



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la asociación mitocondria-retículo  
endoplásmico”**

**T E S I S**

Que presenta

**VÍCTOR HUGO SÁNCHEZ VÁZQUEZ**

Para obtener el Grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE  
**BIOQUÍMICA**

Director de la Tesis:

**Dr. Agustín Guerrero Hernández**

Ciudad de México

Agosto, 2017



Durante mis estudios de maestría conté con una beca asignada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con el número de registro 710716

# ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO .....	II
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
ABREVIATURAS.....	VI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. El retículo endoplásmico.....	1
1.1.1. Estructura y dinámica del RE .....	1
1.2. El retículo endoplásmico como depósito de Ca <sup>2+</sup> .....	3
1.2.1. Canales liberadores de Ca <sup>2+</sup> en el RE.....	4
1.2.2. La ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo Sarco/endoplásmico (SERCA).....	7
1.2.3. El retículo endoplásmico como un compartimento continuo.....	9
1.3. La mitocondria: Morfología y función mitocondrial.....	10
1.4. La interacción RE – Mitocondria.....	11
1.4.1. Fusión y fisión mitocondrial .....	12
1.4.2. La interacción RE-mitocondria está involucrada en la biosíntesis y transporte de lípidos.....	13
1.4.3. Transferencia de Ca <sup>2+</sup> del RE hacia la mitocondria .....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1. Caracterización del proceso de adquisición de imágenes por microscopía confocal	26
7.2. Cultivo celular: Células HeLa.....	28
7.3. Indicadores fluorescentes para el RE, las mitocondrias y el Ca <sup>2+</sup> luminal .....	29
7.3.1. Indicadores de RE y mitocondrias.....	29
7.3.2. El MagFluo-4: un indicador de Ca <sup>2+</sup> luminal .....	31
7.4. Indicadores proteicos de Ca <sup>2+</sup> .....	33
7.4.1. Transfección transitoria de los indicadores proteicos de Ca <sup>2+</sup> .....	35
7.5. Incubación de células HeLa con tapsigarina y bafilomicina .....	36

7.6.	Adquisición de imágenes por microscopía confocal.....	36
7.7.	Análisis de colocalización.....	37
7.8.	Ensayo funcional de los indicadores de Ca <sup>2+</sup> .....	39
8.	RESULTADOS .....	40
8.1.	Optimización del uso de láseres en el microscopio confocal .....	40
8.2.	El proceso de adquisición de imágenes presenta un desfase en las coordenadas “X” y “Y” que está por debajo del límite de resolución.....	41
8.3.	La función de deconvolución aumentó la resolución de las imágenes obtenidas por microscopía confocal.....	41
8.4.	La gran mayoría de las mitocondrias están asociadas al RE .....	42
8.5.	El RE cuenta con zonas de alto y bajo Ca <sup>2+</sup> , sugiriendo que estas últimas interactúan con las mitocondrias .....	45
8.6.	Los indicadores proteicos de Ca <sup>2+</sup> también sugieren la presencia de zonas de alto Ca <sup>2+</sup> en el RE.....	49
8.6.1.	El erGAP3 mostró datos similares al MagFluo-4.....	49
8.6.2.	Otro indicador proteico de Ca <sup>2+</sup> expresado en la luz del RE mostró pobre colocalización con las mitocondrias .....	52
8.6.3.	Las mitocondrias colocalizan con el indicador de Ca <sup>2+</sup> que refleja regiones de bajo Ca <sup>2+</sup> en el RE.....	55
8.7.	La Tg y la bafilomicina modifican el Ca <sup>2+</sup> luminal en direcciones opuestas, pero ambos reducen la interacción entre la mitocondria y el RE .....	58
9.	DISCUSIÓN .....	61
10.	CONCLUSIONES.....	70
11.	PERSPECTIVAS .....	71
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	72

## Resumen

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo multifuncional y altamente dinámico que está en comunicación constante con otros organelos, como la mitocondria. Esta interacción consiste en procesos como la fisión mitocondrial, el intercambio de fosfolípidos y la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la matriz mitocondrial. Este último se ha propuesto como un regulador positivo de la respiración mitocondrial, ya que se piensa que un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en la matriz mitocondrial aumenta la actividad de algunas enzimas del ciclo de Krebs, sugiriendo un papel fundamental del  $\text{Ca}^{2+}$  para estimular la producción de ATP. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el metabolismo bioenergético no requiere la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria y que, por el contrario, el  $\text{Ca}^{2+}$  es removido rápidamente de la matriz mitocondrial y de no hacerlo, se presentan alteraciones en el desarrollo neurológico y muscular debido a un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno. Estos datos en conjunto, sugieren una paradoja; el mismo  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la respiración y por otro lado destruye a la mitocondria; por tal motivo, nos dimos a la tarea de estudiar el papel que desempeña el  $\text{Ca}^{2+}$  en la asociación mitocondria – RE.

Para lograr esto, como un primer enfoque, estandarizamos el proceso de adquisición de imágenes mediante microscopía confocal, así como las condiciones óptimas para llevar a cabo la función de deconvolución. Usando estas condiciones se obtuvo un incremento en la resolución espacial del 25%. Posteriormente se procedió a cargar las células HeLa con indicadores del RE, de las mitocondrias y con el MagFluo-4, un indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. Las imágenes obtenidas fueron deconvolucionadas y utilizadas para determinar el grado de colocación entre ambos organelos y el MagFluo-4. El 77% de las mitocondrias colocaron con el RE, pero sólo el 20% del RE colocó con las mitocondrias; además, encontramos que sólo el 34% del RE tuvo señal de MagFluo-4. Por otra parte, la colocación de las mitocondrias con el MagFluo-4 fue mucho menor a lo esperado (4% en vez del 26%), sugiriendo que las mitocondrias se segregan de las regiones de alto  $\text{Ca}^{2+}$  del RE.

Si bien, el MagFluo-4 es utilizado ampliamente para reportar  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, este indicador carece de un mecanismo de retención en el RE, por tal motivo, éste pudiese terminar en otros compartimentos; para reducir esta posibilidad utilizamos indicadores proteicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (erGAP3 y G-CEPIA1er) que cuentan con secuencias de retención en el RE. Aun así, estos indicadores mostraron valores similares de colocación con el RE a los reportados por el MagFluo-4 y de igual manera, las mitocondrias presentaron una baja colocación con estos indicadores. Con la finalidad de evaluar la hipótesis de que las mitocondrias se asocian con las regiones de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, decidimos utilizar un tercer indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$  (GEM-CEPIA1er) el cual posee la característica de aumentar su fluorescencia ante la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Con este indicador encontramos una colocación con las mitocondrias significativamente mayor a la predicha. Finalmente, para incrementar la evidencia de que el  $\text{Ca}^{2+}$  modifica la asociación entre estos dos organelos, incubamos a las células HeLa con bafilomicina (la cual produce un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal) y encontramos que la colocación de las mitocondrias con el RE disminuyó de 77% a un 60%, corroborando que las mitocondrias se segregan de las zonas de alto  $\text{Ca}^{2+}$  del RE.

Es importante destacar que varios trabajos han demostrado que el RE no tiene barreras de difusión y por lo mismo se considera que su luz es continua de un extremo a otro de la célula, sin embargo, nuestros datos sugieren que el RE cuenta con zonas de alto y bajo  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual requeriría de barreras de difusión dentro del RE. Nuestros datos son insuficientes para explicar esta aparente paradoja. Sin embargo, en este trabajo encontramos algo sumamente interesante; la observación de que la gran mayoría de las mitocondrias están asociadas a regiones de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, (ER-tracker y GEM-CEPIA 1er). Falta por dilucidar la naturaleza de la región subcelular teñida por los indicadores proteicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (que representa cerca del 50% de los píxeles del indicador), pero que no se tiñe con el marcador de RE (ER-tracker). Estos datos sugieren que las mitocondrias de las células HeLa evitan regiones de alto  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, aunque aún falta por estudiar si esta situación permite a estas células ser una línea celular inmortal.

## Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is a multifunctional and highly dynamic organelle, which is able to interact with other organelles, for instance mitochondria. This interaction results in different processes, among others, mitochondrial fission, phospholipid transfer and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization to the mitochondrial matrix, this stimulates mitochondrial respiration by increase the activity of different enzymes of Krebs cycle. Therefore, these data suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  inside mitochondrial matrix has an important role for stimulating ATP production. However, new data have demonstrated that bioenergetic metabolism does not require mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, on the contrary,  $\text{Ca}^{2+}$  has to be removed quickly from the mitochondrial matrix. Failing to do so, results in neurologic and muscular developmental problems due to overproduction of reactive oxygen species. Collectively, these data reveal a  $\text{Ca}^{2+}$  paradox in mitochondria.

Hence, the goal of the present work was to study the role played by  $\text{Ca}^{2+}$  in the association between ER-mitochondria. To achieve this goal, the first step was to obtain the optimal conditions for confocal imaging and image deconvolution. These resulted in a 25% improvement in image resolution. Next, HeLa cells were incubated with RE and mitochondria probes and also with MagFluo-4, a luminal  $\text{Ca}^{2+}$  indicator. The resulting images were deconvoluted to obtain that 77% of mitochondria overlapped with the ER, but only the 20% of the ER colocalized with mitochondria. Further, we found that only the 34% of the ER showed MagFluo-4 signal. Additionally, the colocalization of mitochondria with MagFluo-4 was only 4 %, much less than predicted (26 %), suggesting that mitochondria were “actively” avoiding regions of high  $\text{Ca}^{2+}$  in the ER.

MagFluo-4 is an organic dye that does not have a mechanism to remain inside the ER; therefore, it could end up down the line in organelles such as Golgi or secretory vesicles. To overcome this shortcoming, we decided to use genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators (GECIs) targeted to the lumen of the ER (erGAP3 and G-CEPIA 1er). Interestingly, these dyes showed the same level of colocalization with the ER as MagFluo-4, and mitochondria also displayed a low level of colocalization. We evaluated the hypothesis that regions of low  $\text{Ca}^{2+}$  are preferred by mitochondria, to achieve this, we used another GECI, GEM-CEPIA 1er, which has an inverse relationship with  $\text{Ca}^{2+}$  since the reduction in the  $[\text{Ca}^{2+}]$  increases its fluorescence. Remarkably, we have found that mitochondria presented a significantly higher level of colocalization with GEM-CEPIA 1er than predicted by the closeness between mitochondria and the ER.

To support even further the idea that mitochondria dislike regions of high  $[\text{Ca}^{2+}]$  in the ER, we have incubated HeLa cells with bafilomycin, which increases the luminal ER  $[\text{Ca}^{2+}]$ . This condition resulted in a decrease of the association of mitochondria with the ER from 77 % down to 60 %, arguing for the idea that mitochondria associate with regions of low  $[\text{Ca}^{2+}]$  in the ER.

Considering that the ER does not show any diffusion barrier for  $\text{Ca}^{2+}$  or even large proteins and yet our data suggest that the ER has regions of low and high  $[\text{Ca}^{2+}]$  that we cannot explain with our current data. However, we have shown that most of the mitochondria associate with the ER when using ER-tracker and GEM-CEPI 1er to mark the ER; while very little mitochondria associate with the ER when stained with MagFluo-4, erGAP3 and G-CEPIA1er. These data suggest that mitochondria associate with the ER but only in regions of low  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Additionally, we need to understand the location of the luminal  $\text{Ca}^{2+}$  indicators since around 50 % of these dyes are in regions that are negative for ER-tracker. It will be very interesting to figure out whether HeLa cells survive by having mitochondria in association with the ER, but only in those regions of low luminal  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

## ABREVIATURAS

<b>[Ca<sup>2+</sup>]</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup>
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>L</sub></b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> luminal
<b>CK</b>	Ciclo de krebs
<b>CM</b>	Coeficientes de Manders
<b>EIM</b>	Espacio Intermembranal
<b>FRAP</b>	Del inglés, <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
<b>GECI's</b>	Del inglés, <i>Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators</i>
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>mCa<sup>2+</sup></b>	Ca <sup>2+</sup> mitocondrial
<b>MCU</b>	Del inglés, <i>Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter</i>
<b>MEM</b>	Membrana Externa Mitocondrial
<b>MIM</b>	Membrana Interna Mitocondrial
<b>MM</b>	Matriz Mitocondrial
<b>NCLX</b>	Del inglés, <i>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger</i>
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>REL</b>	Retículo endoplásmico liso
<b>RER</b>	Retículo endoplásmico rugoso
<b>RIP3</b>	Receptor de IP3
<b>ROS</b>	Especies Reactivas del Oxígeno
<b>RyR</b>	Receptor de rianodina
<b>SERCA</b>	<i>Del inglés, Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase</i>
<b>Tg</b>	Tapsigargina
<b>TMRE</b>	Tetrametilrodamina



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo compuesto por un entramado de membranas que se extienden a lo largo del citoplasma en forma de sacos o túbulos aplanados que en conjunto abarcan aproximadamente el 10% del volumen celular (**Voeltz et al 2002**). Morfológicamente el RE puede o no contener ribosomas adosados a su superficie (retículo endoplásmico rugoso (RER) o retículo endoplásmico liso (REL), respectivamente), el RER está involucrado en la síntesis, plegamiento y modificación de proteínas, mientras que en el REL ocurre la síntesis de lípidos, detoxificación de drogas y almacenamiento de  $Ca^{2+}$  (**Voeltz et al., 2002**). Así, aunque las células pueden contener ambos tipos de RE, la abundancia de cada uno de ellos dependerá de la función y necesidades específicas de cada tipo celular, por ejemplo, células involucradas en la producción de anticuerpos o la secreción de insulina tendrán una mayor cantidad de RER, mientras que las células productoras de hormonas esteroideas contendrán mayoritariamente REL. Interesantemente, a pesar de que en diferentes tipos celulares predomina el REL, la función principal que éste realiza es muy diferente dependiendo de la estirpe celular, así, en células hepáticas, el REL desempeña un papel importante en detoxificación de sustancias mientras que en células musculares el REL está enriquecido de proteínas como el receptor de rianodina (RyR), la triadina, la junctina y la bomba SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase*) las cuales en conjunto son capaces de liberar y capturar  $Ca^{2+}$ , ion importante para la contracción muscular (**Healy et al., 2012**).

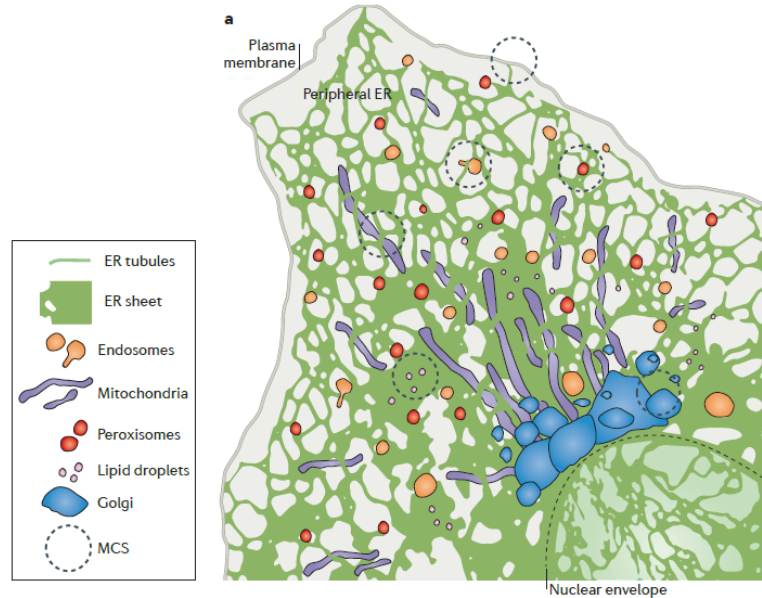
### 1.1.1. Estructura y dinámica del RE

El RE forma una red membranosa continua que posee un espacio interno denominado lumen del RE. Esta estructura membranosa está compuesta a su vez por subdominios estructural y funcionalmente diferentes, los cuales incluyen el envoltorio nuclear (EN), las cisternas y una red tubular interconectada que se encuentran presentes en la periferia del RE (**Phillips & Voeltz, 2015**), un hecho importante es que la presencia de cierto tipo de proteínas de membrana y el ensamble de estas mismas facilitan la formación de estos dominios del RE (**English & Voeltz, 2013**). El EN es el dominio del RE que rodea al núcleo formando una

doble membrana la cual mantiene controlado el flujo de moléculas tanto dentro como fuera del núcleo (**English & Voeltz, 2013**). Las cisternas del RE tienden a estar en cercanía al EN y poseen ribosomas para la síntesis de diversos tipos de proteínas, mientras que los túbulos se encuentran predominantemente en la periferia, poseen menos ribosomas y su morfología les permite formar abundantes sitios de contacto con membranas (MCS, *Membrane Contact Sites*) de otros organelos, incluida la membrana plasmática (**Phillips & Voeltz, 2015**). Actualmente se sabe que la morfología que adopta la red tubular y que a su vez facilita la formación de estos MCS está regulada por proteínas integrales de la membrana del RE que pertenecen a dos familias principales, el Reticulon (Rtn) y DP1/Yop1 (**Shibata et al., 2008**).

De esta manera, el RE es un organelo con una estructura altamente dinámica (**Shim et al., 2012**) y capaz de formar regiones de aposición (dominios) con otros organelos como serían la membrana plasmática, la mitocondria, lisosomas, el aparato de Golgi, endosomas y peroxisomas (**Figura 1.1**), mismos que son necesarios para mediar los diferentes e importantes procesos celulares mencionados anteriormente.

Una estrategia, como sería la microscopia de fluorescencia ha demostrado que el RE está en una constante reorganización del entramado reticular, ya sea por el crecimiento de los túbulos, la retracción de estos o bien por la fusión de membranas adyacentes del RE (**Friedman et al, 2010**). Esta dinámica del RE involucra la participación de motores moleculares como la kinesina-1 (**Lane & Allan, 1999**) y dineina-1 (**Allan, 1995**), los cuales se mueven a lo largo de los microtúbulos (MTs); de tal forma que se ha observado que los túbulos del RE se posicionan sobre los MTs y se desplazan sobre estos gracias a las proteínas antes mencionadas. Este mecanismo prevalece en la mayoría de las células y tiende a ser muy rápido. Sin embargo se ha descrito otro mecanismo conocido como Complejo de fijación a la extremidad, en el cual el túbulo del RE se fija a una extremidad de los MTs y a medida que estos crecen o se encojen, el RE lo hace también (**English et al., 2009**). En resumen, la dinámica y estructura que posee el RE sugiere que ambas características son indispensables para facilitar el contacto con otros organelos y así llevarse a cabo el intercambio de proteínas, lípidos y  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 1.1. Formación de sitios de contacto entre el RE y otros organelos.** El entramado de túbulos formado por el RE crea dominios estructurales que abarcan desde la envoltura nuclear hasta la membrana plasmática. MCS: sitios de contacto entre membranas. Tomado de Phillips and Voeltz, 2015.

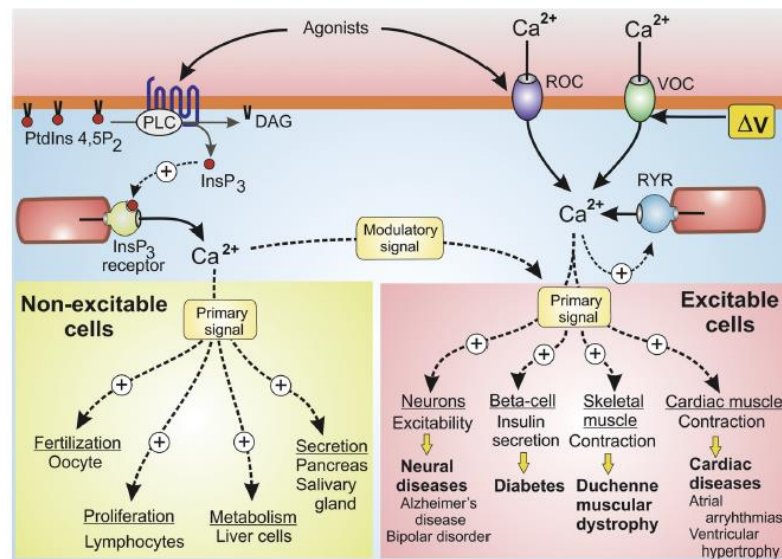
## 1.2. El retículo endoplásmico como depósito de $\text{Ca}^{2+}$

El lumen del RE es considerado como el principal depósito o almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en células excitables como en aquellas que no lo son, y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en este compartimento está en el rango de  $500 \mu\text{M}$  (Michalak et al, 2002). Esta alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $[\text{Ca}^{2+}]_L$ ) parece ser esencial en el proceso de síntesis y plegamiento de proteínas dentro del RE (Verkhratsky & Toescu, 2003) puesto que si la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  se interrumpe, esto puede interferir con el correcto plegado de proteínas, desencadenando un proceso conocido como UPR (*Unfolded Protein Response*) o también llamado estrés del RE (Bravo et al., 2013). De este modo, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RE debe estar finamente regulada, para ello el RE cuenta con diferentes tipos de proteínas encargadas de mantener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  elevada, convirtiéndolo en un depósito heterogéneo en cuanto a la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  (Lam & Galione, 2013). Estas proteínas abarcan desde canales no selectivos que permiten la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  que transportan este ion del citoplasma al lumen del RE en contra de su gradiente

electroquímico, y proteínas lumenales capaces de amortiguar  $\text{Ca}^{2+}$  y que incrementan la capacidad del RE para almacenar este ion (Mekahli et al.,2011).

### 1.2.1. Canales liberadores de $\text{Ca}^{2+}$ en el RE

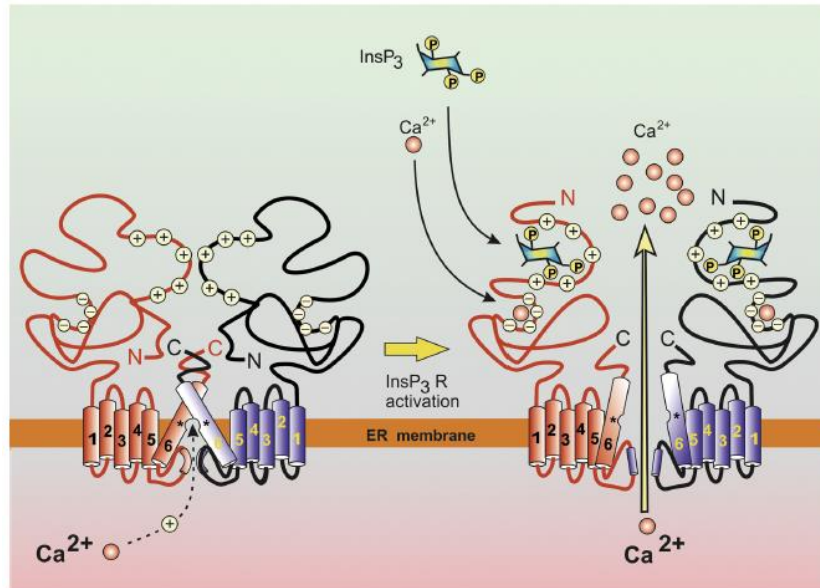
Bajo ciertos estímulos, el RE puede liberar  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de la actividad de dos principales canales no selectivos, el receptor de  $\text{IP}_3$  ( $\text{RIP}_3$ ) y el  $\text{RyR}$  (Figura 1.2). Un incremento en la actividad de estos canales resulta en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente del RE, lo cual a su vez modula una variedad amplia de procesos bioquímicos, tanto fisiológicos como patológicos (Berridge, 2016).



**Figura 1.2. Principales canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el RE.** El  $\text{RIP}_3$  y el  $\text{RyR}$  liberan  $\text{Ca}^{2+}$  del RE hacia el citoplasma en respuesta a diferentes estímulos. Tomado de Berridge, MJ. 2016.

En las células no excitables, el  $\text{RIP}_3$  es el principal artífice de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE hacia el citoplasma y su activación significativa requiere la unión de su ligando fisiológico, el inositol trifosfatado, pero sólo en las posiciones 1, 4 y 5 ( $\text{IP}_3$ ). Este segundo mensajero, junto con el DAG se generan estequiométricamente a partir de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), como resultado de la activación de la fosfolipasa C específica para  $\text{PIP}_2$  debido a la participación de aquellos receptores de 7 pases transmembranales que se acoplan a proteínas G, de la familia q/11. (Mak & Foskett, 2015).

El  $\text{RIP}_3$  es una proteína conformada por 4 subunidades, las cuales en conjunto dan lugar al canal que está presente en la membrana del RE (**Figura 1.3**) e incluso también está en el envoltorio nuclear (**Vais et al., 2010**).



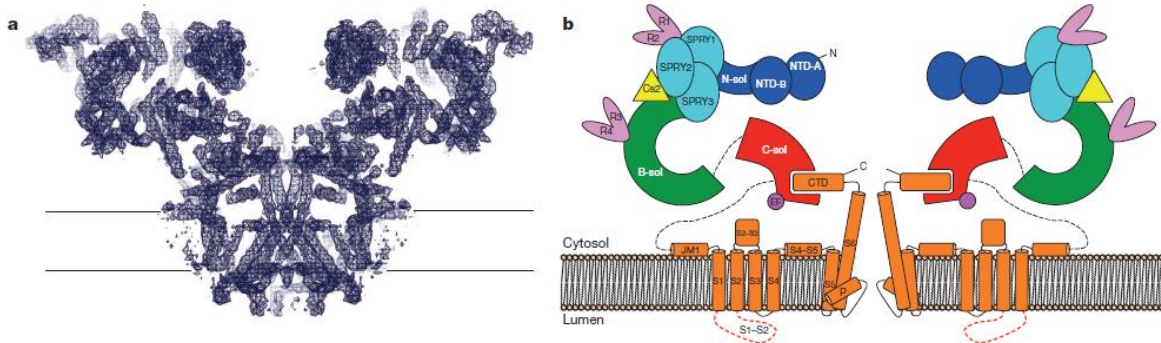
**Figura 1.3. Esquema de la estructura del  $\text{RIP}_3$ .** Dos de las cuatro subunidades son mostradas, así como los 6 dominios transmembranales (presentes en cada subunidad, necesarios para que el receptor se inserte en la membrana del RE) y los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{IP}_3$ , indispensables para la apertura del canal y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. Tomado de Berridge, MJ. 2016.

Se conoce que las células de mamíferos expresan 3 isoformas del  $\text{RIP}_3$ ; las cuales son similares desde el punto de vista estructural, pero que tienen propiedades fisiológicas diferentes (**Berridge, 2016**). Todas las isoformas además de estar reguladas por  $\text{IP}_3$ , también presentan un mecanismo de regulación por  $\text{Ca}^{2+}$ . Diferentes estudios han mostrado que a concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  (aproximadamente 300 nM) los canales requieren de este ion para activarse y abrirse, sin embargo, a concentraciones mayores (que dependen de la concentración de  $\text{IP}_3$ ), este ion actúa como un inhibidor de la apertura del canal (**Iino, 1990**), sugiriendo que el ion  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel dual en la actividad del  $\text{RIP}_3$ , es co-agonista y también un inactivador del  $\text{RIP}_3$  (**Finch et al., 1991; Mak & Foskett, 2015**).

