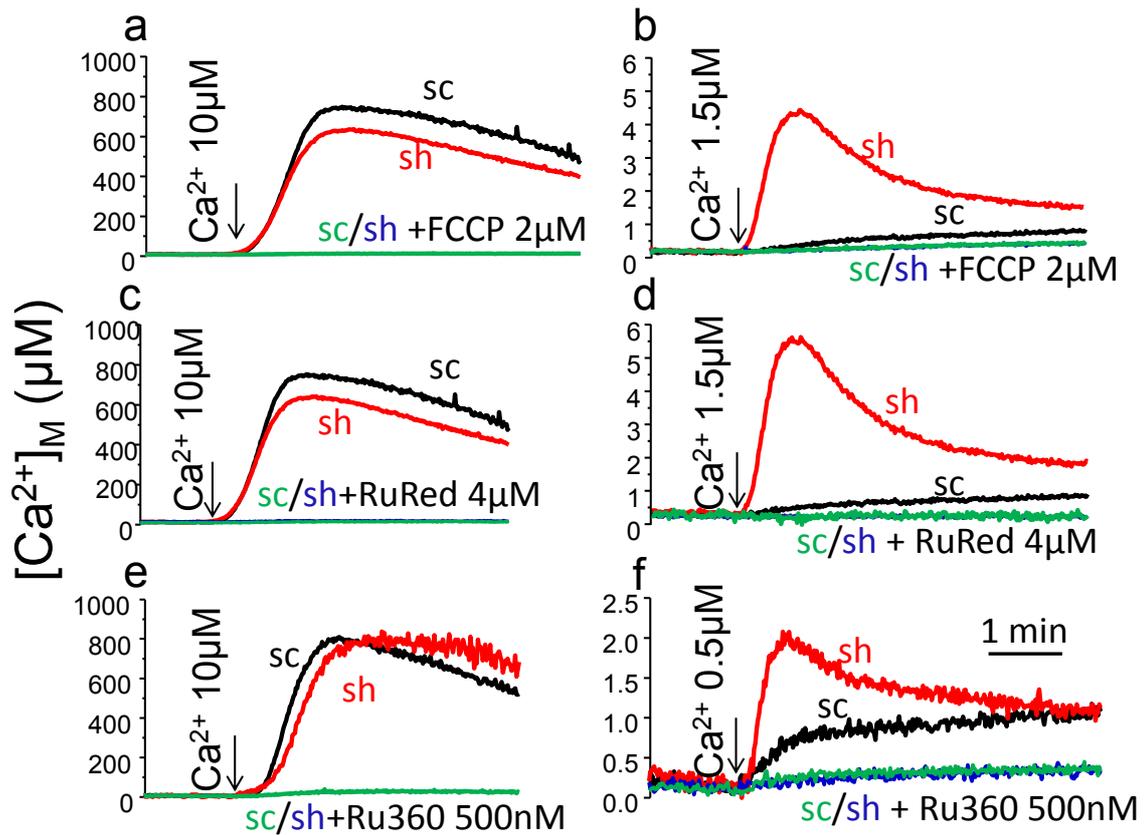


Figura 25: Efecto del FCCP, Rojo de Rutenio y Ru360 en la captación de calcio mitocondrial en células control y células con MICU1 silenciado. Las células HeLa fueron transfectadas de forma transitoria con el SH-RNA de MICU1 (sh) o con el SH-RNA control (sc). La columna de la izquierda muestra la captación de calcio mitocondrial cuando se perfunden las células permeabilizadas, con un tampón de $[Ca^{2+}]$ $10 \mu M$, usando aequorina doblemente mutada, y la columna de la derecha con calcio $1.5 \mu M$ o $500 nM$ usando aequorina mutada, ambas dirigidas a la mitocondria. Se añadió FCCP $2 \mu M$ al tampón de calcio (a, b), rojo de rutenio (RuRed) $4 \mu M$ (c, d) o Ru360 $500 nM$ (e, f). Los resultados son medias de tres experimentos.

Por último, se ha utilizado el clon estable SH1-MCU#5, donde se ha silenciado la proteína MCU. Sobre este clon se han co-transfectado de forma transitoria el sh-RNA de MICU1 (azul) o el sh-RNA del control (verde) y la aequorina correspondiente en función de la concentración de calcio a medir. De esta forma hemos medido el calcio mitocondrial de células doblemente silenciadas para las proteínas MCU y MICU1 de forma simultánea. Como podemos observar en la figura 26a, al utilizar el clon estable con MCU silenciado, la captación de calcio mitocondrial queda abolida completamente tanto si se encuentra también silenciado MICU1 (azul) como si no (verde). Esto sucede para concentraciones de calcio tanto altas como bajas (Fig. 26b).

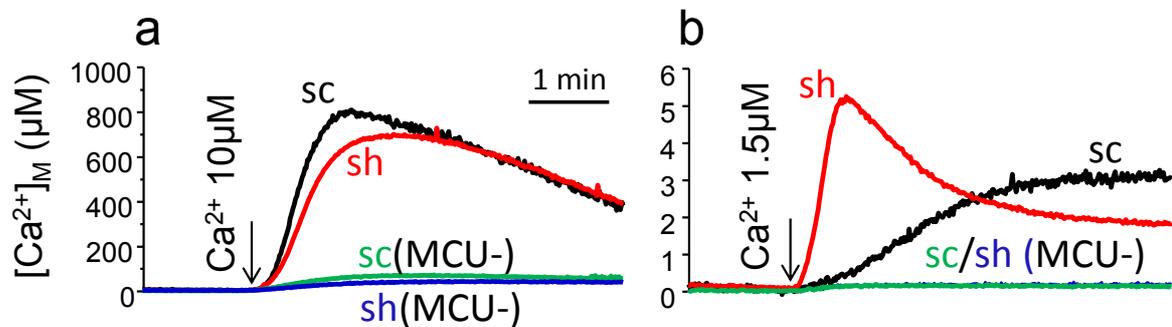


Figura 26: Efecto del silenciamiento de MCU en la captación de calcio mitocondrial en células control y células con MICU1 silenciado. Los clones estables con MCU silenciado (SH1-MCU#5) se transfectan de forma transitoria con el SH-RNA control o con el SH-RNA de MICU1, para co-silenciar MICU1 y MCU. Las células permeabilizadas se perfunden con un tampón de $[Ca^{2+}]$ 10 µM (a), usando aequorina mitocondrial doblemente mutada, o con calcio 1.5 µM (b) usando aequorina mitocondrial mutada. Los resultados son medias de tres experimentos.

4.2.5 Inhibición dependiente de calcio activada por el silenciamiento de MICU1.

Estudiamos más en detalle la peculiar dinámica de captación de calcio mitocondrial obtenida en las células con MICU1 silenciado perfundidas con concentraciones bajas de calcio. En estas células la adición de calcio produce un aumento de la concentración de calcio mitocondrial que desaparece rápidamente hasta llegar a un estado estacionario mucho menor. En cambio, en las células control se observa un suave y constante aumento de la concentración de calcio mitocondrial. Este pico de calcio mitocondrial transitorio sugiere la presencia de una inhibición dependiente del tiempo en la vía de entrada de calcio, que además es inducida por el silenciamiento de MICU1.

Para estudiar esta hipótesis, se ha diseñado un protocolo con dos perfusiones de calcio consecutivas con una duración cada una de 5 minutos en células permeabilizadas. La primera perfusión tiene una concentración de calcio variable desde los 100 a los 500nM y la segunda perfusión tiene una concentración de 1.5 μ M. Los experimentos se han realizado con la aequorina mitmutAEQ reconstituida con celenterazina w.

Si la primera adición produce una inhibición en el transporte de calcio a través del MCU, el pico transitorio correspondiente a la segunda será menor al encontrado cuando sólo se realiza una sola adición (Fig. 27a y e). Los resultados experimentales confirman este efecto temporal y muestran una dependencia directa de la desaparición del efecto transitorio en la segunda perfusión con la concentración de calcio de la primera perfusión.

En la figura 27 se observa cómo el tampón de calcio 100nM no tiene ningún efecto sobre la siguiente adición de calcio en los tipos celulares estudiados (Fig. 27b y f). Cuando la concentración de calcio del tampón es de 200nM, se observa ya una significativa reducción del pico transitorio correspondiente a la perfusión posterior de calcio 1.5 μ M. Este efecto aparece únicamente en las células con MICU1 silenciado (Fig. 27c y g).

Por último, cuando la primera perfusión tiene una concentración de calcio de 500nM, el pico transitorio de la segunda adición desaparece por completo en las células con MICU1 silenciado, mientras que en las células control el valor final de la captación de calcio corresponde a la suma de las captaciones de las dos perfusiones consecutivas (Fig. 27d y h). La velocidad de captación de calcio mitocondrial correspondiente a la adición de calcio 1.5 μ M, se cuantifica como la media \pm el error estándar de tres experimentos diferentes (Fig. 27i).

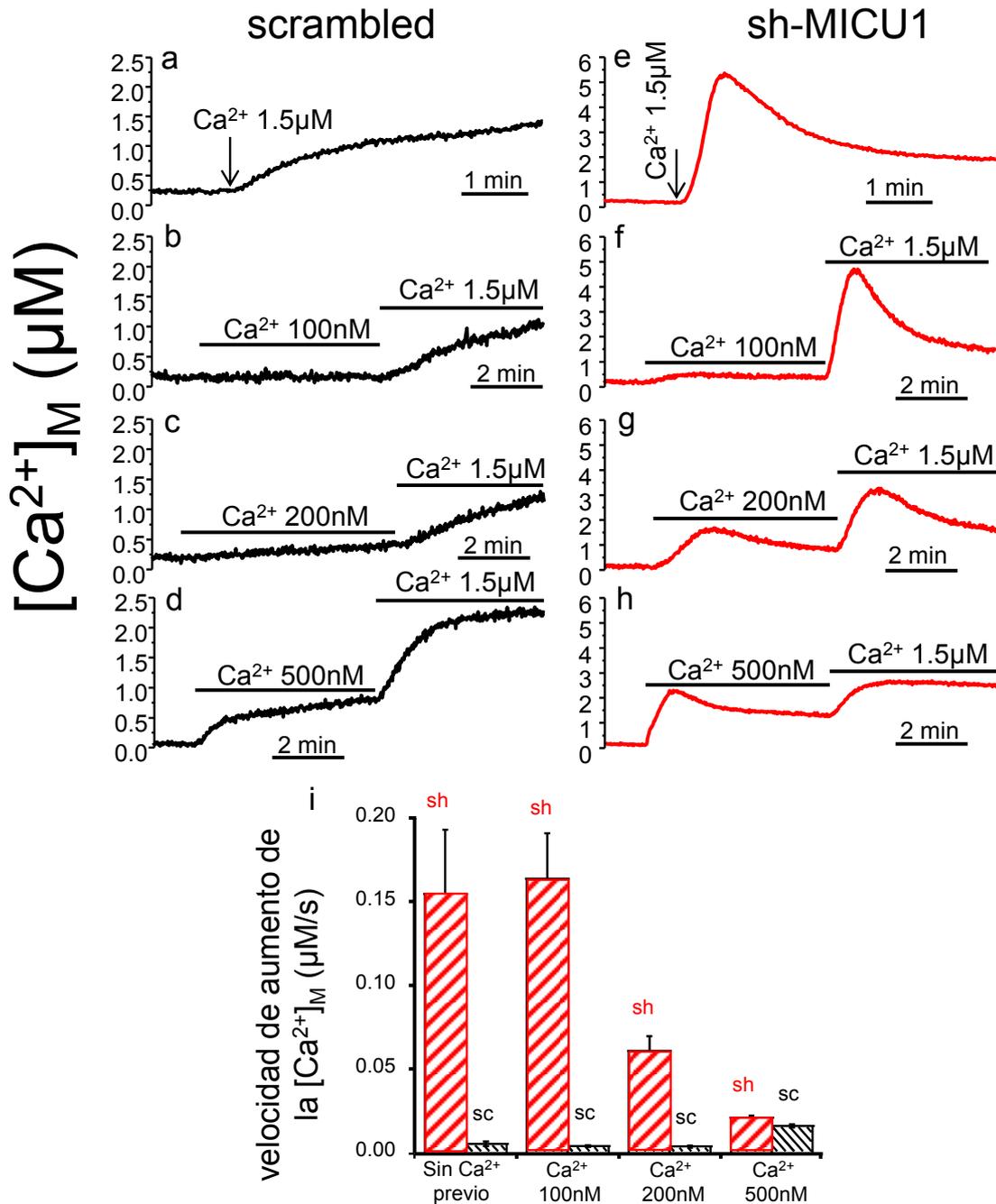


Figura 27: Inhibición de la captación de calcio mitocondrial dependiente de calcio activada por el silenciamiento de MICU1. En la columna izquierda se muestran las células HeLa transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA control y en la columna derecha con el sh-RNA de MICU1. Se perfunden las células con calcio 1.5µM durante 5 minutos tras una primera perfusión de 5 minutos de concentración 100, 200 o 500nM (a-h). Cuantificación de la tasa de captación de calcio mitocondrial inicial, inducida por la perfusión de calcio 1.5µM sin perfusión previa o tras la perfusión de calcio 100, 200 o 500nM (i). Los resultados son medias \pm e.e.m. de tres experimentos diferentes.

4.2.6 Modulación temporal de la autoinhibición de la captación de calcio mitocondrial activada por el silenciamiento de MICU1

Para entender mejor cómo se produce la inhibición dependiente de calcio inducida por el silenciamiento de MICU1, estudiamos en detalle su dependencia temporal. Para ello realizamos un protocolo en células permeabilizadas, con dos perfusiones consecutivas de calcio 500nM. En este caso la duración de la primera perfusión varía entre 15 segundos y 5 minutos. Tras esta primera adición se mantienen las células en medio interno EGTA durante 5 minutos y se realiza la segunda adición de calcio, con una duración de 5 minutos. Se ha utilizado la sonda mitmutAEQ reconstituida con celenterazina w para realizar los experimentos.

En la figura 28 observamos cómo el pico transitorio de Ca^{2+} que aparece en las células silenciadas para MICU1 va desapareciendo a medida que vamos aumentando el tiempo de la primera perfusión de calcio 500nM. Cuando la primera adición tiene una duración de 15 o 30 segundos, el pico transitorio correspondiente a la segunda adición de calcio apenas se modifica (Fig. 28d y e).