Por otra parte, en células excitables, la proteína funcionalmente homóloga al  $\text{RIP}_3$  sería el RyR; que tiene un papel fundamental en la contracción de células musculares, particularmente las estriadas. Esta proteína es un homotetrámero y es el canal iónico más

grande conocido en la actualidad, pues tiene un peso aproximado de 2200 kDa (**Inui et al., 1987**). Se han descrito tres isoformas del RyR que se expresan de forma diferencial en diferentes tipos de células, por ejemplo, el RyR1 está expresado en músculo esquelético (**Marks et al., 1989**), el RyR2 se encuentra principalmente en corazón (**Nakai et al., 1990**) y el RyR3 está en cerebro (**Otsu et al., 1990**). Interesantemente, las células de músculo liso expresan las tres diferentes isoformas del RyR (**Guerrero-Hernández et al., 2014**).

En el caso del músculo esquelético, la activación de RyR1 involucra la interacción directa con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, que están presentes en el sarcolema, de esta forma, los cambios de voltaje generados en la membrana plasmática provocan la apertura del RyR1 (incluso en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular) debido a la interacción entre el RyR1 y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , conduciendo así la liberación rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma (**Block, 1988**). En el caso de los miocitos cardíacos esta unión física está ausente, sin embargo no están muy alejados puesto que la apertura del RyR2 se lleva a cabo debido a la despolarización del sarcolema que genera la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje permitiendo así el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  el cual se une al RyR2 facilitando la apertura del canal y con ello la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (RS) en un proceso conocido como liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (*CICR* por sus siglas en inglés) (**Fabiato, 1983**). Recientemente, mediante crio-microscopía electrónica se ha logrado observar la estructura de este canal con una resolución de 4.8 Ångström (**Figura 1.4**) poniendo de manifiesto con esto los dominios de la proteína e incluso los sitios reguladores y el mecanismo de activación de la misma (**Zalk et al., 2014**).



**Figura 1.4. Estructura del RyR tipo 1.** a) Gran parte del canal sobresale hacia el citoplasma. b) Representación esquemática de los diferentes dominios presentes en el canal, la región amino terminal contiene varios dominios reguladores que controlan las propiedades de apertura del poro que se encuentra en la región carboxilo terminal. Tomado de Zalk, R. et al. 2015.

### 1.2.2. La ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo Sarco/endoplásmico (SERCA)

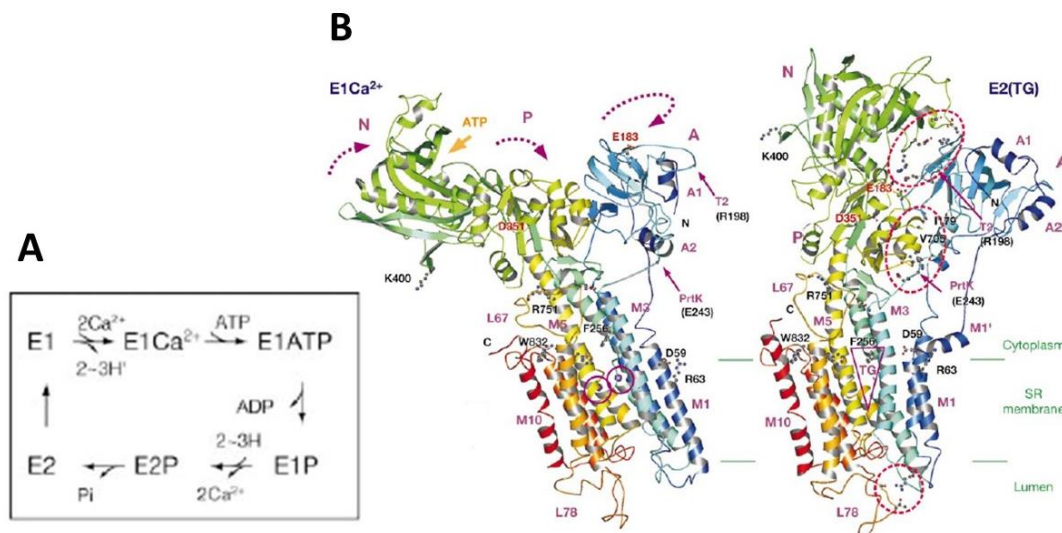
Para mantener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el orden de sub-milimolar dentro del RE, el  $\text{Ca}^{2+}$  debe ser capturado de nueva cuenta hacia el interior del depósito, para ello, las células cuentan con un mecanismo de relleno conformado por una proteína presente en la membrana del RE conocida como bomba SERCA. Esta bomba pertenece a la familia de ATPasas de tipo P y se caracteriza por acumular  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de su gradiente electroquímico mediante la hidrólisis del ATP (MacLennan et al., 1997). Para que este proceso se lleve a cabo, SERCA debe sufrir cambios conformacionales que le permitan movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RE evitando, al mismo tiempo, la posibilidad de que se regrese al citoplasma. En el estado de reposo (conformación E1), la bomba SERCA expone sus dos sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad, hacia el citoplasma, acto seguido se une ATP. Posterior a esto, la hidrólisis del ATP, resulta en un intermediario fosforilado de alta energía (fosforilación en el Asp 351), que permite un cambio conformacional que bloquea el movimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma y a la vez reduce la afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  (esta conformación se conoce como E2) y en este estado el  $\text{Ca}^{2+}$  difunde hacia el lumen del RE. Finalmente, para reiniciar el ciclo catalítico, la desfosforilación del Asp 351 permite el retorno de la bomba al estado E1 (Figura 1.5A, Toyoshima et al. 2002).

La arquitectura de la bomba SERCA consiste de 10 hélices alfa, cuatro de las cuales (M4, M5, M6 y M8) son importantes para la formación de los dos sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y son además la ruta para el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma a la luz del RE. Por su parte,

en el lado citoplásmico están los tres dominios denominados como N (unión a nucleótidos), P (fosforilación) y A (acoplador) (**Carafoli, 2003**), que son característicos de las bomba tipo P (**Figura 1.5B**).

La familia de bombas SERCA consta de tres genes homólogos: *SERCA1*, *SERCA2* y *SERCA3*, siendo este último, el que codifica para seis isoformas diferentes que se expresan predominantemente en células epiteliales y de origen hematopoyético (**Dode et al., 1998**). Así mismo, SERCA 1 y SERCA 2 se expresan de manera específica en diferentes tejidos (**Periasamy & Kalyanasundaram, 2007**).

La actividad de la bomba SERCA está finamente regulada por la presencia de diferentes péptidos que pueden ser, tanto inhibidores como activadores de la misma. Los péptidos inhibidores son el fosfolamban, la sarcolipina (**MacLennan & Kranias, 2003**) y la mioregulina (**Anderson et al., 2015**). Sin embargo, en años recientes se ha encontrado un RNA pequeño que codifica para un péptido de 34 aminoácidos (denominado DWORF), el cual mejora la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por SERCA debido a que desplaza los péptidos inhibidores, dando como resultado un incremento en la actividad de SERCA (**Nelson et al., 2016**).



**Figura 1.5. Estructura cristalina de la bomba SERCA.** A) representa el ciclo catalítico de la bomba SERCA en el cual se bombean 2  $\text{Ca}^{2+}$  por cada ATP que es hidrolizado. B) Estados de alta ( $\text{E1Ca}^{2+}$ ) y baja ( $\text{E2TG}$ ) afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ . Se muestran los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (esferas en círculos), la región de unión a ATP, así como el sitio de fosforilación (D351). El movimiento de los dominios citosólicos (N, P y A) está representado por las flechas punteadas. Tomado de Toyoshima, C. & Nomura, H., 2002.

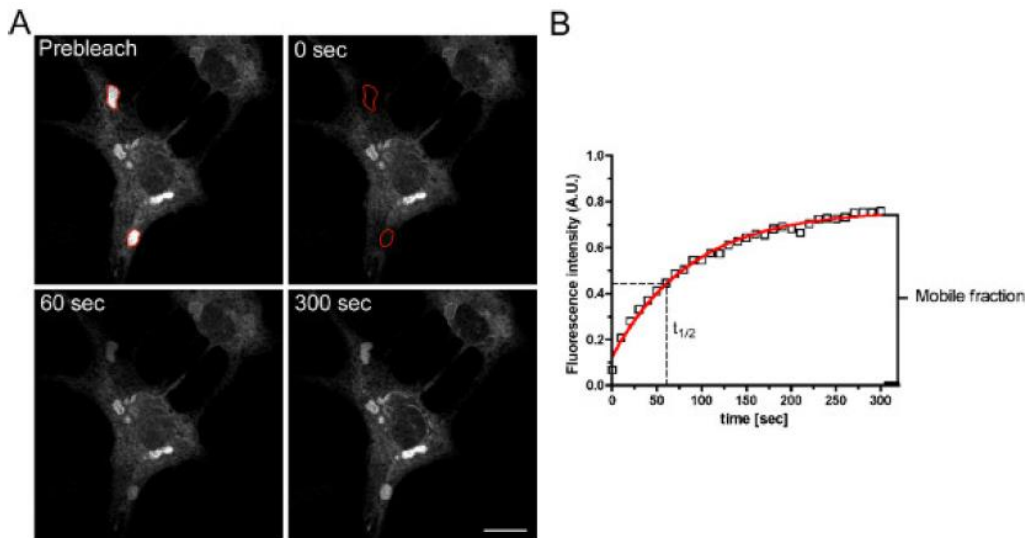


### 1.2.3. El retículo endoplásmico como un compartimento continuo

A pesar de que el RE es espacial y funcionalmente heterogéneo (distribución no homogénea de proteínas y canales) (Papp et al., 2003) este organelo está formado por un entramado tubular continuo, puesto que no hay evidencias experimentales que muestren barreras de difusión en la luz del RE. Esto se ha observado ya que proteínas y  $\text{Ca}^{2+}$  difunden libremente por todo el lumen del RE (Dayel et al., 1999; Park et al., 2000).

Esto concuerda con la idea de que la mayoría de procesos fisiológicos que ocurren dentro del RE dependen de la movilización constante de solutos (Simon et al., 1992).

Una de las evidencias experimentales que ha permitido llegar a esa conclusión han sido los estudios de FRAP (del inglés, *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) en los que se monitoreó la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RE de células acino-pancreáticas, y se encontró que había una rápida movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  del extremo basal al lado apical de estas células secretoras, demostrando con ello que la luz del RE no presenta barreras de difusión para el ion  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto se propone que el RE está conectado funcionalmente (Park et al., 2000). Por otra parte, utilizando la proteína verde fluorescente (*GFP*, por sus siglas en inglés) se observó que, a pesar de ser un soluto mucho mayor en tamaño que el ion  $\text{Ca}^{2+}$ , se movilizó rápidamente de un extremo a otro de las células (Figura 1.6), bastando solo decenas de segundos para que ocurriera este fenómeno (Fossati et al., 2014) y que si se modificaba el ambiente del RE o bien, éste sufría cambios morfológicos (fragmentación o un incremento del volumen) la velocidad de difusión de esta proteína se veía modificada notablemente (Dayel et al., 1999); reforzando la idea de que la luz del RE pareciera ser un continuo a todo lo largo y ancho del RE.



**Figura 1.6. Experimentos de FRAP que revelan la velocidad de difusión de la GFP. A)** muestra dos zonas de una célula que fueron blanqueadas y la correspondiente recuperación de la fluorescencia después de un lapso de tiempo. **B)** Análisis cuantitativo que muestra la constante cinética de recuperación la cual equivale a 60 segundos, tiempo en el cual la recuperación de fluorescencia es claramente detectada. Tomado de Fossati, M. et al., 2014.

### 1.3. La mitocondria: Morfología y función mitocondrial

La mitocondria o red mitocondrial, al igual que el RE, es un organelo dinámico que desempeña un papel esencial en un amplio rango de procesos que incluyen la producción de ATP, la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el control de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en el inicio de la señal de apoptosis (Filadi et al., 2012); es decir, la mitocondria controla si la célula transita por el camino de la sobrevivencia o el de la muerte celular (Giacomello et al., 2007).

Una de las características peculiares de la mitocondria es que posee su propio DNA, el cual está en la matriz mitocondrial (MM) y contiene la información necesaria para codificar 13 subunidades de los complejos de la cadena respiratoria y de la ATP sintasa (Friedman et al., 2014). Sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales se sintetizan a partir de genes nucleares y las nuevas proteínas son incorporadas a la mitocondria; entre las proteínas que se importan a la mitocondria están las enzimas del ciclo de Krebs (CK) (Taylor & Turnbull, 2005). Así mismo, la MM desempeña un papel fundamental en el metabolismo oxidativo, ya que en ella se encuentran las enzimas del CK; las cuales llevan a cabo una serie

de reacciones encargadas de generar los equivalentes reductores, necesarios para la producción de energía en forma de ATP (**Ernster & Schatz, 1981**).

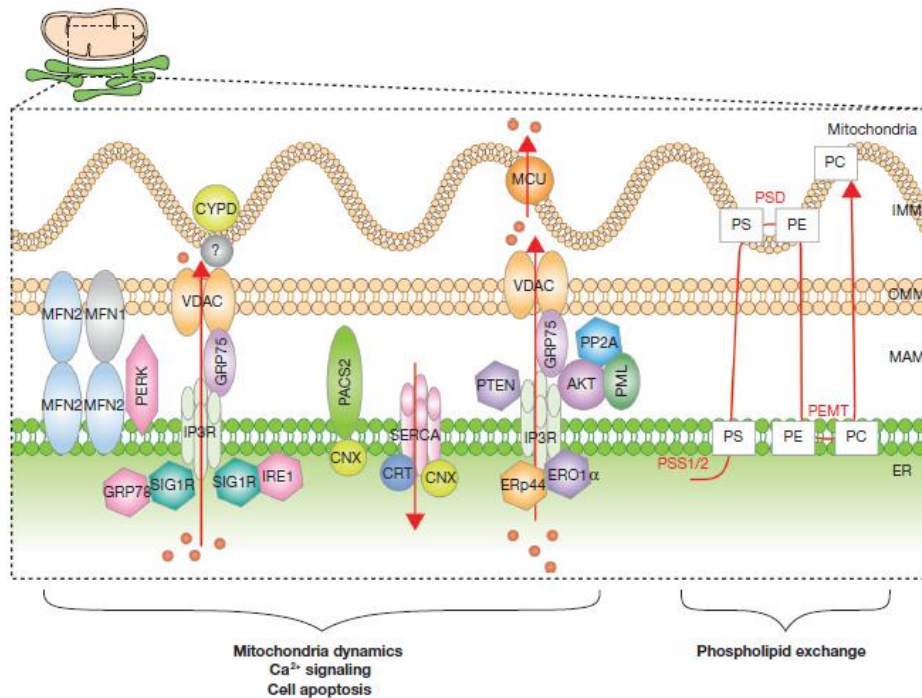
Otra característica interesante de las mitocondrias es que poseen dos membranas que separan, el contenido de la MM, del citoplasma. La primera, la membrana interna mitocondrial (MIM) genera invaginaciones (llamadas crestas) hacia el interior de la matriz y en ella se encuentran localizadas los complejos proteicos que forman parte de la cadena respiratoria, que crean un gradiente de protones, el cual es utilizado por otro complejo proteico, la ATP sintasa, para la producción de ATP. Por lo tanto, la MIM es la responsable de mantener el gradiente electroquímico generado por la cadena respiratoria, dicho gradiente, además de ser utilizado para la producción de ATP, es esencial para la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria (**De Stefani et al., 2011**).

Por otra parte, la membrana externa mitocondrial (MEM), que se encuentra ubicada hacia el lado citoplásmico, contiene proteínas integrales de la familia de las porinas o también llamadas VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) (**Shoshan-Barmatz et al., 2010**). Este canal posee la característica de tener una gran conductancia a aniones y solutos de gran tamaño en su estado abierto, por el contrario, en su estado cerrado tiende a mostrar una alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  (**Tan & Colombini, 2007**), por lo tanto, esta proteína le confiere a la MEM la característica de ser altamente permeable. Varios trabajos han estudiado la importancia de VDAC en la fisiología celular sin que se haya logrado un consenso, puesto que eliminando o disminuyendo la actividad de esta proteína, en algunos casos se promueve la apoptosis y en otros casos parece no tener ninguna afectación (**De Stefani et al., 2012**).

#### **1.4. La interacción RE – Mitocondria**

La dinámica y morfología que presentan el RE facilita la interacción de éste con otros organelos, como la mitocondria. Esta interacción ocurre debido a la gran proximidad entre estos dos organelos, esto es una distancia de entre 10 y 30 nm entre ambos organelos (**Csordás et al., 2006**). Además, existe una gran variedad de proteínas que “puentean” estos dos organelos (**Figura 3.1**), generando así lo que se conoce como MAMs (*Mitochondria Associated ER Membrane*). Esta interacción desempeña un papel importante para mantener

la fisiología de ambos organelos, ya que en estos sitios ocurre la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rizzuto et al., 1998), la biosíntesis de lípidos (Vance, 1990) y la fisión mitocondrial (Friedman et al., 2011), por lo tanto, desempeñan una acción sinérgica (Figura 3.1).



**Figura 1.7. Sitios de contacto entre el RE y la mitocondria.** La cercanía y la presencia de proteínas en ambos organelos facilita la formación de puentes o complejos proteicos que desempeñan un papel importante en la dinámica mitocondrial (fusión y fisión), la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial ( $\text{Ca}_m^{2+}$ ), la biosíntesis y el intercambio de lípidos y en algunas ocasiones dependiendo de las condiciones, la señal que se desencadena es la de muerte celular programada. Tomado de Tubbs & Rleusset, 2017.

### 1.4.1. Fusión y fisión mitocondrial

La mitocondria, al igual que el RE es un organelo altamente dinámico, que se puede elongar y cambiar de forma rápidamente, para ello, las mitocondrias cuentan con dos procesos para que estos cambios ocurran: La fusión y fisión mitocondrial (Filadi et al., 2012).

Por una parte, la fusión mitocondrial facilita la transferencia de material genético entre mitocondrias. Las células de mamíferos presentan dos proteínas ubicadas en la MEM que pertenecen a una familia de GTPasas transmembranales; mitofusina 1 y 2 (MFN 1 y 2), son las principales proteínas que facilitan la fusión de la MEM (Santel & Fuller, 2001), por otra parte, Opa1, presente en la MIM regula la fusión de ésta (Cipolat et al., 2004). En conjunto, estas proteínas generan el mecanismo por el cual ocurre la fusión mitocondrial.

A pesar de que se pensaba que las MFN estaban principalmente en la MEM, estudios posteriores demostraron que la MFN2 también se encuentra localizada en el RE, enriquecido principalmente en las MAMs y que esta proteína puede interactuar con MFN1 y MFN2 de las mitocondrias, formando puentes que regulan tanto la morfología del RE como la transferencia de  $Ca^{2+}$  hacia la mitocondria (de Brito & Scorrano, 2008).

Por otra parte, la fisión mitocondrial ocurre en los sitios de contacto entre la mitocondria y los túbulos del RE (Friedman et al., 2011). Este proceso depende de una GTPasa citosólica llamada DRP1 (*Dynamain-related protein 1*) que es reclutada en la MEM como un oligómero helicoidal por una proteína mitocondrial, Mff (*Mitochondrial fission factor*), así cuando se forma este complejo, DRP1 hidroliza GTP generando con esto un cambio conformacional que provoca que el RE constriña a la mitocondria, lo cual resulta en la división de ésta (Ingerman et al., 2005). Un hecho importante a resaltar es que la ausencia de DRP1 o Mff no desorganiza los sitios de contacto ER-mitocondria, lo cual sugiere que la maquinaria de división mitocondrial es independiente de la formación de los sitios de contacto (Friedman et al., 2011), sin embargo, la reducción de DRP1 o de Mff provocan una división anormal, por lo tanto, este proceso es importante para evitar y/o eliminar el daño mitocondrial. Por otra parte, un exceso de división trae consigo numerosas enfermedades, incluyendo neurodegeneración y diabetes (Cho et al., 2010).

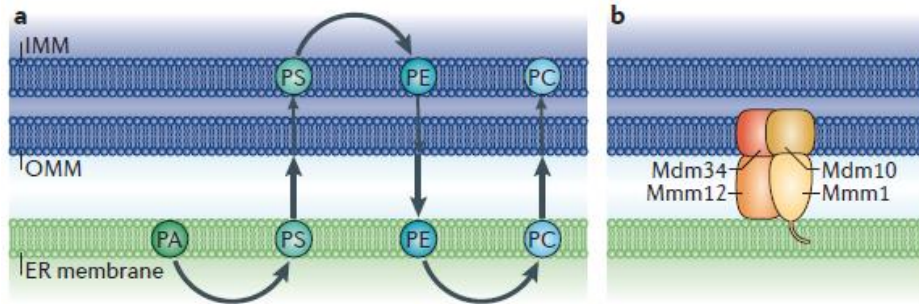
#### **1.4.2. La interacción RE-mitocondria está involucrada en la biosíntesis y transporte de lípidos**

Históricamente, la primera función que se le atribuyó a los sitios de contacto entre el RE y la mitocondria fue la síntesis de fosfolípidos, debido a que las enzimas involucradas en este

proceso se encuentran localizadas tanto en la membrana del RE, como en la membrana de la mitocondria, siendo las MAMs la fracción del RE que se encuentran enriquecidas con estas enzimas (**Vance, 1990**).

La importancia de ambas membranas se ve reflejada en su papel en la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC), uno de los fosfolípidos más abundantes en las células (**Figura 1.8**). Durante este proceso se inicia con un precursor; el ácido fosfatídico, el cual mediante la acción de la fosfatidilserina sintasa 1 ó 2 (que se encuentra en la membrana del RE) da origen a la fosfatidilserina (PS), la conversión de éste a fosfatidiletanolamina (PE) depende de proteínas residentes en la mitocondria, por lo tanto se transporta la PS del RE a la MIM para este proceso, mientras que la conversión de PE a PC requiere de enzimas localizadas en la membrana del RE (**van Meer et al., 2008**). Esta serie de reacciones además de mantener la correcta biosíntesis de lípidos, es también importante para el intercambio de estos y con ello mantener la composición lípidica final de ambas membranas (**Rowland & Voeltz, 2012**).

A pesar de que este proceso se lleva a cabo en los sitios de contacto RE-mitocondria, pareciese que no existe un complejo proteico que se forme entre ellos. Esto es diferente en las levaduras, donde la participación de proteínas tanto de la mitocondria como del RE son capaces de formar puentes los cuales median la biosíntesis de lípidos (**Kornmann et al., 2009**). Este complejo, llamado ERMES (*ER-Mitochondria Encounter Structure*) incluye cuatro componentes; Mmm1 (una proteína integral del RE), Mdm 10 y Mdm 34, ambas proteínas de la MEM y Mdm 12, una proteína citosólica (**Figura 1.8**). Además de su papel en el tráfico de lípidos, ERMES parece también estar involucrado en la transferencia de  $Ca^{2+}$  del RE a la mitocondria, esto debido a que se ha identificado una GTPasa integral de la MEM que además posee dominios de unión a  $Ca^{2+}$  (**Kornmann et al., 2011**). Por lo tanto, esto sugiere un papel multifuncional de los complejos creados en la proximidad RE-mitocondria.



**Figura 1.8. Los sitios de contacto RE-mitocondria median la biosíntesis de fosfolípidos.** a) La síntesis de fosfatidilcolina involucra una serie de pasos que necesita de la presencia de enzimas presentes tanto en la membrana del RE como en las membranas de la mitocondria. b) El complejo ERMES, exclusivo de la mitocondria, consta de un grupo de proteínas encargadas de formar un puente entre el RE y la mitocondria el cual es el encargado de la síntesis de lípidos y de la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tomado de Rowland & Voeltz, 2012.

### 1.4.3. Transferencia de $\text{Ca}^{2+}$ del RE hacia la mitocondria

El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la mitocondria fue observado específicamente en los sitios de contacto entre estos dos organelos, siendo aquellas zonas del RE que están enriquecidas con el  $\text{RIP}_3$  o el  $\text{RyR}$ , las que estimulan la captura de  $\text{mCa}^{2+}$ . Este proceso ocurre una vez que se libera  $\text{Ca}^{2+}$  del RE vía el  $\text{RIP}_3$  (Rizzuto et al., 1998), el cual mantiene una interacción con  $\text{VDAC}$ , permitiendo de esta forma que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado difunda al espacio intermembranal (EIM) y su posterior captura a la MM por  $\text{MCU}$  (*Mitochondrial Calcium Uniporter*), presente en la MIM (De Stefani et al., 2011). A pesar de que la captura de  $\text{mCa}^{2+}$  es muy rápida,  $\text{MCU}$  posee una baja afinidad ( $K_d$  20-50  $\mu\text{M}$ ), por lo tanto, se ha sugerido la necesidad de microdominios de alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que permitirían la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma eficiente en la MM. Además de esto, la funcionalidad de estos microdominios depende de la cercana localización de la mitocondria con los canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (Giacomello et al., 2010), por lo tanto, este mecanismo, al igual que los descritos anteriormente, dependen de la gran proximidad que existen entre ambos organelos, pues si se altera el espacio existente entre estos, la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se anula (Csordás et al., 2010).

Por otra parte, se han demostrado que  $\text{GRP75}$  (una chaperona que se induce en condiciones de baja glucosa o en estrés nutricional) sirve como acoplador entre  $\text{VDAC}$  y el

RIP<sub>3</sub>, estabilizando la interacción entre estas dos proteínas, observando con ello que se mejora la acumulación de  $mCa^{2+}$  (Szabadkai et al., 2006).

La importancia de la acumulación de  $Ca^{2+}$  en la MM estriba en la idea de que el  $Ca^{2+}$  regula, de diferentes maneras, la actividad mitocondrial. Paradójicamente, esto incluye tanto la supervivencia como la muerte celular, dos aspectos que son totalmente opuestos en su resultado final (Giacomello et al., 2007). En el primer caso, el  $Ca^{2+}$  estimula la actividad de varias deshidrogenasas del CK (Jouaville et al., 1999) y regula además la función de varios acarreadores presentes en la MIM (Del Arco et al., 2016), todo esto resulta en un aumento en la producción de ATP. Por el otro lado, las señales debidas al  $mCa^{2+}$  también pueden inducir la muerte celular, particularmente cuando ocurren oscilaciones en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  y, en conjunto con otros estímulos pre-apoptóticos, pueden generar la apertura del poro de transición, lo que conduce a la liberación de citocromo c, propagando así la completa cascada apoptótica (Rizzuto et al., 2012).



## 2. ANTECEDENTES

La importancia de la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria se debe a su aparente papel en la regulación del metabolismo bioenergético, pues se tiene evidencia de que este catión es capaz de regular de manera positiva la respiración mitocondrial, lo cual conduce a un incremento en la producción de ATP (**Jouaville et al., 1999**).