Sin embargo, cuando la primera perfusión tiene una duración de un minuto, la magnitud del pico transitorio de la segunda adición comienza a disminuir (Fig. 28c). En concreto disminuye un 40%, respecto a la situación control (Fig. 28g). Al aumentar el tiempo de la primera adición de calcio a dos minutos, la inhibición del pico transitorio de la segunda adición es del 50%, también respecto al control (Fig. 28b y g).

Finalmente, cuando el tiempo de la primera perfusión de calcio 500nM se amplía a 5 minutos, se obtiene una inhibición del pico transitorio correspondiente a la segunda adición de calcio del 100% con respecto al control (Fig. 28a y g). Este mismo experimento se ha realizado en células control, transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA control, sin que se observe ningún efecto de la primera adición sobre la segunda (Fig. 28f y g). Por lo tanto, concluimos que el pico transitorio y su dependencia de una adición previa de Ca^{2+} solo aparecen en células silenciadas para MICU1.

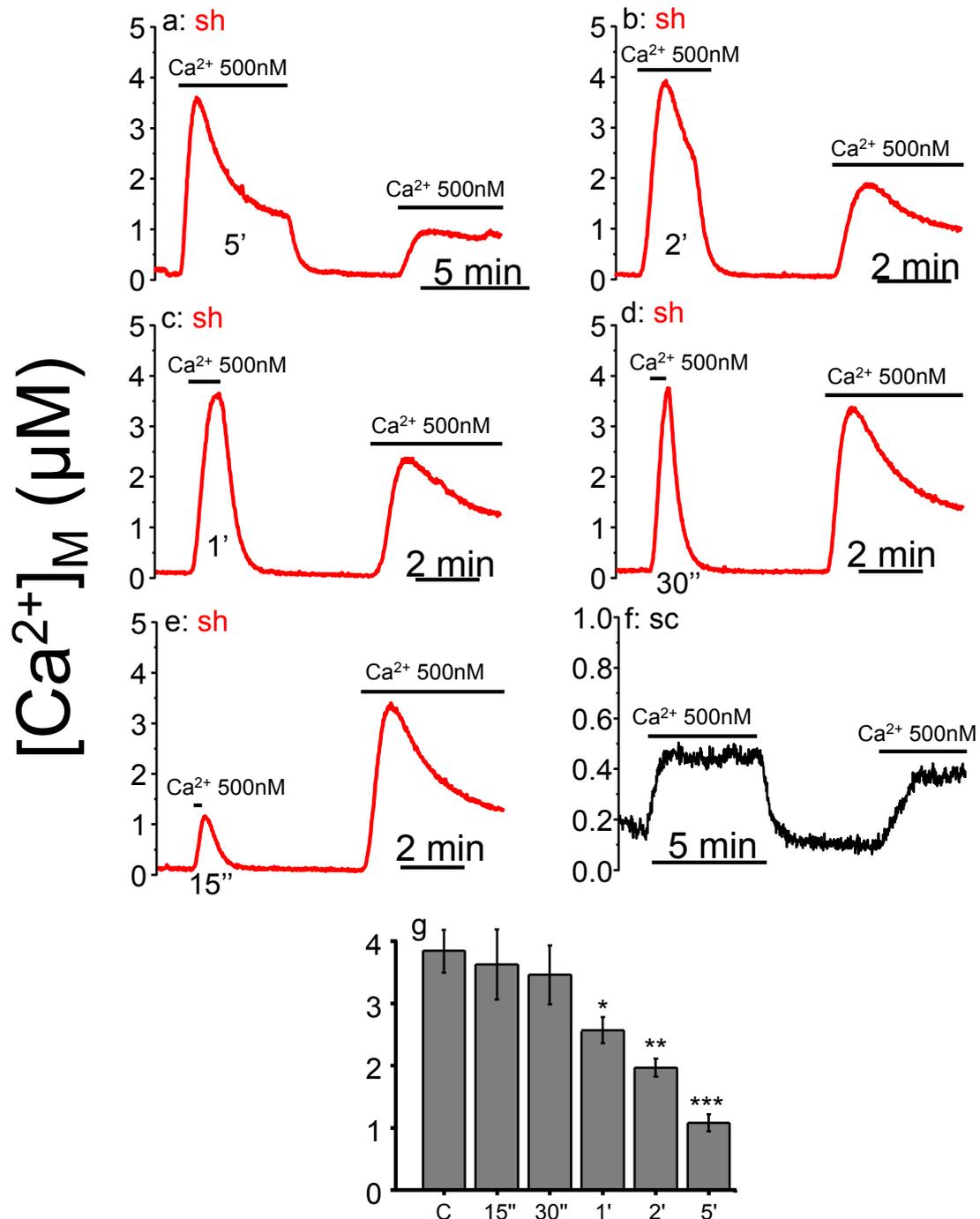


Figura 28: Modulación temporal de la captación transitoria de calcio mitocondrial activada por MICU1. Células HeLa transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA MICU1 (a-e), o con el sh-RNA control (f). Las células fueron permeabilizadas y perfundidas con calcio 500nM dos veces con un intervalo de 5 minutos entre cada perfusión. La captación transitoria de calcio mitocondrial correspondiente a la segunda perfusión se fue restaurando de forma progresiva según se disminuye el tiempo de la primera perfusión de 5min a 15s (a-e). En células control, el tampón de calcio 500nM no produce apenas efecto sobre una segunda adición de calcio 500nM (f). Cuantificación de este efecto (g). Los valores son medias \pm e.e.m. de tres experimentos diferentes.

Hemos estudiado también si una perfusión previa de Ca^{2+} podría tener algún efecto sobre el aumento de Ca^{2+} mitocondrial inducido por una concentración de Ca^{2+} mayor de $2.5\mu\text{M}$, rango en el que el silenciamiento de MICU1 produce ya una inhibición de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. En la figura 29a, podemos observar como una primera adición de calcio 500nM durante cinco minutos produce una inhibición parcial (35%) en el pico de calcio inducido por una segunda adición de calcio de $3.5\mu\text{M}$ (la cuantificación del experimento se encuentra en la propia figura como la media de tres experimentos \pm el error estándar). La curva de captación de calcio mitocondrial cuando sólo se realiza una única perfusión de calcio $3.5\mu\text{M}$ está representada como una línea discontinua. Por lo tanto, el efecto de la primera perfusión de Ca^{2+} se manifiesta todavía en este rango de concentraciones.

Este mismo experimento se ha realizado en células control, transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA control, sin producir inhibición significativa (Fig. 29b). Este hecho confirma la necesidad del silenciamiento de MICU1 para que el uniportador se vuelva sensible a la perfusión previa de Ca^{2+} .

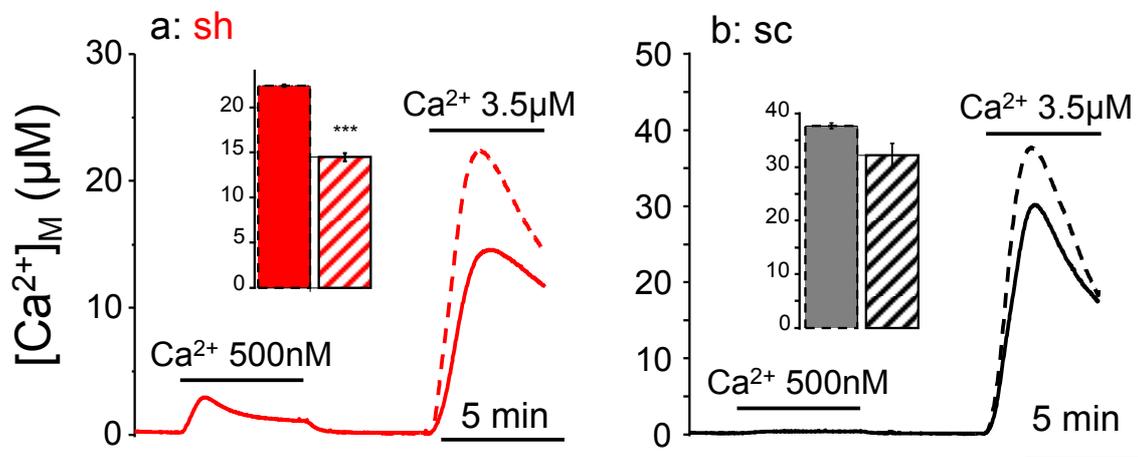


Figura 29: Efecto de una perfusión previa de Ca^{2+} sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial inducida por una $[\text{Ca}^{2+}]$ de $3.5\mu\text{M}$. Células HeLa transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA MICU1 (a), o con el sh-RNA control (b). Las células fueron permeabilizadas y perfundidas con calcio 500nM y calcio $3.5\mu\text{M}$ con un intervalo de 5 minutos entre cada perfusión. La cuantificación está en las mismas figuras (a y b). La línea punteada representa los valores alcanzados sin perfusión previa (j). Los valores son medias \pm e.e.m. de tres experimentos diferentes.

Una vez que se ha producido la inhibición de la captación transitoria de calcio mitocondrial por la perfusión previa de Ca^{2+} , su periodo de duración es largo. De hecho, aumentar el tiempo en el que las células se encuentran en medio interno EGTA, entre una perfusión y otra, hasta 15 minutos no revierte la inhibición que se produce en la captación de calcio mitocondrial de la segunda adición de calcio.

Finalmente, hemos confirmado que la inhibición no se debe a la despolarización de la membrana mitocondrial. Para demostrarlo hemos realizado mediciones con TMRE que no han detectado ningún cambio en el potencial de membrana tras perfundir las células con tampones de calcio 500nM de forma consecutiva (Fig. 30). Estos resultados son medias de 14 (sc, en negro) y 37 (sh, en rojo) células únicas, y son representativos de 7 experimentos diferentes.

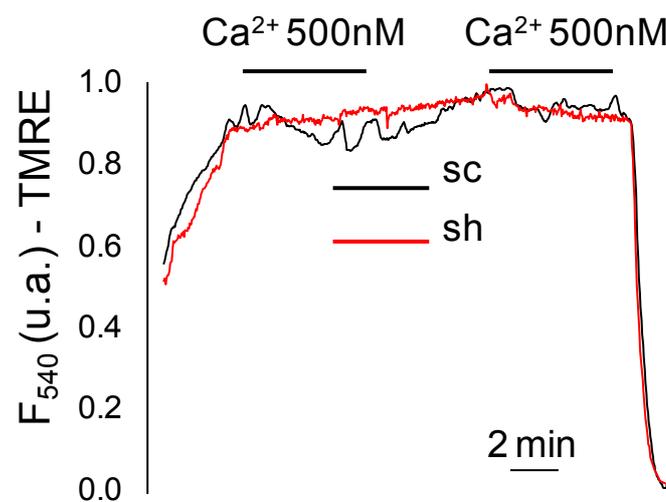


Figura 30: Efecto de la perfusión de Ca^{2+} sobre el potencial de membrana mitocondrial. Células HeLa transfectadas de forma transitoria con el sh-RNA MICU1, o con el sh-RNA control. La perfusión con calcio 500nM no produce ningún cambio en el potencial de membrana mitocondrial medido con TMRE. Valores correspondientes a la media de $n=14$ sc y $n=37$ sh, que son representativas de 7 experimentos de cada tipo.

4.2.7 Efecto de las fosforilaciones y las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la captación transitoria de calcio inducida por el silenciamiento de MICU1

Para explorar los posibles mecanismos por los que se produce la inhibición dependiente de calcio en las células con MICU1 silenciado hemos realizado experimentos en ausencia de ATP y en presencia de diferentes antioxidantes. El objetivo es estudiar si el mecanismo de la inhibición podría estar relacionado con procesos de fosforilación o reducción-oxidación.

Los experimentos se realizan en células con MICU1 silenciado de forma transitoria co-transfectadas con aequorina *mitmutAEQ*, reconstituida con celenterazina *w*. Estas células se permeabilizan y perfunden durante 5 minutos con medio interno EGTA normal o sin ATP, para realizar los estudios de fosforilación. Después, se perfunde el medio de concentración de calcio conocida que estará suplementado con los diferentes antioxidantes o bien carecerá de ATP, según se analice la actividad de ROS o de las fosforilaciones respectivamente.

En primer lugar, perfundimos las células permeabilizadas con un medio libre de ATP para, de este modo, eliminar el ATP citosólico. Esto lleva a una depleción del ATP mitocondrial a través de los intercambiadores ATP/ADP y ATP/Pi. Si el mecanismo de inhibición es dependiente de alguna fosforilación en la matriz mitocondrial, este proceso de autoinhibición se vería reducido en estas condiciones. En la figura 31a observamos cómo la inhibición no se ve modificada por la depleción de ATP, indicando que el mecanismo no depende de ninguna fosforilación.

Por otro lado, hemos estudiado la participación de los ROS, producidos en la matriz mitocondrial, en esta autoinhibición activada por la depleción de MICU1. Hemos analizado la dinámica de la inhibición dependiente de calcio en presencia de cuatro tipos diferentes de antioxidantes, dos liposolubles (α -tocoferol y ácido lipoico) y dos hidrosolubles (ácido ascórbico y N-metil cisteína). Ninguno de los antioxidantes estudiados ha tenido ningún efecto en el nivel de inactivación (Fig. 31b), lo que sugiere que los ROS tampoco están involucrados en este proceso.

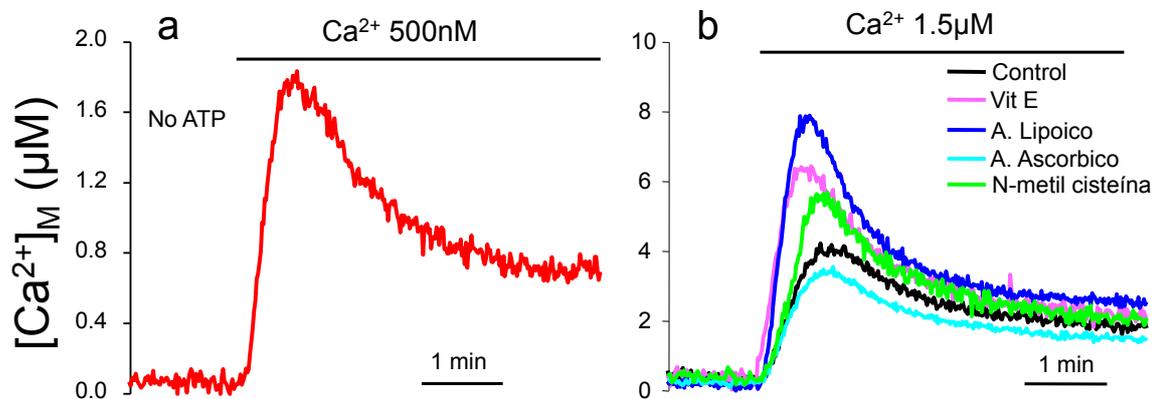


Figura 31: Efecto de la eliminación del ATP y de la adición de diferentes antioxidantes en la autoinhibición dependiente de calcio inducida por el silenciamiento de MICU1. (a) La inhibición dependiente de calcio no sufre ninguna modificación al eliminar el ATP del medio de perfusión. Los resultados son medias de 3 experimentos diferentes. (b) La adición de Vitamina E (100µM), ácido lipoico (100µM), ácido ascórbico 1mM o N-metil cisteína (5mM) no tiene ningún efecto sobre la inhibición de la captación de calcio mitocondrial inducida por el silenciamiento de MICU1. Los resultados son medias de tres experimentos.

4.3 Efecto del silenciamiento de MICU2

4.3.1 Generación de clones estables con MICU2 silenciado

Se han realizado transfecciones estables en la línea HeLa con el sh-RNA de MICU2 y se han seleccionado las poblaciones transfectadas correctamente. Se ha escogido el clon SH4-MICU2#2 dado que era el que mejor respondía ante una adición de calcio, según experimentos previos.

El nivel de silenciamiento de la proteína MICU2 se ha estudiado por medio de Western blot. En la figura 32 podemos observar como el nivel residual de la proteína MICU2 en el clon SH4-MICU2#2 (sh-clon) es del 40% respecto al clon control SHsc-MCU#5 (sc-clon). Los valores se encuentran normalizados en relación a la proteína actina, usada como control de carga. Los resultados son medias \pm e.e.m. de 6 muestras. La proteína MICU2 tiene un peso molecular de 54kDa y la actina de 42kDa.

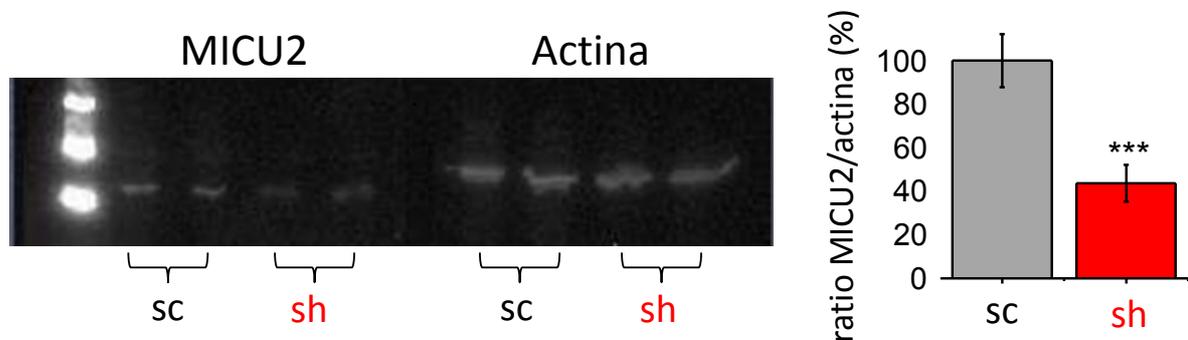


Figura 32: Cuantificación de la expresión de MICU2 por Western blot. Análisis de la densitometría de los Western blot de MICU2 normalizados con su correspondiente actina. Los valores se muestran como la media \pm e.e.m. de los niveles de MCU de $n=6$ de los clones SH4-MICU2#2 (sh-clon) y SHsc-MCU#3 (sc-clon).

4.3.2 Pico de calcio citosólico y mitocondrial inducido por histamina

Se han estimulado las células con histamina 100 μ M con el fin de estudiar cómo afecta el silenciamiento de MICU2 a la dinámica de calcio celular en células intactas. La histamina tras unirse a su receptor, genera IP₃ que produce la salida de calcio desde el retículo endoplásmico.

Para analizar el aumento de calcio citosólico y el efecto tamponador de la mitocondria ante este aumento, hemos medido la concentración de calcio en ambos compartimentos.

Para realizar las mediciones de calcio citosólico hemos utilizado el clon con MICU2 silenciado denominado SH4-MICU2#2 (sh, rojo), así como el clon con el Sh control denominado SHsc-MCU#5 (sc, negro). Ambos clones han sido transfectados con aequorina citosólica (AEQ) y reconstituidos con celenterazina w. Las medidas de calcio mitocondrial se han realizado sobre los mismos clones, pero en este caso, las células han sido transfectadas con aequorina mitocondrial (mitmutAEQ) y se han reconstituido con celenterazina w.

El efecto del silenciamiento de MICU2 en el pico de calcio citosólico inducido por histamina se muestra en la figura 33. Al estimular las células con histamina 100 μ M, observamos que las células con MICU2 silenciado tienen un pico de calcio citosólico significativamente menor que las células control, en concreto un 65% del valor control (Fig. 33a y b).

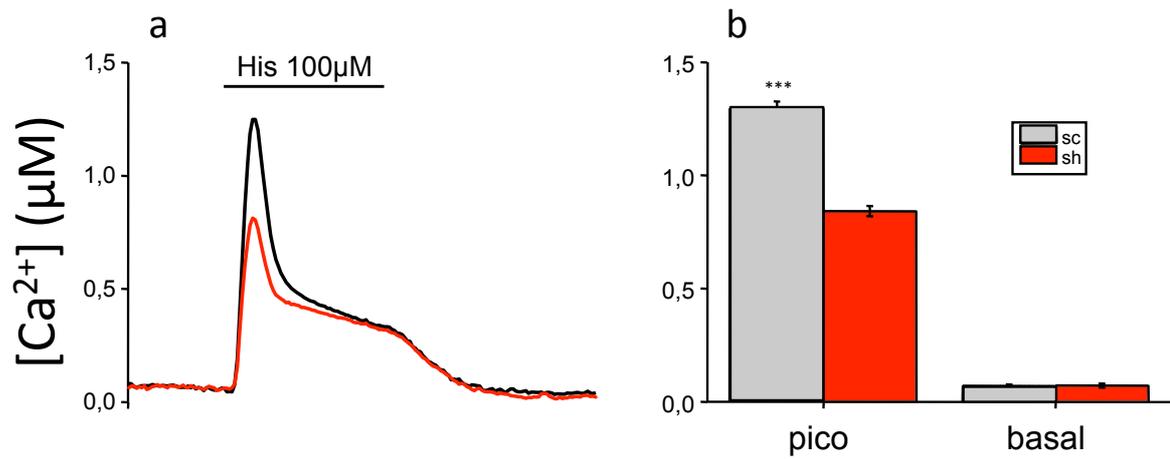


Figura 33: Efecto del silenciamiento de MICU2 en el pico de calcio citosólico inducido por histamina. Pico de calcio citosólico inducido por histamina 100 μM (His) en clones estables de SH4-MICU2#2 (sh, rojo) o de SHsc-MCU#5 (sc, negro) (a). Análisis estadístico de la concentración de calcio citosólica alcanzada el punto más alto (pico) y en la basal final (basal) (media \pm e.e.m. de n=15-14) (b). Las células fueron transfectadas con la aequorina citosólica.

El pico de calcio mitocondrial inducido por histamina se muestra en la figura 34. Podemos observar que al estimular las células con histamina 100 μ M, el pico de calcio mitocondrial de las células con MICU2 silenciado es significativamente mayor (250%) respecto al de las células control (Fig. 34a y b).

Los valores correspondientes a los niveles basales de calcio alcanzados tras la estimulación con histamina, tanto citosólicos como mitocondriales, no presentan diferencias entre las células control y las células con MICU2 silenciado.

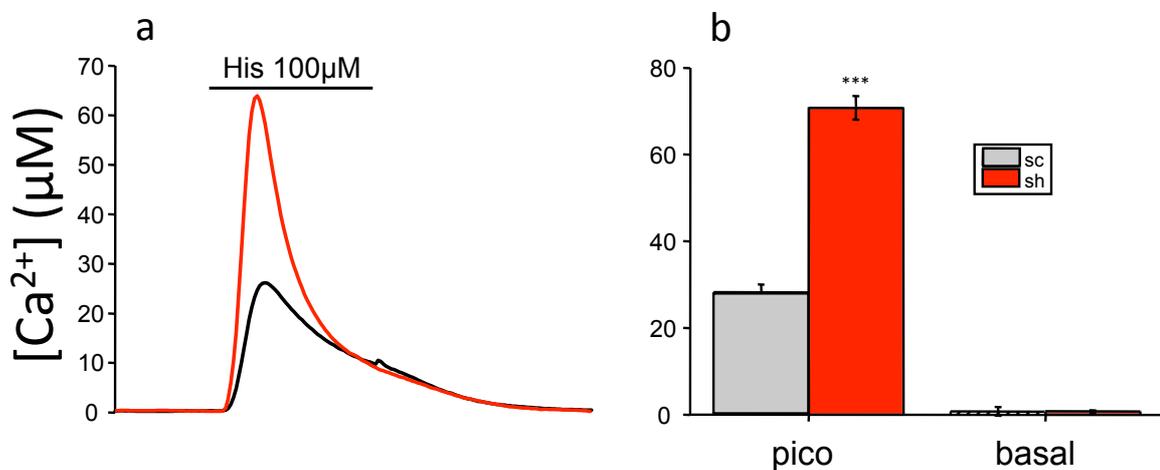


Figura 34: Efecto del silenciamiento de MICU2 en el pico de calcio mitocondrial inducido por histamina. Pico de calcio mitocondrial inducido por histamina 100 μ M (His) en clones estables de SH4-MICU2#2 (sh, rojo) o de SHsc-MCU#5 (sc, negro) (a). Análisis estadístico de la concentración de calcio mitocondrial alcanzada en el punto más alto (pico) y en la basal final (basal) (media \pm e.e.m. de n=24-27). Las células fueron transfectadas con la aequorina mitocondrial mutada.

4.3.3 Salida de calcio del retículo endoplásmico inducida por histamina

Teniendo en cuenta la disminución en el pico de calcio citosólico inducido por histamina en las células con MICU2 silenciado, es importante preguntarse si esas variaciones pueden ser debidas, al menos en parte, a cambios en la liberación de calcio por parte del retículo endoplásmico. Para estudiar esta posibilidad, hemos analizado la salida de calcio del retículo tras la estimulación con histamina 100 μ M de las células silenciadas (SH4-MICU2#2, sh en rojo) y de las células control (SHsc-MCU#5, sc en negro).

Los estudios en retículo se han realizado transfectando las células con aequorina dirigida a retículo endoplásmico doblemente mutada (LAerAEQ) y reconstituidas con celenterazina i. La figura 35 muestra la concentración de calcio del retículo durante la liberación de calcio inducida por histamina 100 μ M.

Como se ha descrito previamente (Montero et al., 1997; Vay et al., 2007), la liberación de calcio por parte del retículo en las células control tiene dos fases. Una primera fase más rápida seguida de una segunda fase más lenta. La transición entre las dos fases se debe a la inhibición dependiente de calcio que sufre el receptor de IP₃. Este cambio de velocidad en la salida de calcio desde el retículo se puede observar en las células control de la figura 35a. En cambio, las células con MICU2 silenciado no presentan esta diferencia en la velocidad de salida de calcio del retículo. En este tipo celular se observa una salida de calcio rápida y constante.

La figura 35 b, es una ampliación de la zona donde se produce el cambio de velocidad de liberación de calcio en las células control. En esta figura podemos observar las barras de error así como la significación de las diferencias que se observan entre las células con MICU2 silenciado, donde no se aprecia un cambio en la velocidad de salida de calcio, y las células control que presentan las dos fases descritas anteriormente.

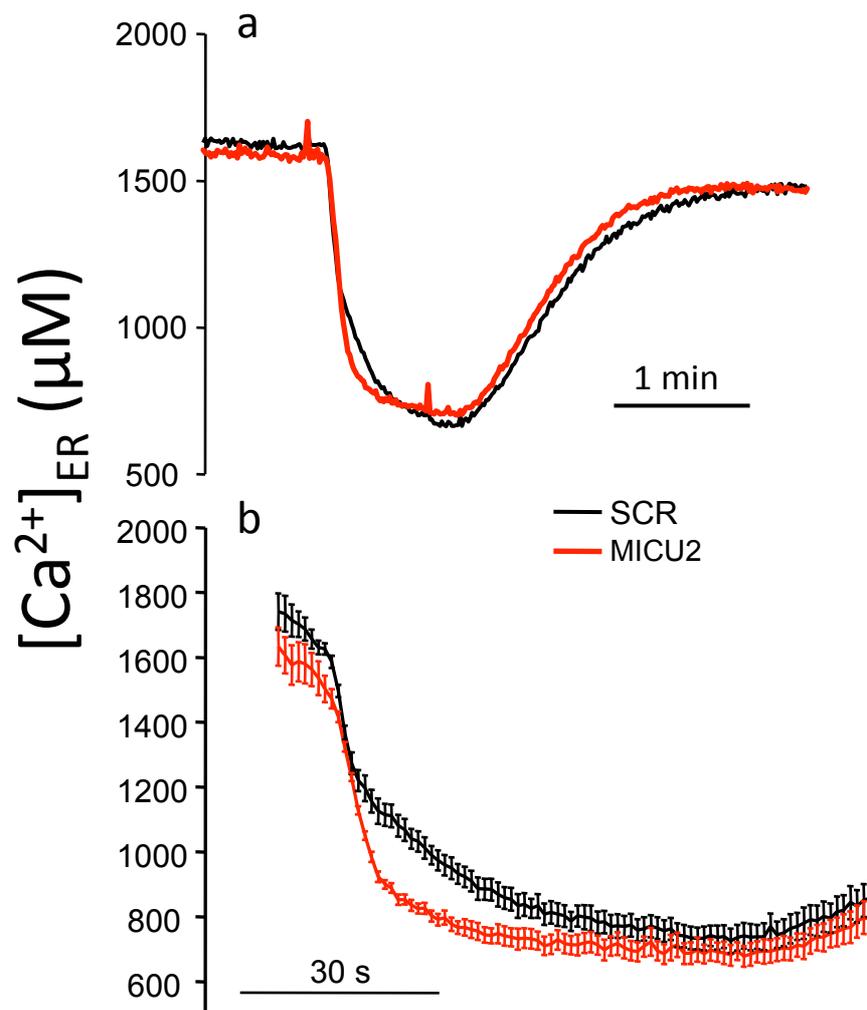


Figura 35: Efecto del silenciamiento de MICU2 en la velocidad de salida de calcio desde el retículo endoplásmico inducida por histamina. La figura **a** muestra la salida de calcio desde el retículo inducida por histamina $100\mu M$ en clones estables con MICU2 silenciado, SH4-MICU2#2 (*sh*, rojo) y clones control, SHsc-MCU#5 (*sc*, negro). La gráfica representa la media de $n=13-17$. La figura **b** muestra una vista ampliada de la figura **a**, donde se incluyen las barras de error. Las células fueron transfectadas con aequorina doblemente mutada dirigida al retículo endoplásmico.