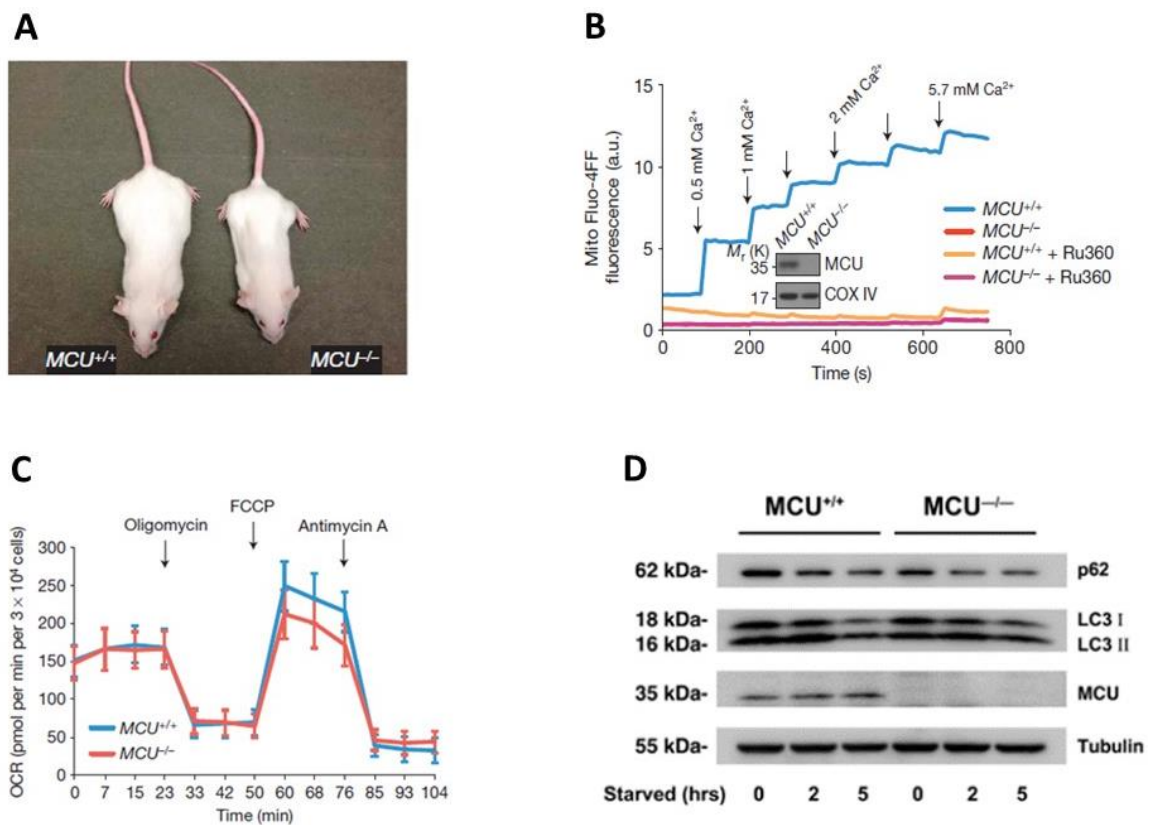
Cárdenas y cols. utilizando células DT40-3KO (células de linfoma de ave que son capaces de sobrevivir sin expresar ninguna de las 3 isoformas del  $\text{RIP}_3$ ) demostraron que el consumo de  $\text{O}_2$  fue significativamente menor (**Figura 2.1A**), similar a cuando se utilizó un inhibidor de este canal (Xestospongina B) y que esto fue revertido al utilizar un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (datos no mostrados). Por otra parte, para evaluar la contraparte mitocondrial, se utilizó RU360, un inhibidor del MCU, y se observó, de igual manera, que el consumo de  $\text{O}_2$  fue reducido al bloquear la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la mitocondria (**Figura 2.1B**). Estos datos sugieren que al eliminar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RE o bien, al bloquear la captura hacia la mitocondria, el metabolismo energético se ve reducido y que, si alguno de estos componentes está ausente, las células disparan la autofagia (**Figura 2.1C**) como medida compensatoria ante la limitada producción de ATP (**Cárdenas et al., 2016**).

Por otra parte, al evaluar la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH), una de las enzimas del CK que es regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  (específicamente por una fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) se observó que la inactivación de esta enzima, vista como un incremento en la fosforilación (**Figura 2.2A**) condujo de igual forma a una disminución en el consumo de  $\text{O}_2$  (**Figura 2.2B**) y que el estado fosforilado (**Figura 2.2C**) así como los niveles de autofagia (**Figura 2.2D**) disminuyeron cuando se utilizó un inhibidor de la cinasa que fosforila a la PDH (**Cárdenas et al., 2010**).

Estos datos concuerdan con los reportados en otro trabajo por el mismo grupo, donde observaron que las células tumorales en específico, fueron más vulnerables a la inhibición de la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a la mitocondria, pues cuando esto ocurre, estas células son incapaces de sobrevivir incluso cuando la autofagia está presente, esto debido a su acelerado crecimiento y por lo tanto una mayor demanda de ATP (**Cárdenas et al., 2016**).

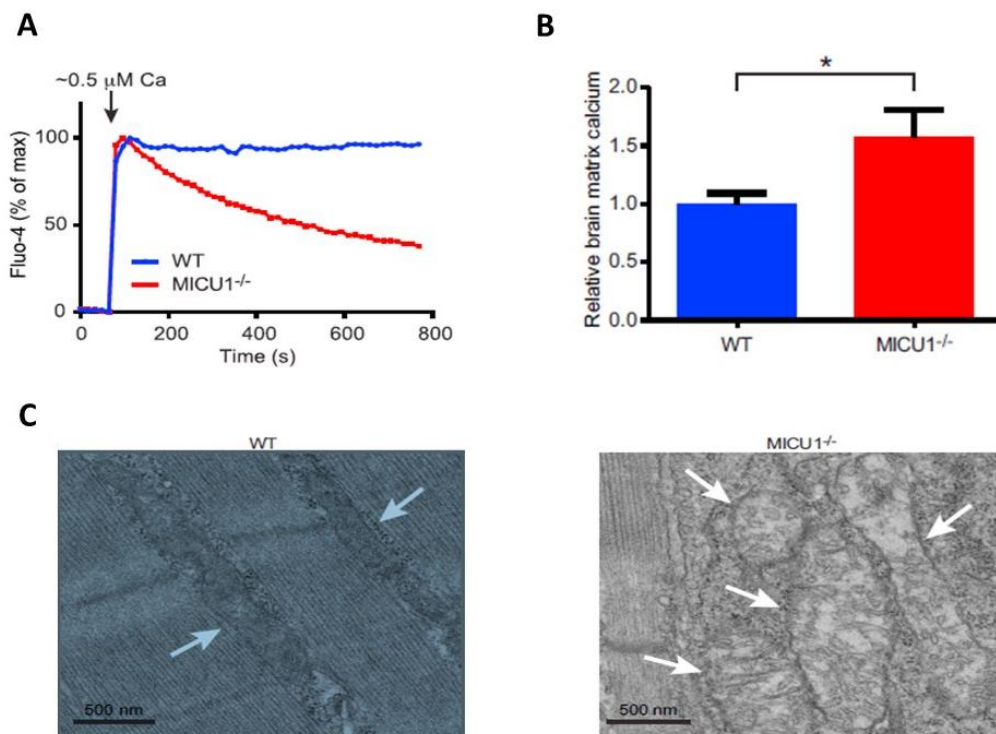


Estos datos en conjunto refuerzan la idea de que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la MM activa la respiración y que cuando no hay entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , la célula sufre alteraciones en la función mitocondrial. Sin embargo, un estudio reciente (Pan et al., 2013) utilizando un ratón KO del MCU, se encontró, de forma inesperada, que los animales fueron viables (Figura 2.3A), a pesar de que sus mitocondrias fueron incapaces de capturar  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 2.3B) y sin embargo se encontró que la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  no se vio alterada (Figura 2.3C), manteniendo de esta forma los niveles de autofagia disminuidos (Figura 2.3D). Estos datos sugieren que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la MM no pareciera ser un proceso esencial para el desarrollo de un organismo.



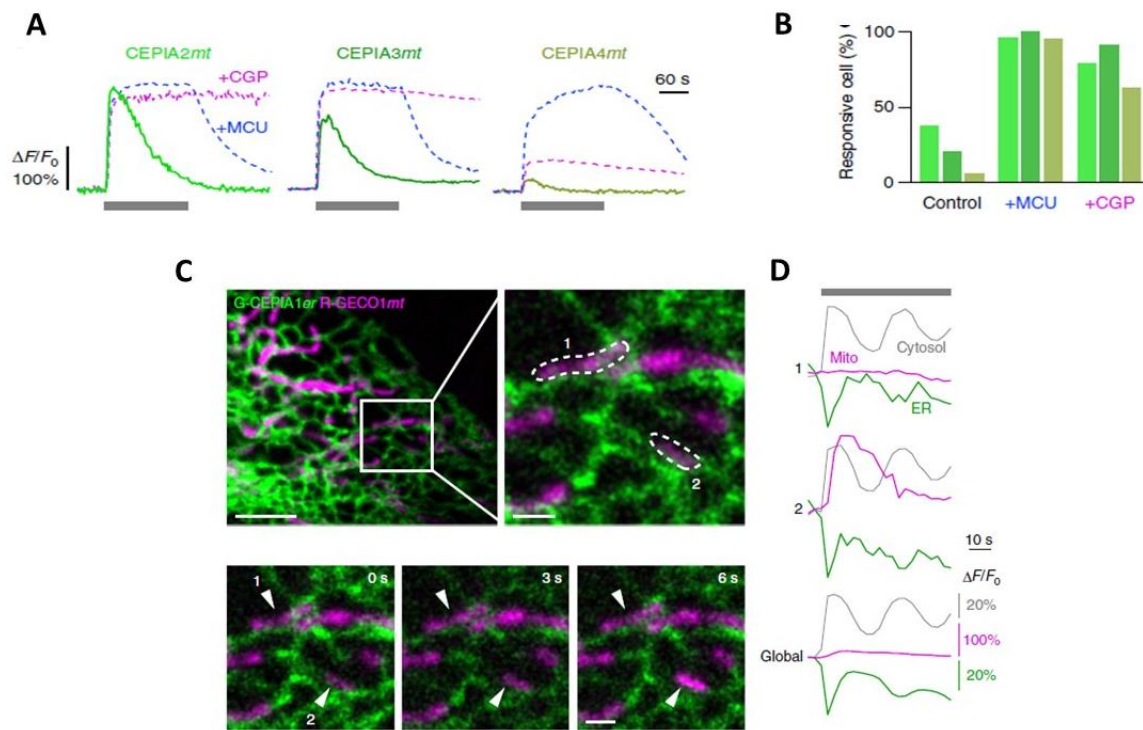
**Figura 2.3. Ratones carentes de la expresión de MCU no mostraron alteración en el metabolismo bioenergético.** **A)** El ratón KO a MCU ( $\text{MCU}^{-/-}$ ) solo mostró tener un tamaño menor con respecto al ratón WT ( $\text{MCU}^{+/+}$ ). **B)** Ensayos de captura de  $\text{mCa}^{2+}$  adicionando concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias silvestres (WT) y KO aisladas de músculo esquelético. La captura de  $\text{Ca}^{2+}$  fue inhibida en mitocondrias silvestres (WT) al utilizar Ru360, un inhibidor del MCU. **C)** La velocidad en el consumo de  $\text{O}_2$  fue evaluada en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) WT y KO bajo condiciones basales o seguida de la adición de oligomicina, FCCP y de antimicina A. **D)** Los niveles de autofagia fueron evaluados tomando como referencia la proteína p62 y la relación LC3-I/LC3-II en MEFs WT y KO.

Desde que se describió por primera vez al MCU (De Stefani et al., 2011), y una vez que éste fue clonado, se demostró que el ingreso de  $mCa^{2+}$  involucra un complejo multiproteico (Mammucari et al., 2016). Un estudio reciente (Liu et al., 2016) demostró que MICU1 (*Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake 1*), una de las proteínas de este complejo, inhibió la captura de  $mCa^{2+}$  a bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$  citoplásmico (Figura 2.4A), de tal forma que la ausencia de esta proteína produjo la sobrecarga con  $Ca^{2+}$  en la MM (Figura 2.4B), lo cual resultó en fallas en el desarrollo muscular (Figura 2.4C) debido a una producción en exceso de ROS. Por lo tanto, estos datos sugieren que el  $Ca^{2+}$ , que ingresa a la MM, tiene un papel deletéreo en la viabilidad mitocondrial.



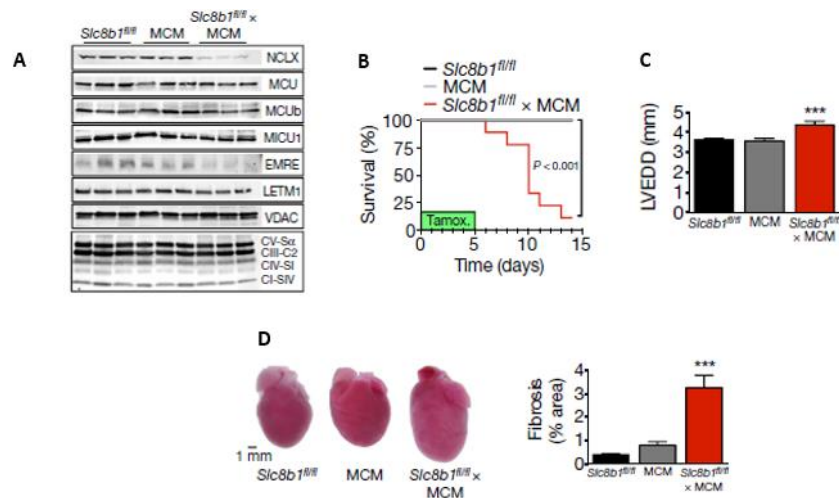
**Figura 2.4. MICU1 ejerce un efecto protector al inhibir la captura de  $mCa^{2+}$ .** **A)** Captura de  $mCa^{2+}$  representado como una disminución en la fluorescencia del Fluo-4, un indicador de  $Ca^{2+}$  citoplásmico. Se utilizaron mitocondrias de hígado WT y KO (MICU1<sup>-/-</sup>). **B)** Niveles relativos de  $Ca^{2+}$  capturado en la MM. Se observa que la ausencia de MICU1 provocó una sobrecarga de  $Ca^{2+}$ . **C)** Micrografía electrónica de músculo esquelético que muestra mitocondrias (flechas) WT y KO. La morfología es claramente alterada cuando no se inhibe la captura de  $Ca^{2+}$  por MICU1.

Por otra parte, Suzuki y cols. utilizando indicadores proteicos de  $\text{Ca}^{2+}$  dirigidos a mitocondrias y en respuesta a histamina, midieron la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  en células HeLa (**Figura 2.5A**), observando que una fracción pequeña de células fueron capaces de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  una vez que éste fue liberado del RE y que esta fracción aumentó solo cuando se sobreexpresó el MCU o bien, cuando se inhibió el NCLX ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger) (**Figura 2.5B**). Así mismo, se observó que solamente una subpoblación de mitocondrias respondió a esta señal, pues a pesar de que todas estuvieron en cercanía al RE (**Figura 2.5C**), la respuesta global no mostró un aumento de  $\text{mCa}^{2+}$ , siendo retardada en aquella fracción de mitocondrias que si pudieron capturar  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 2.5D**) (Suzuki et al., 2014).



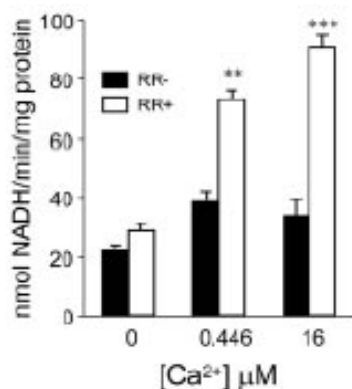
**Figura 2.5. La captura de  $\text{mCa}^{2+}$  en respuesta a histamina es heterogénea en células HeLa.** **A)** Respuestas de  $\text{mCa}^{2+}$  utilizando tres indicadores diferentes e Histamina como agonista. Para aumentar la respuesta se sobreexpresó el MCU (+MCU, trazo azul) y se inhibió el NCLX (+CGP, trazo magenta). **B)** Porcentaje de células con respuesta a histamina. Se comparó células control con células +MCU y +GCP. **C)** Células HeLa expresando indicadores de RE (G-CEPIA1er) y mitocondria (R-GECO1mt). Las zonas punteadas indican dos mitocondrias. **D)** Curso temporal de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en citoplasma, RE y mitocondria en células HeLa al estimular con Histamina. 1 y 2 muestran las mitocondrias evaluadas y mostradas en C.

Estos datos sugieren que el principal mecanismo utilizado por la mitocondria para amortiguar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la MM es la remoción rápida por el NCLX. Esta idea se vio reforzada por los datos de otro trabajo donde se mostró la importancia de remover el  $\text{Ca}^{2+}$  de la MM (Luongo et al., 2017). En este trabajo, ratones *Slc8b1<sup>fl/fl</sup>* (a los cuales les condicionaron la pérdida de la función del NCLX) fueron cruzados con ratones MCM, (un modelo transgénico inducible por tamoxifen que permite la supresión de ciertas proteínas de cardiomiocitos en corazón adulto) observando que la administración de tamoxifen condujo a un 70% de la pérdida del NCLX y que interesantemente ninguna de las proteínas accesorias del MCU sufrió disminución en la expresión, a excepción de EMRE (*Essential MCU Regulator*) (Figura 2.6A), la cual es una proteína relacionada con la actividad de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de MCU, y por lo tanto, importante para la captura de este catión, sugiriendo con ello que debido a la falta de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  de la MM, las células disminuyen la expresión de EMRE como un posible mecanismo compensatorio que inhiba la captura de  $\text{mCa}^{2+}$ . Por otra parte, al evaluar los efectos de la supresión del NCLX observaron que un porcentaje por arriba del 80% de estos ratones murieron después de dos semanas de la administración del tamoxifen (Figura 2.6B), esto como causa de insuficiencia cardiaca (Figura 2.6C) y a alteraciones en el corazón (Figura 2.6D). Por lo tanto, estos datos sugieren que la extrusión mediada por el NCLX es importante para mantener la correcta homeostasis de  $\text{mCa}^{2+}$  y así evitar la sobrecarga en la MM.



**Figura 2.6. La supresión del NCLX condujo a insuficiencia cardiaca y muerte en ratones adultos.** A) Western blots de NCLX y otras proteínas asociadas al intercambio de  $mCa^{2+}$ . B) Curvas de supervivencia después de la exposición al tamoxifen. C) Ecocardiografía de estructura y función ventricular izquierda después del tratamiento con tamoxifen. D) Alteraciones sufridas por el tratamiento con tamoxifen, incrementó el tamaño del corazón y se observa la presencia de fibrosis.

Estos datos, en conjunto, sugieren un papel deletéreo del  $Ca^{2+}$  en la MM y por lo tanto proponemos la idea de que si bien, la producción de ATP es activada por  $Ca^{2+}$ , ésta parecería estar ocurriendo en el EIM y no necesariamente por el ingreso de este catión a la MM. Esta idea se apoya en los datos derivados del estudio de los acarreadores presentes en la MIM y que son activados por  $Ca^{2+}$  y que a su vez forman parte de la lanzadera malato-aspartato. Se observó que la actividad de esta lanzadera se incrementó significativamente sólo cuando estuvo presente un inhibidor del MCU (**Figura 2.6**), es decir, cuando el  $Ca^{2+}$  no ingresó a la MM (**Pardo et al., 2006**).



**Figura 2.6. El bloqueo de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria aumentó la actividad de la lanzadera malato-aspartato.** Utilizando mitocondrias del cerebro de ratón se evaluó la actividad de la lanzadera malato-aspartato a concentraciones crecientes de  $Ca^{2+}$  en ausencia (barras negras) o presencia (barras blancas) de un inhibidor del MCU, el rojo de rutenio (RR). La actividad fue medida como la concentración de NADH producido.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El retículo endoplásmico es un organelo multifuncional de gran importancia para la fisiología celular y, que a su vez, está en constante comunicación con otros organelos como la mitocondria. A pesar de que existen evidencias de que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente del RE estimula la respiración mitocondrial, estudios recientes han demostrado que el  $\text{Ca}^{2+}$  de la MM tiene una acción deletérea en la viabilidad mitocondrial. Ya que estas dos situaciones son mutuamente excluyentes, consideramos necesario estudiar la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la asociación mitocondria – RE.

### **4. HIPÓTESIS**

La asociación mitocondria – RE está regulada de manera negativa por  $\text{Ca}^{2+}$ .



## **5. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la asociación de las mitocondrias con el RE y determinar el papel que desempeña el  $\text{Ca}^{2+}$  en este fenómeno.

## **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Caracterizar y estandarizar las condiciones de adquisición de imágenes por microscopía confocal así como para el proceso de deconvolución.
- II. Determinar el grado de colocación entre el RE y las mitocondrias, así como la relación existente entre el MagFluo-4 y ambas estructuras.
- III. Utilizar indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  proteicos que se dirigen exclusivamente a la luz del RE y comparar su distribución con la del MagFluo-4.
- IV. Determinar si las mitocondrias se asocian con las regiones de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  del RE al utilizar un indicador que fluoresce ante la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$ .
- V. Estudiar el efecto de la Tapsigargina (Tg) y la bafilomicina en la asociación de las mitocondrias con el RE.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Caracterización del proceso de adquisición de imágenes por microscopía confocal

#### *Perfiles de intensidad*

Debido a que la herramienta principal de este proyecto fue el microscopio confocal, decidimos determinar aquellas condiciones que serían las óptimas para la adquisición de imágenes. Como un primer enfoque decidimos evaluar si la contaminación de señales afectaba a los canales de manera individual. Para ello, mediante el uso del kit TetraSpeck Fluorescent Microspheres Size (Molecular Probes) adquirimos imágenes de perlas fluorescentes individuales tanto para la señal roja como para la señal verde, utilizando las modalidades de 1 y 2 tracks, es decir, a diferentes escalas de tiempo puesto que al tener dos canales (verde y rojo) el uso de 1 track minimiza el tiempo de captura, mientras que en 2 tracks el escaneo de un canal seguido del otro hace que esto sea un proceso más lento. De esta forma, se capturaron las imágenes de las perlas fluorescentes para ambos colores en las modalidades de 1 y 2 tracks utilizando las siguientes condiciones: objetivo de 63x, 1.4 de apertura numérica (NA), el tamaño de la imagen fue de 1024 x 1024 pixel y 12-bits, una unidad de airy, una ganancia de 900 a 1000 unidades y una intensidad de laser de 0.5 %. Se utilizaron los láseres de  $\lambda$  488 nm y  $\lambda$  555 nm para la señal verde y roja, respectivamente, los cuales se mantuvieron prendidos uno a la vez, es decir, mientras estuvo encendido el láser rojo, el láser verde se apagó y viceversa, sin embargo, ambas imágenes fueron adquiridas (la perla tanto en rojo como en verde) con el fin de observar si alguno de los láseres era capaz de estimular un fluoróforo que no correspondía con su espectro de excitación, aun cuando éste se encuentra apagado. Las imágenes adquiridas fueron analizadas con el programa ImageJ, con el cual se obtuvieron los gráficos de intensidades correspondientes para cada canal.

### *Análisis de desfase*

Por otra parte, para determinar el grado y la estabilidad del desfase entre los dos canales, realizamos un curso temporal de las perlas fluorescentes, con las mismas condiciones de adquisición descritas en el apartado anterior, utilizando las opciones de 1 y 2 tracks. A diferencia de la metodología anterior, en este protocolo se realizó el escaneo de las perlas con los dos láseres prendidos. El curso temporal fue de 10 minutos en intervalos de 30 s. Las imágenes fueron analizadas en el programa ImageJ con el plugin *Stacks* y la opción *Measure stack*, los datos de centro de masa fueron procesados y se construyeron las gráficas de movimiento con respecto al tiempo. Ambos protocolos fueron hechos con la finalidad de obtener las mejores condiciones de adquisición y con ello disminuir tanto la contaminación de señales y el movimiento, que en conjunto pudieran dar datos erróneos de colocalización.

### *Deconvolución*

El proceso de deconvolución es una operación matemática que utiliza un algoritmo capaz de determinar la luz que se encuentra fuera de foco, removiéndola y regresándola a su punto de origen, generando con ello una imagen más nítida (**Sibarita, 2005**). Por otra parte, debido a que el proceso de adquisición de la imagen involucra el paso de luz a través de una serie de lentes, se genera un patrón de dispersión de luz, dando como resultado una imagen con dimensiones mayores al tamaño original del objeto. Este patrón de dispersión generado por la difracción de la luz se conoce como PSF (*Point Spread Function*) el cual puede determinarse experimentalmente (**Cole et al., 2011**).

Para ello, como una primera aproximación determinamos el PSF tanto para el láser de 488 nm como para el láser de 555 nm mediante el programa ImageJ utilizando el plugin *Diffraction PSF 3D* e ingresando los siguientes parámetros (**Tabla 6.1**) de acuerdo a las características de las imágenes obtenidas:

**Tabla 6.1. Parámetros y valores necesarios para la generación del PSF**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<b>Índice de refracción del medio</b>	1.515
<b>Apertura numérica (NA)</b>	1.4
<b>Longitud de onda</b>	488 nm o 555 nm
<b>Aberración esférica</b>	0.5
<b>Espacio entre pixel en la imagen (IPS)</b>	40
<b>Tamaño de la imagen (en pixeles)</b>	1024 x 1024
<b>Número de cortes ópticos</b>	1

El PSF generado a partir de estos valores fue utilizado para realizar la deconvolución de las imágenes. El proceso fue realizado con el plugin *Parallel Iterative Deconvolution 2D* utilizando el método MRNSD (*Modified Residual Norm Steepest Descent*) (**Wendykier, 2009**).

## **7.2. Cultivo celular: Células HeLa**

Las células HeLa son una línea celular de origen epitelial procedente de un adenocarcinoma de cérvix humano.

Para el mantenimiento de las células HeLa se utilizó medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 0.5% de antibiótico (Penicilina 10 000 U/mL/Estreptomina 10 000 µg/mL, Gibco).

Las células fueron crecidas en placas de cultivo p-60 (60x15 mm, Corning) hasta alcanzar una confluencia de 90% bajo el siguiente protocolo:

Una vez que las placas alcanzaron una confluencia de 90% se retiró el medio de cultivo y posteriormente se agregó 1 mL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) para eliminar el exceso de medio restante, después de lavar la monocapa se retiró el PBS y enseguida se adicionó 1 mL de tripsina-EDTA (Sigma) al 0.05% y se dejó incubando por 1 minuto y medio en una

incubadora Nuair a 37% y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo se retiró la tripsina de la monocapa celular y se adicionó 1 mL de DMEM y mediante pipeteo suave se despegó la monocapa y se homogenizó la suspensión celular. Después de obtener la suspensión celular se distribuyó 250 µL de ésta en placas p-60 las cuales se les adicionó previamente 4 mL de DMEM. Las placas se incubaron por 48 hr a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para determinar la cantidad de células depositada en cada placa se consideró la siguiente relación: Se ha reportado que las células HeLa necesitan de 23 horas para duplicarse y alcanzar entre un 90 y 100% de confluencia, por lo tanto, de una suspensión de 1 mL necesitamos 500 µL para que al día siguiente tengamos el doble de células. De esta manera se agregaron 250 µL a las placas de los pases realizados ya que se incubaron por 48 horas y no por 24 horas.