4.3.4 Captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas

Como ya hemos hecho en el caso de MICU1, hemos ampliado los estudios de captación de calcio mitocondrial utilizando células permeabilizadas. En estas células la captación de calcio por parte de la mitocondria es únicamente dependiente de la concentración de calcio perfundido.

Los clones estables tanto con MICU2 silenciado (sh, rojo) como control (sc, negro) han sido transfectados con aequorina dirigida a la mitocondria. Dependiendo de la concentración de calcio perfundida se han utilizado aequorinas de diferente afinidad (igual que en los estudios realizados para MICU1).

Una vez permeabilizadas las células, se mantienen durante diez minutos en medio interno EGTA para asegurar una concentración de calcio menor de 10nM correspondiente al estado basal. Posteriormente se perfunden los diferentes tampones de concentración de calcio conocida.

Como vemos en la figura 36a, la perfusión del tampón de concentración de calcio 100nM, produce un aumento en la concentración de calcio mitocondrial de las células con MICU2 silenciado, pero no en las células control. Además, Las células silenciadas alcanzan un estado estacionario en el cual permanecen de forma prolongada.

Cuando perfundimos con una concentración de calcio de 300nM o 500nM, la respuesta de las células control es todavía muy pequeña, mientras que en las células silenciadas el aumento de la concentración de calcio mitocondrial es mucho mayor. En ambos casos la concentración de calcio mitocondrial de las células silenciadas también alcanza un estado estacionario en el cual permanece estable (Fig. 36b y c).

Las diferencias en el incremento de la concentración de calcio, entre las células control y las células con MICU2 silenciado, para las concentraciones de calcio citosólico 100nM, 300nM y 500nM son estadísticamente significativas (Fig. 36d).

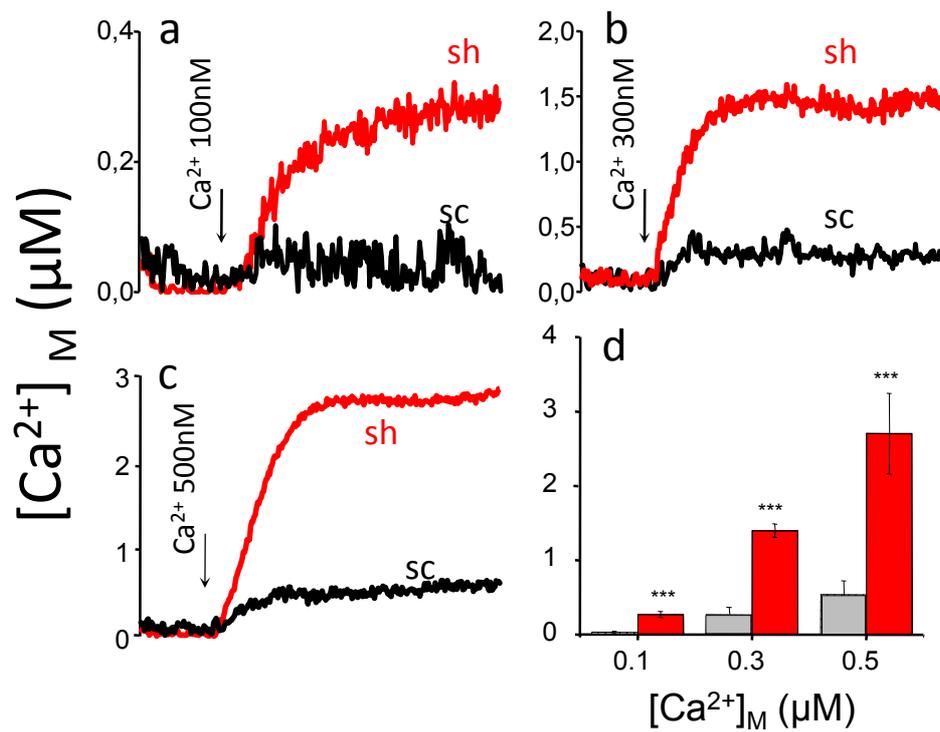


Figura 36: Efecto del silenciamiento de MICU2 en la captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas en presencia de diferentes concentraciones de calcio (I). Las células HeLa con MICU2 silenciado de forma estable (sh, rojo) y el clon control (sc, negro) fueron transfectadas con aequorina mitocondrial mutada. Las células fueron permeabilizadas y perfundidas con tampones de calcio de concentración conocida desde 100 hasta 500nM como se indica en la figura. Los resultados son medias de 3-4 experimentos diferentes de cada tipo. La figura **d** muestra las medias \pm e.e.m de la concentración de calcio mitocondrial máxima alcanzada en cada caso, así como la significación estadística de los cambios inducidos por el silenciamiento de MICU2.

Al perfundir los tampones con concentración de calcio 1,5 μ M, 2,5 μ M y 3,5 μ M observamos el mismo efecto. El aumento de la concentración de calcio mitocondrial es mucho mayor en las células silenciadas respecto a las células control, en torno a unas 5 veces y es, en todos los casos, estadísticamente significativa (Fig. 37).

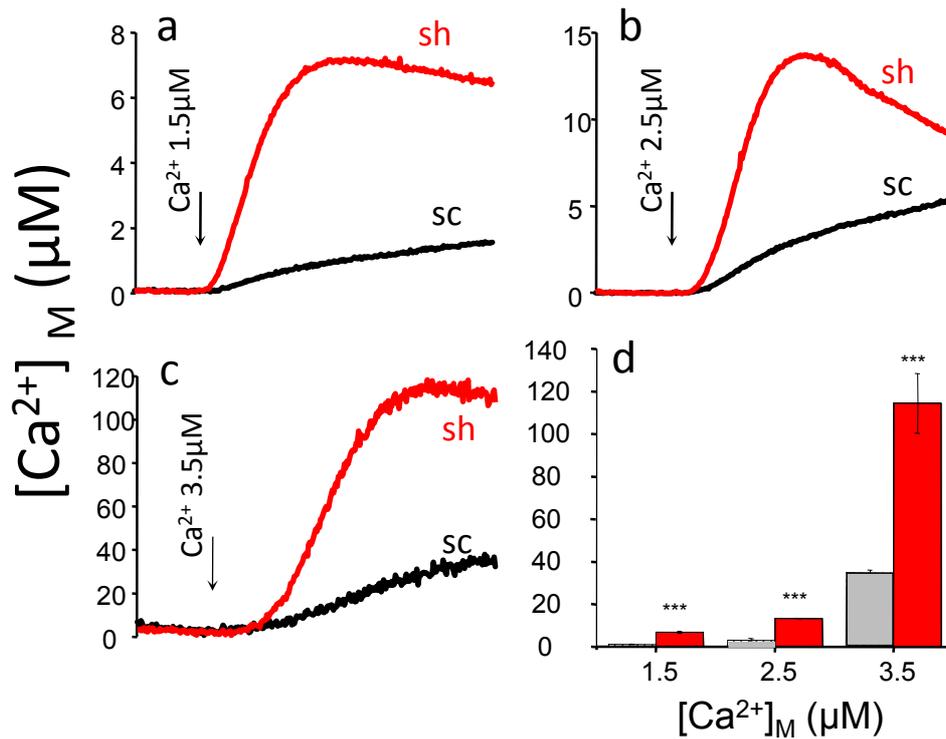


Figura 37: Efecto del silenciamiento de MICU2 en la captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas en presencia de diferentes concentraciones de calcio (II). Las células HeLa con MICU2 silenciado de forma estable (sh, rojo) y el clon control (sc, negro) fueron transfectadas con aequorina mitocondrial mutada. Las células fueron permeabilizadas y perfundidas con tampones de calcio de concentración conocida desde 1.5 hasta 3.5 μ M como se indica en la figura. Los resultados son medias de 3-4 experimentos diferentes de cada tipo. La figura d muestra las medias \pm e.e.m de la concentración de calcio mitocondrial máxima alcanzada en cada caso, así como la significación estadística de los cambios inducidos por el silenciamiento de MICU2.

Cuando perfundimos el tampón de calcio de concentración $4,5\mu\text{M}$ también observamos que la captación de calcio mitocondrial es mayor y más rápida en las células con MICU2 silenciado respecto a las células control, y la diferencia es estadísticamente significativa (Fig. 38a y d).

Sin embargo, al perfundir tampones de calcio de concentraciones superiores ($7\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$), las diferencias en la captación de calcio mitocondrial entre los dos tipos celulares desaparecen y ya no observamos cambios significativos (Fig. 38b, c, d).

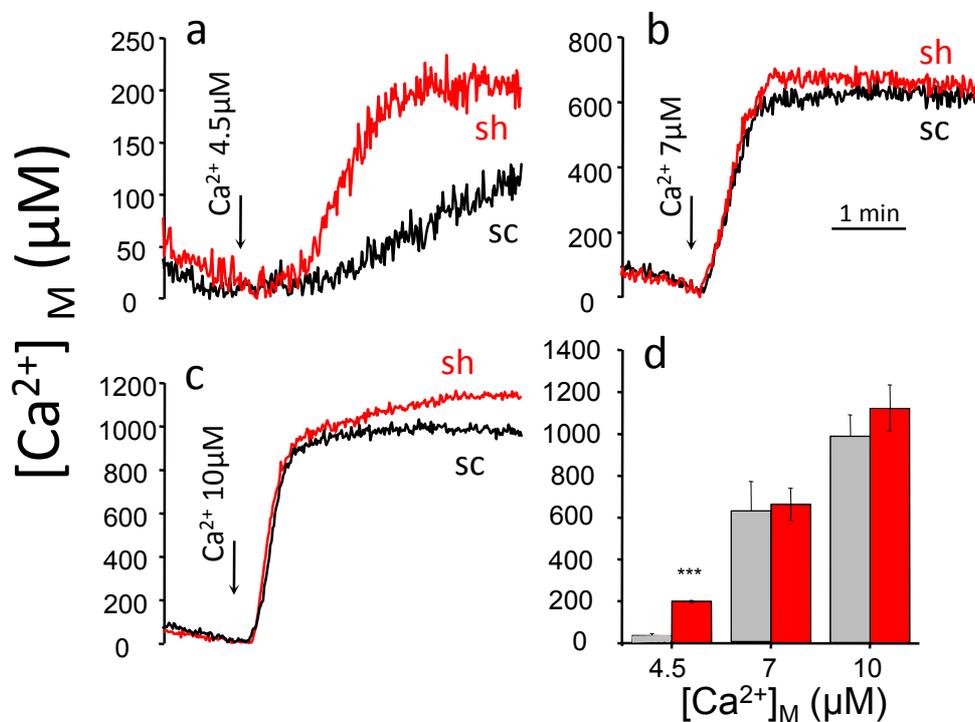


Figura 38: Efecto del silenciamiento de MICU2 en la captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas en presencia de diferentes concentraciones de calcio (III). Las células HeLa con MICU2 silenciado de forma estable (sh, rojo) y el clon control (sc, negro) fueron transfectadas con aequorina mitocondrial mutada. Las células fueron permeabilizadas y perfundidas con tampones de calcio de concentración conocida desde 4.5 hasta $10\mu\text{M}$ como se indica en la figura. Los resultados son medias de 3-4 experimentos diferentes de cada tipo. La figura **d** muestra las medias \pm e.e.m de la concentración de calcio mitocondrial máxima alcanzada en cada caso, así como la significación estadística de los cambios inducidos por el silenciamiento de MICU2.

Por todo ello podemos concluir que la captación de calcio mitocondrial de las células con MICU2 silenciado es mucho mayor, con respecto a las células control, para concentraciones de calcio citosólico bajas, desde 100nM hasta 4,5 μ M. A partir de este valor no se producen diferencias significativas en la captación de calcio mitocondrial. Además, la magnitud de ese incremento en la concentración de calcio mitocondrial es máxima para valores bajos de calcio citosólico y va disminuyendo progresivamente al aumentar la concentración de calcio citosólico.

La figura 39 muestra el cociente entre el incremento de la concentración de calcio mitocondrial en células silenciadas y en células control para cada concentración de calcio citosólico. En esta figura podemos observar que la diferencia en la captación de calcio mitocondrial entre ambos tipos celulares va disminuyendo según aumenta la concentración de calcio citosólico.

Estos resultados indican que MICU2 actúa como inhibidor del uniportador de calcio mitocondrial, pero sólo a bajas concentraciones de calcio citosólico. Además este efecto va disminuyendo a medida que va aumentando la concentración de calcio citosólico y desaparece por completo a partir de 7 μ M.

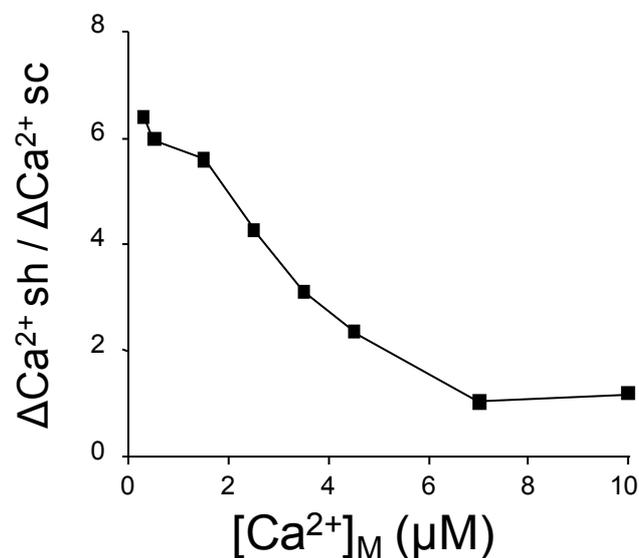


Figura 39: Efecto del silenciamiento de MICU2 en la captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas en presencia de diferentes concentraciones de calcio (IV). Se muestra la razón entre la concentración de calcio mitocondrial máxima alcanzada en los clones con MICU2 silenciado con respecto a los clones control, en función de la concentración de calcio del tampón perfundido.