#### *Generación de una monocapa de células HeLa sobre cubreobjetos para microscopía confocal*

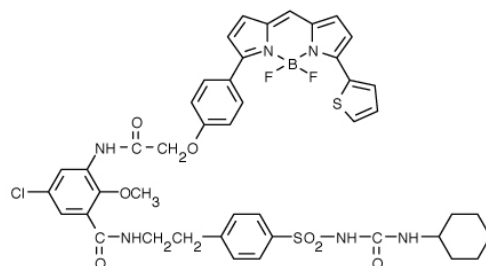
En una placa multipozos (Corning) se colocaron cubreobjetos (21x21 mm) previamente esterilizados e inmediatamente se adicionaron 2 mL de DMEM, así como 90 µL de la suspensión celular previamente obtenida mediante la metodología antes mencionada. Una vez realizado esto, se homogenizó la placa con movimientos circulares para permitir que la suspensión celular se distribuyera homogéneamente en cada pozo. La placa fue incubada durante 48 hr a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **7.3. Indicadores fluorescentes para el RE, las mitocondrias y el Ca<sup>2+</sup> luminal**

#### **7.3.1. Indicadores de RE y mitocondrias**

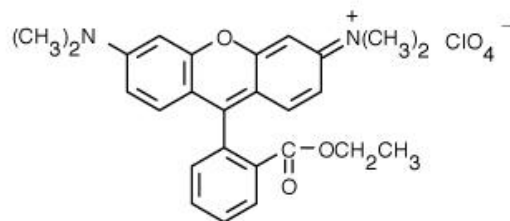
Para caracterizar la distribución de estos dos organelos, células HeLa fueron incubadas con dos indicadores orgánicos: el ER-tracker (BODIPY FL Glibenclamide, Thermo Fisher Scientific) y TMRE (Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate, Thermo Fisher Scientific) para teñir RE y mitocondrias, respectivamente. El ER-tracker estructuralmente consiste de un BODIPY verde fluorescente unido a glibenclamida (**Figura 6.1**), siendo ésta

la que se une de manera directa a los receptores de sulfonilurea (SUR, *Sulfonylurea receptors*) que forman parte del canal de  $K^+$  sensible a ATP. El SUR además de encontrarse en la membrana plasmática de células  $\beta$ -pancreáticas se ha observado que también se localiza en el RE de células cardíacas (Zhou et al., 2007) y epiteliales (Burke et al., 2008), por lo tanto, este indicador es un buen candidato para teñir el RE en células HeLa.



**Figura 6.1. Estructura química del ER-tracker.** Posee un máximo de excitación a 587 nm y un máximo de emisión a 615 nm.

Por otra parte, el TMRE es un indicador catiónico lipofílico (**Figura 6.2**) capaz de acumularse en las mitocondrias, debido a que el potencial de membrana mitocondrial es aproximadamente -180 mV. Por ello mismo, la acumulación de este indicador es una buena referencia de que las mitocondrias se encuentran activas, ya que cuando se elimina el potencial de membrana mitocondrial, se pierde la capacidad del TMRE para teñir a las mitocondrias (Scaduto & Grotyohann, 1999).



**Figura 6.2. Estructura química del TMRE.** Posee un máximo de excitación de 553 nm y un máximo de emisión de 577 nm.

De esta manera, células HeLa que formaron una monocapa en los cubreobjetos y que alcanzaron un 90% de confluencia se incubaron con ambos indicadores de la siguiente manera:

En primer lugar, 2  $\mu\text{L}$  de ER-tracker a una concentración de 1 mM se adicionaron al pozo donde se encontraba el cubreobjetos con la monocapa de células HeLa conteniendo 2 mL de DMEM. Posterior a la adición del indicador se homogenizó perfectamente la placa y se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se retiró el DMEM y se adicionó 2 mL de solución de registro con  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM en la cual se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de TMRE 50  $\mu\text{M}$ , se homogenizó la placa y se dejó incubando por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

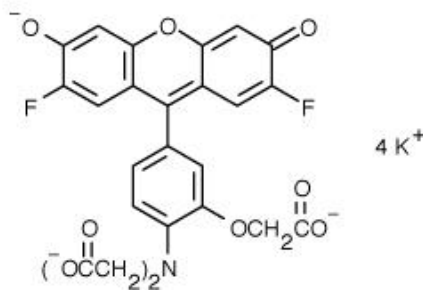
### 7.3.2. El MagFluo-4: un indicador de $\text{Ca}^{2+}$ luminal

Para reportar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal en células HeLa utilizamos el MagFluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific) ( $K_d=22 \mu\text{M}$ ), un indicador que estructuralmente cuenta con la molécula de fluoresceína asociada con tres grupos carboxilatos (**Figura 6.3**) los cuales son los encargados de coordinar al  $\text{Ca}^{2+}$  y con ello incrementar su fluorescencia (**Gee et al., 2000**). Este fluoróforo es incapaz de penetrar a la célula, debido a esto se bloquean los grupos carboxilos con acetoximetilos (AM), de esta forma se favorece su incorporación a través de la membrana celular por difusión simple. Los grupos AM son removidos en el interior de la célula por esterasas citoplásmicas quedando así sólo la molécula del MagFluo-4, una vez en el citoplasma éste se internaliza en el RE, sugiriendo la existencia de un transportador de tricarboxilatos de naturaleza desconocida.

A pesar de que existen otros indicadores orgánicos para sensar  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, algunos estudios utilizando diferentes indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal mostraron que el MagFluo-4 genera un patrón de tinción característico de RS, esto se observó utilizando miocitos cardiacos donde la mayor señal de fluorescencia se reportó entre la distancia de un sarcómero y otro, es decir, en cada díada y que bajo estimulación eléctrica y con un activador del RyR, como es la cafeína, se observó disminución de la señal del MagFluo-4 (**Warszta et al., 2014**). Estas evidencias, en conjunto con datos experimentales de nuestro laboratorio, mostraron que solamente una fracción pequeña del Mag-Fura 2, otro indicador de  $\text{Ca}^{2+}$ , fue capaz de ingresar

al RE (Gómez-Viquez et al., 2003). Por lo tanto, estas evidencias nos demuestran que el MagFluo-4 es un indicador que ingresa de forma preferencialmente al RE y por lo tanto puede ser utilizado para determinar señales de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. Un inconveniente que presenta el MagFluo-4 es la facilidad con que se oxida dentro del RE una vez que es excitado, un elemento importante a considerar puesto que la señal se reduce de forma continua.

Finalmente, puesto que se piensa que el  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE se encuentra en equilibrio con el  $\text{Ca}^{2+}$  unido a proteínas, es relevante resaltar que la señal reportada por este indicador corresponde a la del  $\text{Ca}^{2+}$  libre luminal.



**Figura 6.3. Estructura química del MagFluo-4.** La imagen muestra el MagFluo-4 en su forma ácida, es decir, después de ser escindidos los grupos AM que le permiten penetrar la membrana celular. Posee un pico máximo de excitación de 493 nm y un máximo de emisión de 516 nm.

Para determinar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, células HeLa fueron “cargadas” con este indicador en base a la siguiente estrategia:

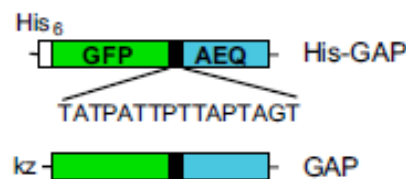
A partir de cubreobjetos con una monocapa celular con un 90% de confluencia, se adicionó 2  $\mu\text{L}$  del indicador MagFluo-4 AM al medio de cultivo a una concentración de 1 mM, el cual se dejó incubando durante dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Al término de este tiempo, se retiró el DMEM y se agregó 2 mL de solución de registro con  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM, enseguida y dependiendo del organelo a evaluar (RE o mitocondrias), se adicionó 2  $\mu\text{L}$  de ER-tracker 1 mM ó 2  $\mu\text{L}$  de TMRE 50  $\mu\text{M}$ , por separado y a diferentes pozos cargados con MagFluo-4 AM, se incubó por 30 minutos más a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se retiró la solución de registro sustituyéndose por nueva solución salina.



#### 7.4. Indicadores proteicos de Ca<sup>2+</sup>

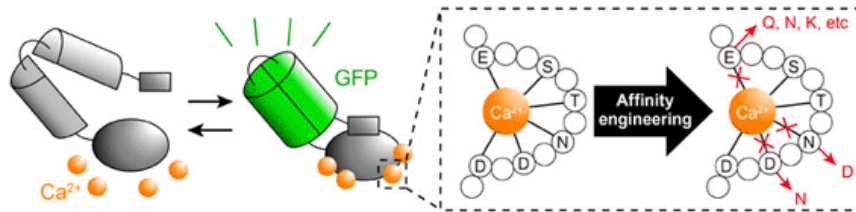
Si bien, el MagFluo-4 es utilizado ampliamente para reportar Ca<sup>2+</sup> del RE, este indicador carece de un mecanismo de retención que lo mantenga exclusivamente en este depósito, por tal motivo, éste pudiese terminar en otros compartimentos. Para determinar si esta situación tenía alguna relevancia con los resultados obtenidos con MagFluo-4, se utilizaron tres diferentes indicadores proteicos de Ca<sup>2+</sup> (erGAP3, G-CEPIA 1er y GEM-CEPIA 1er) que se dirigen y se mantiene exclusivamente en la luz del RE, esto porque contienen una secuencia de direccionamiento o péptido señal que los manda al RE y además una secuencia de retención en este organelo, como sería la secuencia KDEL.

El erGAP3 (**Figura 6.4**) es una proteína que pertenece a una nueva familia de indicadores de Ca<sup>2+</sup> llamada GAP (*GFP-aequorin protein*) que estructuralmente está conformada por dos proteínas; La aequorina y la GFP (*Green Fluorescent Protein*). La característica principal de este indicador es que la aequorina, (la proteína que une Ca<sup>2+</sup>) está desprovista de su grupo prostético, la coelenteracina, por lo tanto es incapaz de emitir bioluminiscencia, y lo más importante que se descubrió, de forma fortuita, es que al fusionar esta proteína con la GFP había un corrimiento en el espectro de excitación en función del Ca<sup>2+</sup>, por lo tanto, esto convierte a erGAP3 en un excelente indicador de Ca<sup>2+</sup> (**Navas-Navarro et al., 2016**). La aequorina de erGAP3 fue mutada de tal forma que poseé una K<sub>d</sub> de 489 µM y además es un indicador de cociente e insensible al pH, por lo que esta serie de indicadores son una buena herramienta para determinar con exactitud la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>L</sub> (**Rodriguez-Garcia et al., 2014**).



**Figura 6.4. Estructura general de un indicador de la familia GAP.** La aequorina está fusionada a la GFP por medio de un puente de 16 residuos de aminoácidos que le confiere sensibilidad por Ca<sup>2+</sup>. La secuencia de Kozak (kz) sirvió para aumentar su expresión en células de mamíferos. Tomado de Rodriguez-Garcia et al., 2014.

Por otra parte, utilizamos dos indicadores pertenecientes a la familia de los CEPIA (*Calcium-measuring organelle-Entrapped Protein Indicators*) los cuales se derivan de los indicadores conocidos como GCamP y estructuralmente constan de la proteína calmodulina (CaM) y el péptido M13 fusionados a una GFP circularmente permutada, (Suzuki et al., 2014). Cuando la CaM une  $\text{Ca}^{2+}$  se forma el complejo  $\text{CaM-Ca}^{2+}$ -M13 que a su vez induce cambios en la fluorescencia de la GFP (Figura 6.5).

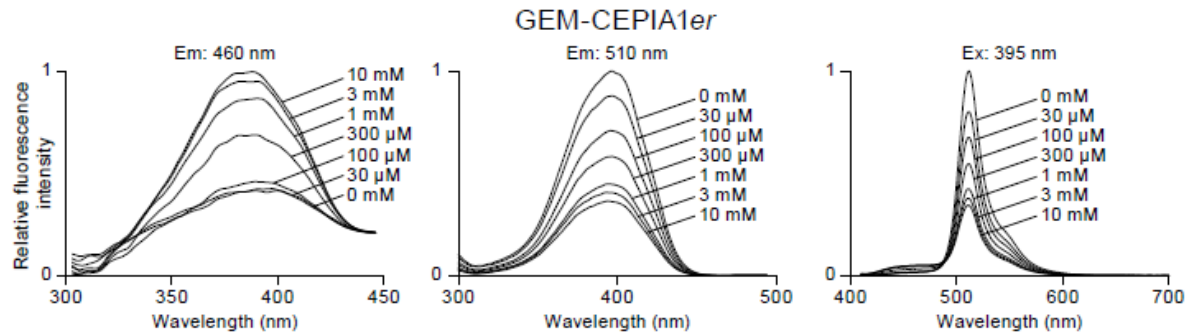


**Figura 6.5. Representación esquemática de los indicadores CEPIA.** Cambios conformacionales inducidos por la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadenan la señal para que la GFP reporte cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Diferentes estrategias, como la mutación de residuos de aminoácidos, pueden mejorar la afinidad de estos indicadores. Tomado de Suzuki et al., 2014.

Estructuralmente, tanto el G-CEPIA 1er ( $K_d = 672 \pm 23 \mu\text{M}$ ) como el GEM-CEPIA 1er ( $K_d = 558 \pm 14 \mu\text{M}$ ) poseen un péptido señal (calreticulina, que los direcciona al RE) y una secuencia de retención (SEKDEL) que los mantiene exclusivamente en el RE (Figura 6.6). Sin embargo, GEM-CEPIA 1er posee una característica importante; presenta un comportamiento dual dependiendo del ambiente en el que se encuentre, así cuando ocurre una reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_L$  su fluorescencia aumenta, por otro lado, a altas  $[\text{Ca}^{2+}]_L$  la fluorescencia disminuye (Figura 6.7).



**Figura 6.6. Secuencias de los mapas de G-CEPIA 1er y GEM-CEPIA 1er.** Ambos poseen un péptido señal ubicado en la región amino terminal, mientras que en el extremo carboxilo terminal se encuentra la secuencia de retención. Tomado de [www.addgene.com.org](http://www.addgene.com.org).



**Figura 6.7. Espectros de excitación y emisión del GEM-CEPIA 1er.** Presenta un pico máximo de excitación de 395 nm (panel de la derecha) y dos picos de emisión; uno de 460 nm, en el cual a altas  $[Ca^{2+}]_L$  la fluorescencia aumenta (panel de la izquierda), por otro lado, la fluorescencia aumenta cuando ocurre una disminución en las  $[Ca^{2+}]_L$  cuando la emisión es de 510 nm (panel central). Tomado de Suzuki et al. 2014.

#### 7.4.1. Transfección transitoria de los indicadores proteicos de $Ca^{2+}$

Para la expresión de estos indicadores en células HeLa se dividió la estrategia de trabajo en dos etapas:

##### a) Preparación de los reactivos

300 μL de Opti-MEM (Gibco) se dividió en dos tubos, a uno de ellos se le adicionó 2 μg de plásmido (erGAP3 ó G-CEPIA 1er ó GEM-CEPIA 1er) mientras que al tubo restante se le agregó 4 μL de lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific). El tubo conteniendo el DNA plasmídico se resuspendió suavemente con la pipeta, mientras que el tubo con lipofectamina fue mezclado con vortex suave durante 5 s. Una vez realizado esto, la mezcla del DNA plasmídico fue combinado con la mezcla de lipofectamina, generando así una sola mezcla de reacción la cual fue incubada por 5 min a temperatura ambiente.

### *b) Transfección*

Aproximadamente  $2 \times 10^6$  células HeLa recién tripsinizadas fueron adicionadas en una placa p-60 (Corning) conteniendo 4 mL de DMEM y dos cubreobjetos (21x21 mm). Las células fueron homogenizadas perfectamente para asegurar que se distribuyeran por toda la placa y enseguida de esto y una vez finalizado el tiempo de incubación del complejo formado con el DNA plasmídico y la lipofectamina; esta mezcla se adicionó a la placa. Se realizaron movimientos circulares suaves para homogenizar la mezcla de reacción y las células. Las células fueron incubadas por 48 hr a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Pasadas las 48 hr se retiraron los cubreobjetos de la placa y las monocapas celulares formadas fueron cargadas con ER-tracker o TMRE utilizando el protocolo de cargado de estos indicadores, antes descrito.

## **7.5. Incubación de células HeLa con tapsigarina y bafilomicina**

Para determinar el efecto de la Tg y la bafilomicina en el grado de colocalización entre el RE y las mitocondrias, células HeLa que crecieron en cubreobjetos y que fueron cargadas con ER-tracker y TMRE como se describió en el apartado 6.3.1. se incubaron con estos fármacos. La Tg fue incubada en solución de registro con Ca<sup>2+</sup> 1.8 mM a una concentración final de 1 µM durante 10 minutos. En el caso de la bafilomicina, ésta fue incubada durante 15 minutos a una concentración final de 100 nM en solución de registro con Ca<sup>2+</sup> 1.8 mM.

## **7.6. Adquisición de imágenes por microscopía confocal**

Pasado el tiempo de cargado de los indicadores, así como el tiempo de incubación para cada uno de los experimentos antes descritos, se retiraron los cubreobjetos de la solución de registro y se colocaron sobre una plataforma modelo P-2 (Warner Instrument). Posteriormente, esta plataforma se colocó sobre una cámara de registro RC-21B (Warner Instrument) y se adicionó a ésta 200 µL de solución de registro con Ca<sup>2+</sup>, a su vez, la plataforma con la cámara se colocó sobre la platina de un microscopio invertido confocal Zeiss LSM 700. La adquisición de imágenes se realizó utilizando el modo de 2 tracks con el objetivo de 63x y 1.4 de apertura numérica (NA), el tamaño de la imagen fue de 1024 x 1024

pixel y 12-bits, un tamaño de pixel de 44 nm, una unidad de airy, una ganancia de 900 a 1000 unidades y una intensidad de laser de 0.2 a 1.0 %. Se utilizaron los láseres de  $\lambda$  488 nm y  $\lambda$  555 nm para la señal verde y roja, respectivamente.

### 7.7. Análisis de colocalización

Una vez obtenidas las imágenes con el microscopio confocal se procedió a realizar el análisis de colocalización. La colocalización entre dos estructuras celulares nos indica el grado en el que una estructura coincide espacialmente con otra, es decir, si estas están en el mismo pixel o muy cercanos entre sí. Existen dos formas básicas para evaluar los eventos de colocalización en procesos celulares, una de ellas es la aproximación estadística basada en coeficientes de correlación de intensidades y mediante el cual están basados los coeficientes de Manders (CM) (Bolte & Cordelieres, 2006).

$$M_1 = \frac{\sum_i R_{i,colocal}}{\sum_i R_i} \qquad M_2 = \frac{\sum_i G_{i,colocal}}{\sum_i G_i}$$

Donde  $R_1 \text{ colocal} = R_1$  si  $G_1 > 0$  y  $R_1 \text{ colocal} = 0$  si  $G_1 = 0$  y

Donde  $G_1 \text{ colocal} = G_1$  si  $R_1 > 0$  y  $G_1 \text{ colocal} = 0$  si  $R_1 = 0$

**Figura 6.8. Representación matemática de los coeficientes de Manders.** Tomado de Dunn et al., 2011.

$M_1$  está definido como la proporción de los pixeles verdes que coinciden con los pixeles rojos que son positivos según un umbral que determina cuales pixeles rojos son positivos y  $M_2$  está definido para aquellos pixeles rojos que se encuentran donde hay pixeles verdes que han rebasado el umbral. (Dunn et al., 2011). En resumen, los CM nos indica una fracción de pixeles positivos para un color con respecto a aquellos pixeles positivos para el otro color (Figura 6.8). De esta manera,  $M_1$  ó  $M_2$  son buenos indicadores de la proporción de la señal verde que coincide con una señal en el canal rojo, independientemente de las intensidades de las señales.

El análisis que se realizó incluyó el campo completo, el cual contenía de una a dos células, esto se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ y el plug-in JACoP (Just Another Colocalisation Plug-in) el cual nos arrojó directamente los CM; estos coeficientes de superposición pueden variar de 0 a 1, donde 0 corresponde a las imágenes donde ocurre exclusión de un pixel respecto del otro y 1 refleja el 100% de colocalización, es decir, la superposición completa de un color con respecto al otro. Es importante indicar que en este caso M1 y M2 no necesariamente tienen el mismo valor.

#### *Evaluación de significancia de los valores de colocalización*

Para evaluar si los datos obtenidos del análisis de colocalización fueron significativos, a partir de las imágenes obtenidas de los experimentos antes mencionados, se generaron imágenes desordenadas aleatoriamente con el fin de determinar los valores de Manders para una colocalización aleatoria de los pixeles. Para ello se utilizó el plugin JACoP y mediante la opción de *Costes randomization* se crearon bloques de 5 y 10 pixeles (para la  $\lambda$  de 488 nm) para los ejes laterales (X, Y) y axial (Z), respectivamente y que habían sido agrupados de manera aleatoria. En el caso de las imágenes que fueron capturadas utilizando el láser rojo, los bloques abarcaron 6 (para X, Y) y 12 (para Z) pixeles. El tamaño de estos bloques se calculó con base al tamaño del pixel de las imágenes (44 nm) y del límite de resolución para las coordenadas X, Y y Z en ambas longitudes de onda (Sánchez-Vázquez, 2015, Tabla 6.2)

**Tabla 6.2. Valores de resolución para los ejes X, Y y Z para las longitudes de onda de 488 y 555 nm**

Longitud de onda	Resolución (nm)		
	X	Y	Z
488 nm	226 ± 16	200 ± 21	438 ± 73
555 nm	256 ± 21	233 ± 24	514 ± 86

A partir de estas imágenes se calcularon los CM y se tomaron estos, como los valores de colocación aleatoria de los datos obtenidos anteriormente.

### **7.8. Ensayo funcional de los indicadores de $\text{Ca}^{2+}$**

Para determinar que la fluorescencia reportada por los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tanto por MagFluo-4 como por los indicadores proteicos) correspondiera a la señal dada por la unión de estos con  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, utilizamos tanto Tg como histamina, esto con la finalidad de reducir la  $[\text{Ca}^{2+}]_L$  y con ello reducir la fluorescencia de los indicadores.

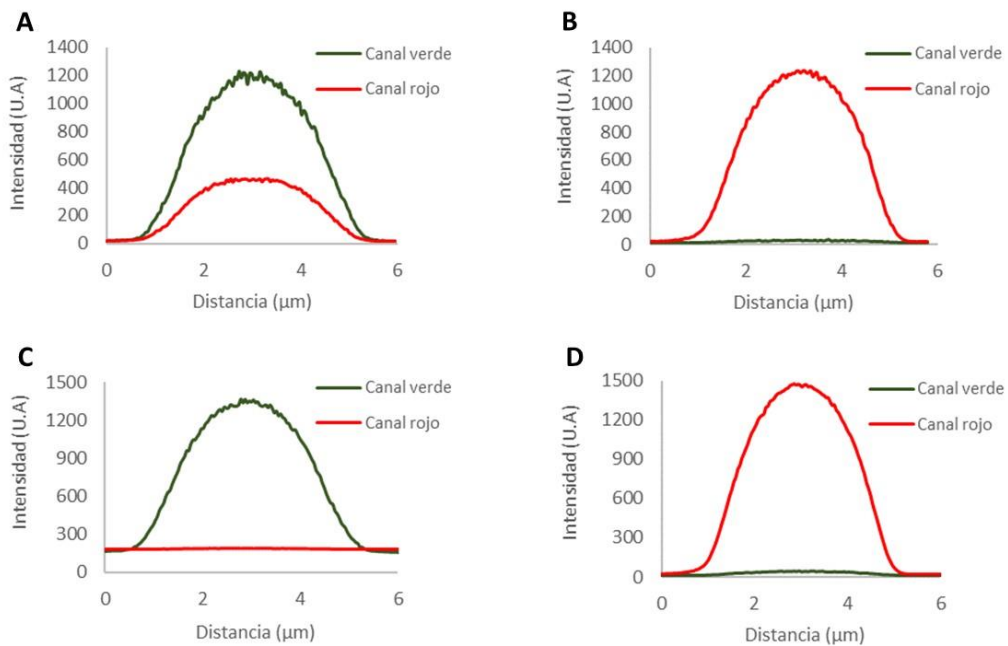
Para ello, se realizaron cursos temporales a células HeLa previamente cargadas con MagFluo-4 o transfectadas con los indicadores proteicos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los cubreobjetos que recibieron los tratamientos antes mencionados, se colocaron sobre una plataforma modelo P-2 (Warner Instrument) y enseguida sobre una cámara de registro RC-21B (Warner Instrument). Sobre la monocapa celular se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de solución de registro con  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM, posterior a esto se colocó la cámara de registro sobre la platina de un microscopio invertido confocal Zeiss LSM 700. Realizado lo anterior, se obtuvo una primera imagen la cual fue considerada como tiempo 0 y a partir de la cual se tomaron imágenes a intervalos de 3 minutos para observar el cambio en la intensidad de fluorescencia. Después de 12 minutos de registro (para los protocolos con MagFluo-4, erGAP3 y G-CEPIA 1er), se retiró la solución salina y se adicionó inmediatamente 200  $\mu\text{L}$  de Tg a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  en solución de registro con  $\text{Ca}^{2+}$  siguiendo el curso temporal con intervalos de 3 minutos hasta llegar a un tiempo final aproximado de 30 minutos. Para las células que expresaron GEM-CEPIA 1er se siguió el mismo protocolo solo que en ellas se utilizó histamina a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  en solución de registro con EGTA 0.1 mM la cual fue adicionada en el minuto 9.

El análisis de datos constó de la medición en el cambio de intensidad de los indicadores, con respecto al tiempo. Esto se llevó a cabo seleccionando las zonas de las células a evaluar (específicamente aquellas cercanas a la zona perinuclear) las cuales fueron marcadas con ROI's para su posterior cálculo de fluorescencia en cada intervalo de tiempo.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Optimización del uso de láseres en el microscopio confocal

Con el fin de determinar si la señal de un canal es capaz de contaminar la otra, realizamos la adquisición de imágenes utilizando perlas fluorescentes tanto en el modo de 1 y 2 tracks, manteniendo solo 1 láser prendido a la vez. La **Figura 8.1** muestra los gráficos de intensidades generados de estos experimentos, los cuales revelaron que al utilizar la modalidad de 1 track y al tener encendido únicamente el láser de 488 nm (**Figura 8.1A**) éste fue capaz de generar fluorescencia en el canal rojo y que esto no ocurrió cuando los canales estuvieron por separado (2 tracks) (**Figura 8.1C**), obteniendo únicamente la señal en el canal verde como era de esperarse. Por otra parte, al mantener encendido únicamente el láser de 555 nm se observó que éste no contaminó la señal del canal verde al utilizar 1 ó 2 tracks (**Figura 8.1 B y D**).



**Figura 8.1. Perfiles de intensidad a 488 nm y 555 nm.** A) Perfiles de intensidad en el canal rojo y verde cuando únicamente el láser de 488 nm estuvo prendido usando 1 track. B) Perfiles de intensidad utilizando 1 track y el láser de 555 nm. C) Perfiles de intensidad en el modo de 2 tracks utilizando el láser de 488 nm y D) Perfiles de intensidad cuando se utilizó el láser de 555 nm en 2 tracks. (n=3, para cada uno de los cuatro protocolos).



## 8.2. El proceso de adquisición de imágenes presenta un desfase en las coordenadas “X” y “Y” que está por debajo del límite de resolución

Una vez realizados los perfiles de intensidad y observando que el uso de 2 tracks minimiza la contaminación de la señal roja por la señal verde; decidimos determinar, bajo estas condiciones, si existía desfase entre ambos canales durante el proceso de adquisición. Al realizar el curso temporal observamos que, si bien existe un desfase entre ambos canales, éste se encuentra por debajo del límite de resolución del microscopio confocal (70 nm para el eje X y 30 nm para el eje Y, comparado con 200 nm en promedio para ambas coordenadas) y además este desfase se mantiene constante (la deriva tiende a cero) con respecto al tiempo (Figura 8.2).

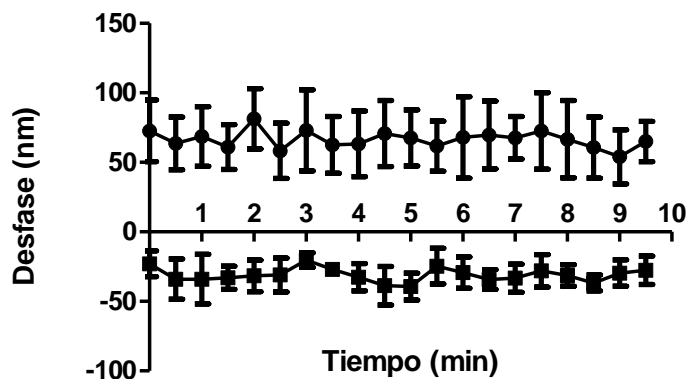
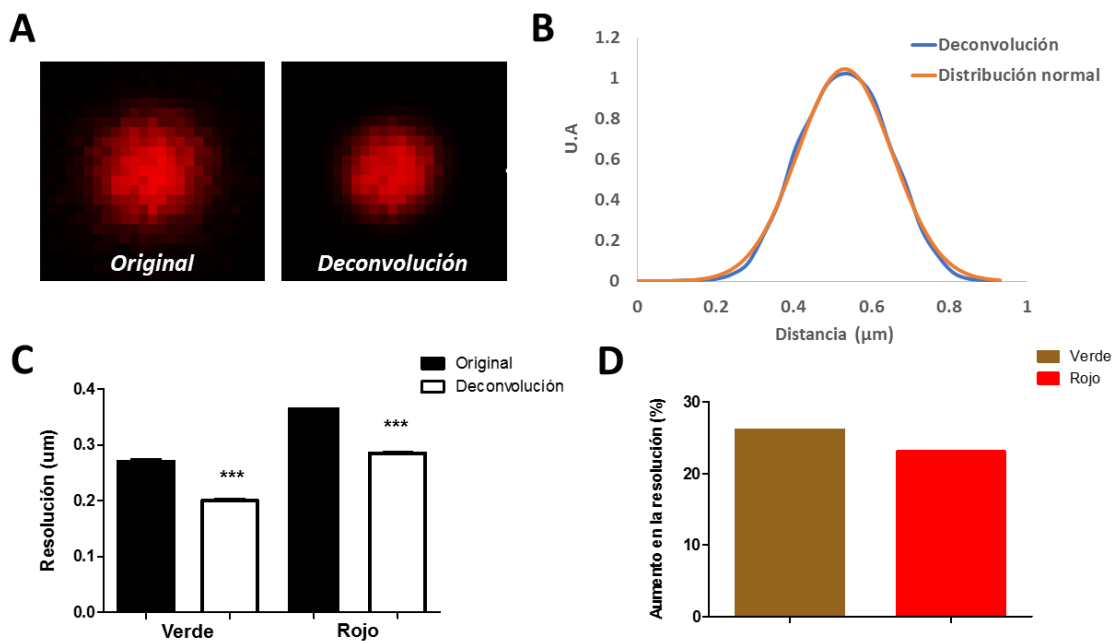


Figura 8.2. Desfase promedio entre las coordenadas X y Y con respecto al canal rojo y verde. ● representa el desfase en el eje X (X en verde – X en rojo) y ■ representa el desfase existente en el eje Y (Y en verde – Y en rojo).  $R^2 = 0.0723$  y  $0.0082$  para X y Y respectivamente, (n=3).

## 8.3. La función de deconvolución aumentó la resolución de las imágenes obtenidas por microscopía confocal

Con la finalidad de aumentar la resolución de las imágenes obtenidas y conociendo las condiciones óptimas para la adquisición de imágenes, nos dimos a la tarea de caracterizar el proceso de deconvolución. Para ello se obtuvieron las mejores condiciones para llevar a cabo este proceso mediante el uso de perlas fluorescentes, utilizando como parámetro que la estructura de estas perlas se mejoraba, generando una estructura esférica mejor definida (Figura 8.3A) sin que este proceso involucrase la deformación de la perla; esto se verificó

pues la imagen deconvolucionada se ajusta perfectamente a una distribución normal, como también lo hace la imagen original (**Figura 8.3B**). Al realizar el análisis y comparar la resolución de esta estructura antes y después de realizar la deconvolución, obtuvimos un aumento de la misma tanto para el canal rojo como para el canal verde (**Figura 8.3C**) y utilizando el espesor a la mitad del pico de amplitud, pudimos corroborar que se observó un aumento del 25% (**Figura 8.3D**). Estos datos por lo tanto nos indican que, después del proceso de deconvolución, la imagen obtenida no contó con alteraciones estructurales, y sin embargo se obtuvo un aumento significativo de la resolución.

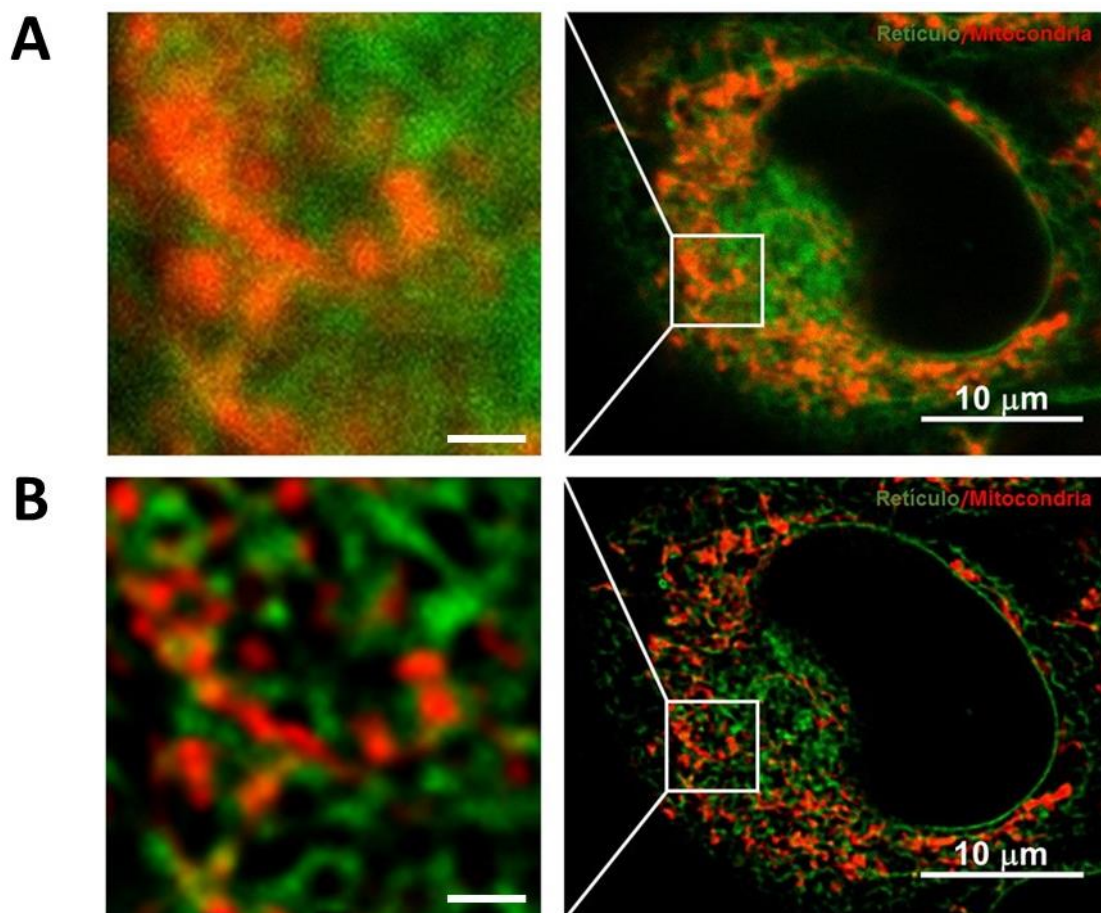


**Figura 8.3. Caracterización del proceso de deconvolución.** **A)** Comparación de una perla fluorescente antes y después de aplicarle la deconvolución. **B)** Dispersión de la perla deconvolucionada, que se muestra en A y su comparación con un ajuste de distribución normal. **C)** Resolución del canal verde y rojo antes y después de la deconvolución, (n=6, \*\*\*p<0.05) **D)** Aumento de la resolución (en porcentaje) debido a la deconvolución.

#### 8.4. La gran mayoría de las mitocondrias están asociadas al RE

Una vez que se observó que el proceso de deconvolución aumentó la resolución, se aplicó esta función a las imágenes obtenidas y se realizó la cuantificación del grado de colocalización. Para poner de manifiesto este aumento de resolución, una imagen teñida con

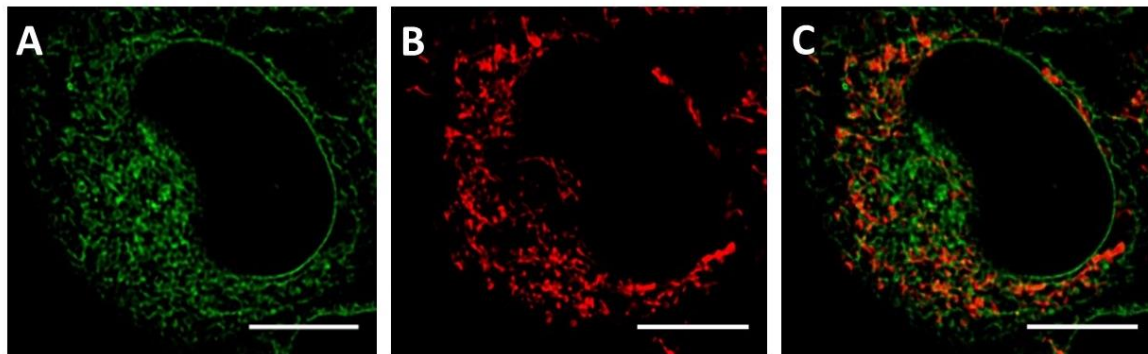
ER-tracker y TMRE fue amplificada, mostrando que aquellas estructuras que en la imagen original no eran definidas claramente (**Figura 8.4A**), en la imagen deconvolucionada se observaron mucho mejor (**Figura 8.4B**), esto como resultado de eliminar la luz fuera de foco con el algoritmo de deconvolución.



**Figura 8.4. Mejora en la resolución de las imágenes por deconvolución.** A) El acercamiento de una misma zona de la célula antes de aplicar el proceso de deconvolución, muestra que las estructuras no están bien definidas. B) Estas mismas estructuras se observan con mayor claridad después de haber llevado a cabo el proceso de deconvolución y que permite con ello, que estas estructuras puedan distinguirse de mejor manera debido al aumento en la resolución. La barra en los insertos tanto para A y B indica 1 µm.

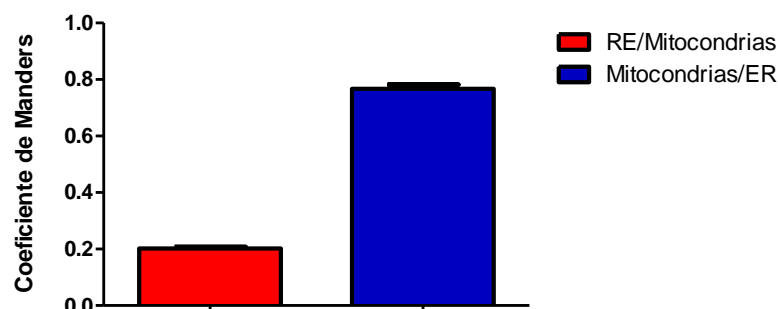
Visualizando la distribución de estos indicadores en células HeLa, observamos que el RE se distribuye por toda la célula, a excepción del núcleo y que la morfología de éste es una red tubular, que ha sido ampliamente descrita; por otra parte, la señal que corresponde a las

mitocondrias involucra un número menor de píxeles y éstos colocalizaron ampliamente con los píxeles verdes, los cuales corresponden con al RE (**Figura 8.5**).



**Figura 8.5. Distribución del RE y las mitocondrias en células HeLa.** A) El RE se extiende a lo largo del citoplasma generando una red tubular y de sacos. B) Distribución de las mitocondrias en células HeLa. C) Corresponde al empalme del canal A y B, que nos permite ver la cercanía entre ambos organelos. La barra en las imágenes indica 10  $\mu\text{m}$ .

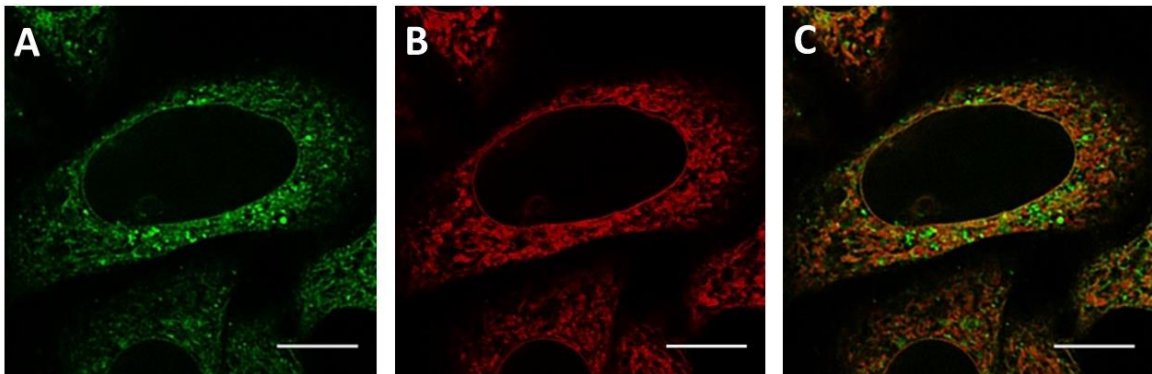
Con la finalidad de contar con un parámetro cuantitativo de la cercanía entre la mitocondria y el RE, se llevó a cabo la determinación de los CM para establecer el grado de colocalización entre ambas estructuras. La **Figura 8.6** muestra que en estas condiciones (n= 44 células de 3 pases diferentes) el 77% de los píxeles mitocondriales colocalizaron con los del RE, pero sólo el 20% de los píxeles del RE colocalizaron con los píxeles mitocondriales, dejando en claro que casi en su totalidad las mitocondrias están en cercanía a los túbulos del RE y que el bajo porcentaje del RE que colocalizó con las mitocondrias se debe a la diferencia de volúmenes entre ambos organelos.



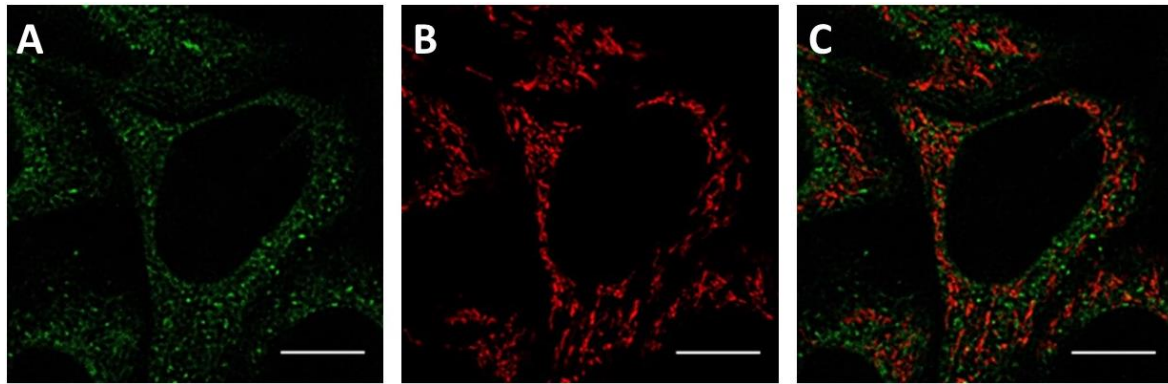
**Figura 8.6. Análisis de colocalización entre el RE y las mitocondrias.** Promedio de los valores de colocalización entre ambos organelos. Las líneas verticales sobre las barras representan el error estándar de la media (SEM). n= 44, el análisis corresponde a 3 experimentos independientes.

### 8.5. El RE cuenta con zonas de alto y bajo $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que estas últimas interactúan con las mitocondrias

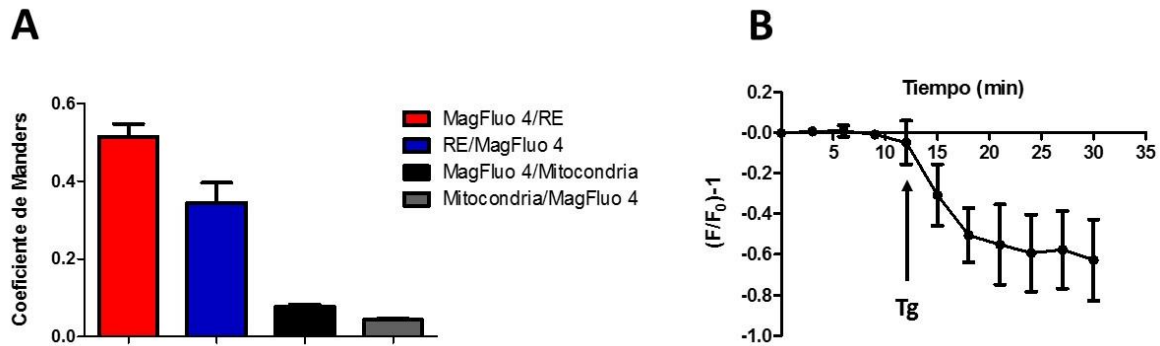
Como se mencionó anteriormente, el MagFluo-4 es un indicador que reporta  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, partiendo de esta idea, cargamos a células HeLa con este indicador y con los indicadores de RE y mitocondria. En apariencia, la tinción obtenida con este indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fue similar a un patrón de entramado tubular (**Figuras 8.7 y 8.8**), el cual presentó un mayor traslape con el RE, que con las mitocondrias (**Figura 8.9A**). Con la finalidad de verificar que esta señal venía del RE se indujo el vaciamiento con Tg para inhibir la bomba SERCA, en estas condiciones el porcentaje de vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (aproximadamente del 60%) (**Figura 7.9B**) fue similar a la fracción del MagFluo-4 que coincidió con el RE (50%). A partir de estos datos y considerando que solo el 30% del RE posee esta señal de MagFluo-4, nos sugiere que la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RE no es homogénea, a diferencia de lo que se ha planteado con anterioridad.



**Figura 8.7. Distribución del MagFluo-4 y del RE en células HeLa.** A) Patrón del MagFluo-4 el cual abarca la totalidad de la superficie celular. B) Distribución del RE teñido con ER-tracker. C) Empalme del canal A y B que visualmente muestra un alto grado de colocalización (regiones amarillas). La barra en las imágenes indica 10  $\mu\text{m}$ .



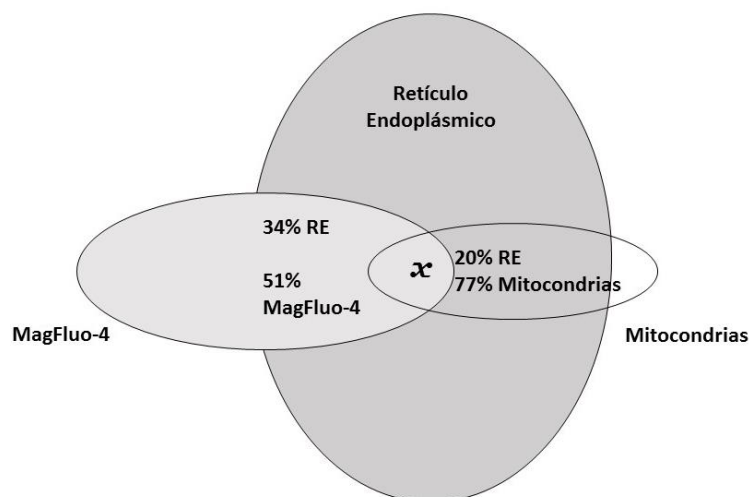
**Figura 8.8. Distribución del MagFluo-4 y de las mitocondrias en células HeLa. A)** Patrón que adopta el MagFluo-4 en células HeLa. **B)** Distribución de las mitocondrias teñidas con TMRE. **C)** Empalme de los canales A y B, visualmente la colocalización es mucho menor (ausencia de zonas amarillas). La barra en las imágenes indica 10  $\mu\text{m}$ .



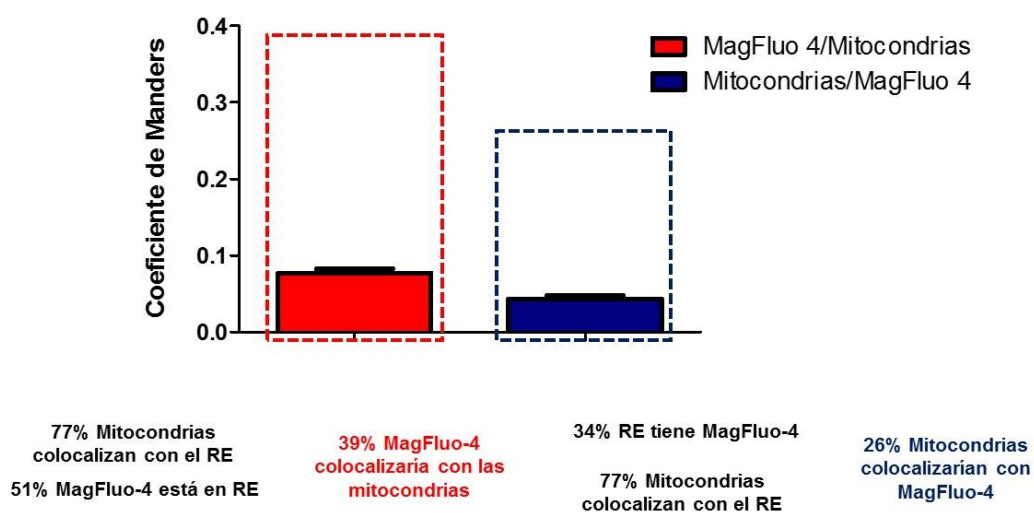
**Figura 8.9. Análisis de colocalización entre el MagFluo- 4, el RE y las mitocondrias. A)** Promedio de los valores de colocalización entre el MagFluo-4 y ambos organelos. Las líneas verticales sobre las barras representan el SEM. n= 31 para los experimentos de MagFluo-4 con ER y n= 39 para los experimentos de MagFluo-4 con mitocondrias. Ambos corresponden al análisis de 3 experimentos independientes. **B)** Decremento en la señal del MagFluo-4 por efecto de la Tg (1  $\mu\text{M}$ ), n= 13.

La **Figura 8.10** muestra el diagrama de Venn que condensa los datos de colocalización entre el RE, las mitocondrias y el MagFluo-4. A partir de estos datos, decidimos utilizar estos valores para calcular el porcentaje del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  que se esperaría colocalizase con las mitocondrias, partiendo de la premisa de que la mayoría de éstas están asociadas al RE y que el tamaño del pixel permite que quepan ambos organelos. De esta manera, por probabilidad calculamos los valores de colocalización esperados para el MagFluo-4 y las mitocondrias y los comparamos con los datos obtenidos experimentalmente, observando que estos últimos

están por debajo de los valores calculados (**Figura 8.11**), lo cual sugiere que si bien, la mayoría de las mitocondrias se asocian con el RE, éstas lo hacen en las zonas donde las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son bajas.

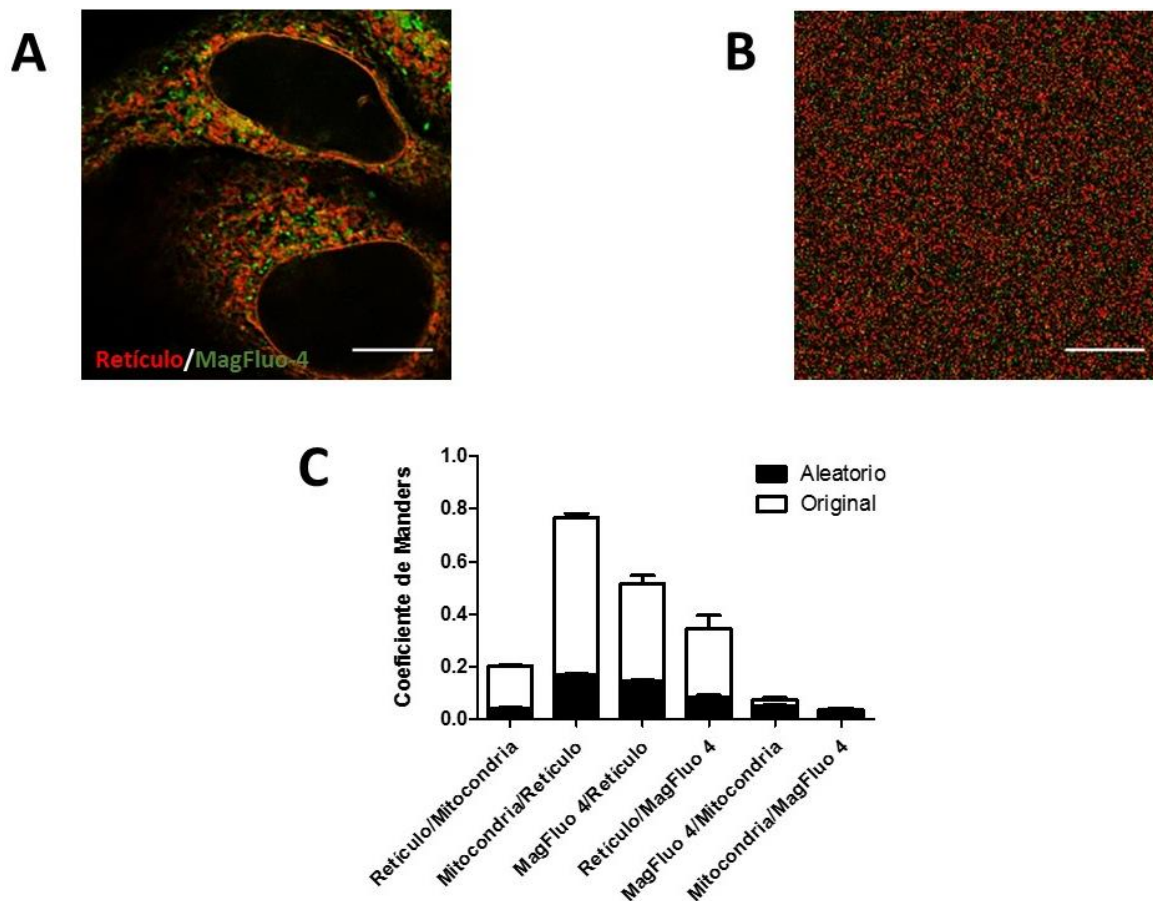


**Figura 8.10. Diagrama de Venn del grado de colocalización entre el RE y las mitocondrias y del MagFluo-4 con el RE.**  $x$  representa la intersección que se esperaría, entre el MagFluo-4 y las mitocondrias, debido a la proximidad existente entre el RE y la mitocondria.