4.3.5 Efecto del inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial y del activador del Uniportador de calcio mitocondrial kaempferol

El aumento de la captación de calcio mitocondrial, inducida por el silenciamiento de MICU2, podría estar relacionada con procesos ya conocidos que producen un aumento en la captación de calcio mitocondrial no relacionado con cambios en la concentración de calcio citosólico. Estos procesos son, en primer lugar, la inhibición de la salida de calcio de la mitocondria a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial. Inhibiendo la salida de Ca^{2+} de la mitocondria se produce un aumento de la velocidad de llenado de Ca^{2+} de la mitocondria que no se debe a aumento de la entrada sino al bloqueo de la salida. Un conocido compuesto que produce este efecto es el CGP37157, un conocido inhibidor de este intercambiador. En segundo lugar, sabemos que hay una serie de compuestos que activan directamente la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria a través del MCU por mecanismos que aún desconocemos (Montero et al. 2004). Entre estos activadores del MCU, uno de los más conocidos es el kaempferol. Para descartar que los efectos del silenciamiento de MICU2 puedan deberse a una interacción con los flujos de salida de Ca^{2+} de la mitocondria o con este mecanismo de activación del MCU, hemos estudiado si los efectos de CGP37157 o kaempferol son aditivos al efecto del silenciamiento.

Las células con MICU2 silenciado (sh, rojo), o con el control negativo de silenciamiento (sc, negro), se permeabilizan para perfundirlas con el tampón de calcio 500nM. A estos tampones de calcio se añaden los compuestos a estudiar: CGP37157 y kaempferol. Para estudiar la dinámica de calcio mitocondrial debida a tampones de calcio 500nM, se ha utilizado la aequorina mitmutAEQ reconstituida con celenterazina w.

Como se observa en la figura 40a, las células con MICU2 silenciado presentan una mayor captación de calcio mitocondrial que las células control. Al añadir CGP37157 10 μM , observamos que la captación de calcio mitocondrial se ve incrementada, tanto en las células control como en las células silenciadas, y en una magnitud similar en ambos casos (Fig. 40b).

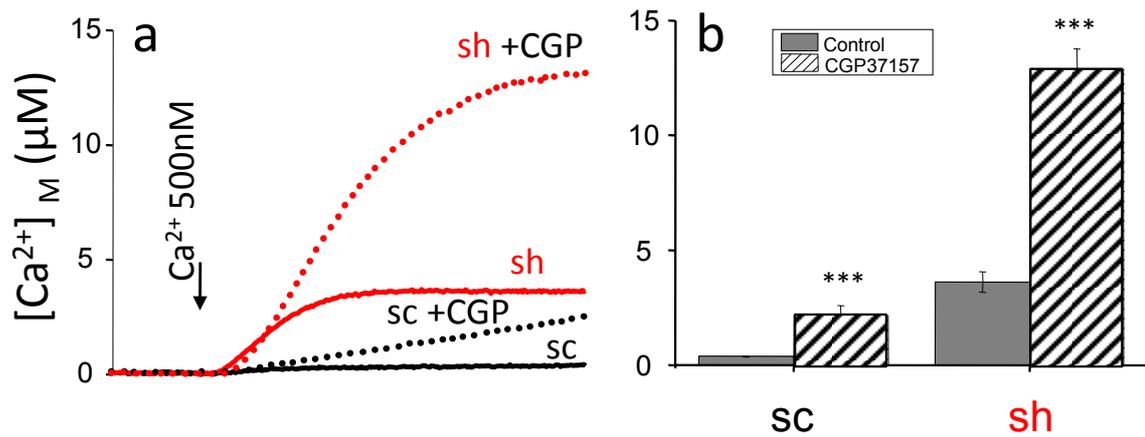


Figura 40: Efecto del CGP37157 en la captación de calcio mitocondrial en células control y en células con MICU2 silenciado. El clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, *sh*) y el clon control (SHsc-MCU#5, *sc*) fueron transfectados con aequorina mitocondrial mutada. Las células fueron permeabilizadas y perfundidas con un tampón de calcio 500nM en ausencia o en presencia de CGP37157 (CGP) a una concentración de 10 μM (figura **a** y estadística en figura **b**). Los resultados son media \pm e.e.m de 3-5 experimentos de cada tipo.

Cuando se añade kaempherol 10 μ M al tampón de calcio 500nM, observamos el mismo efecto. La captación de calcio mitocondrial se ve incrementada tanto en las células control como en las células silenciadas (Fig. 41b). Además, este aumento es también significativo en ambos casos (Fig. 41b).

Si alguno de los mecanismos estudiados estuviera relacionado con el efecto del silenciamiento de MICU2, el compuesto correspondiente debería haber tenido un efecto mucho menor en las células silenciadas. Por lo tanto, al no ser así, podemos decir que la activación de la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria inducida por el silenciamiento de MICU2 no está mediada por ninguno de esos mecanismos.

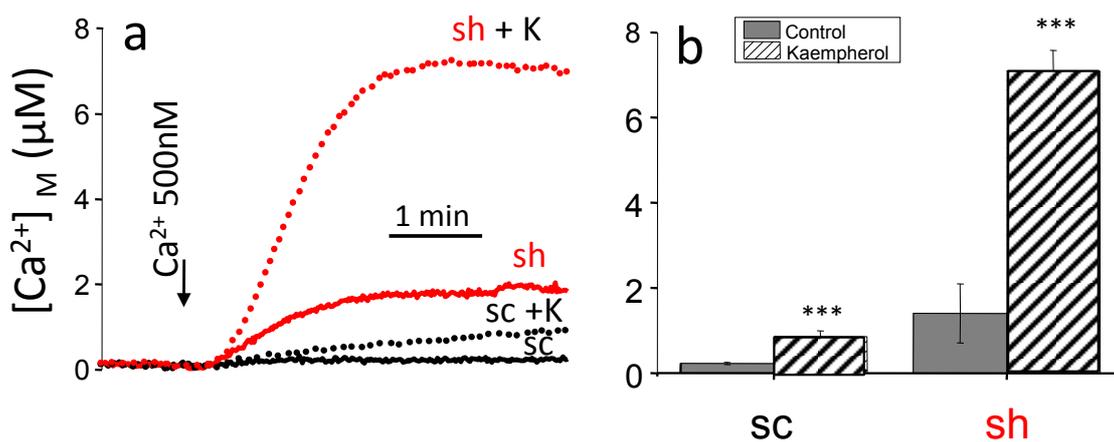


Figura 41: Efecto del kaempherol en la captación de calcio mitocondrial en células control y en células con MICU2 silenciado. El clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, sh) y el clon control (SHsc-MCU#5, sc) fueron transfectados con aequorina mitocondrial mutada. Las células fueron permeabilizadas y perfundidas con un tampón de calcio 500nM en ausencia o en presencia de kaempherol 10 μ M (K). Los resultados son media de 3-5 experimentos de cada tipo. La figura b muestra la media \pm e.e.m. de la concentración de calcio mitocondrial máxima alcanzada junto con la significancia de los cambios inducidos por kaempherol.

4.3.6 Efecto del doble silenciamiento de MICU1 y MICU2 en la captación de calcio mitocondrial

La relación entre MICU1 y MICU2, así como su implicación en la modulación del flujo de calcio a través del MCU están actualmente en debate. La principal dificultad para esclarecer el proceso concreto, radica en la necesidad de MICU2 de formar heterodímeros con MICU1 para poder unirse al complejo del MCU. Por este motivo, el silenciamiento de MICU1 conlleva la pérdida de MICU2 (Patron et al., 2013, Kamer & Mootha, 2014).

Como hemos visto en las figuras 36-38, la captación de calcio mitocondrial, en células con MICU2 silenciado, alcanza un estado estacionario final, mantenido en el tiempo, para todas las concentraciones de calcio citosólico estudiadas. Este hecho contrasta con el gran pico transitorio de alto calcio observado en experimentos de la misma naturaleza donde se ha silenciado MICU1 (Fig. 22 y 23, efecto del silenciamiento de MICU1 en la captación de calcio mitocondrial). Estas diferencias tan marcadas en la cinética de captación de calcio mitocondrial, debidas al silenciamiento de MICU1 en un caso, o de MICU2 en otro caso, sugieren que el aumento de velocidad de captación de calcio mitocondrial en las células con MICU1 silenciado no puede ser atribuida simplemente a la eliminación de MICU2 inducida por la ausencia de MICU1. Alternativamente, MICU1 podría tener también un papel inhibitor del flujo de Ca^{2+} a concentraciones bajas de calcio citosólico.

Para obtener evidencia adicional sobre los efectos específicos de MICU1 y MICU2 sobre el MCU a calcios citosólicos bajos, hemos realizado una serie de experimentos midiendo la entrada de Ca^{2+} en células con silenciamiento simple o doble de estas proteínas. En todos los casos son células transfectadas con aequorina mitmutAEQ, reconstituida con celenterazina w. Estas células se permeabilizan y perfunden durante 5 minutos con medio interno EGTA. Después, se perfunde el medio de concentración de calcio $1.5\mu\text{M}$.

En primer lugar, hemos comparado la eficiencia del silenciamiento de MICU2 bajo diferentes condiciones, analizando su efecto en la captación de calcio mitocondrial. Para ello hemos utilizado dos plásmidos de silenciamiento, SH3-MICU2 y SH4-MICU2

(véase Materiales y Métodos). Ambos plásmidos generan efectos similares, aunque relativamente pequeños, tras transfecciones transitorias. El efecto se ve incrementado en ambos casos cuando se generan clones estables con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2), y obtenemos un efecto aún mayor cuando en uno de estos clones estables realizamos una transfección transitoria con el otro plásmido de silenciamiento.

La figura 42a muestra la captación de calcio mitocondrial en las células control (negro, *línea 1*), en la transfección transitoria, en células HeLa con SH3-MICU2 (morado, *línea 3*), en el clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, rojo, *línea 2*) y en la transfección transitoria, sobre el clon con MICU2 silenciado, con el plásmido SH3-MICU2 (rosa, *línea 4*). El aumento de la concentración de calcio mitocondrial es mucho mayor en el clon con MICU2 silenciado (*línea 2*) con respecto a la transfección transitoria (*línea 3*). El silenciamiento de MICU2 no es completo en el clon ya que la transfección transitoria en estas células (*línea 4*) conlleva un incremento aún mayor de la captación de calcio mitocondrial. En efecto, como hemos mencionado anteriormente (Fig. 32), estudios de expresión por western blot mostraron que el grado de silenciamiento de MICU2 en el clon es del 60%. El valor de la velocidad de captación de calcio mitocondrial obtenido en esta última condición (clon + transitorio), 15 veces superior al valor de las células control, sugiere que se ha conseguido un grado de silenciamiento de MICU2 muy alto. Este valor ha ido aumentando en las diferentes condiciones estudiadas según aumentaba el grado de silenciamiento. Los valores son estadísticamente significativos (Fig. 42b).

La figura 42c muestra la comparación de los efectos encontrados al silenciar MICU2 de forma estable (rojo, *línea 2*) y MICU1 de forma transitoria (azul, *línea 5*), así como la combinación de ambos (verde, *línea 6*). En esta figura se hacen evidentes las diferencias en la cinética de captación de calcio mitocondrial debida al silenciamiento de cada una de las proteínas por separado. En primer lugar, la velocidad de captación de calcio mitocondrial es mucho más rápida (el doble, Fig. 42d) en las células con MICU1 silenciado respecto a las células con MICU2 silenciado. Además, mientras que las células con MICU2 silenciado llegan a un estado estacionario, las células con MICU1 silenciado generan un pico transitorio de alto calcio que va disminuyendo en el tiempo

hasta llegar a un valor de concentración de calcio mitocondrial cercano al alcanzado al silenciar MICU2.

Por otro lado, cuando silenciamos de forma transitoria MICU1 en células con MICU2 silenciado de forma estable (*línea 6*), la velocidad de captación de calcio mitocondrial aumenta rápidamente y aparece el pico de alto calcio obtenido al silenciar MICU1. Por lo tanto se observa la suma de dos efectos activadores diferentes, debidos al silenciamiento de cada una de las proteínas por separado.

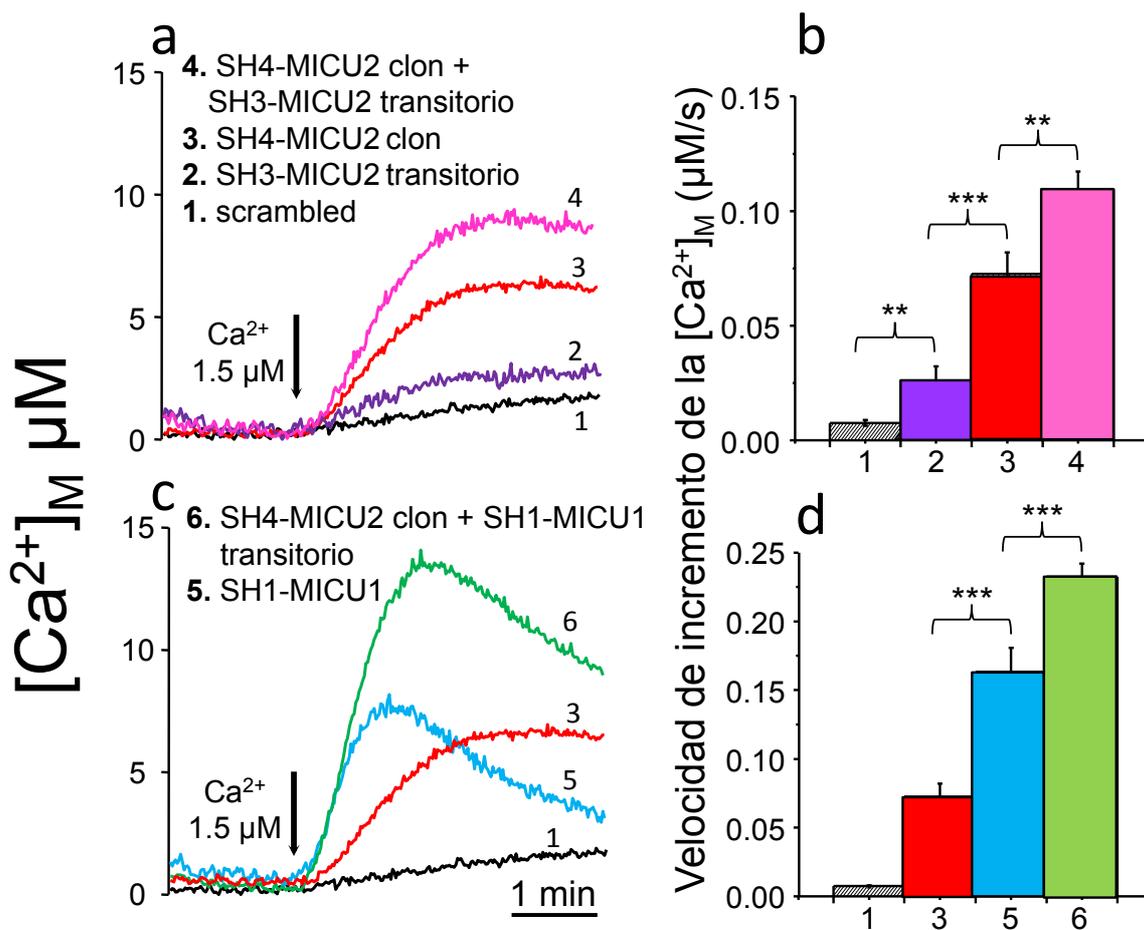


Figura 42: Efecto del silenciamiento de MICU1 y MICU2 sobre la captación de calcio mitocondrial. Las células de las diferentes condiciones estudiadas fueron transfectadas con aequorina mitocondrial mutada, permeabilizadas y perfundidas con un tampón de calcio $1,5\mu M$. Las condiciones estudiadas fueron las siguientes: **1**, clon control (negro); **2**, silenciamiento transitorio de MICU2 con SH3-MICU2 (morado); **3**, clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, rojo); **4**, silenciamiento transitorio de MICU2 con SH3-MICU2 sobre el clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, rosa); **5**, silenciamiento transitorio de MICU1 con SH1-MICU1 (azul) y **6**, silenciamiento transitorio de MICU1 con SH1-MICU1 sobre el clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, verde). Los resultados son medias de tres experimentos de cada tipo. Las figuras **b** y **d** muestran la media \pm e.e.m. de las velocidades de aumento de la concentración de calcio mitocondrial junto con la significancia de los cambios.

4.3.7 Efecto del silenciamiento simple o doble de MICU1 y MICU2 en el protocolo de doble perfusión de Ca^{2+} .

Como hemos visto antes, (Fig. 28 y 29) el pico transitorio de calcio mitocondrial que aparece en las células con MICU1 silenciado se suprime ampliamente cuando se realiza una adición previa de calcio 500nM durante 5 minutos.

Para estudiar en detalle las diferencias en la cinética de captación de calcio mitocondrial en las distintas condiciones, hemos realizado experimentos similares a los comentados en el punto anterior, pero en este caso con dos perfusiones de calcio consecutivas. Para ello, se ha diseñado un protocolo con dos perfusiones de calcio 500nM consecutivas con una duración cada una de 5 minutos, en células permeabilizadas. Tras la primera adición se mantienen las células en medio interno EGTA durante 5 minutos y se realiza la segunda adición de calcio. Los experimentos se han realizado con la aequorina *mitmutAEQ* reconstituida con *celenterazina w*.

En la figura 43 a-d vemos el efecto de las dos adiciones de calcio consecutivas en células con silenciamiento de MICU1, MICU2 o MICU1 y MICU2. Las condiciones de estudio son las siguientes: : 1, clon control (SHsc-MCU#5, negro); 2, silenciamiento transitorio de MICU2 con SH3-MICU2 (morado); 3, clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, rojo); 4, silenciamiento transitorio de MICU2 con SH3-MICU2 sobre el clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, rosa); 5, silenciamiento transitorio de MICU1 con SH1-MICU1 (azul) y 6, silenciamiento transitorio de MICU1 con SH1-MICU1 sobre el clon estable con MICU2 silenciado (SH4-MICU2#2, verde).

En la figura 43 b-e, podemos ver que las diferencias existentes entre los dos picos de calcio para las células con MICU2 silenciado de forma transitoria, estable o ambas, son muy pequeñas. En concreto los valores correspondientes al valor de concentración de calcio mitocondrial máximo alcanzado, no presentan diferencias significativas en ningún caso (Fig. 43b). Con respecto a los valores asociados a la velocidad de captación de calcio mitocondrial, vemos solamente una ligera diferencia, que es significativa, entre el pico de calcio asociado a la primera adición respecto a la segunda, únicamente en el clon con MICU2 silenciado (Fig. 43c).

En cambio, en la figura 43 d, como hemos descrito previamente, se observa una gran diferencia entre la primera y la segunda captación de calcio mitocondrial en las células con MICU1 silenciado. Tanto el valor máximo de calcio alcanzado (Fig. 43e), como la velocidad de captación del segundo pico (Fig. 43f), son muy inferiores a las encontradas tras la primera adición de calcio. Además, cuando silenciamos MICU1 en el clon con MICU2 silenciado, al presentar un efecto aditivo de ambos silenciamientos, encontramos los mismos resultados que al silenciar únicamente MICU1, pero sobre una base estable de mayor magnitud que corresponde al silenciamiento de MICU2.

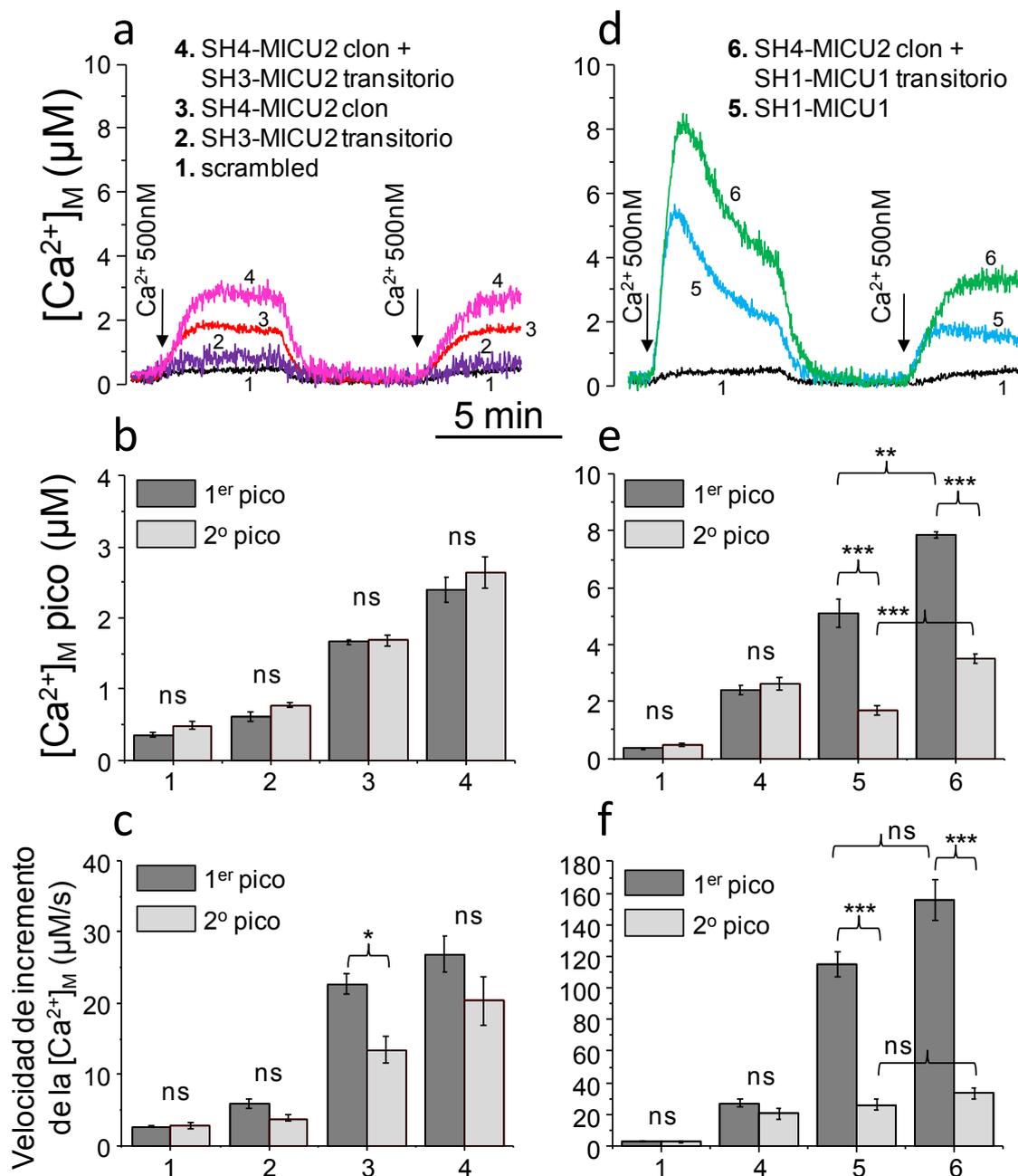


Figura 43: Efecto del silenciamiento de MICU1 y MICU2 sobre la captación de calcio mitocondrial durante dos estímulos consecutivos con un tampón de calcio de 500nM. Las células fueron transfectadas con aequorina mitocondrial mutada y permeabilizadas antes de ser estimuladas dos veces consecutivas con un tampón de calcio de concentración 500nM. Las condiciones estudiadas fueron las mismas que en la figura 42. Los resultados son medias de 3 experimentos diferentes de cada tipo. Las figuras **b** y **e** muestran las medias \pm e.e.m. de la concentración de calcio mitocondrial máxima alcanzada en cada caso tanto en el pico producido por la primera perfusión de calcio como en el segundo. Las figuras **c** y **f** muestran las medias \pm e.e.m. de las velocidades de captación de calcio mitocondrial junto con las significancias de ambos picos de calcio mitocondrial.

DISCUSIÓN

Desde el reciente descubrimiento del sustrato molecular del poro del uniportador de calcio mitocondrial, la proteína MCU (De Stefani et al., 2011; Bughman et al., 2011), se han descrito otras proteínas capaces de modular el transporte de calcio a través del MCU. Estas proteínas, forman el complejo del uniportador de calcio mitocondrial: MICU1, MICU2, MCUB, MCUR1 y EMRE (Perocchi et al., 2010; Plovanich et al., 2013; Raffaello et al., 2013; Mallilankaraman et al., 2012a; Sancak et al., 2013).

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la proteína formadora del poro MCU y sus dos reguladores MICU1 y MICU2. La mayor parte de los tejidos de mamífero expresan estos dos reguladores, aunque su expresión es variable y MICU1 tiene un patrón de expresión más amplio que MICU2 (Plovanich et al., 2013; Pagliarini et al., 2008). Por lo tanto muchos tejidos contienen ambas proteínas reguladoras, aunque algunos solo expresarán MICU1.

5.1 MCU

La proteína MCU es esencial para generar una corriente de calcio, por lo tanto para que se produzca la captación de calcio mitocondrial. Tanto los experimentos de sobreexpresión como de silenciamiento han indicado que esta proteína es la formadora del canal (Patron et al., 2013).

Hemos usado shRNA para silenciar la proteína MCU en células HeLa y hemos creado un clon estable con la proteína silenciada. Hemos comprobado el grado de silenciamiento por western blot, siendo éste del 98% con respecto a las células control. Usando este clon hemos realizado estudios de dinámica de calcio en la mitocondria y en el retículo endoplásmico.

La captación de calcio mitocondrial ante un estímulo de alta intensidad (Histamina 100 μ M) es prácticamente nula cuando MCU esta silenciado. Además, no se observa captación de calcio mitocondrial significativa en células permeabilizadas de los clones con MCU silenciado para ninguna concentración de calcio citosólico perfundida. Por lo tanto, la actividad del uniportador queda totalmente abolida al silenciar la proteína MCU.

En cuanto al retículo endoplásmico, la ausencia de MCU produce dos efectos. En primer lugar, aumenta la velocidad de relleno de Ca^{2+} del retículo tras la depleción inicial. Este hecho, que puede deberse en parte a que la carencia de MCU hace que todo el Ca^{2+} que entra por vía capacitativa esté disponible para las bombas SERCA, sugiere también que la entrada capacitativa no se ve alterada significativamente por la ausencia de MCU en estas células. En segundo lugar, observamos también que la liberación de calcio desde el retículo en respuesta a Histamina $100\mu\text{M}$ es más lenta en las células donde se ha silenciado de forma estable MCU. Este hecho puede deberse al aumento de la autoinhibición del IP_3R por parte del calcio que libera, al aumentar el nivel del microdominio local de Ca^{2+} como consecuencia de la falta de captación de calcio mitocondrial. En condiciones normales, esta captación permite reducir la concentración de calcio del microdominio que se crea en la boca del canal del IP_3R , y que es responsable de su modulación.

5.2 MICU1

MICU1 tiene un papel muy importante en la regulación del flujo de calcio a través de MCU. El grupo de Mallilankaraman mostró que el silenciamiento de MICU1 activa ampliamente la captación de calcio mitocondrial a concentraciones bajas de calcio citosólico, mientras que no encuentran efectos a concentraciones de calcio citosólico altas (Mallilankaraman et al. 2012b). Concluyeron que MICU1 podría actuar como un controlador de la apertura del MCU, bloqueando la entrada de calcio en la mitocondria durante aumentos de baja magnitud en la concentración de calcio citosólico. Por otro lado, el grupo de Csordás demostró que MICU1 no sólo controla el valor de la concentración de calcio que activa el MCU, sino que también juega un papel importante en la activación del MCU a concentraciones altas de calcio citosólico. Por ello, cuando MICU1 es silenciado la velocidad en la captación de calcio mitocondrial, para concentraciones de calcio citosólico altas, es mucho menor (Csordás et al., 2013). Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman este doble papel de MICU1, como controlador de la apertura del MCU a bajas concentraciones de calcio citosólico, y como activador de la captación de calcio mitocondrial a concentraciones

de calcio citosólico elevadas. Además se ha utilizado la aequorina para estudiar en detalle los mecanismos de esos efectos a diferentes concentraciones de calcio citosólico.