**Figura 8.11. Comparación del grado de colocalización entre el MagFluo-4 y las mitocondrias.** Las barras punteadas indican los valores esperados de colocalización, los cuales fueron calculados como se muestra en la parte inferior, a partir de los valores obtenidos de la Figura 8.10. Las barras sólidas indican los valores de colocalización obtenidos experimentalmente.

Con la finalidad de dimensionar el significado de estos números decidimos utilizar las imágenes originales (**Figura 8.12A**) para crear patrones desordenados aleatoriamente (**Figura 8.12B**) con el objetivo de calcular numéricamente el nivel de colocación fortuita entre las estructuras marcadas. Los datos arrojaron que, en todos los casos analizados, el valor de CM fue claramente mayor de cero, y que estos valores de colocación aleatoria en el caso del MagFluo-4 y las mitocondrias es prácticamente idéntico a los valores obtenidos experimentalmente (**Figura 8.12C**), es decir, la colocación entre el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal y las mitocondrias fue totalmente fortuita, y por lo tanto, estos datos fortalecen la idea de que las mitocondrias se segregan, de forma “activa”, de las zonas de alto  $\text{Ca}^{2+}$  del RE.



**Figura 8.12. Distribución aleatoria de los pixeles.** **A)** Células HeLa teñidas con ER-tracker y con MagFluo-4. **B)** Imagen A desordenada aleatoriamente. **C)** Valores de colocación aleatorios de las imágenes obtenidas para MagFluo-4, RE y mitocondrias.

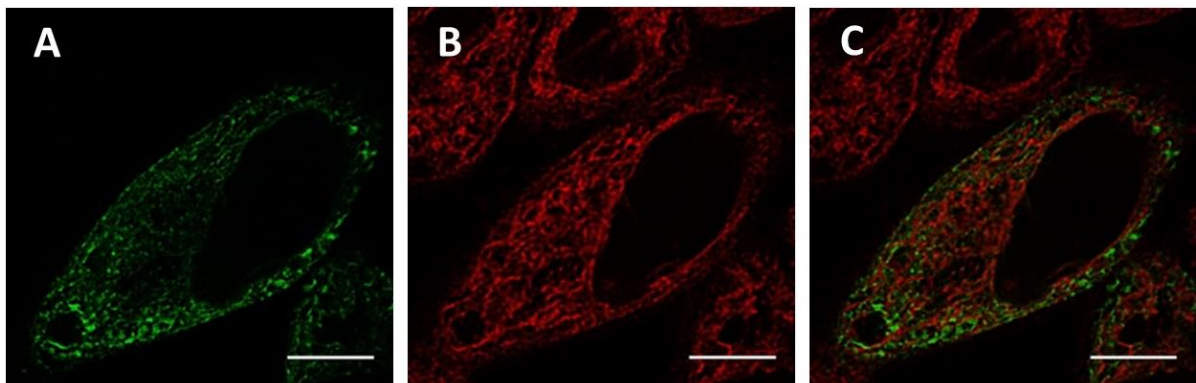


## 8.6. Los indicadores proteicos de $\text{Ca}^{2+}$ también sugieren la presencia de zonas de alto $\text{Ca}^{2+}$ en el RE.

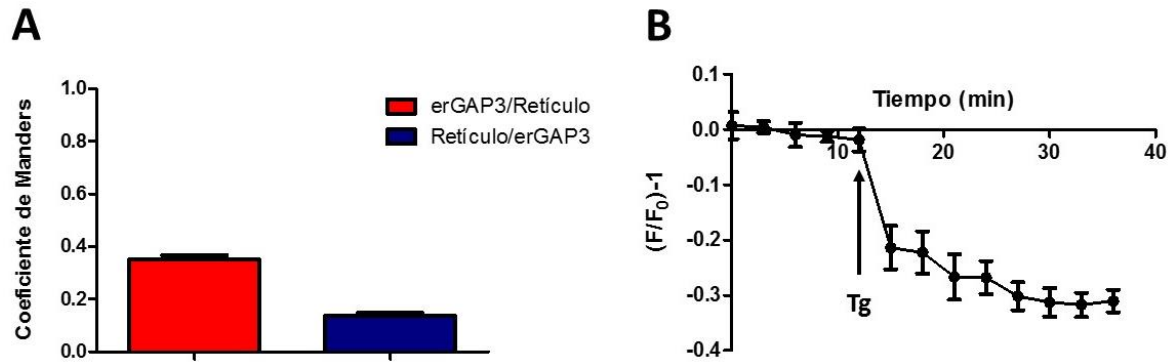
### 8.6.1. El erGAP3 mostró datos similares al MagFluo-4

El MagFluo-4 es un indicador ampliamente utilizado para reportar la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, sin embargo, este indicador no posee un mecanismo de retención dentro del RE y por lo mismo, puede terminar en otros compartimentos que son derivados del RE (Golgi, vesículas, etc). Para ello transfectamos células HeLa con tres diferentes indicadores proteicos que van dirigidos y permanecen exclusivamente en el RE (al llegar al Golgi son retro-transportados al RE).

El hecho de que estos indicadores presenten una secuencia de direccionamiento y retención en el RE nos hacía suponer que el porcentaje de colocalización entre estos y el RE debería de ser mayor que al utilizar el MagFluo-4 (**Figura 8.13**). Sorprendentemente, el erGAP3 (**Figura 8.14A**) mostró un porcentaje de colocalización con el ER-tracker menor que el del MagFluo-4 (de 35%); que por otro lado fue un porcentaje similar el que respondió con reducción de fluorescencia ante la aplicación de Tg (**Figura 8.14B**). Todavía más sorprendente fue obtener que la fracción de RE que posee erGAP3 fue muy pequeña (solamente el 13% del RE) (**Figura 8.14**).

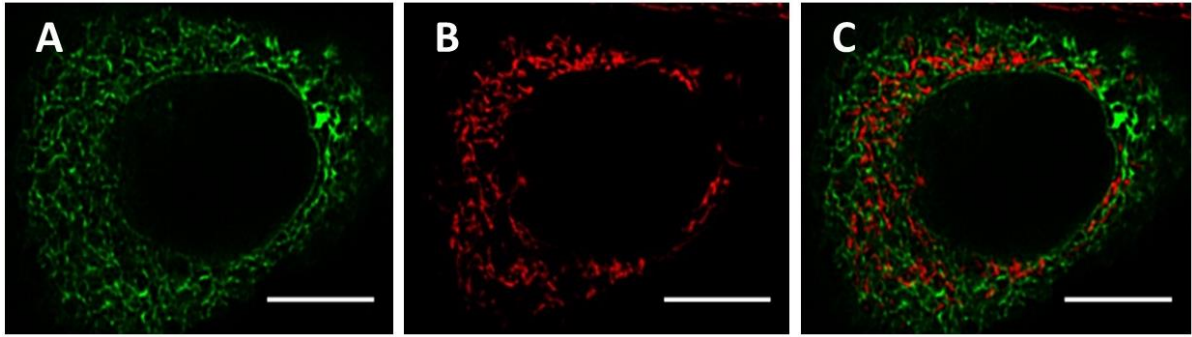


**Figura 8.13. Distribución del erGAP3 y del RE en células HeLa.** A) Células que expresaron el indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$  erGAP3. B) Células teñidas con ER-tracker para marcar RE. C) Empalme del canal A con el canal B que muestra ciertas zonas de colocalización. Las barras en las imágenes representan 10  $\mu\text{m}$ .

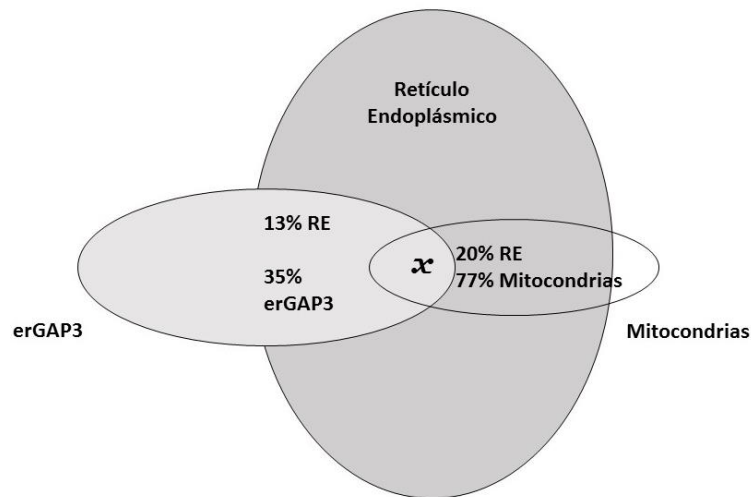


**Figura 8.14. Colocalización entre el erGAP3 y el RE.** **A)** Promedio de los valores de colocalización entre el indicador erGAP3 y el RE. Las líneas verticales sobre las barras representan el SEM. n= 35, el análisis corresponde a 3 experimentos independientes. **B)** Decremento en la señal fluorescente del erGAP3 por efecto de la Tg (1  $\mu$ M), n= 7.

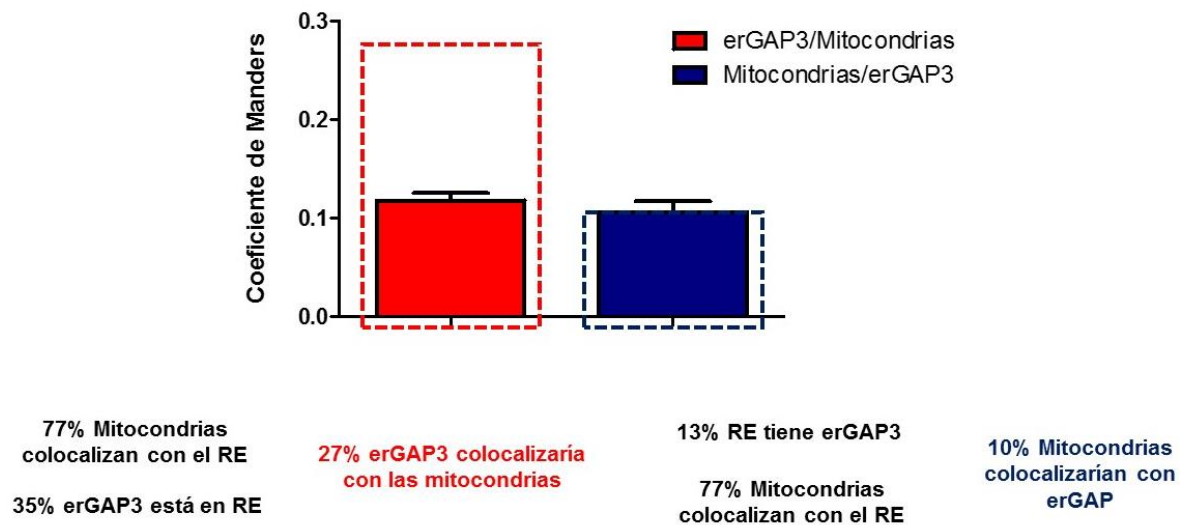
De igual forma, llevamos a cabo experimentos de colocalización entre erGAP3 y las mitocondrias (**Figura 8.15**). Utilizamos estos datos de colocalización para explorar los valores de colocalización que se esperaba ver entre el erGAP3 y los pixeles mitocondriales. La **Figura 8.16** muestra el diagrama de Venn correspondiente con los valores de colocalización con respecto al RE. De igual forma se observó que los datos experimentales se encontraron por debajo de lo calculado (**Figura 8.17**), así podemos concluir que los datos de baja colocalización con el RE y con la mitocondria, reportados por el MagFluo-4, no se debe a falta de asideros moleculares al RE, puesto que un indicador proteico, que cuenta con dichos asideros, se distribuye con un patrón de menor colocalización con el RE que el MagFluo-4.



**Figura 8.15. Distribución del erGAP3 y de las mitocondrias en células HeLa.** A) Células que expresaron el indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$  erGAP3. B) Células teñidas con TMRE para marcar mitocondrias. C) Muestra el empalme del canal A con el canal B. Las barras en las imágenes representan 10  $\mu\text{m}$ .



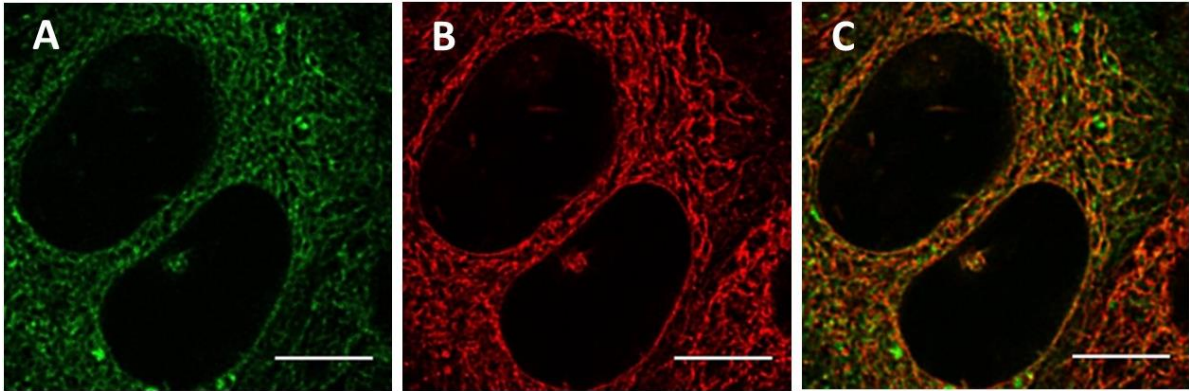
**Figura 8.16. Diagrama de Venn del grado de colocalización entre el RE y las mitocondrias y del erGAP3 con el RE.** X representa la intersección entre el erGAP3 y las mitocondrias, que se esperaría, debido a la proximidad existente entre la mitocondria y el RE.



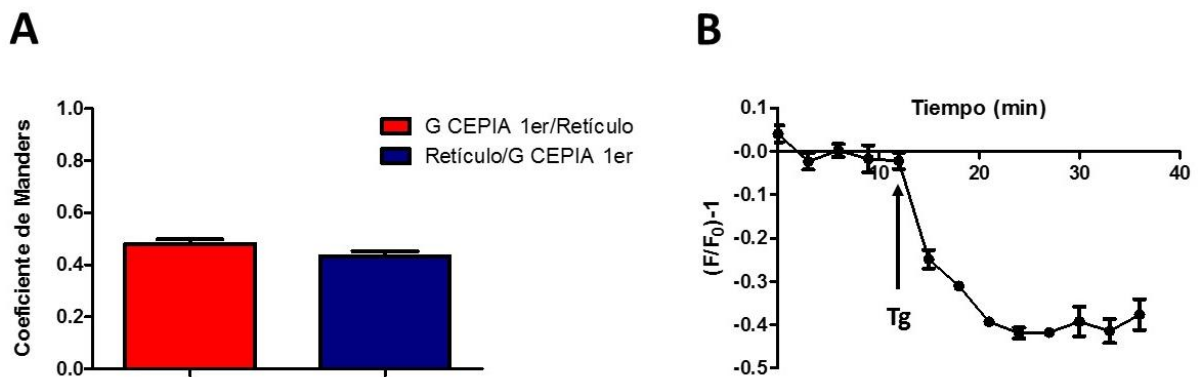
**Figura 8.17. Comparación del grado de colocalización entre erGAP3 y las mitocondrias.** Las barras punteadas indican los valores esperados de colocalización, los cuales fueron calculados como se muestra en la parte inferior, utilizando los valores de la Figura 8.16. Las barras sólidas indican los valores de colocalización obtenidos experimentalmente. n= 31, el análisis corresponde a 3 experimentos independientes.

### 8.6.2. Otro indicador proteico de $\text{Ca}^{2+}$ expresado en la luz del RE mostró pobre colocalización con las mitocondrias

Para fortalecer los datos obtenidos con el erGAP3, transfectamos células HeLa con el G-CEPIA 1er, otro indicador proteico que también posee la característica de dirigirse al RE. Las células que expresaron este indicador mostraron un patrón reticular (**Figura 8.18**), el cual también fue obtenido tanto con el MagFluo-4 como con el erGAP3. Además de esto, seguimos obteniendo valores de colocalización mucho menores al 100%, entre este indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  y el marcador de RE (ER-tracker). De hecho, en este caso (al igual que con MagFluo-4 y erGAP3) también encontramos que la fracción de G-CEPIA 1er que se encuentra en el RE, fue similar en magnitud, a la señal sensible a Tg (**Figura 8.19**).



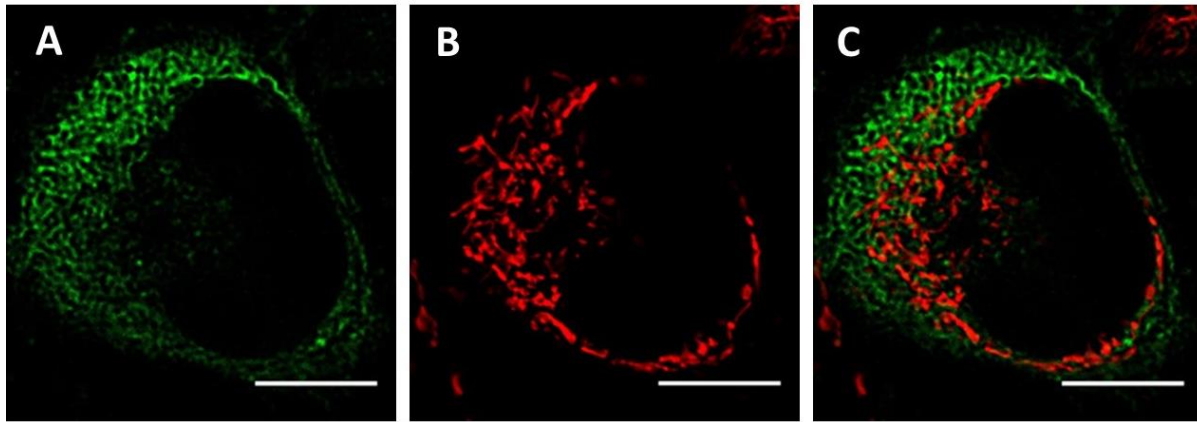
**Figura 8.18. Distribución del G-CEPIA 1er y del RE en células HeLa.** A) Células que expresaron el indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$  G-CEPIA 1er. B) Células teñidas con ER-tracker para marcar RE. C) Empalme del canal A con el canal B que muestra zonas amarillas como resultado de la colocalización entre estos dos indicadores. Las barras en las imágenes representan 10  $\mu\text{m}$ .



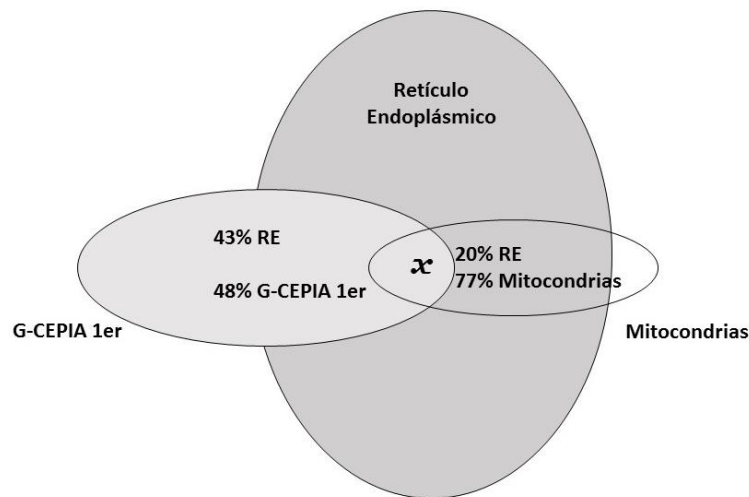
**Figura 8.19. Colocalización entre el G-CEPIA 1er y el RE.** A) Promedio de los valores de colocalización entre el indicador G-CEPIA 1er y el RE. Las líneas verticales sobre las barras representan el SEM.  $n = 56$ , el análisis corresponde a 3 experimentos independientes. B) Decremento en la señal fluorescente del G-CEPIA por efecto de la Tg (1  $\mu\text{M}$ ),  $n = 6$ .

Por otra parte, al realizar la comparación con células que expresaron este indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (G-CEPIA 1er) y además fueron teñidas con TMRE (**Figura 8.20**), observamos que al comparar los datos de colocalización del RE y este indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con los datos de las mitocondrias (**Figura 8.21**), los valores de traslape de G-CEPIA 1er con los pixeles mitocondriales, de nueva cuenta, estuvieron por debajo de los valores que se esperaban obtener (**Figura 8.22**), lo que refuerza la idea de que las mitocondrias pareciesen que se excluyen de aquellas regiones donde los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  muestran que hay alto

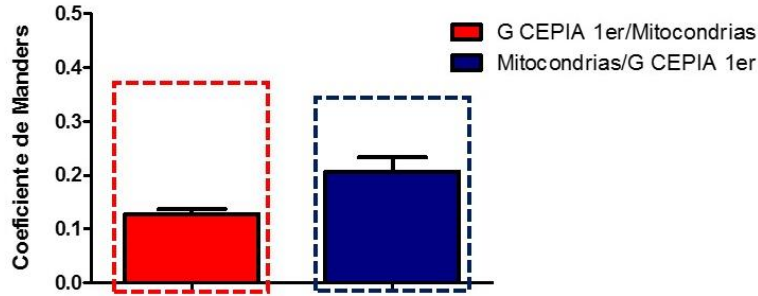
Ca<sup>2+</sup> dentro del RE, es decir, las mitocondrias se asocian al RE, pero solamente en aquellas zonas donde la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>L</sub> es baja.



**Figura 8.20. Distribución del G-CEPIA 1er y de las mitocondrias en células HeLa.** A) Células que expresaron el indicador protéico de Ca<sup>2+</sup> G-CEPIA 1er. B) Células teñidas con TMRE para marcar mitocondrias. C) Muestra el empalme del canal A con el canal B mostrando que hay muy pocos sitios de colocalización (amarillo). Las barras en las imágenes representan 10 μm.



**Figura 8.21. Diagrama de Venn del grado de colocalización entre el RE y las mitocondrias y del G-CEPIA 1er con el RE.**  $\mathcal{X}$  representa la intersección entre el G-CEPIA 1er y las mitocondrias debido a la proximidad existente entre las mitocondrias y el RE (ER-tracker).

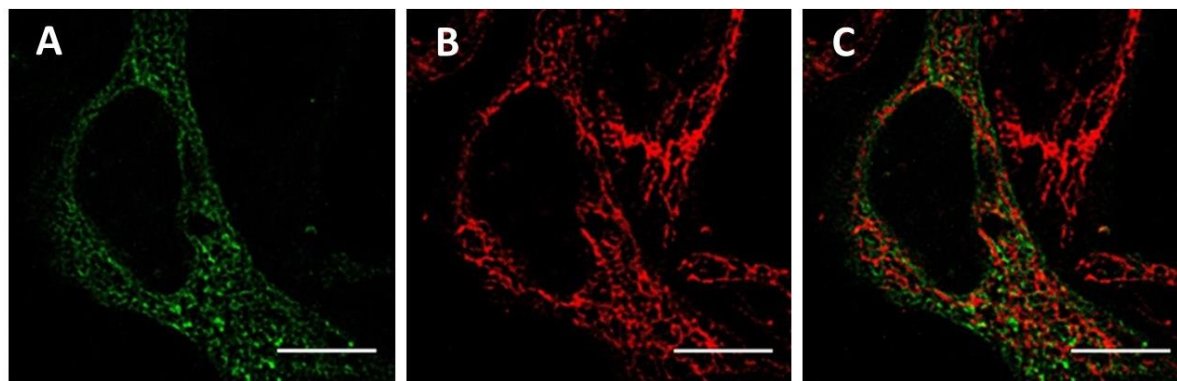


77% Mitochondrias colocalizan con el RE  
 48% G CEPIA 1er está en RE  
 37% G CEPIA 1er colocalizaría con las mitocondrias  
 43% RE tiene G CEPIA 1er  
 77% Mitochondrias colocalizan con el RE  
 33% Mitochondrias colocalizarían con G CEPIA 1er

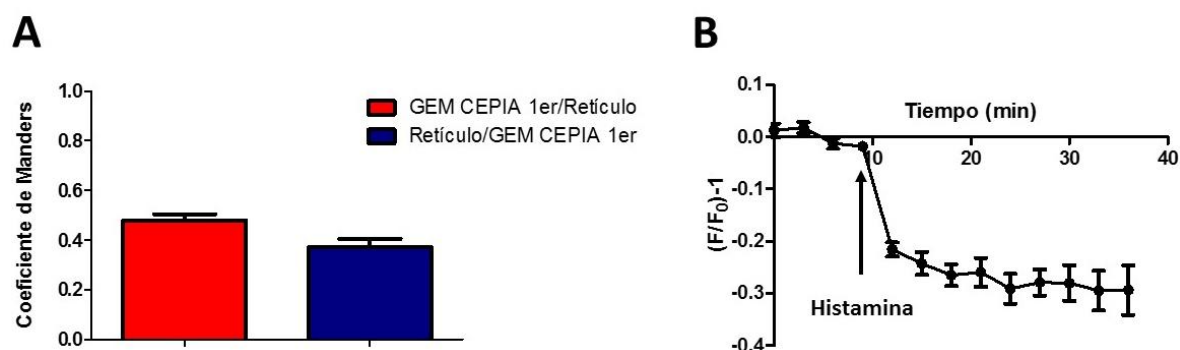
**Figura 8.22. Comparación del grado de colocalización entre G-CEPIA 1er y las mitocondrias.** Las barras punteadas indican los valores esperados de colocalización los cuales fueron calculados como se muestra en la parte inferior, utilizando los valores de la Figura 8.21. Las barras sólidas indican los valores de colocalización obtenidos experimentalmente. n= 33, el análisis corresponde a 3 experimentos independientes.