Al estudiar la captación de calcio mitocondrial en un amplio rango de concentraciones de calcio citosólicas, encontramos que el silenciamiento de MICU1 activa la captación de calcio mitocondrial de forma significativa para valores de calcio citosólico bajos, entre 100nM y 2 μ M. En este rango de concentraciones, la velocidad de captación es muy superior en las células silenciadas que en las controles. Por el contrario, para concentraciones de calcio citosólico altas, la velocidad de captación de calcio mitocondrial se ve reducida en las células con MICU1 silenciado. Los resultados muestran que incluso una concentración de calcio citosólico muy baja (100nM) promueve un aumento rápido en la concentración de calcio mitocondrial en las células con MICU1 silenciado, mientras que no produce ningún efecto en las células control. La velocidad de captación de calcio mitocondrial aumenta en las células control al aumentar la concentración de calcio citosólico. Cuando la concentración de calcio citosólico es mayor de 2 μ M, la captación de calcio mitocondrial consigue ya valores mayores en las células control con respecto a las células silenciadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para valores de calcio citosólico entre 2 y 5 μ M, la velocidad inicial de captación de calcio mitocondrial es aún mayor en las células silenciadas, y además comienza antes que en las células control. Es ya a partir de concentraciones de Ca²⁺ citosólico de 7 μ M cuando se evidencia claramente el efecto inhibitorio en las células silenciadas. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que para abrir el canal del MCU es necesario eliminar el bloqueo que produce MICU1 y que este proceso requiere una cierta cantidad de tiempo y niveles de Ca²⁺. A concentraciones de calcio citosólico por encima de 5 μ M, la velocidad inicial de captación de calcio mitocondrial no es tan diferente entre las células control y las células silenciadas. Esto indica que la eliminación del bloqueo de MICU1 se produce de forma más rápida a concentraciones de calcio citosólico elevadas.

En este trabajo también se ha encontrado otra característica inesperada de la regulación del MCU por parte de MICU1. Hemos visto que la apertura prolongada del

MCU por concentraciones de calcio submicromolares, promueve un mecanismo de inactivación de la captación de calcio mitocondrial que solo ocurre en las células con MICU1 silenciado, pero no en los controles. Esta inactivación solo se produce en presencia de calcio y el grado de inactivación depende tanto del tiempo como de la concentración de calcio citosólica. Es necesario mantener abierto el MCU durante al menos 5 minutos en presencia de calcio 500nM para conseguir una inactivación completa del MCU. Si mantenemos abierto el canal durante 2 minutos conseguimos una inactivación del 50%. Por otro lado, la inactivación es también incompleta cuando el nivel de Ca^{2+} es de 100 o 200nM, y hace falta perfundir concentraciones de 500nM o superiores para conseguir una inactivación completa en 5 minutos. Además, la inactivación es persistente, ya que una vez que se ha producido la inactivación del canal, no se ha conseguido reactivarlo ni siquiera manteniendo las células en medio libre de calcio durante 15 minutos. Por lo tanto, en ausencia de MICU1, cuando el MCU permanece abierto durante varios minutos, por concentraciones de calcio citosólico en el rango micromolar o submicromolar, aparece un nuevo bloqueo que restablece la impermeabilidad del MCU a bajas concentraciones de calcio citosólico. Este mecanismo podría representar un sistema de seguridad contra la sobrecarga de calcio mitocondrial durante aumentos prolongados en la concentración de calcio citosólico. Además, aunque la inactivación afecta principalmente a la entrada de calcio a concentraciones de calcio citosólico bajas, hay también un pequeño efecto a concentraciones de calcio citosólico altas. En conclusión, la apertura prolongada del MCU produce un bloqueo del mismo de forma independiente de MICU1, que es persistente, requiere tiempo para desarrollarse, y es más pronunciado a concentraciones de calcio citosólico bajas.

Este mecanismo de inactivación comparte ciertas características con el mecanismo denominado RaM (*rapid mode of calcium uptake into mitochondria*; Buntinas et al., 2001), aunque hay otras características en las que difieren como la sensibilidad al Rojo de Rutenio, el mayor tiempo necesario para producir la inactivación, y la ausencia de reactivación.

En relación con el mecanismo de inhibición dependiente de calcio, hemos demostrado que se produce aun en ausencia de ATP y en presencia de varios antioxidantes. Estos resultados sugieren que ni la fosforilación ni los ROS están implicados en el proceso. También se puede excluir que se deba a alteraciones en los amortiguadores de Ca^{2+} mitocondriales como consecuencia de una alcalinización de la matriz derivada de la entrada de Ca^{2+} , ya que aumentos similares en la concentración de calcio mitocondrial en las células control no producen ningún tipo de inhibición. Por lo tanto, no tenemos en este momento una hipótesis definida sobre el mecanismo de este efecto. Con todos los datos obtenidos, podemos decir que para que se produzca la apertura del MCU es necesario eliminar el bloqueo que genera MICU1 y que este proceso necesita un tiempo para producirse, el cual es inversamente proporcional a la concentración de calcio citosólico. Esto podría significar que la cantidad relativa de expresión de la proteína MICU1 en los diferentes tejidos, podría controlar cómo responden las mitocondrias, en cada uno de ellos, a oscilaciones rápidas de calcio citosólico de baja amplitud. Por ello, una baja expresión de MICU1 podría promover un mejor desplazamiento hacia la mitocondria de oscilaciones rápidas y pequeñas de calcio citosólico. Además, en ausencia de MICU1, la activación prolongada del MCU por concentraciones de calcio citosólico submicromolares lleva a una inactivación del canal. Esta inactivación dependiente de la apertura del canal podría ayudar a la mitocondria a evitar sobrecargas de calcio durante los aumentos en la concentración de calcio citosólico prolongados.

5.3 MICU2

MICU2 es un parálogo de MICU1 con un 27% de homología en sus secuencias. Los primeros resultados de silenciamiento mostraron a MICU2 como un inhibidor de la captación de calcio mitocondrial (Plovanich et al., 2013). Los últimos estudios, han demostrado que MICU2 requiere la presencia de MICU1 en el complejo del uniportador para interactuar con MCU. Por el contrario, MICU1 puede estar presente en el complejo y modular a MCU en ausencia de MICU2 (Patron et al., 2014; Kamer & Mootha, 2014). Existen discrepancias entre ambos grupos con respecto al

papel de estas dos proteínas en la regulación del MCU. Por un lado, se ha propuesto que ambas proteínas son reguladores negativos del canal y que la ausencia de MICU2 facilita la captación de calcio, aunque sólo la eliminación de ambas proteínas (MICU1 y MICU2) conduciría a una desregulación del uniportador (Kamer & Mootha, 2014). Por otro lado, se ha propuesto que MICU1 y MICU2 presentan efectos opuestos sobre la actividad de MCU, con MICU2 actuando como un inhibidor y MICU1 estimulando la apertura del canal (Patron et al., 2014). Según estos autores, la función de MICU1 descrita previamente como un controlador de la apertura del canal a concentraciones bajas de calcio citosólico podría ser únicamente una consecuencia de la forzada pérdida de MICU2 (el inhibidor real) cuando se silencia MICU1. Por todo ello es necesario estudiar en detalle el efecto del silenciamiento de MICU1, de MICU2 y de ambos a la vez en la cinética de la captación de calcio mitocondrial.

Al estudiar la captación de calcio mitocondrial en un amplio rango de concentraciones de calcio citosólico, encontramos que el silenciamiento de MICU2 aumenta la captación de calcio mitocondrial de forma significativa para valores de calcio citosólico relativamente bajos, inferiores a $5\mu\text{M}$. De hecho, el efecto activador generado al eliminar MICU2 es máximo para valores de calcio citosólico submicromolares, y va disminuyendo progresivamente al aumentar la concentración de calcio citosólico. De esta forma cuando los valores de calcio citosólico son mayores de $7\mu\text{M}$ ya no se aprecia este efecto.

De forma consistente con lo anterior, el pico de concentración de calcio mitocondrial inducido por un agonista esta incrementado, mientras que el pico en la concentración de calcio citosólico esta reducido. Esto es debido a que la mitocondria capta una mayor fracción del calcio liberado por el retículo. Es interesante comentar que esta disminución del pico de Ca^{2+} citosólico ocurre a pesar de que el silenciamiento de MICU2 induce un aumento en la velocidad de liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. El motivo de este aumento es probablemente que la mayor captación de calcio por parte de la mitocondria está reduciendo el tamaño de los microdominios de alto calcio de la boca de los receptores de IP_3 , aboliendo su inactivación

dependiente de calcio. Esto mismo sucede cuando la captación de calcio mitocondrial es estimulada por kaempherol u otros compuestos (Vay et al., 2007).

El aumento en la captación de calcio mitocondrial inducido por el silenciamiento de MICU2 no se debe a cambios en la velocidad de liberación de calcio desde la mitocondria. La inhibición del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con CGP37157 aumentó con igual magnitud la velocidad de captación de calcio mitocondrial tanto en las células control como en las células con MICU2 silenciado. De forma similar, el activador del MCU, kaempherol, aumentó también la velocidad de captación de calcio mitocondrial de forma similar en las células silenciadas y en las células control. Por lo tanto, el mecanismo de activación del uniportador por kaempherol no está relacionado con la función de MICU2.

El silenciamiento de MICU2 genera una estimulación de la captación de Ca^{2+} mitocondrial con una cinética típica consistente en un aumento exponencial de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial hasta llegar a un estado estacionario alto establecido por el balance entre la captación de calcio por el MCU y la liberación de calcio a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (de la Fuente et al., 2012). De hecho, la inhibición del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con CGP37157 aumenta ampliamente los niveles de concentración de calcio mitocondrial alcanzados. Esta cinética contrasta con lo observado al silenciar MICU1, donde la adición de calcio induce una entrada rápida de calcio que muestra un pico transitorio más alto, que luego rápidamente disminuye hasta llegar a un estado estacionario elevado. Este tipo de cinética sugiere que la activación de la vía de calcio en este caso tiene dos componentes, uno transitorio y otro permanente.

Los estudios realizados con dos adiciones de calcio consecutivas muestran claramente esos dos patrones cinéticos diferentes de estimulación de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, y cómo en la segunda estimulación la respuesta transitoria debida a la eliminación de MICU1 desaparece. Por lo tanto, el silenciamiento de MICU2 produce una apertura persistente de la vía de entrada de calcio, mientras que el silenciamiento de MICU1 produce ambas respuestas, una persistente y otra transitoria. Finalmente, el silenciamiento transitorio de MICU1 sobre el clon estable con MICU2 silenciado ha

generado la misma respuesta que la observada al silenciar únicamente MICU1 (un pico transitorio más alto que disminuye hasta llegar a un estado estacionario), pero en este caso con una respuesta persistente mayor.

La hipótesis que explicaría estos experimentos es que la eliminación de MICU2 es responsable de la respuesta persistente de aumento de la captación de calcio mitocondrial obtenida a niveles de calcio citosólico bajos. La eliminación de MICU1 sería responsable de la respuesta transitoria y de la inhibición del canal debida a una apertura prolongada. Por otro lado, como la eliminación de MICU1 conlleva la eliminación de MICU2 del complejo del MCU, el efecto final del silenciamiento de MICU1 produce un aumento de la captación de calcio mitocondrial tanto transitorio como persistente.

Como se ha mencionado, existe actualmente un debate sobre la función de MICU1 en la regulación del MCU. Mientras que el papel inhibitorio de MICU2 está más aceptado, ya que su eliminación produce siempre un aumento en la captación de calcio mitocondrial, el papel de MICU1 no está claro ya que se le ha propuesto como inhibidor (Kamer & Mootha, 2014) y activador al mismo tiempo (Patron et al., 2014). En este trabajo se ha mostrado que el silenciamiento de MICU1 produce a concentraciones de Ca^{2+} citosólico bajas una activación de MCU transitoria que no puede ser atribuida a la eliminación paralela de MICU2. Además, MICU1 coopera con MICU2 para mantener cerrado y establecer el límite de activación de MCU a niveles bajos de calcio citosólico. Por lo tanto, ambas moléculas actúan como inhibidores del MCU a concentraciones bajas de calcio citosólico, aunque su efecto cambia a concentraciones de calcio citosólico altas. A estas concentraciones de calcio citosólico, MICU1 actúa como un activador de MCU (valores de concentración de calcio citosólico superiores a $2.5\mu\text{M}$). MICU2 por su lado, no tiene ningún efecto sobre la regulación del MCU cuando se alcanzan valores de calcio citosólico de $7\mu\text{M}$ o mayores. Por todo ello, podemos decir que MICU2 es un inhibidor del MCU, aunque solo a concentraciones bajas de calcio citosólico, y que MICU1 tiene un doble papel, actuando como inhibidor a concentraciones de calcio citosólico bajas y como activador a concentraciones altas.

CONCLUSIONES

1. El silenciamiento de MCU abole la captación de calcio mitocondrial.
2. En células con el MCU silenciado se observa un aumento de la velocidad de llenado del retículo endoplásmico y una reducción de la velocidad de liberación de calcio a través del IP₃R, probablemente como consecuencia de una inhibición dependiente de Ca²⁺ del propio IP₃R.
3. Nuestros resultados confirman que la ausencia de MICU1 activa la captación de calcio mitocondrial a bajas concentraciones de calcio citosólico, mientras que a altas concentraciones de calcio citosólico la captación de calcio mitocondrial se ve reducida.
4. La ausencia de MICU1 revela un nuevo modo de operar del uniportador a bajas concentraciones de calcio citosólico, donde la entrada de calcio inducida por el silenciamiento de MICU1 sufre una inactivación lenta cuando el MCU se abre de forma prolongada (minutos) con concentraciones de calcio citosólico mayores de 200nM.
5. La apertura de MCU requiere la eliminación del bloqueo de MICU1 en un proceso lento cuya velocidad es dependiente de la [Ca²⁺]_c.
6. MICU2 actúa como inhibidor del MCU a concentraciones de Ca²⁺ citosólico inferiores a 7μM. En este rango de [Ca²⁺], su silenciamiento produce un gran aumento en la captación de calcio mitocondrial. Esta captación, tiene una cinética constante (no inactivante) que aumenta los niveles de calcio mitocondriales hasta llegar a un estado estacionario elevado, en el que se mantiene de forma prolongada.
7. El aumento en la captación de calcio mitocondrial inducido por el silenciamiento de MICU2 no se debe a cambios en la velocidad de liberación de calcio desde la mitocondria. Tampoco está relacionado con el mecanismo de activación del uniportador por kaempferol.
8. La estimulación de la captación de calcio mitocondrial inducida por el silenciamiento de MICU2, aumenta la velocidad de liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico, probablemente porque reduce la magnitud de los microdominios de alto calcio de la boca de los receptores de IP₃, aboliendo su inactivación dependiente de calcio.