### 8.6.3. Las mitocondrias colocalizan con el indicador de $\text{Ca}^{2+}$ que refleja regiones de bajo $\text{Ca}^{2+}$ en el RE

Con la finalidad de evaluar la hipótesis de que las mitocondrias se asocian con las regiones de bajo  $\text{Ca}^{2+}$ , decidimos utilizar un tercer indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$ ; el GEM-CEPIA1er, el cual posee la característica de aumentar su fluorescencia ante la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_L$ . La transfección de este indicador en células HeLa, al igual que los otros indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostró un patrón característico de RE (**Figura 8.23**) pero de nuevo, al igual que los otros indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , con excepción de erGAP3, los CM obtenidos con RE mostraron que este indicador está aproximadamente en el 50% del RE (**Figura 8.24A**).



**Figura 8.23. Distribución del GEM-CEPIA 1er y del RE en células HeLa.** **A)** Células que expresaron el indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$  GEM-CEPIA 1er. **B)** Células teñidas con ER-tracker para marcar RE. **C)** Empalme del canal A con el canal B que muestra zonas amarillas como resultado de la colocalización entre estos dos indicadores. Las barras en las imágenes representan 10  $\mu\text{m}$ .

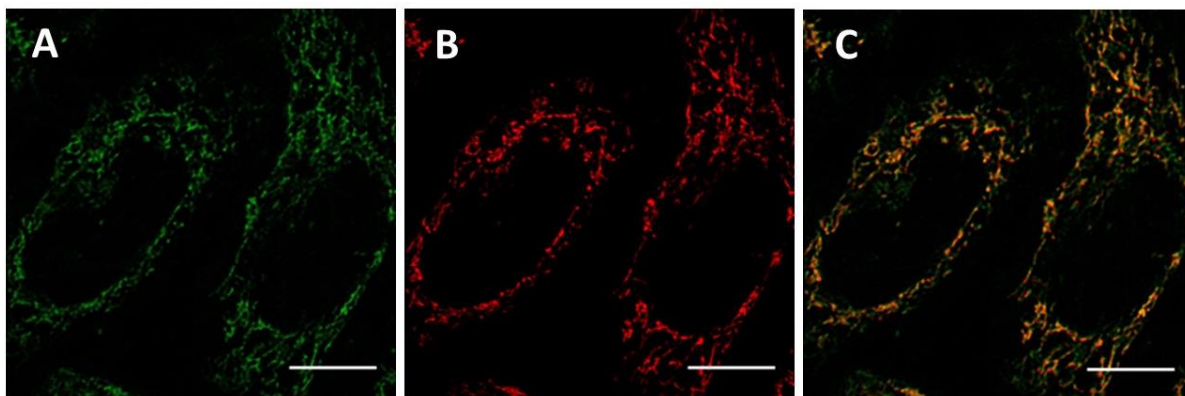


**Figura 8.24. Colocalización entre el GEM-CEPIA 1er y el RE.** **A)** Promedio de los valores de colocalización entre el indicador GEM-CEPIA 1er y el RE. Las líneas verticales sobre las barras representan el SEM.  $n = 21$ , el análisis corresponde a 3 experimentos independientes. **B)** Decremento en la señal fluorescente del GEM-CEPIA 1er por efecto de la Histamina (100  $\mu\text{M}$ ),  $n = 5$ .

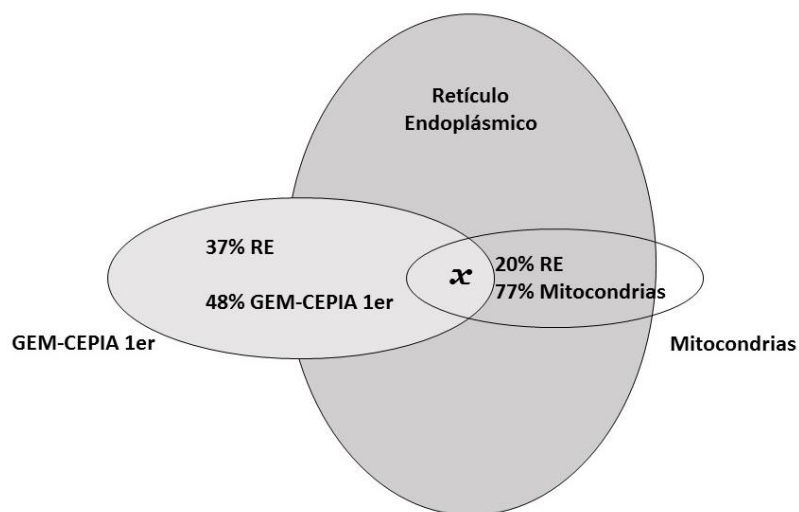
Como mencionamos anteriormente, la expresión de esta proteína en células HeLa generó un patrón similar al RE, sin embargo, este patrón también tuvo cierta similitud con el patrón obtenido con el TMRE (**Figura 8.25**) e interesantemente, al utilizar los valores de colocalización entre el GEM-CEPIA 1er y el RE, así como los evaluados para el RE y las mitocondrias (**Figura 8.26**) encontramos que la colocalización de este indicador con los pixeles mitocondriales estuvo significativamente por arriba de los valores predichos (**Figura**



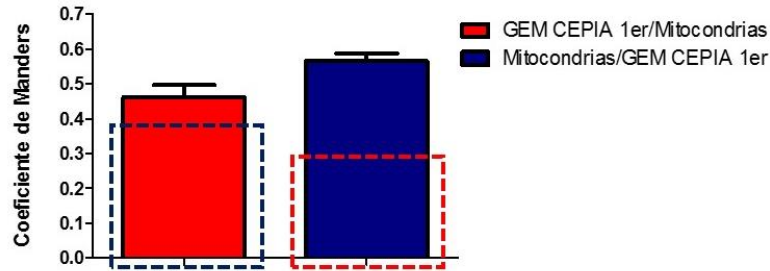
8.27), es decir, lo opuesto a lo encontrado anteriormente con los otros tres indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 8.25. Distribución del GEM-CEPIA 1er y de las mitocondrias en células HeLa.** A) Células que expresaron el indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$  GEM-CEPIA 1er. B) Células teñidas con TMRE para marcar mitocondrias. C) Muestra el empalme del canal A con el canal B mostrando que las zonas de colocalización (amarillo) tienen una alta frecuencia. Las barras en las imágenes representan 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8.26. Diagrama de Venn del grado de colocalización entre el RE y las mitocondrias y del GEM-CEPIA 1er con el RE.**  $\mathcal{X}$  representa la intersección entre el GEM-CEPIA 1er y las mitocondrias debido a la proximidad que hay entre la mitocondria y el RE.

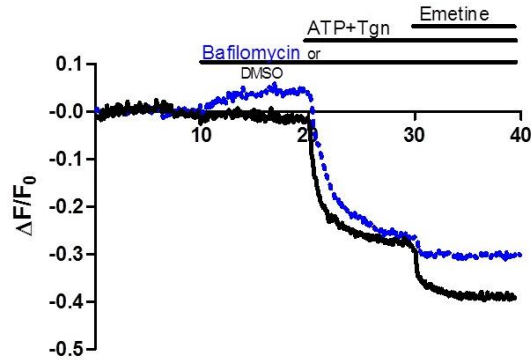


77% Mitochondrias colocalizan con el RE  
 48% GEM CEPIA 1er está en RE  
 37% GEM CEPIA 1er colocalizaría con las mitocondrias  
 37% RE tiene GEM CEPIA 1er  
 77% Mitochondrias colocalizan con el RE  
 28% Mitochondrias colocalizarían con GEM CEPIA 1er

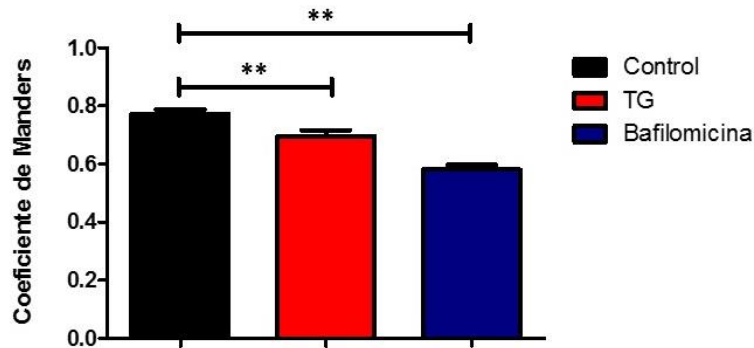
**Figura 8.27. Comparación del grado de colocalización entre GEM-CEPIA 1er y las mitocondrias.** Las barras punteadas indican los valores esperados de colocalización los cuales fueron calculados como se muestra en la parte inferior utilizando los valores de la Figura 7.26. Las barras sólidas indican los valores de colocalización obtenidos experimentalmente. n = 22, el análisis corresponde a 3 experimentos independientes.

### 8.7. La Tg y la bafilomicina modifican el Ca<sup>2+</sup> luminal en direcciones opuestas, pero ambos reducen la interacción entre la mitocondria y el RE

Finalmente, para incrementar la evidencia de que el Ca<sup>2+</sup> luminal del RE modifica la asociación entre estos dos organelos, incubamos a las células HeLa con bafilomicina, la cual produce un incremento del Ca<sup>2+</sup> luminal (**Figura 8.28**) (como se ha observado en nuestro laboratorio, datos del M. en C. Martín Leonardo Gallegos Gómez) y pudimos constatar que la colocalización de las mitocondrias con el RE disminuyó de 77% a un 60% (**Figura 8.29**) corroborando así que las mitocondrias se segregan de las zonas de alto Ca<sup>2+</sup> del RE. Por su parte, la Tg, que disminuye el Ca<sup>2+</sup> luminal, no aumentó la colocalización entre estos dos organelos (**Figura 8.29**). Lo cual sugiere que el Ca<sup>2+</sup> del citoplasma también afecta la interacción entre las mitocondrias y el RE.



**Figura 8.28. Efecto de la bafilomicina en el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal.** A células HeLa se le añadieron bafilomicina (100 nM) o DMSO, donde se indica y por un tiempo de 10 minutos. Se puede observar que el efecto de la bafilomicina produjo un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, al menos durante los 10 minutos de registro, antes de agregar la combinación de ATP y Tg. Datos proporcionados por el M. en C. Gallegos Gómez, Laboratorio 10.



**Figura 8.29. Efecto de la Tg y la bafilomicina en el grado de colocalización entre las mitocondrias y el RE (Mitocondrias/RE).** Las células fueron incubadas con Tg 1  $\mu\text{M}$  o con bafilomicina 100 nM por 10 y 15 minutos, respectivamente.  $n=16$ , el análisis corresponde a 3 experimentos independientes. \*\*/\*\*  $p < 0.05$ .

Estos datos en su conjunto sugieren que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espacio luminal del RE no es homogénea y que hay regiones de alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que conviven con regiones de baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las primeras fueron detectadas por tres diferentes indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, uno sintético, el MagFluo-4, y dos GECIs, el erGAP3 y el G-

CEPIA 1er, mientras que las segundas fueron detectadas por el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  que fluoresce ante una reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, el GEM-CEPIA 1er. Además, encontramos que ninguno de los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  ocupó el 100% del RE, basado en la señal de ER-tracker, el más alto fue el G-CEPIA 1er con el 43% y el más bajo el erGAP3 con un 13%. Por otro lado, encontramos que los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  reportan regiones de alto  $\text{Ca}^{2+}$  que no se tiñen con ER-tracker. La fracción más alta de colorante dentro de ER-tracker la presentó MagFluo-4, con un 51%, mientras que la más baja fue erGAP3 con un 35%. Todos estos datos validan el uso de MagFluo-4 como un indicador del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del RE, a pesar de no contar con un mecanismo de direccionamiento hacia ese organelo. Por último, estos datos sugieren que las mitocondrias sí se asocian con el RE, pero que la razón por la cual los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  muestran baja asociación con las mitocondrias, es que éstas prefieren las regiones de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y esto lo pudimos corroborar porque el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  reverso (GEM-CEPIA 1er) mostró una mayor asociación a la esperada con las mitocondrias, y que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, con bafilomicina, redujo la asociación entre las mitocondrias y el RE.

## 9. DISCUSIÓN

Históricamente, el RE ha sido definido como un organelo multifuncional y dinámico que forma una red tubular continua (Voeltz et al., 2002), permitiendo así el libre tráfico de moléculas en su interior, incluido el  $\text{Ca}^{2+}$ ; además el RE está considerado como el principal reservorio de este catión en células eucariontes, puesto que lo puede acumular en el orden de mM (Berridge et al., 2000). Otra característica importante del RE es su capacidad de asociarse con diferentes organelos, incluida la mitocondria (Rowland & Voeltz, 2012). La mitocondria es un organelo que puede capturar  $\text{Ca}^{2+}$  vía el MCU (De Stefani et al., 2011) y que esto aumenta la actividad respiratoria y la síntesis de ATP (Jouaville et al., 1999); sin embargo, un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  en la MM, dispara el poro de transición, que eventualmente puede llevar a la muerte mitocondrial, y también a la muerte celular. Este escenario plantea que el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene efectos positivos y negativos en la actividad mitocondrial. Con la finalidad de entender esta aparente paradoja, decidimos estudiar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la interacción entre el RE y la mitocondria.

Como un primer enfoque, y debido a que los datos principales del presente trabajo están basados en los niveles de colocalización, decidimos caracterizar las condiciones óptimas del proceso de adquisición de imágenes por microscopía confocal y también los parámetros adecuados para llevar a cabo el proceso de deconvolución. Nuestros datos sugieren que el láser de 488 nm puede fácilmente excitar a TMRE y que para minimizar esta contaminación se deben utilizar canales separados. También verificamos la magnitud y la estabilidad del desfase entre las coordenadas X e Y para los canales verde y rojo. En este caso pudimos verificar que el microscopio confocal Zeiss 700 está en óptimas condiciones, pues el desfase es menor al límite de resolución (Sánchez-Vázquez, 2015) y fue estable en un periodo de 10 minutos. Las condiciones que encontramos para llevar a cabo la deconvolución con ImageJ nos arrojó un aumento del 25% para ambos canales en la resolución de las imágenes. Además, nos aseguramos que el protocolo de deconvolución no generase ninguna distorsión, puesto que las imágenes de las perlas fluorescentes se ajustaron a una distribución normal de fluorescencia antes y después de la deconvolución. Adicionalmente podemos decir que los detalles de las estructuras celulares teñidas se definieron claramente sin que hubiera cambios perceptibles de su morfología. De esta forma y teniendo en cuenta que, tanto el proceso de

adquisición de imágenes, como la deconvolución nos permitían tener una mejor resolución espacial, decidimos evaluar los niveles de traslape de la mitocondria (teñida con TMRE) y el RE (teñido con ER-tracker, Mag-fluo4, erGAP3, G CEPIA1er ó GEM CEPIA1er).

Cuando el RE se tiño con ER-tracker observamos un traslape del 77% con los pixeles mitocondriales. Lo cual se ha observado previamente utilizando diferentes estrategias experimentales y por diferentes grupos de trabajo (**Friedman et al., 2011; Lesh et al., 1998; Simpson et al., 1997**). Partiendo de estos datos y teniendo en cuenta que el RE es el principal depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  decidimos utilizar al MagFluo-4, para determinar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de este organelo y su relación con las mitocondrias. Inesperadamente, observamos que a pesar de que el RE es una red continua de túbulos y sáculos, la señal del MagFluo-4 sólo se detectó en el 34% del RE y únicamente el 51% de este indicador se encontró en el RE; justo esta misma fracción de la señal fue inhibida con Tg, indicándonos que esta fracción está reportando  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. Si bien, estos datos son opuestos a lo esperado, teniendo en cuenta la naturaleza del RE, estos mismos sugieren que hay una heterogeneidad de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el lumen del RE.

En neuronas de hipocampo se encontró que la despolarización incrementa la  $[\text{Ca}^{2+}]$  total en regiones discretas, aproximadamente un 40% del RE y sin embargo había regiones contiguas a éstas incapaces de acumular  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos datos sugieren que el RE puede comportarse como dos depósitos, uno capaz de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  y otro incapaz de hacerlo (a pesar de estar comunicados por la misma luz del RE), asociando estas regiones a la presencia de una proteína “amortiguadora” que no se encuentra distribuida de forma homogénea dentro del RE (**Pozzo-Miller et al., 1999**). Lo anterior concuerda con datos de la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE en células PC12, donde se observó que en una misma cisterna las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron diferentes, siendo incluso nula en ciertas regiones (**Pezzati et al., 1997**). Por otra parte, al utilizar dos indicadores (basados en aquorina) con diferentes afinidades para  $\text{Ca}^{2+}$ , el RE respondió a ambos, es decir, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron diferentes, corroborando la heterogeneidad de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del lumen del RE (**Montero et al., 1997**).

Nuestros datos, en conjunto con estos trabajos, respaldan la idea de que el RE posee al menos 2 sub-compartimentos o regiones, una de alto y otra de bajo  $\text{Ca}^{2+}$ . Teniendo en cuenta

que el MagFluo-4 fluoresce en zonas donde las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son altas, sugerimos que dichas zonas del RE, que reporta el indicador, son justo aquéllas enriquecidas en proteínas amortiguadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto con alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto concuerda con trabajos previos de nuestro grupo de trabajo, pues al evaluar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  debida al  $\text{RIP}_3$  o al RyR, se observó que el RE se comportó como dos compartimentos aislados, en los que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  dependen de si éste se encuentra libre o unido a proteínas (**Dagnino-Acosta & Guerrero-Hernández, 2009**). A su vez, en diferentes modelos celulares, incluso en células HeLa, se observó que una vez que se libera  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, el impacto en el citoplasma fue inmediato al estímulo, sin embargo, la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal presentó un retardo, y cuando ocurrió la caída de  $\text{Ca}^{2+}$  de este depósito, el impacto de esa liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma fue despreciable. Por lo tanto, esto corrobora que el  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del lumen se encuentra en dos compartimentos aislados; uno del cual el  $\text{Ca}^{2+}$  está disponible (libre) y otro en el que se encuentra oculto (“pegado” a proteínas), siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  unido a proteínas el que impacta directamente en el citoplasma, mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  libre del RE llega al citoplasma una vez que se agota la fuente oculta (**Guerrero-Hernandez et al., 2010**).

Si bien, estos datos responden algunas preguntas acerca del fenómeno que ocurre en cuanto a la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$ , está claro que las evidencias de la ausencia de barreras de difusión para el  $\text{Ca}^{2+}$  y proteínas, dentro del RE (**Dayel et al., 1999; Fossati et al., 2014**) están en conflicto con los datos de distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE. Nuestros datos, en conjunto, sugieren que el RE se comporta como 2 compartimentos separados. Sin embargo, no contamos con una explicación para conciliar estos dos panoramas tan disímbolos entre sí.

Partiendo de nuestros datos y los ya publicados, que demuestran que la mayoría de las mitocondrias están asociadas al RE (**Friedman et al., 2011; Lesh et al., 1998; Simpson et al., 1997**), nosotros esperábamos que la señal del MagFluo-4 en el RE, tuviera también una fuerte asociación con las mitocondrias. Sin embargo, el hecho de observar que el MagFluo-4 no coincidía con toda la señal de ER-tracker sugiriendo la presencia de regiones de alto  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, nos generó la siguiente pregunta: ¿Las mitocondrias se asocian de forma indiscriminada al RE?

Para responder esta pregunta, decidimos utilizar los datos de colocalización entre el RE y las mitocondrias, así como los de asociación del RE con el MagFluo-4, y así pudimos calcular el grado de colocalización esperado del MagFluo-4 con las mitocondrias. Interesantemente, los valores obtenidos mostraron estar significativamente por debajo de los valores predichos, lo cual sugiere que si bien, las mitocondrias se asocian en su mayoría con el RE, éstas pareciesen que lo hacen en las zonas de bajo  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, al haber calculado los valores de colocalización por una distribución aleatoria de los píxeles, y resultando que estos valores fueron prácticamente idénticos a los obtenidos experimentalmente, se refuerza nuestra hipótesis de que las mitocondrias “de forma activa” se distancian de las zonas de alto  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. Estos datos sugieren la existencia de un mecanismo que les permite a las mitocondrias poder evitar las regiones del RE con altas  $[\text{Ca}^{2+}]$ , lo cual está apoyado por trabajos que mostraron que las mitocondrias solamente fueron capaces de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se bloqueó la bomba SERCA con Tg (**Pozzo-Miller et al., 1999**) y que al medir  $\text{Ca}^{2+}$  total se observó que éstas no acumulan a este catión en condiciones normales (**Pezzati et al., 1997**).

Para corroborar estos datos obtenidos con MagFluo-4 utilizamos una segunda estrategia, el uso de indicadores proteicos de  $\text{Ca}^{2+}$  que se dirigen y mantienen exclusivamente en el RE. A pesar de que el MagFluo-4 es utilizado ampliamente para reportar  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, este carece de un mecanismo de retención que lo mantenga exclusivamente en este depósito, por tal motivo, éste pudiese terminar en otros compartimentos y de esta forma generar una señal diferente a la esperada. Partiendo de que el RE es una red continua sin barreras de difusión (**Dayel et al., 1999; Fossati et al., 2014**) y de que los indicadores tienen una secuencia de retención en el RE, esto nos generaba un panorama en el que la fracción de RE conteniendo señal del indicador debería ser mayor a la que se había observado con el MagFluo-4 y de igual forma, la fracción del indicador en el interior del RE debería de ser mayor; sin embargo, para sorpresa nuestra, observamos que los datos reportados por el MagFluo-4 fueron similares a los GECIs. El erGAP3 y el G-CEPIA 1er, a pesar de que generan un patrón reticular similar al del ER-tracker, los valores de colocalización arrojados mostraron que sólo una fracción del RE posee señal de estos indicadores (10% al utilizar erGAP3 y un 43% para el G-CEPIA 1er). Aunque los GECIs están diseñados para expresarse en la luz del RE y que se supone que no hay barreras de difusión dentro del RE, los GECIs



al igual que el MagFluo-4 sugieren la presencia de dos zonas del RE con diferente concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero con los datos que contamos es complicado explicar el mecanismo utilizado por el RE para generar zonas de alto y bajo  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, la presencia de estas regiones no necesariamente puede deberse a la naturaleza del RE, sino más bien a las condiciones en las cuales se encuentra la célula, pues el grupo de Tobias Meyer propuso dos modelos en los cuales, dependiendo de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico, el lumen puede ser continuo o bien, estar compartimentalizado (**Subramanian & Meyer, 1997**). Por lo tanto, estos modelos, en conjunto con nuestros datos, nos obligan a estudiar la naturaleza de la región subcelular que se tiñe con los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Siguiendo esta tónica, al evaluar la fracción de estos indicadores que colocalizó con los pixeles mitocondriales, observamos que los CM estuvieron por debajo de los valores predichos, por lo tanto, y en conjunto con reportes que encontraron que las mitocondrias no colocalizaron con la calreticulina (**Wang et al., 2000**), se refuerza la hipótesis de que las mitocondrias se asocian preferencialmente con las zonas de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  ya que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que requieren estos indicadores para fluorescer deben ser altas. Nosotros proponemos que se puede conciliar la ausencia de barreras de difusión y  $\text{Ca}^{2+}$  compartimentalizado en el RE mediante la idea de tanto el Mag-Fluo-4 como los GECIs son capaces de interactuar con  $\text{Ca}^{2+}$  que está adosado a proteínas del RE, siempre y cuando este  $\text{Ca}^{2+}$  se mantenga solamente adsorbido y no totalmente coordinado por las proteínas del RE, dejando espacio para que los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  pudiesen interactuar.

Con la finalidad de corroborar nuestra hipótesis de que las mitocondrias se asocian con las regiones de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, utilizamos un tercer indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$  (GEM-CEPIA1er) el cual posee la característica de aumentar su fluorescencia ante la reducción de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Suzuki et al., 2014**). Interesantemente, encontramos que de igual manera, el indicador no traslapó del todo con el indicador del RE, generando el mismo patrón en donde aparentemente el  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra compartimentalizado en más de un depósito. Sin embargo, al realizar el análisis de colocalización con los pixeles positivos para mitocondrias, encontramos una mayor colocalización entre éstas y el indicador inverso de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluso por arriba de los valores predichos.

Si bien, nuestros resultados demostraron que el 77% de las mitocondrias están asociadas al RE, lo cual concuerda con otra serie de datos (**Montisano et al.,1982**), Rizzuto y cols. mediante el uso de indicadores proteicos demostraron que únicamente entre un 10 y 15% de la superficie total de las mitocondrias están en proximidad con el RE (**Rizzuto et al., 1998**). Estos datos son totalmente opuestos, pues por un lado nos indican que la mayoría de las mitocondrias están asociadas al RE, y por otro, que estas mismas se mantienen alejadas del retículo. Un hecho importante a resaltar es que aunque estos datos suenen paradójicos, es algo muy similar a lo encontrado en este trabajo, pues como mencionamos anteriormente, al utilizar el ER-tracker obtuvimos que casi un 80% de las mitocondrias se asocian a los pixeles positivos para este indicador, por el otro lado, al utilizar indicadores de alto  $\text{Ca}^{2+}$  la imagen fue totalmente opuesta, encontrando un traslape entre estos y las mitocondrias con un promedio del 10 al 20%, muy similar a lo reportado por Rizzuto y cols. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que las mitocondrias se asocian al RE de una manera dual, dependiendo si la señal de colocalización refleja  $\text{Ca}^{2+}$  o no, revelando un modelo en el que las mitocondrias tienen una asociación preferencial con indicadores de RE que no reflejan altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , por el contrario, la colocalización es baja cuando se utilizan indicadores de alto  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo de nueva cuenta que las mitocondrias prefieren las zonas de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo.