9. La activación de la vía de calcio tras el silenciamiento de MICU1 (y la pérdida consiguiente de MICU2) tiene dos componentes aditivos, uno transitorio y otro persistente. La ausencia de MICU2 es responsable de la respuesta persistente mientras que el silenciamiento de MICU1 lo es de la respuesta transitoria y de la inhibición del canal dependiente de Ca^{2+} durante su apertura prolongada.
10. En resumen, concluimos que MICU2 es un inhibidor del MCU, aunque solo a concentraciones de calcio citosólico inferiores a $7\mu\text{M}$. En cambio, MICU1 tiene un doble papel, actuando como inhibidor a concentraciones de calcio citosólico inferiores a $2,5\mu\text{M}$ y como activador a concentraciones superiores.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarrán L, Dionisio N, Lopez E, Salido GM, Redondo PC, Rosado JA** (2014). STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location. *Biochem J.* 463, 373-81.
- Allen DG, Blinks JR, Prendergast FG** (1977). Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration: a calcium-independent component. *Science.* 195, 996-8.
- Alvarez J, Montero M** (2002). Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium.* 32, 251-60.
- 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, 341-5.
- Baysal K, Brierley GP, Novgorodov S, Jung DW** (1991). Regulation of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ antiport by matrix pH. *Arch Biochem Biophys.* 291, 383-9.
- Berridge MJ** (2012). Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans.* 40, 297-309.
- Bick AG, Calvo SE, Mootha VK** (2012). Evolutionary diversity of the mitochondrial calcium uniporter. *Science.* 336, 886.
- Bondarenko AI, Jean-Quartier C, Malli R, Graier WF** (2013). Characterization of distinct single-channel properties of Ca²⁺ inward currents in mitochondria. *Pflugers Arch.* 465, 997-1010.
- 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, a004168.
- Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, Rizzuto R** (1995). Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c). A critical evaluation. *J Biol Chem.* 270, 9896-903.
- Bublitz M, Musgaard M, Poulsen H, Thøgersen L, Olesen C, Schiøtt B, Morth JP, Møller JV, Nissen P** (2013). Ion pathways in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 288, 10759-65.

- Buck E, Zimanyi I, Abramson JJ, Pessah IN** (1992). Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem.* 267, 23560-7.
- 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.* 1504, 248-61.
- Cahalan MD** (2009). STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nat Cell Biol.* 11, 669-77.
- Carafoli E, Tiozzo R, Lugli G, Crovetto F, Kratzing C** (1974). The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J Mol Cell Cardiol.* 6, 361-71.
- Cates MS, Teodoro ML, Phillips GN Jr** (2002). Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. *Biophys J.* 82, 1133-46.
- Catterall WA** (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3, a003947.
- Chin D, Means AR** (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 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.* 1, 668-74.
- 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, Adijanto J, Mootha VK, Hajnóczky G** (2013). MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Metab.* 17, 976-87.
- Csordás G, Thomas AP, Hajnóczky G** (2001). Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria in cardiac muscle. *Trends Cardiovasc Med.* 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.* 39, 121-32.
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S** (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 25, 317-24.

- de la Fuente S, Fonteriz RI, de la Cruz PJ, Montero M, Alvarez J (2012).** Mitochondrial free $[Ca^{2+}]$ dynamics measured with a novel low- Ca^{2+} affinity aequorin probe. *Biochem J.* 445, 371-6.
- de la Fuente S, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J (2013).** Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low- Ca^{2+} -affinity targeted aequorin. *Cell Calcium.* 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.* 476, 336-40.
- Denton RM, Randle PJ, Martin BR (1972).** Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J.* 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.* 176, 899-906.
- Drago I, De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T (2012).** Mitochondrial Ca^{2+} uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca^{2+} peaks in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 12986-91.
- Dröse S, Brandt U, Wittig I (2014).** Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1844, 1344-54.
- 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.* 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.* 228, 34-6.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000).** Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25, 533-5.
- Fieni F, Lee SB, Jan YN, Kirichok Y (2012).** Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues. *Nat Commun*3, 1317.

- Fill M, Copello JA** (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* 82, 893-922.
- 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.* 19, 723-33.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY** (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260, 3440-50.
- Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP** (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell.* 82, 415-24.
- Hardingham GE, Chawla S, Cruzalegui FH, Bading H** (1999). Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels. *Neuron.* 22, 789-98.
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su T-P** (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends in cell biology.* 19, 81-88.
- Hoffman NE, Chandramoorthy HC, Shamugapriya S, Zhang X, Rajan S, Mallilankaraman K, Gandhirajan RK, Vagnozzi RJ, Ferrer LM, Sreekrishnanilayam K, Natarajaseenivasan K, Vallem S, Force T, Choi ET, Cheung JY, Madesh M** (2013). MICU1 motifs define mitochondrial calcium uniporter binding and activity. *Cell Rep.* 5, 1576-88.
- Hoth M, Button DC, Lewis RS** (2000). Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 10607-12.
- Hoth M, Penner R** (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 355, 353-6.
- Hung V, Zou P, Rhee HW, Udeshi ND, Crahan V, Svinkina T, Carr SA, Mootha VK, Ting AY** (2014). Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratiometric APEX tagging. *Mol Cell.* 55, 332-41.
- Inesi G, Sagara Y** (1992). Thapsigargin, a high affinity and global inhibitor of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *Arch Biochem Biophys.* 298, 313-7.
- Jiang D, Zhao L, Clapham DE** (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science.* 326, 144-7.

- Joiner ML, Koval OM, Li J, He BJ, Allamargot C, Gao Z, Luczak ED, Hall DD, Fink BD, Chen B, Yang J, Moore SA, Scholz TD, Strack S, Mohler PJ, Sivitz WI, Song LS, Anderson ME (2012).** CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature*. 491, 269-73.
- Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD (1995).** Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*. 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*. 410, 549-54.
- Kamer KJ, Mootha VK (2014).** MICU1 and MICU2 play nonredundant roles in the regulation of the mitochondrial calcium uniporter. *EMBO Rep*. 2014 Mar;15(3):299-307.
- 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*. 187, 1091-7.
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004).** The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 427, 360-4.
- Kono T, Jones KT, Bos-Mikich A, Whittingham DG, Carroll J (1996).** A cell cycle-associated change in Ca^{2+} releasing activity leads to the generation of Ca^{2+} transients in mouse embryos during the first mitotic division. *J Cell Biol*. 132, 915-23.
- Kraft R, Harteneck C (2005).** The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch*. 451, 204-11.
- Kröner H (1988).** Spermine, another specific allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 267, 205-10.
- Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, Deerinck TJ, Ellisman MH, Mootha VK, Ting AY (2015).** Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods*. 12, 51-4.
- Laver DR (2007).** Ca^{2+} stores regulate ryanodine receptor Ca^{2+} release channels via luminal and cytosolic Ca^{2+} sites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 34, 889-96.

- Ligeti E, Bodnar J, Karoly E, Lindner E** (1981). Ni²⁺, a new inhibitor of mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta*. 656, 177-82.
- 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*. 86, 1689-93.
- Lobatón CD, Vay L, Hernández-Sanmiguel E, Santodomingo J, Moreno A, Montero M, Alvarez J** (2005). Modulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake by estrogen receptor agonists and antagonists. *Br J Pharmacol*. 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*. 858, 125-34.
- Lytton J** (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J*. 406, 365-82.
- MacLennan DH, Kranias EG** (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 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*. 59, 141-50.
- Malli R, Frieden M, Osibow K, Zoratti C, Mayer M, Demaurex N, Graier WF** (2003). Sustained Ca²⁺ transfer across mitochondria is essential for mitochondrial Ca²⁺ buffering, store-operated Ca²⁺ entry, and Ca²⁺ store refilling. *J Biol Chem*. 278, 44769-79.
- 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** (2012a). MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 14, 1336-43.
- Mallilankaraman K, Doonan P, Cárdenas C, Chandramoorthy HC, Müller M, Miller R, Hoffman NE, Gandhirajan RK, Molgó J, Birnbaum MJ, Rothberg BS, Mak DO, Foskett JK, Madesh M** (2012b). MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cell survival. *Cell*. 151, 630-44.

- Mangialavori IC, Ferreira-Gomes MS, Saffioti NA, González-Lebrero RM, Rossi RC, Rossi JP** (2013). Conformational changes produced by ATP binding to the plasma membrane calcium pump. *J Biol Chem.* 288, 31030-41.
- Mannella CA** (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta.* 1763, 542-8.
- Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, Poulos TL, Mootha VK, Sosinsky GE, Ellisman MH, Ting AY** (2012). Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nat Biotechnol.* 30, 1143-8.
- 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.* 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.* 89, 327-8.
- Medler K, Gleason EL** (2002). Mitochondrial Ca(2+) buffering regulates synaptic transmission between retinal amacrine cells. *J Neurophysiol.* 87, 1426-39.
- Mikoshiba K** (2007). IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem.* 102, 1426-46.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V** (2002a). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell.* 108, 595-8.
- 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** (2002b). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell.* 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.* 2, 57-61.
- Montero M, Barrero MJ, Alvarez J** (1997). [Ca²⁺] microdomains control agonist-induced Ca²⁺ release in intact HeLa cells. *FASEB J.* 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.* 14, 5467-75.
- Montero M, Garcia-Sancho J, Alvarez J (1993).** Transient inhibition by chemotactic peptide of a store-operated Ca²⁺ entry pathway in human neutrophils. *J Biol Chem.* 268,13055-61.
- 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.* 384, 19-24.
- Moore GA, McConkey DJ, Kass GE, O'Brien PJ, Orrenius S (1987).** 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone--a novel inhibitor of liver microsomal Ca²⁺ sequestration. *FEBS Lett.* 224, 331-6.
- 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.* 53, 41-54.
- 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).** elective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysteroocrates gigas*. *Biochemistry.* 37, 15353-62.
- Nilius B, Owsianik G (2011).** The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 12, 218.
- Nowikovskiy 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.* 139, 445-54.
- Oh-hora M, Rao A (2008).** Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 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.
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK (2008).** A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell.* 134, 112-23.

- Palade P, Mitchell RD, Fleischer S** (1983). Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum. General description and effects of calcium. *J Biol Chem.* 258, 8098-107.
- 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.* 45, 11856-66.
- 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.* 107, 436-41.
- Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira II, Allen M, Springer DA, Aponte AM, Gucek M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T** (2013). The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol.* 15, 1464-72.
- Panfili E, Sandri G, Sottocasa GL, Lunazzi G, Liut G, Graziosi G** (1976). Specific inhibition of mitochondrial Ca²⁺ transport by antibodies directed to the Ca²⁺-binding glycoprotein. *Nature.* 264, 185-6.
- Parekh AB, Putney JW Jr** (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85, 757-810.
- Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, Granatiero V, Szabò I, De Stefani D, Rizzuto R** (2014). MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Mol Cell.* 53, 726-37.
- 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, 10750-8.
- 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, 291-6.
- 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, Kotliansky V, Mootha VK** (2013). MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS One.* 8, e55785.

- Qiu J, Tan YW, Hagenston AM, Martel MA, Kneisel N, Skehel PA, Wyllie DJ, Bading H, Hardingham GE** (2013). Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nat Commun.* 4, 2034.
- 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.* 32, 2362-76.
- Reuter H** (1979). Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol.* 41, 413-24.
- Rhee HW, Zou P, Udeshi ND, Martell JD, Mootha VK, Carr SA, Ting AY** (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science.* 339, 1328-31.
- Rios E, Brum G** (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature.* 325, 717-20.
- Rizzuto R, Pozzan T** (2006). Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 86, 369-408.
- Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T** (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature.* 358, 325-7.
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ** (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452, 486-500.
- Rousseau E, Ladine J, Liu QY, Meissner G** (1988). Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch Biochem Biophys.* 267, 75-86.
- Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovács-Bogdán E, Kamer KJ, Udeshi ND, Carr SA, Chaudhuri D, Clapham DE, Li AA, Calvo SE, Goldberger O, Mootha VK** (2013). EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science.* 342, 1379-82.
- Santo-Domingo J, Demaurex N** (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1797, 907-12.

- 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.* 21, 558-65.
- Schneggenburger R, Neher E** (2000). Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature.* 406, 889-93.
- 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.* 1, 241-58.
- Shimomura O, Inouye S** (1996). Titration of recombinant aequorin with calcium chloride. *Biochem Biophys Res Commun.* 221, 77-81.
- Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D** (2012). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion.* 12, 24-34.
- Smyth JT, Dehaven WI, Jones BF, Mercer JC, Trebak M, Vazquez G, Putney JW Jr** (2006). Emerging perspectives in store-operated Ca²⁺ entry: roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta.* 1763, 1147-60.
- Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL** (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13, 549-65.
- Sottocasa G, Sandri G, Panfili E, De Bernard B, Gazzotti P, Vasington FD, Carafoli E** (1972). Isolation of a soluble Ca²⁺ binding glycoprotein from ox liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 47, 808-13.
- Sudhof TC** (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* 27, 509-47.
- Szalai G, Csordás G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnóczky G** (2000). Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem.* 275, 15305-13.
- Szperl M, Opas M** (2005). Calreticulin, Ca²⁺-binding chaperon of the endoplasmic reticulum. *Postepy Biochem.* 51, 382-6.
- Tabary O, Boncoeur E, de Martin R, Pepperkok R, Clément A, Schultz C, Jacquot J** (2006). Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal.* 18, 652-60.

- Tarasov AI, Semplici F, Ravier MA, Bellomo EA, Pullen TJ, Gilon P, Sekler I, Rizzuto R, Rutter GA** (2012). The mitochondrial Ca²⁺ uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic β -cells. *PLoS One*. 7, e39722.
- Taylor CW, da Fonseca PC, Morris EP** (2004). IP(3) receptors: the search for structure. *Trends Biochem Sci*. 29, 210-9.
- Taylor CW, Laude AJ** (2002). IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium*. 32, 321-34.
- Toyoshima C** (2008). Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*. 476, 3-11.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R** (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 62, 405-96.
- Van Petegem F** (2012). Ryanodine receptors: structure and function. *J Biol Chem*. 287, 31624-32.
- Vay L, Hernández-Sanmiguel E, Santo-Domingo J, Lobatón CD, Moreno A, Montero M, Alvarez J** (2007). Modulation of Ca(2+) release and Ca(2+) oscillations in HeLa cells and fibroblasts by mitochondrial Ca(2+) uniporter stimulation. *J Physiol*. 580, 39-49.
- Venkatachalam K, Montell C** (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem*. 76, 387-417.
- Vial C, Roberts JA, Evans RJ** (2004). Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci*. 25, 487-93.
- 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*. 539, 41-52.
- 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*. 262, 12132-6.
- 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*. 44, 15074-81.

Yáñez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M (2012). Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol.* 740, 461-82.

Zahradníková A, Palade P (1993). Procaine effects on single sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channels. *Biophys J.* 64, 991-1003.