Finalmente, para incrementar la evidencia de que el  $\text{Ca}^{2+}$  participa como un modulador negativo en la interacción de las mitocondrias con el RE, utilizamos Tg y bafilomicina A1, inhibidores de la bomba SERCA (**Michelangeli & East, 2011**) y de la ATPasa de protones vacuolar (**Yoshimori et al., 1991**), respectivamente. A pesar de que se observó una disminución del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal por efecto de la Tg, la asociación RE-mitocondrias disminuyó con respecto al control, opuesto a lo esperado. Estos resultados pueden ser debido a un aumento localizado de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma como resultado de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, en donde este  $\text{Ca}^{2+}$  sería sentido por las mitocondrias y con ello “buscasen” separarse de la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que normalmente es el RE. Otra explicación de estos datos es que debido a la disminución del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, el mecanismo de SOCE pudiese estar activado y de esta manera el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  afectar de manera negativa la colocalización entre el RE y las mitocondrias debido al aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

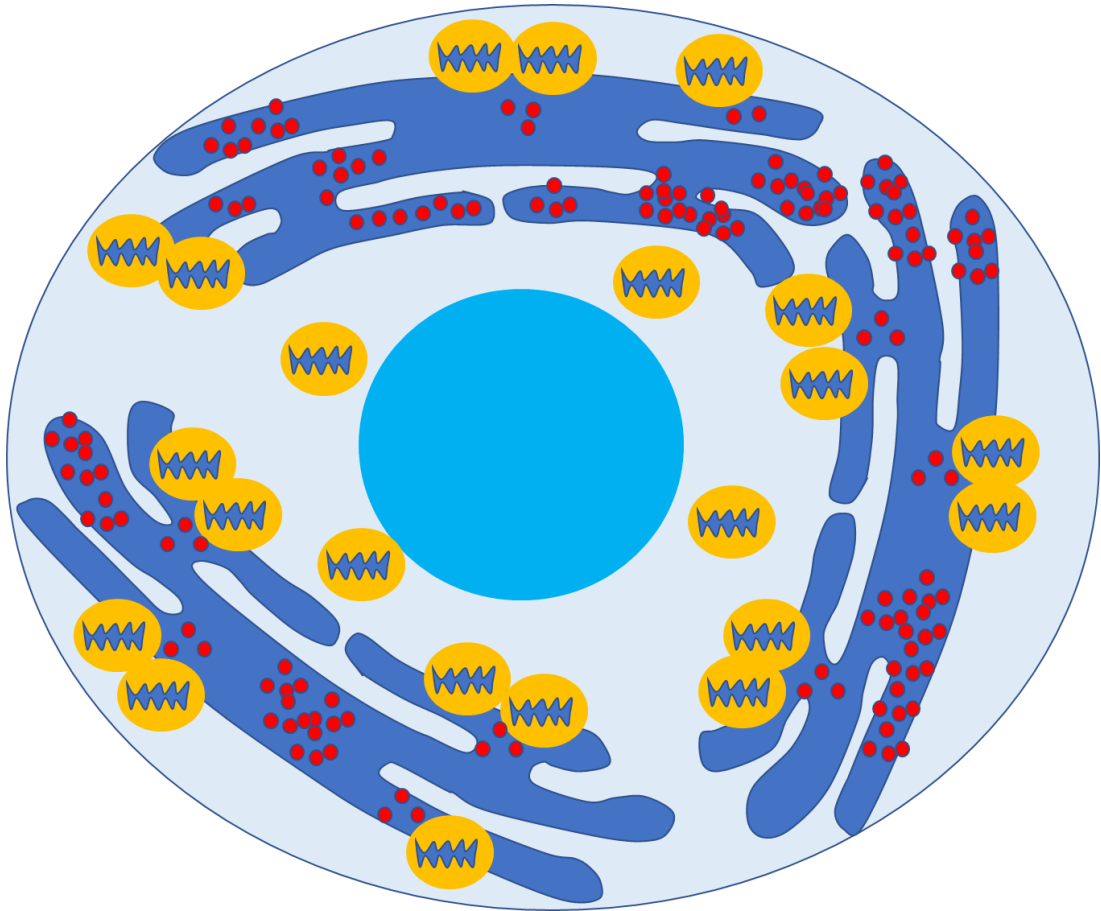
Por otro lado, datos de nuestro laboratorio demostraron que al utilizar bafilomicina A1 se produjo un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal (**Gallegos Gómez, datos no publicados**), por lo tanto, partiendo de esta primicia, utilizamos esta herramienta para incrementar las zonas de alto  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. En efecto, la asociación de las mitocondrias con el RE disminuyó de 77% a un 60% al utilizar bafilomicina A1, corroborando que las mitocondrias se segregan de las zonas de alto  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo.

Aunque estos datos abren una nueva visión acerca del papel que desempeña el  $\text{Ca}^{2+}$  en la asociación RE-mitocondria, está claro que no podemos soslayar las evidencias experimentales que demuestran la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  para aumentar la actividad de algunas deshidrogenasas del CK (**Jouaville et al., 1999**), lo que sugiere la importancia de que las mitocondrias deben permanecer en cercanía al RE y así poder “percibir” los niveles tan bajos de  $\text{Ca}^{2+}$  que se manejan en el citoplasma. Sin embargo, los datos mostrados en el presente trabajo sugieren, por el contrario, que las mitocondrias se excluyen de las zonas donde la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE es alta, y por ende, donde la liberación de éste es mayor. Si bien, nuestros datos contradicen lo ya aceptado históricamente, evidencias de años recientes han demostrado que el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria no es un proceso esencial (**Pan et al., 2013**), y por el contrario, cuando se sobrecarga la mitocondria de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto condujo a alteraciones del desarrollo (**Liu et al., 2016**), es decir, existe una fina regulación para que las mitocondrias eviten el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la MM, o bien, que éste sea removido inmediatamente (**Suzuki et al., 2014**) pues de no hacerlo, la mortalidad en un modelo murino aumentó debido a la insuficiencia cardíaca (**Luongo et al., 2017**). Si bien, el  $\text{Ca}^{2+}$  regula de manera positiva el metabolismo bioenergético, nuestros datos en conjunto con las evidencias antes mencionadas, sugieren un modelo en el que el  $\text{Ca}^{2+}$  no necesariamente debe ingresar a la MM para regular la respiración mitocondrial pues existen datos en los que al bloquear el MCU la producción de equivalentes reductores se vio aumentada, esto gracias a la actividad de ciertos acarreadores presentes en la MIM (**Pardo et al., 2006**) ya que son regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  (**del Arco et al., 2016**). A pesar de que se ha sugerido la formación de microdominios de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la proximidad RE-mitocondria (**Giacomello et al., 2010**), el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por el  $\text{RIP}_3$  no es capaz de activar al MCU (se encuentra por debajo del umbral) pero si es capaz de activar a los acarreadores glutamato-aspartato y con ello activar la actividad de la lanzadra malato-aspartato (**Palmieri, 2001; Pardo et al., 2006**). Esto en

conjunto refuerza la idea de que la regulación del metabolismo bioenergético posiblemente se realice por el  $\text{Ca}^{2+}$  externo a la mitocondria y en la cara citoplásmica de la MIM.

Está claro que nuestro trabajo genera muchas preguntas que no se pueden explicar fácilmente con la información que contamos. Sin embargo, esto nos abre la puerta a nuevos cuestionamientos acerca de las moléculas presentes en el acople RE-mitocondria y su participación no solo en esta asociación, sino también en la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ambos organelos, pues trabajos en los cuales estudiaron el papel de MFN2, una proteína involucrada en la fusión mitocondrial (**Santel & Fuller, 2001**), encontraron datos totalmente opuestos. Por una parte, la supresión de MFN2 provocó una disminución en la interacción RE-mitocondria, reduciendo con esto la eficiencia en la captura de  $\text{mCa}^{2+}$  (**de Brito & Scorrano, 2008; Naon et al., 2016**). Por otra parte, el acople entre estos dos organelos se incrementó (**Cosson et al., 2012**) e incluso la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a la mitocondria se vio favorecida (**Filadi et al., 2015**).

La discrepancia entre estos estudios, en conjunto con nuestros datos generan más preguntas de las que podemos responder hasta el momento. Sin embargo, es obvio que la asociación del RE con la mitocondria, así como la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre estos dos organelos involucran una situación más compleja de la que habíamos visualizado hasta la fecha y debido a ello, la necesidad de explorar aún más este tema está latente. Por el momento nuestros datos nos indican que las mitocondrias se encuentran asociadas en su mayoría al RE pero que este acople se lleva a cabo en las zonas donde las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son bajas, puesto que aparentemente el lumen del RE cuenta con concentraciones heterogéneas de este catión (**Figura 9.1**).



**Figura 9.1. Modelo de trabajo propuesto en el que se representa la interacción de las mitocondrias con el RE.** El esquema sugiere una heterogeneidad del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal (puntos en rojo) debido a la presencia de zonas de alto y bajo  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo estas últimas en las cuales se mantiene la asociación con las mitocondrias.

## 10. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo nos permiten concluir lo siguiente:

- La caracterización del proceso de adquisición de imágenes, en conjunto con el proceso de deconvolución, nos permitió tener un aumento en la resolución de las imágenes obtenidas cercano al 25%.
- Encontramos que no todo el RE tiene señal de MagFluo-4, sugiriendo la existencia de zonas de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del lumen de este organelo. Esto se pudo corroborar al utilizar indicadores proteicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que con ellos se obtuvo un patrón similar al de MagFluo-4, en cuanto a la sensibilidad a Tg, de la señal reportada en el RE.
- Hay una fracción sustancial tanto del MagFluo-4 como de los indicadores proteicos de  $\text{Ca}^{2+}$  que no coinciden con el marcador del RE (ER-tracker). Esto sugiere que el RE es mucho más grande que lo indicado por el ER-tracker o que hay otro depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma reticular que no requiere la bomba SERCA para su relleno con  $\text{Ca}^{2+}$ .
- La gran mayoría de las mitocondrias están asociadas al RE (ER-tracker e indicador de bajo  $\text{Ca}^{2+}$ ). Esta asociación es muy pequeña cuando se utilizan indicadores de alto  $\text{Ca}^{2+}$  como marcadores del RE. Esto sugiere que las mitocondrias se asocian de forma preferencial con aquellas zonas de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  del RE.
- La bafilomicina A1 generó una disminución en la asociación de las mitocondrias con el RE debido a un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, corroborando el papel negativo del  $\text{Ca}^{2+}$  en este fenómeno. Por su parte, la Tg generó de igual manera una disminución en el grado de colocación entre estos organelos, contrario a lo que se esperaba, sugiriendo un efecto indirecto sobre las mitocondrias debido a un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico. Estos datos corroboran la idea de que las mitocondrias prefieren regiones de bajo  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE.

## 11. PERSPECTIVAS

El presente trabajo, mostró un panorama muy interesante de la interacción mitocondria-RE, sin embargo, abrió también muchos interrogantes. Por lo mismo, es necesario reforzar estos datos con diversos experimentos que proponemos a continuación.

- Con la finalidad de definir de forma completa la distribución de estos dos organelos, vamos a transfectar indicadores proteicos dirigidos específicamente al RE (mCherry-Sec61-beta) y a las mitocondrias (mito BFP) y compararlos con el ER-tracker y TMRE, respectivamente.
- Estudiar el efecto de Tg en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo para determinar si la disminución de los niveles de colocalización entre mitocondrias y retículo endoplásmico se debe a SOCE o bien, a un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  local en el citoplasma al vaciar el retículo endoplásmico.
- Utilizar un indicador proteico de  $\text{Ca}^{2+}$  (erGAP1) que tiene una alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  (12  $\mu\text{M}$ ) para determinar si hay una mejor colocalización con el ER-tracker. Sugiriendo la presencia de zonas de bajo y alto  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE.
- Realizar la misma serie de experimentos ahora utilizando una línea celular no inmortalizada (hepatocitos) para definir si estos datos son exclusivos de células inmortales como las células HeLa.
- Estudiar la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria y determinar las condiciones mediante las cuales el  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la respiración mitocondrial (utilizar BAPTA-AM para quelar  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y el siRNA en contra del MCU).
- Determinar el papel que desempeña MFN2 en los niveles de colocalización entre el RE y las mitocondrias, así como evaluar el efecto de esta proteína al utilizar indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Allan, V. (1995). Protein phosphatase 1 regulates the cytoplasmic dynein-driven formation of endoplasmic reticulum networks in vitro. *Journal of Cell Biology*, 128 (5), 879–891.
2. Anderson, D. M., Anderson, K. M., Chang, C. L., Makarewich, C. A., Nelson, B. R., McAnally, J. R. & Olson, E. N. (2015). A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*, 160, 595–606.
3. Berridge, M. J. (2016). The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 96(4), 1261–1296.
4. Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). THE VERSATILITY AND SIGNALLING UNIVERSATILITY OF CALCIUM SIGNALLING. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 11–21.
5. Block, B. A. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 107(6), 2587–2600.
6. Bolte, S., & Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), 213–232.
7. Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A. E., Torrealba, N., Paredes, F. & Lavandero, S. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. Dynamics and Metabolic Integration. *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 301).
8. Burke, M. A., Mutharasan, R. K., & Ardehali, H. (2008). The Sulfonylurea Receptor , an Atypical ATP-Binding Cassette Protein , and Its Regulation of the K ATP Channel. *Circulation Research*, 102, 164–176.
9. Carafoli, E. (2003). The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(4), 326–332.
10. Cárdenas, C., Miller, R. A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M. & Foskett, J. K. (2010). Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP3 Receptor Ca<sup>2+</sup> Transfer to Mitochondria. *Cell*, 142(2), 270–283.
11. Cárdenas, C., Müller, M., McNeal, A., Lovy, A., Jaña, F., Bustos, G. & Foskett, J. K.



- (2016). Selective Vulnerability of Cancer Cells by Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  Transfer from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. *Cell Reports*, 14(10), 2313–2324.
12. Cho, D.H., Nakamura, T., & Lipton, S. A. (2010). Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(20), 3435–3447.
  13. Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), 15927–15932.
  14. Cole, R. W., Jinadasa, T., & Brown, C. M. (2011). Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control. *Nature Protocols*, 6(12), 1929–1941.
  15. Cosson, P., Marchetti, A., Ravazzola, M., & Orci, L. (2012). Mitofusin-2 Independent Juxtaposition of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria: An Ultrastructural Study. *PLoS ONE*, 7(9), 1–5.
  16. Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., & Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 174(7), 915–921.
  17. Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T. G., & Hajnóczky, G. (2010). Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular Cell*, 39(1), 121–132.
  18. Dagnino-Acosta, A., & Guerrero-Hernández, A. (2009). Variable luminal sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  buffer capacity in smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 46, 188–196.
  19. Dayel, M. J., Hom, E. F. Y., & Verkman, A. S. (1999). Diffusion of Green Fluorescent Protein in the Aqueous-Phase Lumen of Endoplasmic Reticulum. *Biophysical Journal*, 76(5), 2843–2851.
  20. de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222), 605–610.
  21. De Stefani, D., Bononi, A., Romagnoli, A., Messina, A., De Pinto, V., Pinton, P., & Rizzuto, R. (2012). VDAC1 selectively transfers apoptotic  $\text{Ca}^{2+}$  signals to

- mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 19(2), 267–273.
22. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 336–340.
  23. del Arco, A., Contreras, L., Pardo, B., & Satrustegui, J. (2016). Calcium regulation of mitochondrial carriers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2413–2421.
  24. Dode, L., Greef, C. De, Mountian, I., Attard, M., Town, M. M., Casteels, R., & Wuytack, F. (1998). Structure of the Human Sarco / Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 Gene, 273(22), 13982–13994.
  25. Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 46202, 723–742.
  26. English, A. R., & Voeltz, G. K. (2013). Interconnections with Other Organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1–16.
  27. English, A. R., Zurek, N., & Voeltz, G. K. (2009). Peripheral ER structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 596–602.
  28. Ernster, L., & Schatz, G. (1981). Mitochondria : A Historical Review. *The Journal of Cell Biology*, 91, 227–255.
  29. Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am.J.Physiol*, 245, C1-14.
  30. Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., & Pizzo, P. (2015). Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), E2174–E2181.
  31. Filadi, R., Zampese, E., Pozzan, T., Pizzo, P., & Fasolato, C. (2012). *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease*.
  32. Finch, E. A., Turner, T. J., & Goldin, S. M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-triphosphate-induced calcium release. *Science*, 252, 443–446.
  33. Fossati, M., Borgese, N., Colombo, S. F., & Francolini, M. (2014). Visualization of endoplasmic reticulum subdomains in cultured cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (84), e50985.

34. Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., & Voeltz, G. K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science*, *334*(6054), 358–362.
35. Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, *505*(7483), 335–343.
36. Friedman, J. R., Webster, B. M., Mastrorarde, D. N., Verhey, K. J., & Voeltz, G. K. (2010). ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *Journal of Cell Biology*, *190*(3), 363–375.
37. Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. U., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup> indicator dyes. *Cell Calcium*, *27*(2), 97–106.
38. Giacomello, M., Drago, I., Bortolozzi, M., Scorzeto, M., Gianelle, A., Pizzo, P., & Pozzan, T. (2010). Ca<sup>2+</sup> Hot Spots on the Mitochondrial Surface Are Generated by Ca<sup>2+</sup> Mobilization from Stores, but Not by Activation of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Molecular Cell*, *38*(2), 280–290.
39. Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., & Pozzan, T. (2007). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of cell life and death. *Cell Death and Differentiation*, *14*(7), 1267–1274.
40. Gómez-Viquez, L., Guerrero-Serna, G., García, U., & Guerrero-Hernández, A. (2003). SERCA Pump Optimizes Ca<sup>2+</sup> Release by a Mechanism Independent of Store Filling in Smooth Muscle Cells. *Biophysical Journal*, *85*(July), 370–380.
41. Guerrero-Hernández, A., Ávila, G., & Rueda, A. (2014). Ryanodine receptors as leak channels. *European Journal of Pharmacology*, *739*, 26–38.
42. Guerrero-Hernandez, A., Dagnino-Acosta, A., & Verkhratsky, A. (2010). An intelligent sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: Release and leak channels have differential access to a concealed Ca<sup>2+</sup> pool. *Cell Calcium*, *48*(2–3), 143–149.
43. Healy, S. J. M., Verfaillie, T., Jäger, R., Agostinis, P., & Samali, A. (2012). *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease*.
44. Iino, M. (1990). Biphasic Ca<sup>2+</sup> dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *The Journal of General Physiology*, *95*(6), 1103–22.
45. Ingerman, E., Perkins, E. M., Marino, M., Mears, J. A., McCaffery, J. M., Hinshaw,

- J. E., & Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *Journal of Cell Biology*, *170*(7), 1021–1027.
46. Inui, M., Saito, A., & Fleischer, S. (1987). Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(4), 1740–1747.
47. Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A., & Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(24), 13807–12.
48. Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S., & Walter, P. (2009). An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. *Science*, *325*(5939), 477–481.
49. Kornmann, B., Osman, C., & Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(34), 14151–14156.
50. Lam, A. K. M., & Galione, A. (2013). The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(11), 2542–2559.
51. Lane, J. D., & Allan, V. J. (1999). Microtubule-based endoplasmic reticulum motility in *Xenopus laevis*: activation of membrane-associated kinesin during development. *Molecular Biology of the Cell*, *10*, 1909–1922.
52. Lesh, R. E., Nixon, F. G. F., Fleischer, F. S., Airey, J. A., Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1998). Localization of Ryanodine Receptors in Smooth Muscle. *Circulation Research*, *82*, 175–185.
53. Liu, J. C., Liu, J., Holmstrom, K. M., Menazza, S., Parks, R. J., Fergusson, M. M., & Finkel, T. (2016). MICU1 Serves as a Molecular Gatekeeper to Prevent In Vivo Mitochondrial Calcium Overload. *Cell Reports*, *16*(6), 1561–1573.
54. Luongo, T. S., Lambert, J. P., Gross, P., Nwokedi, M., Lombardi, A. A., Shanmughapriya, S., & Elrod, J. W. (2017). The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability. *Nature*, *545*(7652), 93–97.
55. MacLennan, D. H., & Kranias, E. G. (2003). Calcium: Phospholamban: a crucial

- regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 566–577.
56. MacLennan, D. H., Rice, W. J., & Green, N. M. (1997). The Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by Sarco ( Endo ) plasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28815–28818.
57. Mak, D. O. D., & Foskett, J. K. (2015). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium*, 58(1), 67–78.
58. Mammucari, C., Raffaello, A., Vecellio Reane, D., & Rizzuto, R. (2016). Molecular structure and pathophysiological roles of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2457–2464.
59. Marks, A. R., Tempst, P., Hwang, K. S., Taubman, M. B., Inui, M., Chadwick, C., & Nadal-Ginard, B. (1989). Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22), 8683–8687.
60. Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J. B., Smedt, H. De, & Missiaen, L. (2011). Endoplasmic-Reticulum Calcium Depletion and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1–10.
61. Michalak, M., Parker, J. M. R., & Opas, M. (2002).  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 32(5–6), 269–278.
62. Michelangeli, F., & East, J. M. (2011). A diversity of SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  pump inhibitors. *Biochemical Society Transactions*, 39(3), 789–797.
63. Montero, M., Alvarez, J., Scheenen, W. J., Rizzuto, R., Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1997).  $\text{Ca}^{2+}$  Homeostasis in the Endoplasmic Reticulum: Coexistence of High and Low  $\text{Ca}^{2+}$  subcompartments in Intact HeLa Cells. *The Journal of Cell Biology*, 139(3), 601–611.
64. Montisano, D., Cascarano, J., Pickett, C., & James, T. (1982). Association Between Mitochondria and Rough Endoplasmic Reticulum in Rat Liver. *The Anatomical Record*, 203, 441–450.
65. Nakai, J., Imagawa, T., Hakamata, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H., & Numa, S. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac

- ryanodine receptor/calcium release channel. *Febs Letter*, 271(1), 169–177.
66. Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., & Scorrano, L. (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum–mitochondria tether. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11249–11254.
67. Navas-Navarro, P., Rojo-Ruiz, J., Rodriguez-Prados, M., Ganfornina, M. D., Looger, L. L., Alonso, M. T., & García-Sancho, J. (2016). GFP-Aequorin Protein Sensor for Ex Vivo and in Vivo Imaging of Ca<sup>2+</sup> Dynamics in High Ca<sup>2+</sup> Organelles. *Cell Chemical Biology*, 23(6), 738–745.
68. Nelson, B. R., Makarewich, C. A., Anderson, D. M., Winders, B. R., Troupes, C. D., Wu, F., & Cannon, S. C. (2016). A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle Benjamin. *Science*, 351(6270), 271–275.
69. Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., Zorzato, F., Green, N. M., & MacLennan, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(23), 13472–13483.
70. Palmieri, F. (2001). Citrin and aralar1 are Ca<sup>2+</sup> stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO Journal*, 20(18), 5060–5069.
71. Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., Teng, Y., & Finkel, T. (2013). The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Cell Biology*, 15(12), 1464–1472.
72. Papp, S., Dziak, E., Michalak, M., & Opas, M. (2003). Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling proteins. *Journal of Cell Biology*, 160(4), 475–479.
73. Pardo, B., Contreras, L., Serrano, A., Ramos, M., Kobayashi, K., Iijima, M., & Satrustegui, J. (2006). Essential role of aralar in the transduction of small Ca<sup>2+</sup> signals to neuronal mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 1039–1047.
74. Park, M. K., Petersen, O. H., & Tepikin, A. V. (2000). The endoplasmic reticulum as one continuous Ca<sup>2+</sup> pool: visualization of rapid Ca<sup>2+</sup> movements and equilibration. *The EMBO Journal*, 19(21), 5729–5739.

75. Periasamy, M., & Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*, 35(4), 430–442.
76. Pezzati, R., Bossi, M., Podini, P., Meldolesi, J., & Grohovaz, F. (1997). High-resolution calcium mapping of the endoplasmic reticulum-Golgi-exocytic membrane system. Electron energy loss imaging analysis of quick frozen-freeze dried PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 8(8), 1501–1512.
77. Phillips, M. J., & Voeltz, G. K. (2015). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(2), 69–82.
78. Pozzo-Miller, L. D., Pivovarova, N. B., Connor, J. A., Reese, T. S., & Andrews, S. B. (1999). Correlated measurements of free and total intracellular calcium concentration in central nervous system neurons. *Microscopy Research and Technique*, 46(6), 370–379.
79. Rizzuto, R. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Responses. *Science*, 280(5370), 1763–1766.
80. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 566–578.
81. Rodriguez-Garcia, A., Rojo-Ruiz, J., Navas-Navarro, P., Aulestia, F. J., Gallego-Sandín, S., Garcia-Sancho, J., & Alonso, M. T. (2014). GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca<sup>2+</sup> in organelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2584–2589.
82. Rowland, A. A., & Voeltz, G. K. (2012). Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 607–615.
83. Sánchez, V. V. (2015). Estudio de los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> en células HeLa mediante microscopía confocal. Tesis de Licenciatura. ENCB. IPN.
84. Santel, A., & Fuller, M. T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science*, 114(5), 867–874.
85. Scaduto, R. C., & Grotyohann, L. W. (1999). Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophysical Journal*,

- 76(1), 469–477.
86. Shibata, Y., Voss, C., Rist, J. M., Hu, J., Rapoport, T. A., Prinz, W. A., & Voeltz, G. K. (2008). The reticulon and Dp1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18892–18904.
  87. Shim, S.-H., Xia, C., Zhong, G., Babcock, H. P., Vaughan, J. C., Huang, B., & Zhuang, X. (2012). Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 13978–13983.
  88. Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., & Arbel, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(3), 227–285.
  89. Sibarita, J. (2005). Deconvolution Microscopy. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 95, 201–243.
  90. Simon, S. M., Peskin, C. S., & Oster, G. F. (1992). What drives the translocation of proteins? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(9), 3770–3774.
  91. Simpson, P. B., Mehotra, S., Lange, G. D., & Russell, J. T. (1997). High Density Distribution of Endoplasmic Reticulum Proteins and Mitochondria at Specialized Ca<sup>2+</sup> Release Sites in Oligodendrocyte Processes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 22654–22661.
  92. Subramanian, K., & Meyer, T. (1997). Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell*, 89(6), 963–71.
  93. Suzuki, J., Kanemaru, K., Ishii, K., Ohkura, M., Okubo, Y., & Iino, M. (2014). Imaging intraorganellar Ca<sup>2+</sup> at subcellular resolution using CEPIA. *Nature Communications*, 5, 1–13.
  94. Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., & Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Cell Biology*, 175(6), 901–911.
  95. Tan, W., & Colombini, M. (2007). VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1768, 2510–2515.
  96. Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human



- disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 389–402.
97. Toyoshima, C., & Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418(6898), 605–611.
98. Vais, H., Foskett, J. K., & Mak, D. D. (2010). Unitary  $\text{Ca}^{2+}$  current through recombinant type 3 InsP(3) receptor channels under physiological ionic conditions. *The Journal of General Physiology*, 136(6), 687–700.
99. van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–124.
100. Vance, E. (1990). Phospholipid Mitochondria Synthesis in a Membrane Fraction Associated identified. *Journal of Biological Chemistry*, 265(13), 7248–7256.
101. Verkhatsky, A., & Toescu, E. C. (2003). Endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and neuronal death. *J Cell Mol Med*, 7(4), 351–361.
102. Voeltz, G. K., Rolls, M. M., & Rapoport, T. A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports*, 3(10), 944–950.
103. Wang, H. J., Guay, G., Pogan, L., Sauvé, R., & Nabia, I. R. (2000). Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 150(6), 1489–1497.
104. Warszta, D., Nebel, M., Fliegert, R., & Guse, A. H. (2014). NAD derived second messengers : Role in spontaneous diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients in murine cardiac myocytes. *DNA Repair*, 23, 69–78.
105. Wendykier, P. (2009). Parallel Iterative Deconvolution User Guide, 1–11.
106. Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyamas, Y., Futai, M., & Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1 , a Specific Inhibitor of Vacuolar-type  $\text{H}^{+}$  -ATPase , Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17707–17712.
107. Zalk, R., Clarke, O. B., des Georges, A., Grassucci, R. A., Reiken, S., Mancina, F., & Marks, A. R. (2014). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature*, 517(7532), 44–49.
108. Zhou, M., He, H., Suzuki, R., Liu, K., Tanaka, O., Sekiguchi, M., & Abe, H.

(2007). Localization of Sulfonylurea Receptor Subunits , SUR2A and SUR2B , in Rat Heart The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(8), 795–804.